

Analyse der Expression von Chemokinrezeptoren auf T-Lymphozyten im
peripheren Blut von Patienten mit verschiedenen Manifestationen des
kutanen Lupus erythematodes

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vorgelegt von

Stephanie Henze

aus Köln

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutacher: Prof. Dr. med. Thomas Tüting
2. Gutacher: Prof. Dr. Christian Kurts

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.09.2007

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès sci. Thomas Bieber

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

Birgit, Reinhard und Andreas

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung.....	9
1.1. Klinik des kutanen und des systemischen Lupus erythematodes.....	10
1.1.1. Kutaner Lupus erythematodes (CLE)	10
1.1.2. Systemischer Lupus erythematodes (SLE).....	15
1.2. Bedeutung von Chemokinen und Rezeptoren	16
1.2.1. CLA als wichtiges Adhäsionsmolekül für die T-Zell-Migration	21
1.2.2. CCR4 als wichtiger Chemokinrezeptor für das T-Zell-Homing	23
1.2.3. CXCR3 als wichtiger inflammatorischer Chemokinrezeptor	25
2. Fragestellung.....	27
3. Material und Methoden	28
3.1. LE-Patienten und Kontrollgruppen.....	28
3.2. Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC).....	31
3.3. Durchflußzytometrie.....	33
3.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	37
3.5. Statistik:	38
4. Ergebnisse.....	39
4.1. Erhöhte Anzahl zirkulierender CLA+ T-Lymphozyten	39
4.2. Erhöhte Anzahl zirkulierender CCR4+ T-Lymphozyten	42
4.3. Erhöhter Serumspiegel des CCR4 Liganden TARC/CCL17	47
4.4. Erhöhte Anzahl zirkulierender CLA+ und CCR4+ T-Lymphozyten	48
4.5. Verminderte Anzahl zirkulierender CXCR3+ T-Lymphozyten	50
5. Diskussion	53
5.1. Zirkulierende CLA+ T-Lymphozyten bei CLE- Patienten	54

5.2.	Zirkulierende CCR4+ T-Lymphozyten bei dCDLE Patienten	55
5.3.	Zirkulierende CD8+ CLA+ CCR4+ T-Lymphozyten bei CLE Patienten	57
5.4.	Bedeutung inflammatorischer Chemokinrezeptoren	58
6.	Zusammenfassung	61
7.	Publikationsliste	63
8.	Quellen	64
9.	Lebenslauf	71

Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
CD	Cluster of differentiation
CLA	Cutaneous lymphocyte antigen
CLE	Kutaner Lupus erythematoses
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CDLE	Chronisch diskoider Lupus erythematoses
dCDLE	Disseminierter chronisch diskoider LE
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	Fetal calve serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked Immunosorbend Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITS	Fluorescencein Isothiocyanat
FL	Fluoreszenzlicht
FSC	Forward scatter
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP-10	Interferon induces protein / Ligand von CXCR3
ITAC	Interferon inducible T cell α chemoattractant / Ligand von CXCR3
kd	Kilodalton
LE	Lupus erythematoses
mABS	Mononukleäre Antikörper
MDC	Macrophage derives chemokine / Ligand von CCR4
Mig	Monokin induziert durch γ -Interferon / Ligand von CXCR3
mRNA	Messenger RNA

pDC	Plasmazytoide dendritische Zellen
PB	Patientenblut
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered Saline
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
SCLE	Subakut kutaner Lupus erythematodes
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SSC	Side scatter
TARC	Thymus and Activation Regulated Chemokine
TCR	T cell receptor
TH	T Helferzelle
TNF- α	Tunornekrosefaktor alpha

1. Einleitung

Unter dem Oberbegriff Lupus erythematoses (LE) werden verschiedene Krankheitsbilder zusammengefasst, die in ihren Symptomen sehr unterschiedlich ausgeprägt sind und doch Gemeinsamkeiten aufweisen. Bei allen Formen handelt es sich um chronisch entzündliche Autoimmunkrankheiten, deren genaue Ursache noch nicht geklärt werden konnte. Der LE kann sich prinzipiell in jedem Organsystem manifestieren. Hierbei werden die kutanen LE-Formen (CLE) von dem systemischen LE (SLE) unterschieden. Ein Übergang von einer rein kutanen in eine systemische Manifestation ist möglich, ebenso eine Hautbeteiligung beim SLE. Auch kommen kombinierte Verläufe mit Overlap-Syndromen zu den Kollagenosen vor (Abbildung 1).

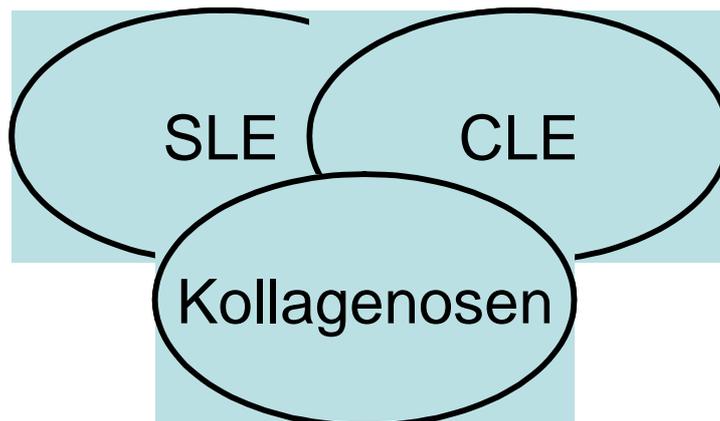


Abbildung 1: Das Schaubild zeigt die Beziehung zwischen dem systemischen Lupus erythematoses (SLE), dem kutanen Lupus erythematoses (CLE) und den Kollagenosen.

1.1. Klinik des kutanen und des systemischen Lupus erythematoses

1.1.1. Kutaner Lupus erythematoses (CLE)

Der CLE umfasst verschiedene Subtypen mit variablem Verlauf und einer großen Vielfalt von klinischen Manifestationen. Die Klassifikation von 2004 umfasst folgende Krankheitsbilder des CLE: den akuten CLE (ACLE), den subakuten CLE (SCLE), den chronischen CLE (CCLE), und intermittierenden CLE (ICLE).

Bislang sind nur vereinzelt Mechanismen des CLE beschrieben worden, die Ätiologie und Pathogenese sind noch weitgehend ungeklärt. Es gibt zahlreiche Faktoren, die den Verlauf des CLE beeinflussen können. So können z.B. UV-Strahlen das Krankheitsbild auslösen und verschlechtern (Kuhn et al., 2001). Auch irritative Stimuli können zu Hautveränderungen des CLE führen. Es ist bekannt, dass einige Medikamente SLE ähnliche Erkrankungen auslösen können. Einige dieser Medikamente, z.B. Hydrochlorothiazid, ACE-Hemmer und Terbinafin, können auch den CLE induzieren. Meist kommt es dabei zu der Auslösung eines SCLE (Bonsmann et al., 2001). Aufgrund fehlender epidemiologischer Studien ist die Inzidenz des CLE nicht zu ermitteln. Internationale Untersuchungen ergaben für den SLE eine Inzidenz von 2-7,6/100000 Personen/Jahr. Man schätzt heute, dass die verschiedenen Subtypen des CLE zwei bis dreimal häufiger vorkommen. Eine Prädisposition, einen CLE zu entwickeln, zeigt sich bevorzugt bei Frauen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, wobei sich die verschiedenen Subtypen des CLE in jedem Alter manifestieren können (Parodi et al., 2000).

1.1.1.1. Akuter kutaner Lupus erythematoses (ACLE)

Der ACLE ist entweder durch das klassische Schmetterlingserythem oder durch eine generalisierte Form mit disseminierten Hautveränderungen charakterisiert. Eine solche Hautmanifestation findet sich auch bei 20 – 60 % der Patienten mit einem SLE. Der ACLE zeigt meist einen akuten Krankheitsverlauf auf und ist häufig mit einer

systemischen Organmanifestation assoziiert, weshalb der ACLE häufig nicht als eigenständiges Krankheitsbild abgegrenzt wird. Die Erkrankung wird von American College of Rheumatology (ACR) als Kriterium zur Diagnose des SLE herangezogen (Hochberg 1997).

Es kann eine lokalisierte und eine generalisierte Form unterschieden werden. Die häufigere Variante ist die lokalisierte Form, für die das Schmetterlingserythem charakteristisch ist, das sich symmetrisch an den Wangen und am Nasenrücken manifestiert. Bei der generalisierten Form können symmetrisch am gesamten Integument, sowie an Händen und Füßen multiple tiefrote bis livide Maculae und Papeln auftreten (Bacman et al., 2004). Im Bereich der oralen und nasalen Schleimhaut können sich Hauterosionen und Ulzerationen entwickeln, die zum Teil sehr schmerzhaft sind. Die Abheilung der Hautveränderungen des ACLE erfolgt narbenlos, häufig kommt es jedoch vorübergehend zu postinflammatorischen Hyperpigmentierungen.

Beide Formen des ACLE manifestieren sich häufig nach Sonnenexposition. Eine erhöhte Krankheitsaktivität bzw. die Exazerbation einer systemischen Organmanifestation ist häufig bei der generalisierten Form zu beobachten (Fabbri et al., 2003)

1.1.1.2. Subakut kutaner Lupus erythematoses (SCLE)

Der SCLE ist eine Subgruppe des CLE, die durch erythematöse, schuppige Plaques mit zentraler Abblassung gekennzeichnet ist. Eine weitere Manifestationsform zeigt papulosquamöse konfluierende Plaques mit einer psoriasiformen Schuppung. Die Hautveränderungen treten hauptsächlich im Bereich der oberen Körperhälfte auf, das Gesicht kann ausgespart sein (Abbildung 2). Es kommt zu einer narbenfreien Abheilung der Hautveränderungen, jedoch können großflächig konfluierende, hypopigmentierte Areale entstehen und persistieren (Fabbri et al., 2003).

Aufgrund des häufigen Auftretens verschiedener systemischer Begleitsymptome, oft in Form von Arthritiden, steht der SCLE zwischen der kutanen und der systemischen Variante. Bei der überwiegenden Anzahl der Patienten verläuft die Erkrankung schubweise rezidivierend, die Prognose ist jedoch insgesamt gut. Neben den Arthritiden

stehen als extrakutane Symptome häufig Nephropathien im Vordergrund. Weniger häufig treten auch Fieber, allgemeines Krankheitsgefühl, Myalgien und das Raynaud-Phänomen auf. Bei etwa der Hälfte der Patienten sind mehr als vier Kriterien des „American College of Rheumatism“ feststellbar, jedoch kommt es nur selten zu einer ZNS-Beteiligung (Sontheimer 1989). Der SCLE ist durch eine ausgeprägte Photosensitivität gekennzeichnet, die Hauterscheinungen sind meist deutlich UV-Licht provozierbar (UV-B, UV-B/UV-A, selten auch UV-A allein). Antinukleäre Antikörper sind bei bis zu 90% der Patienten mit SCLE positiv. Die Blut-Senkungs-Geschwindigkeit (BSG), das C-reaktive Protein (CRP) und weitere Entzündungsparameter sind im aktiven Krankheitsstadium fast immer erhöht (Sontheimer 2005).

Der SCLE macht etwa 10% aller LE-Fälle aus. Er tritt bevorzugt bei der weißen Bevölkerung auf. Pathogenetisch spielen wahrscheinlich SSA/Ro- und SSB/La-Antigene eine entscheidende Rolle. Sie werden unter dem Einfluss von UV-Licht auf der Oberfläche von Keratinozyten exprimiert, so dass die entsprechenden Autoantikörper damit reagieren und eine Entzündungsreaktion mit Gewebsschädigung einleiten können (Furukawa et al., 1990).



Abbildung 2: Nicht vernarbende erythematöse Makulae und schuppende Plaques beim subakut kutanen Lupus erythematoses im Bereich des Dekollete, Hals und der Oberarme (Fotoarchiv, 2006).

1.1.1.3. Chronisch kutaner Lupus Erythematoses (CCLE)

Den chronisch kutanen Lupus erythematoses kann man in folgende Formen unterteilen: Chronisch diskoiden Lupus erythematoses (CDLE), Lupus erythematoses profundus (LEP) und Chilblain Lupus erythematoses (CHLE). Wir haben uns in dieser Arbeit mit dem CDLE beschäftigen.

Chronisch Diskoider Lupus erythematoses (CDLE)

Der chronisch diskoider Lupus erythematoses ist durch scharf begrenzte, scheibenförmige, erythematosquamöse Plaques gekennzeichnet. Er ist die häufigste Manifestationsform des CCLE und stellt mit etwa 75% aller Fälle auch die häufigste kutane LE-Form dar (Yell et al., 1996).

Prädilektionsstellen des CDLE sind das Gesicht und das Capillitium, wobei insbesondere Wangen, Stirn, Nase und Lippen befallen sind. Seltener erstreckt sich das Krankheitsbild auch auf den Stamm und die Streckseiten der Extremitäten (Abbildungen 3 und 4). In diesem Fall wird von einer disseminierten Form gesprochen. Zu Beginn der Erkrankung zeigen sich kleine, etwa linsengroße, scharf begrenzte Erytheme, die im Verlauf konfluieren und zum Teil ein deutlich tastbares Infiltrat aufweisen (Tebbe 2004). Durch peripheres Wachstum werden die Hautveränderungen zu den charakteristischen scheibenförmigen (=diskoiden) Plaques. Im Zentrum der Läsion entwickeln sich häufig fest haftende, folliculäre, weiße Keratosen mit einer Hyperästhesie. Ein wesentliches Merkmal des CDLE ist die Abheilung der Plaques mit Atrophie und zentraler Narbenbildung. Durch eine irreversible Zerstörung der Haarfollikel kann es bei Befall des Capillitiums, der Augenbraue oder des Bartbereiches zu einer vernarbenden Alopezie kommen. Im Zentrum der Herde bleibt häufig ein depigmentierter Bereich zurück.

Die einzige klinische Manifestation des CDLE kann in Form einer Beteiligung der Mundbodenschleimhaut auftreten. Insbesondere im Bereich der Wangenschleimhaut können sich schmerzhafte Erosionen und Ulzerationen entwickeln. Der CDLE bleibt fast immer auf die Haut beschränkt. Es zeigt sich keine Bevorzugung bestimmter ethnischer Gruppen, eine genetische Prädisposition wird jedoch angenommen. Die Erstmanifestation erfolgt meist im mittleren Erwachsenenalter, wobei Frauen doppelt so häufig betroffen sind als Männer. Die direkte Immunfluoreszenz zeigt in 50 – 90 %

breite, bandförmige Ablagerungen von Immunglobulin IgG und IgM, sowie Komplement an der dermoepidermalen Junktionszone. Dieses Lupusband ist im Gegensatz zum systemischen LE nicht in unbefallener lichtgeschützter Haut nachweisbar.

Die Ätiologie des CDLE ist noch nicht geklärt. Es wird angenommen, dass die Läsionen durch autoantikörperabhängige T-zelluläre Mechanismen bedingt werden. Die Prognose des CDLE ist abgesehen von störenden kosmetischen Narben günstig. Nur etwa 5% der Patienten, die an einem CDLE leiden, zeigen einen Übergang in einen SLE. Der Krankheitsverlauf korreliert mit der Anzahl der Hautläsionen. Es kann nach Jahren bei einigen Patienten zu einem spontanen Stillstand der Erkrankung kommen (Tebbe 2004).



Abbildung 3 und 4: Chronisch diskoider Lupus erythematoses (CDLE).

Typische Hautmanifestationen beim CDLE in Form von disseminierten scheinbaren Plaques im Bereich des Rückens und des Gesichts (Fotoarchiv, 2006).

1.1.2. Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

Der systemische Lupus erythematoses stellt eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Gefäßbindegewebes dar, bei der fast alle Organe befallen sein können. Häufig kommt es zur Beteiligung der Haut meist in Form des klassischen Schmetterlingserythems (Abbildung 5). Die Erkrankung ist durch das Auftreten von Autoantikörpern charakterisiert (Tan 1989). Der SLE hat eine Prävalenz von etwa 10/100000 Einwohner, das Verhältnis von Frauen zu Männern beträgt 9:1 (Parodi und Rebora 1997).

Es wird heute davon ausgegangen, dass genetische Faktoren, Alter und Geschlecht eine prädisponierende Rolle spielen. Exogene Einflüsse wie z.B. Licht, Infektionen und Arzneimittel können zu einer Manifestation der Erkrankung führen (Hess 1988). Verschiedene Faktoren können einen SLE induzieren, unter anderem sind zahlreiche Medikamente (z.B. D-Penicillamin, Isoniazid, Hydralazin und Procainamid) bekannt, die einen SLE induzieren können (Pramatarov 1998). Auch Hormonelle Faktoren (Gynäkotropie, Verschlechterung in der Schwangerschaft und unter Östrogentherapie), sowie Infektionen (z.B. Zytomegalie oder Ebstein-Barr-Virus) können ein Trigger sein und einen SLE auslösen (Cooper et al., 1998; Rider et al., 1997).



Abbildung 5: Charakteristisches Schmetterlingserythem im Gesicht einer Patientin mit systemischem Lupus erythematoses (Fotoarchiv, 2006).

1.2. Bedeutung von Chemokinen und Rezeptoren

In den vergangenen Jahren konnten verschiedene Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Chemokinrezeptoren identifiziert werden, die eine wesentliche Rolle für die Migration von Immunzellen in periphere Organe spielen. Uns interessierte insbesondere die Bedeutung von Chemokinen und ihre Rezeptoren für die Migration von T-Zellen in die Haut bei kutanen Lupus erythematoses Patienten. Es ist bekannt, dass Chemokine und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle für den Beginn und Verlauf einer Entzündung in der Haut spielen. Die Anzahl neu entdeckter Mitglieder der Chemokinfamilie ist in den letzten Jahren sprunghaft angestiegen. Es sind mittlerweile über 50 humane Chemokine bekannt (Ohshima et al., 2004).

Chemokine sind eine Klasse von Cytokinen. Es handelt sich um kleine Proteine, die sich aus etwa 70 bis 130 Aminosäuren zusammensetzen und ein Molekulargewicht zwischen 8 und 12 kD haben. Strukturell lassen sich anhand der charakteristischen Anordnung des ersten bzw. der ersten beiden N-terminalen Cystein (C)-Aminosäurereste innerhalb des stark konservierten Abschnittes der Chemokin-Domäne Gruppen bilden (Abbildung 6). Die Cystein-Reste liegen entweder einzeln (C), nebeneinander (CC) oder von einer Aminosäure getrennt vor (CXC) (Wilbanks et al., 2001).

Eine neuere Klassifizierung orientiert sich an den physiologischen Eigenschaften der Chemokine. Man unterscheidet demnach zwischen inflammatorischen (oder induzierbaren) und homöostatischen (oder konstitutiven) Chemokinen (Nakayama et al., 2003). Während die inflammatorischen Chemokine im wesentlichen die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Infektion, der Entzündung oder des Tumors kontrollieren, sind die homöostatischen Chemokine für die Steuerung des entzündungsunabhängigen, kontinuierlichen Verkehrs von Leukozyten durch gesundes peripheres Gewebe verantwortlich. Zu den homöostatischen Chemokinen zählt z. B. der CCR4-Ligand TARC/CCL17, zu den inflammatorischen Chemokinen zählen u.a. die CXCR3-Liganden CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (ITAC). Inflammatorische Chemokine werden unter anderem von Leukozyten produziert. Sie dienen als Entzündungsmediatoren der Abwehrreaktion des Körpers im Rahmen von Infektionen und Entzündungen. Die homöostatischen Chemokine dagegen werden permanent in

bestimmten Abschnitten des lymphoiden Gewebes exprimiert und dienen der Reifung, Differenzierung und Aktivierung von Lymphozyten (Baggiolini 2001). Sie sind unter physikalischen Bedingungen ein wichtiger Bestandteil der gerichteten Wanderung von Lymphozyten.

Jede der Chemokingruppen wirkt auf andere Rezeptoren. Die CC-Chemokine binden an CC-Rezeptoren. CXC-Chemokine binden an CXC-Rezeptoren. Chemokinrezeptoren gehören zur großen Gruppe der an ein G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Sie schlängeln sich mit ihrer Proteinkette siebenmal durch die Zellmembran.

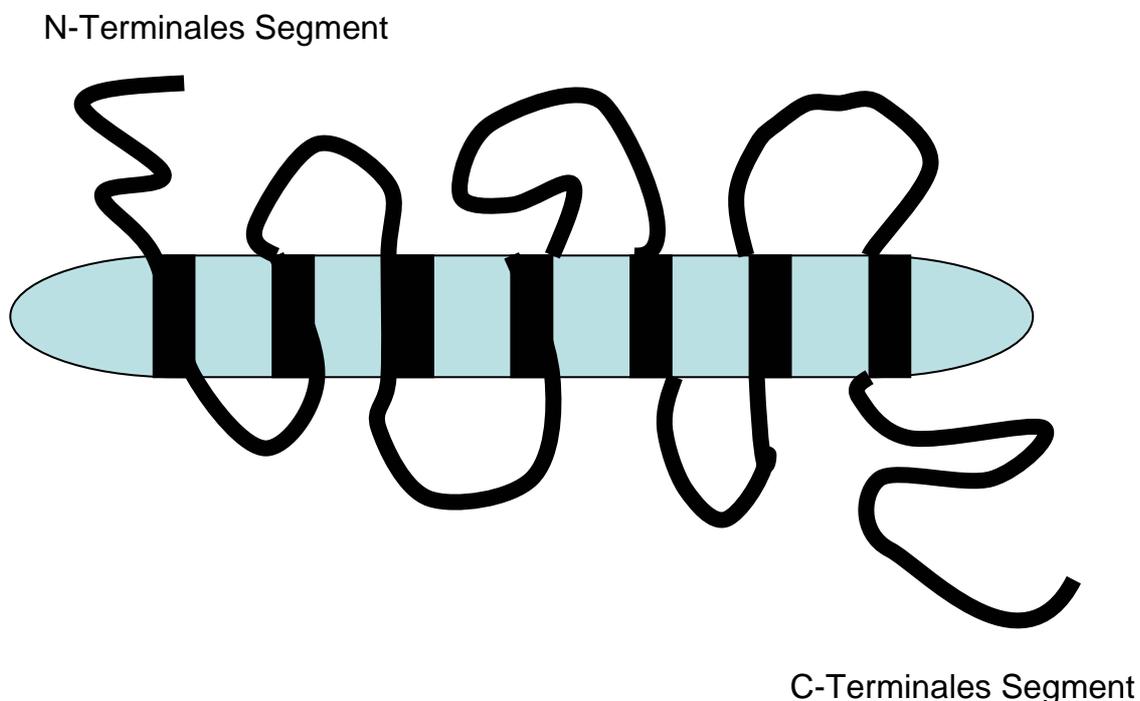


Abbildung 6: Stark vereinfachte schematische Darstellung eines 7-transmembranären, G-Protein gekoppelten Chemokinrezeptors (Gouldsen et al, 2001)

Chemokinrezeptoren finden sich auf vielerlei Zellarten des Organismus. Viele der Zellarten exprimieren dabei mehr als nur einen Rezeptortyp, beispielsweise T-Lymphozyten, die mehr als zehn verschiedene Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche tragen. Die meisten der CXC-Rezeptoren und CC-Rezeptoren haben mehrere potentielle Chemokinliganden, die ihrerseits wiederum auch an mehrere andere Chemokinrezeptoren binden können (Wilbanks et al., 2001).

Eine Vielzahl von Zelltypen kann Chemokine als Reaktion auf bakterielle Produkte und Viren bilden, aber auch als Reaktion auf Agenzien, die physikalische Schäden verursachen. Sowohl eine Infektion als auch eine Verletzung des Gewebes führen zum Aufbau von Chemokingradienten. Dieser Chemokingradient ermöglicht es den T-Lymphozyten, im Zusammenspiel mit den entsprechenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, durch Chemotaxis in die Bereiche zu gelangen, an denen sie benötigt werden. Dabei rufen Chemokine jedoch nur diejenigen Immunabwehrzellen zu Hilfe, die mit spezifischen Andockstellen auf der Zelloberfläche ausgerüstet sind, den korrespondierenden Chemokinrezeptoren.

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt durch antigenpräsentierende dendritische Zellen in drainierenden Lymphknoten. Die aktivierten Zellen proliferieren, exprimieren Aktivierungs- und Effektormoleküle und wandeln sich in Gedächtniszellen (Sallusto et al., 2000). Während dieser Umwandlung erwerben einige T-Zellen neue molekulare Schlüssel, wie z.B. das kutane Lymphozytenantigen (CLA). Das CLA erlaubt ihnen, vorzugsweise in entzündliches Gewebe zu gelangen, wo die entsprechenden Liganden auf kutanen mikrovaskulären endothelialen Zellen exprimiert werden (Verhaegh et al., 1998). Diese gerichtete Migration entlang eines Chemokingradienten stellt im Gewebe einen wichtigen und komplexen Mechanismus der Zellwanderung dar und wird in der Fachliteratur als „Skin Homing“ bezeichnet. Der Vorgang beschreibt die Migration von Zellen entlang eines Gradienten bis in das Zielgewebe Haut.

Die Einwanderung und Infiltration von T-Lymphozyten in die Haut ist ein zentrales Zeichen vieler entzündlicher Dermatosen. Der kutane Lupus erythematoses stellt eine spezifische hautbezogene T-lymphozytäre Autoimmunerkrankung dar, bei der die oben angegebenen Mechanismen in noch nicht vollständig geklärter Abfolge stattfinden. Die Extravasation von T-Zellen in das Gewebe erfolgt über eine genau regulierte Kaskade von Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen mit ihren Liganden und Chemokin-Chemokinrezeptor Wechselwirkung (Campbell und HayGlass 2000).

Die T-Zell-Migration in die Haut beginnt mit einem vielschrittigen Adhäsionsprozess, bei dem die T-Zellen aus dem zirkulierenden Blut an die Endothelschicht der Gefäßwand andocken. Diese Kontaktaufnahme zwischen Lymphozyten und Endothel ist für zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse essentiell.

Zunächst verlassen die Lymphozyten die zentrale Strombahn des Gefäßes und gelangen in die Nähe des Endothels. Es kommt zu einem lockeren Kontakt, wobei die Leukozyten an der Endothelwand entlang rollen und dabei drastisch ihre Geschwindigkeit reduzieren. Verantwortlich für diesen ersten Schritt der Kontaktaufnahme sind Selektine, eine Untergruppe von Zelladhäsionsmolekülen. Man unterscheidet P-Selektin, L-Selektin und E-Selektin. Das P-Selektin erhielt seinen Namen nach den Zellen, auf denen es als erstes entdeckt wurde (Plättchen, engl. = platelets), ebenso L-Selektin (Leukozyten) und E-Selektin (Endothel). Selektine sind Glykoproteine mit besonders langen extrazellulären Domänen, was vermutlich ein Einfangen der Leukozyten aus dem Blutstrom begünstigt (Tedder et al., 1995). Besitzen das Endothel und die Leukozyten Selektine und ihren entsprechenden Liganden, kommt es zu einer Bindung, die zunächst noch nicht stabil ist und das so genannte Rollen (engl.: Rolling) wird eingeleitet. Vor allem die Interaktion des Oberflächenmoleküls CLA auf aktivierten T-Lymphozyten mit E-Selektin, das ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert wird, hat eine entscheidende Bedeutung für diesen Vorgang. E-Selektin liegt nicht in gespeicherter Form vor, sondern muss erst durch Synthese als Antwort auf einen inflammatorischen Reiz wie IL-1 oder TNF- α gebildet werden (Lawrence und Springer 1991).

Die aktivierten Leukozyten binden an endothelseitige Adhäsionsmoleküle der so genannten Immunglobulin-Superagen-Familie und vermitteln so eine stabile Adhäsion. Die Rollbewegung kommt zum Stillstand. Wichtig für diesen Vorgang ist die Adhäsion von CLA⁺ T-Zellen an den Integrinliganden ICAM-1. Die Integrinfamilie umfasst eine große Anzahl von Zelloberflächenrezeptoren, die sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzen, der größeren α und der kleineren β -Untereinheit. Integrine erfüllen eine Vielfalt unterschiedlichster Aufgaben. Sie sind sowohl an Vorgängen der Zelldifferenzierung als auch an der Apoptose und an der Anheftung des Epithels an extrazellulärer Matrix beteiligt. Die Liganden für Integrine werden auf Endothelzellen exprimiert und sind durch Zytokine induzierbar. Sie gehören zu der Familie der Superimmunglobuline, die als gemeinsames Merkmal das Vorhandensein mindestens einer Immunglobulin-Domäne aufweisen. Die beiden bedeutendsten Integrinliganden sind ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule-1) für Mac-1 und LFA-1 sowie VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) für VLA-4.

Neben den Adhäsionsmolekülen spielen jedoch auch Chemokinrezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Lymphozytenrekrutierung in die Haut. Angelockt durch den Gradienten, der durch Chemokine im Zielgewebe Haut aufgebaut ist, steuert der Leukozyt mit dem entsprechenden Chemokinrezeptor auf seiner Oberfläche auf die interendothelialen Junctionen der Gefäßwand zu, bricht die Bindungen auf und zwingt sich durch die entstandene Lücke (=Transmigration). Die Transmigration der T-Lymphozyten durch das Blutgefäß wird durch die Interaktion des Chemokinrezeptors CCR4 mit seinem Liganden“ TARC/CCL17 auf aktivierten endothelialen Zellen eingeleitet. Wichtig für diesen Vorgang ist, wie bereits oben beschrieben, die Stimulation der integrinabhängigen Adhäsion von CLA+ T-Zellen an ICAM-1. Dieser Integrin-Stimulus wird durch Chemokine bereitgestellt, die entweder an CCR4 oder an CCR10 binden (Campbell et al., 1999). Bereits 1991 konnten Picker et al zeigen, dass die Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR10 bei verschiedenen Dermatosen verstärkt auf T-Lymphozyten in der Haut exprimiert werden (Picker et al. 1991).

Das Zusammenspiel der verschiedenen Zelladhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren ermöglicht den Leukozyten-„Verkehr“ zwischen Blutstrom und Haut (Abbildung 7).

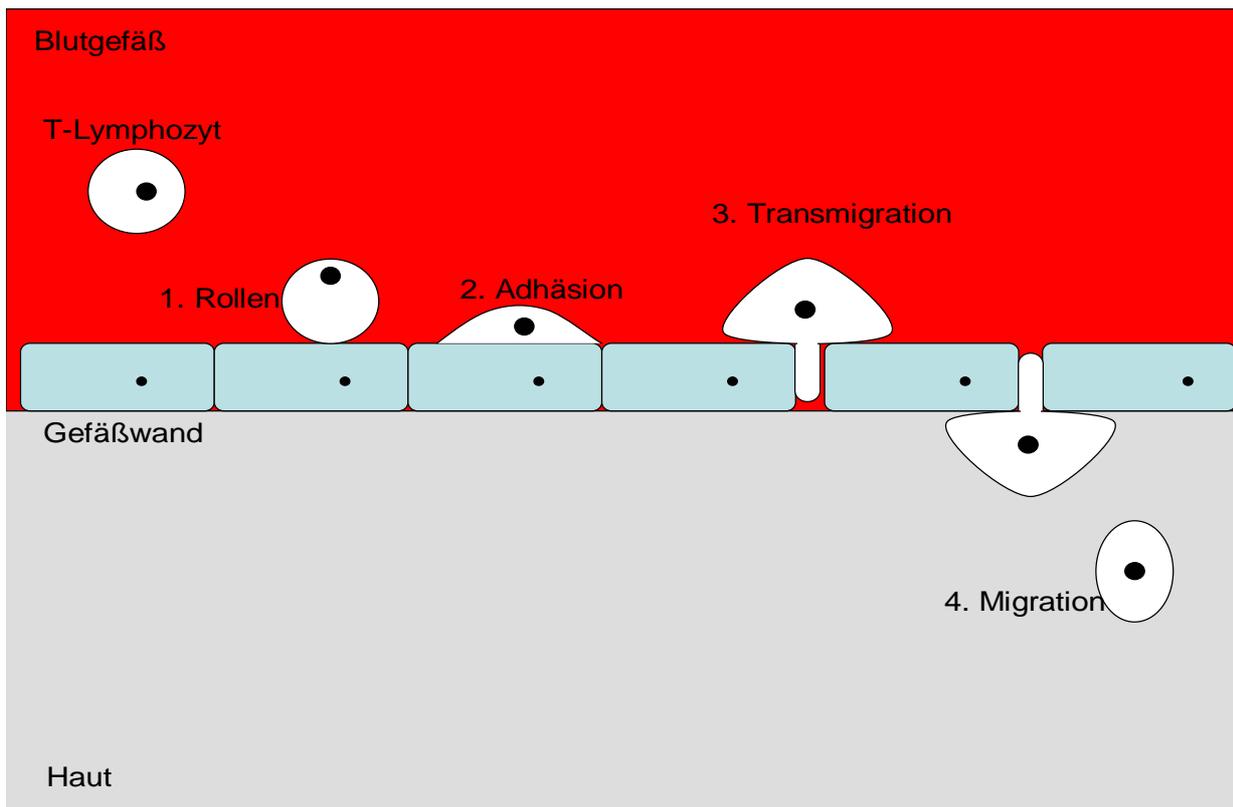


Abbildung 7: Die Zelladhäsionskaskade ist ein wesentliches Element des Leukozyten „Verkehrs“ zwischen Blutbahn und Haut. Der Leukozyt verlässt die zentrale Strombahn und rollt am Endothel entlang (1). Es folgt die Adhäsion an das Endothel. Dieser Schritt wird vor allem durch die Interaktion von Oberflächenmolekülen vermittelt (2). Es folgt die feste Anheftung, der sich die Transmigration anschließt, indem der Leukozyt mit dem entsprechenden Rezeptor das Gefäß entlang eines Chemokingradienten durch einen endothelialen Interzellularspalt durchdringt (3) und in die Haut gelangt (4).

1.2.1. CLA als wichtiges Adhäsionsmolekül für die T-Zell-Migration

Das Oberflächenmolekül CLA (cutaneous lymphocyte antigen) wird zu den Adhäsionsmolekülen gezählt. Adhäsionsmoleküle sind Zell-Oberflächen-Proteine, die verantwortlich sind für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Sie sind in der Lage, eine große Zahl von Stimuli zu erkennen und darauf entsprechend zu reagieren. Sie bilden somit eine Basis für einige physiologische und pathologische Prozesse, insbesondere für das "Homing"-Verhalten, die Homöostase der Immunantwort, die Wundheilung, Entzündungen und für die Tumormetastasierung.

CLA ist eine glykolysierte Isoform von P-Selektin Glykolipid-1 und bindet an E-Selektin (Janeway und Medzhitov 2002). E-Selektin ist ein zytokin-induziertes endotheliales Zelladhäsionsmolekül, das T-Zellen bindet, die CLA exprimieren. E-Selektin (auch als ELAM und CD62E bekannt) ist an der initialen Prägung von Leukozyten beteiligt, bevor diese in entzündliches Gewebe wandern (Nakayama et al., 2000). CLA⁺ T-Zellen, die E-Selektin binden, werden durch den monoklonalen Antikörper HECA 452, ein Zell-Oberflächen Glykoprotein, erkannt (Berg et al., 1991). Es ist bekannt, dass die Interaktion zwischen E-Selektin und seinem Liganden CLA eine zentrale Rolle bei kutanen Entzündungen spielt (Jones et al., 1997).

Während ca. 90 % der Hautlymphozyten CLA exprimieren, sind unter physiologischen Bedingungen nur ca. 10-15% der zirkulierenden T-Zellen CLA positiv. Der Anteil CLA⁺ T-Lymphozyten in extrakutanen Organen übersteigt selten 5% (Homey et al., 2002) (Picker et al., 1990). Zellen hingegen, die zur Haut wandern, exprimieren CLA. Es konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der T-Zellen in entzündlichem Hautgewebe, wie z. B. bei der Atopischen Dermatitis und der Psoriasis vulgaris tatsächlich CLA exprimieren (Nakamura et al., 1998). Im peripheren Blut findet man CLA auf einer Subpopulation der Lymphozyten, auf allen Monozyten und auf Granulozyten. CLA unterstützt die Migration von Lymphozyten in extravaskuläres Gewebe während einer Entzündung (Leung et al. 1995). Picker et al. hypothetisierten bereits 1993, dass CLA ein „Homing-Molekül“ auf Gedächtnis-T-Zellen sei, die mit E-Selektin interagieren (Picker 1993).

Es wird angenommen, dass inflammatorische Zytokine und lokale antigenpräsentierende Zellen die CLA Expression während der Reifung beeinflussen können. IL-12 erhöht die Expression von CLA in vitro (Akdis et al., 2000; Picker 1993) während IL-4 die CLA-Expression supprimiert (Nakayama et al., 2000).

CLA⁺ T-Zellen, die sich in entzündlicher Haut befinden, exprimieren den Chemokin-Rezeptor CCR4, der an TARC bindet (Campbell et al., 1999) und CCR 10, der an CTACK bindet und eine Rolle spielt bei der Anziehung von CLA⁺ T-Zellen in die Epidermis (Morales et al., 1999). Die Bedeutung von CLA auf zirkulierenden T-Lymphozyten ist beim CLE bislang noch nicht untersucht worden.

1.2.2. CCR4 als wichtiger Chemokinrezeptor für das T-Zell-Homing

CCR4 ist, wie alle Chemokinrezeptoren, ein sieben transmembran G-Protein gekoppelter Rezeptor. Der Rezeptor hat zwei bisher identifizierte Liganden, das Chemokin „Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22)“ und das Chemokin „thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17)“. CCR4 mRNA wird hauptsächlich im Thymus und in der Milz exprimiert. Außerdem findet man CCR4 mRNA bei peripheren T-Lymphozyten, Basophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten (Power et al., 1995). Das humane CCR4 Gen wird dem Chromosom 3p24 zugeordnet. (Samson et al., 1996). CCR4 wird auf den meisten einfach positiven CD4 Thymozyten und auf einer großen Gruppe von Blut (aber nicht Intestinalen-) Gedächtnis-CD4 Lymphozyten exprimiert, sowie auf fast alle Haut Gedächtnis T-Zellen, die zusätzlich CLA positiv sind (Andrew et al., 2001).

In Hautläsionen von Patienten mit verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen fand sich eine vermehrte Einwanderung CCR4+ T-Zellen, z.B. bei der Atopischen Dermatitis (Wakugawa et al., 2001), der Psoriasis (Inaoki et al., 2003) und bei kutanen T-Zell-Lymphomen (Kallinich et al., 2003). Bei der Atopischen Dermatitis war das Expressionsniveau von CCR4 sowohl auf zirkulierenden als auch auf gewebsständigen CD4-Lymphozyten erhöht (Nakatani et al., 2001), was laut Wakugawa et al mit der Krankheitsaktivität korreliert (Wakugawa et al., 2001). Vetergaard et al beschrieb bei diesen Patienten eine erhöhte Anzahl zirkulierender T-Lymphozyten, die sowohl CCR4 als auch CLA auf ihrer Oberfläche tragen (Vestergaard et al., 2000). Der CCR4 Ligand TARC/CCL 17 (thymus and activation regulated chemokine) wird in der Haut auf postkapillären Venolen exprimiert (Ferenczi et al., 2002). Nach dem heutigen Kenntnisstand ist CCR4/TARC ein wichtiges Chemokin-Chemokinrezeptorpaar für die chemotaktische Migration von Lymphozyten aus den Gefäßen in die Haut. Die Mehrzahl der CLA+ T-Zellen exprimieren den Chemokinrezeptor CCR4 (Abbildung 8). CLA und CCR4 müssen zusammenarbeiten, um Haut-spezifisches „Homing“ zu übermitteln (Soler et al., 2003).

Während einer Entzündung wird TARC verstärkt auf Keratinozyten exprimiert. TARC ist ein 8 kDa CC Chemokin, das an den CCR4 Rezeptor bindet, es lockt aktivierte T-Lymphozyten an. Es ist seit kurzem bekannt, dass nicht nur der Chemokinrezeptor

CCR4, sondern auch sein Ligand TARC/CCL17 bei verschiedenen Hauterkrankungen erhöht ist. TARC wird bei Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD) von basalen Keratinozyten produziert. TARC mRNA wird in den Endothelien von postkapillären Venolen der Haut gefunden. Bei der atopischen Dermatitis konnte eine Korrelation zwischen den erhöhten Serumwerten und der Schwere der Erkrankung festgestellt werden (Nakatani et al., 2001). Auch beim SLE wurden erhöhte TARC/CCL17 Werte im Serum gefunden, die mit der Schwere der Erkrankung korrelieren sollen (Kallinich et al., 2003). Außerdem zeigte sich beim aktivem systemischen Lupus erythematodes eine erhöhte Expression von CCR4 auf CD4+ T-Lymphozyten (Hase et al., 2001). Die absolute Zahl von CCR4+ T-Lymphozyten war bei SLE-Patienten im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv eindeutig erhöht (Nawata et al., 2001; Wenzel et al., 2005a). Der SLE geht häufig mit einer Lupus Nephritis einher. Yamada et al berichten von einer Akkumulation von CD4+ CCR4+ T-Lymphozyten in renalen Gewebe bei Patienten mit einer solchen Lupus Nephritis (Yamada et al., 2002). Die CCR4 Expression auf zirkulierenden T-Lymphozyten ist beim CLE bislang noch nicht untersucht worden.

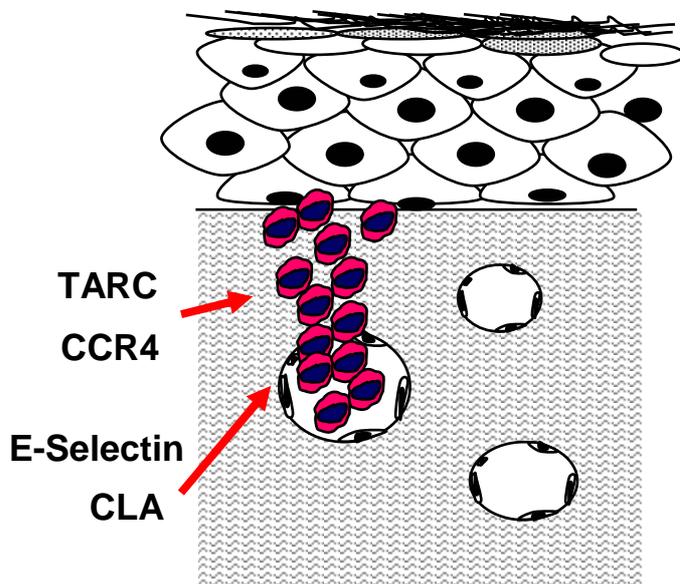


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Bedeutung der Moleküle CLA (kutanes Lymphozyten Antigen) und CCR4 (CC-Chemokinrezeptor 4) für die Migration von Lymphozyten aus Blutgefäßen in die Haut. CLA bindet an E-Selektin, das an der initialen Prägung von Leukozyten beteiligt ist, bevor diese in entzündliches Gewebe wandern. CCR4/TARC (thymus and activation regulated chemokine) ist ein wichtiges Chemokin-Chemokinrezeptorpaar für die chemotaktische Migration von Lymphozyten.

1.2.3. CXCR3 als wichtiger inflammatorischer Chemokinrezeptor

Der Chemokinrezeptor CXCR3, ein Mitglied der CXC Familie der Chemokinrezeptoren, ist beteiligt an der Pathogenese chronisch entzündlicher Veränderungen, der Metastasierung einiger Tumoren und Autoimmunerkrankungen. Die Liganden von CXCR3 werden zu den inflammatorischen Chemokinen gerechnet und sind an der entzündungsabhängigen Rekrutierung von T-Zellen beteiligt.

CXCR3 wird limitiert auf aktivierten T-Zellen, natürlichen Killerzellen und auf einigen B-Zellen exprimiert (Loetscher et al., 1996). CXCR3 besitzt drei verschiedene Liganden: CXCL10 = IP-10 (interferon induced protein von 10 kDA), CXCL9 = Mig (monokine induziert durch gamma-interferon) und CXCL11 = I-TAC (interferon inducible T cell alpha chemoattractant) (Bonecchi et al., 1998; Loetscher et al., 1998; Sallusto et al., 1998). Die CXCR3 Chemokine können durch Interferone während einer Inflammation induziert werden (Moser et al. 2001). Sie sind effektive T-Zell-Chemoaktoren (Liao et al., 1995; Loetscher et al., 1996).

Die Chemokine CXCL10 und CXCL9 akkumulieren vorzugsweise an Orten mit entzündlichem Geschehen und in Tumoren (Liao et al., 1995). Keratinozyten, die durch TNF-alpha und Interferon-gamma stimuliert werden, exprimieren verstärkt CXCL10 und CXCL9. Haut-Endothel-Zellen, die auf ähnliche Weise stimuliert werden, exprimieren ebenfalls verstärkt CXCL10 (Rottman et al., 2001). Die CXCL10 und CXCL9 Signalisierung scheint ein wichtiger Mechanismus für das selektive „Skin Homing“ von aktivierten Effektorzellen zu sein. Man nimmt heute an, dass diese beiden CXCR3 Liganden eine besondere Rolle für die Rekrutierung von T-Lymphozyten spielen und die T-Zell-Wanderung in entzündliches Gewebe regulieren.

Eine große Anzahl der T-Lymphozyten in entzündlichen Hautläsionen sind CXCR3 positiv, während nur relativ wenig CXCR3+ T-Zellen im zirkulierenden Blut und in Lymphknoten zu finden sind. CXCR3 scheint zusammen mit dem Chemokinrezeptor CCR5 eine Untergruppe von Lymphozyten zu kennzeichnen, die die Fähigkeit haben, in entzündliches Gewebe zu wandern (Qin et al., 1998).

Rottman et al stellten die Vermutung auf, der Chemokinrezeptor CXCR3 sei an der transendothelialen Wanderung von T-Lymphozyten in die Haut von Psoriasispatienten

beteiligt. CXCR3 soll letztlich der Rezeptor sein, der die T-Zell-Wanderung in die aufliegende Epidermis leitet (Rottman et al., 2001). Sergerer et al stellten fest, dass CXCR3 auf den meisten inflammatorischen Haut-T-Lymphozyten (75%) beim CDLE, bei der Kontakt Dermatitis und beim Lichen planus exprimiert wird. Weiter beschrieben sie, dass sich bei SLE-Patienten mit einer Lupus Nephritis eine starke Expression von CXCR3 auf T-Zellen des Tubulointestinums findet (Seegerer et al., 2004). Die Anzahl infiltrierender T-Lymphozyten soll ein Indikator für die Progression der renalen Erkrankung sein. Flier et al konnten zeigen, dass beim dCDLE eine erhöhte Expression von CXCL10/IP10 mRNA in Hautläsionen vorliegt (Flier et al., 2001). Uns interessierte in der vorliegenden Arbeit die Expression von CXCR3 auf zirkulierenden T-Lymphozyten während einer akuten Exazerbation des kutanen LE.

2. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des Adhäsionsmoleküls CLA, des homöostatischen Chemokinrezeptors CCR4 und des inflammatorischen Chemokinrezeptors CXCR3 auf zirkulierenden T-Zellen bei CLE Patienten zu untersuchen.

Unsere Hypothese war, dass CLA und CCR4 auf T-Lymphozyten bei CLE Patienten als „Skin Homing“ Faktoren eine Rolle spielen und als relevante Faktoren der Lymphozytenmigration verstärkt auf zirkulierenden T-Zellen exprimiert werden. TARC/CCL17 stellt den Liganden von CCR4 dar. Wir vermuteten, dass dieser Ligand besonders bei Patienten mit vielen Hautläsionen im Serum erhöht ist. Weiterhin hypothetisierten wir, dass auch der inflammatorische Chemokinrezeptor CXCR3 auf T-Zellen bei CLE Patienten relevant ist. Ähnliche Untersuchungen bei der atopischen Dermatitis und der Psoriasis zeigten eine veränderte Expression der Chemokinrezeptoren CCR4 und CXCR3.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen untersucht:

1. Ist die Anzahl der zirkulierenden T-Zellen, die das Adhäsionsmolekül CLA exprimieren, bei CLE Patienten verändert?
2. Ist die Anzahl der zirkulierenden T-Zellen, die den homöostatischen Chemokinrezeptor CCR4 exprimieren, bei CLE Patienten verändert?
3. Ist der Serumspiegel des CCR4 Liganden TARC/CCL17 bei CLE Patienten verändert?
4. Ist die Anzahl der zirkulierenden T-Zellen, die den inflammatorischen Chemokinrezeptor CXCR3 exprimieren, bei CLE Patienten verändert?

3. Material und Methoden

3.1. LE-Patienten und Kontrollgruppen

In der vorliegenden Studie wurde Material von 25 Lupus erythematoses Patienten (17 Frauen und 8 Männer) mit aktivem LE eingeschlossen. Fünf Patienten waren an einem lokalisierten chronisch diskoiden LE (ICDLE) erkrankt, 4 litten an einem disseminierten chronisch diskoiden LE (dCDLE), 11 an einem subakut akutem LE (SCLE) und 5 an einem systemischen LE (SLE). Zusätzlich wurden 5 gesunde Proben, 5 mit exazerbierter Psoriasis und 5 Patienten mit Herpes Zoster als Kontrollgruppe analysiert. Das Alter der Patienten lag zwischen 18 und 72 Jahren. Alle Probanden waren Mitteleuropäer. Die Patienten wurden im Jahr 2004 in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Bonn behandelt. Alle Blutproben wurden den Patienten noch vor Einleitung einer Behandlung in einem akuten Stadium zu diagnostischen Zwecken entnommen.

Die Diagnose des Lupus erythematoses fundierte auf Standardkriterien und beinhaltete klinische Symptome, histologische und immunhistochemische Ergebnisse, sowie Nachweis von antinukleären Antikörpern. Patienten mit aktueller immunsuppressiver Therapie wurden nicht eingeschlossen.

Als Kontrollkollektiv wurde in dieser Arbeit Material von Patienten mit etablierten Dermatosen untersucht.

Die **Psoriasis** ist eine häufige chronische entzündliche Dermatose, von der weltweit ca. 2 % der Bevölkerung betroffen sind. Die Erkrankung kann in verschiedenen Formen und Schweregraden meist familiär gehäuft auftreten.

Ein autosomal dominanter Vererbungsgang mit irregulärer Penetranz wird angenommen. Die Krankheit beginnt meist im 2.-3. Lebensjahrzehnt und verläuft chronisch, meist in Schüben. Ein zweiter Krankheitsgipfel manifestiert sich um das 50. Lebensjahrzehnt. Das Krankheitsbild beruht auf einer erhöhten Zellproliferation der Epidermis mit vermehrter Verhornung (Parakeratose). Durch den erhöhten Nachschub

an Zellen kommt es zu der charakteristischen massiven Schuppung der Haut (Abbildungen 9 und 10). Zusätzlich laufen in der Haut entzündliche Reaktionen ab, die zu einer Rötung der Haut unter den Psoriasis-Herden führen. Eine Miterkrankung der Nägel sowie der Gelenke ist möglich (Nickoloff und Nestle 2004).

Bei der Psoriasis kommt es aufgrund einer genetischen Prädisposition und hinzukommender Umwelt/Provokationsfaktoren zu einer Th1 vermittelten Entzündungsreaktion der Haut. Dies führt zu einer deutlichen Steigerung der Keratinozytenproliferation und letztlich zu den charakteristischen erythemasquamöse Plaques. Durch die T-Zell-Infiltration in der Epidermis und Dermis wird eine Entzündungsreaktion in der Haut ausgelöst, die über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen zu einer Hyperproliferation der Keratinozyten führt.



Abbildungen 9 und 10: Die Fotos zeigen entzündliche erythematöse Plaques mit charakteristischer silbriger Schuppung an den Händen im Sinne einer Psoriasis palmoplantaris und am gesamten Integument bei einer generalisierten Form der Psoriasis (Fotoarchiv, 2006).

Herpes Zoster

Der Herpes Zoster, auch Gürtelrose genannt, ist eine segmentale Erkrankung der Haut, die durch das Varizella-Zoster-Virus ausgelöst wird. Dieses Virus gehört zur Familie der Herpes-Viren und wird häufig bereits in der Kindheit übertragen; ein Großteil der europäischen Bevölkerung ist Träger des Virus. 10 bis 20 % der seropositiven Personen entwickeln im Laufe ihres Lebens einen Zoster, der sich als schmerzhafter Ausschlag der Haut manifestiert. In der Prodromalphase kommt es zu Missempfindungen bis hin zu starken neuralgiformen Schmerzen ohne sichtbare Hautveränderungen. Nach ungefähr sieben Tagen kommt es zur Eruption von gruppierten Vesikeln (Abbildung 11) und Pusteln auf geröteten Grund im Bereich des befallenen Nervensegments. Die anschließende Abheilungsphase geht mit einem Eintrocknen der Krusten einher. Es können zahlreiche Komplikationen auftreten. Das Virus kann über Jahrzehnte in bestimmten Bereichen des Nervensystems überleben. Es kann Jahre später zu einer Reaktivierung und nachfolgender Auswanderung in die Haut kommen. Sowohl Windpocken als auch die Gürtelrose sind in hohem Maße ansteckend für Menschen, die noch nie mit dem Virus Kontakt hatten. Die Gürtelrose kann alle Altersgruppen betreffen, wird aber meistens bei älteren oder immungeschwächten Menschen (z.B. Tumor-Patienten oder HIV-Infizierten) diagnostiziert (Liesegang 2004).



Abbildung 11: Das Foto zeigt den typischen Ausschlag des Herpes Zoster: kleine Blasen auf erythematösem Untergrund (Fotoarchiv, 2006).

Es wurden folgende Daten evaluiert:

Personenbezogene Daten zur Beschreibung des Kollektivs

Geschlecht

Alter

Diagnose

Antikörper

- CD3 PE/PerCP (SK7)
- CD4 PerCP (SK3)
- CD8 FITC (SK1), CD8 PerCP (SK7)
- CLA FITC (HECA452)
- CCR4 PE (1G1)
- TARC/CCL17 (Biotinylated Fluorokine)
- CXCR3 PerCP (1C6)

Alle von BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA)

Leukozytenpopulationen:

- T-Lymphozyten CD3 PE/PerCP (SK7)
- T-Lymphozyten CD4 PerCP/PE (SK3)
- T-Lymphozyten CD8 FITC (SK1) und CD8 PerCP (SK7)

3.2. Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Lymphozytenisolierung mittels Dichtegradient zur Gewinnung von PBMC
(= Peripheral Blood Mononuclear Cells)

Material:

- Patientenblut (PB)
- Ficoll-Trennlösung (TL), Pharmacia, Uppsala, Sweden
- Phosphatpuffer PBS, Pharmacia, Uppsala, Sweden

Testansatz

Zunächst punktierten wir zur Blutgewinnung eine Armvene des Patienten. Dabei verwendeten wir ein heparinisierendes Röhrchen (Vacutainersystem), damit das Blut nicht unmittelbar gerinnt. Mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurde aus diesem Blut PBMC isoliert. Alle Proben wurden möglichst schnell, jedoch maximal innerhalb von 6 Stunden nach Gewinnung verarbeitet. 5 ml heparinisierendes Blut wurden 1:1 mit Phosphatpuffer PBS (pH 7,3, NaCl 8,0g, KCl 0,2g, KH₂PO₄ 0,25g, Na₂HPO₄ 1,35g, Aq.dest. ad 1000ml) verdünnt. Das Gemisch wurde sehr langsam über 25 ml Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden) geschichtet. Das mit verdünntem Blut überschichtete Ficoll-Röhrchen wurde bei 20°C und 2500 Upm 15 min ohne Bremse zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde die deutlich abgesetzte weiße Leukozyteninterphase, die sich über dem Ficoll befindet, mit einer 10 ml Pipette abgenommen (Abbildung 12). Es wurde in ein 50 ml Falcon Tube (Becton Dickinson) überpipettiert, in dem sich bereits 20 ml PBS befanden. Dieses Gemisch wurde erneut bei 20°C, 2000 Upm und höchster Bremse 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einmaliges Abschütten verworfen, anschließend das Sediment durch Aufklopfen auf den Tisch aufgeschüttelt.

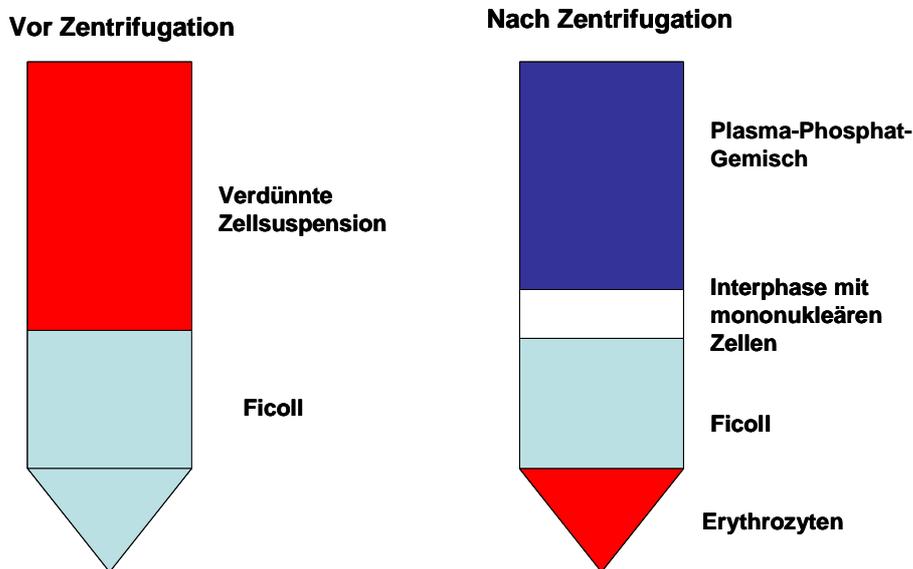


Abbildung 12: Die Abbildung zeigt die schematische Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen. Dargestellt ist ein blutgefülltes heparinisierendes Röhrchen vor und nach der Zentrifugation. Nach der Zentrifugation stellen sich die mononukleären Zellen als schmale grau-weiße Schicht dar, die anschließend vorsichtig abpipettiert werden.

3.3. Durchflußzytometrie

Einleitung:

Die Durchflußzytometrie ist ein fluoreszenzoptisches Verfahren zur Epitopdetektion von Rezeptormolekülen auf Einzelzellniveau mit Hilfe fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper (monoclonal antibodies – mAbs). Alle Zellen in Suspensionen sind für die durchflußzytometrische Messung geeignet. Die Analyse von peripheren Blutzellen hat einen besonderen Stellenwert und heute einen hohen diagnostischen Standart erreicht.

Prinzip:

Die Durchflußzytometrie dient der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird.

In einer Lösung befindliche Zellen werden durch eine Kapillare angesaugt und passieren im Sensor modul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und wenn Antikörper gebunden sind, Fluoreszenzimpulse, woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann. Das Streulicht wird durch Zellgröße, Struktur der Zellwand, sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Die Zellen können damit in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden. Durch Laserlicht werden an mAbs gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe angeregt. Ein Photonenverstärker empfängt die emittierten Fluoreszenzsignale, ein angeschlossener Rechner verarbeitet sie und stellt das Ereignis auf einem Monitor dar. Innerhalb weniger Minuten können mehrere tausend Zellen analysiert werden. Jede native Zelle ohne fluoreszenzmarkierte Antikörper streut beim Durchtritt durch den Laserstrahl das Licht. Durch diese Streusignale lassen sich Größe und Granularität einer Zelle analysieren. Das Maß der Vorwärtsstreuung („forward scatter“, FSC) wird durch das Zellvolumen bestimmt, die Granularität einer Zelle (= die Summe aus Oberflächenbeschaffenheit und intrazellulärem Granulagehalt) bestimmt das Maß der Seitwärtsstreuung („side scatter“, SSC).

Mehrfachmarkierungen der Zellen wurden durch die Einführung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe möglich. Dies hilft bei der Charakterisierung von Zellen über eine Analyse von Oberflächenrezeptoren. Es werden fluoreszenzmarkierte monoklonale

Antikörper verwendet, die an Oberflächenrezeptoren von Leukozyten binden. Diese an mAbs gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren Laserlicht von 488nm (Abbildung 13) und emittieren Licht in einer anderen Wellenlänge. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird mit Hilfe von Fluoreszenzkanälen für verschiedene Wellenlängen detektiert (FL1 – 530nm, FL2 – 585nm, FL3 – 650nm). So ist eine Markierung der Zellen mit drei verschiedenen Oberflächenmarkern möglich. Die Lymphozytenpopulationen lassen sich auf diese Weise anhand ihrer Oberflächenrezeptoren unterscheiden und ihre Anzahl pro μl lässt sich hochspezifisch ermitteln (Bauer und Bohm, 1996).

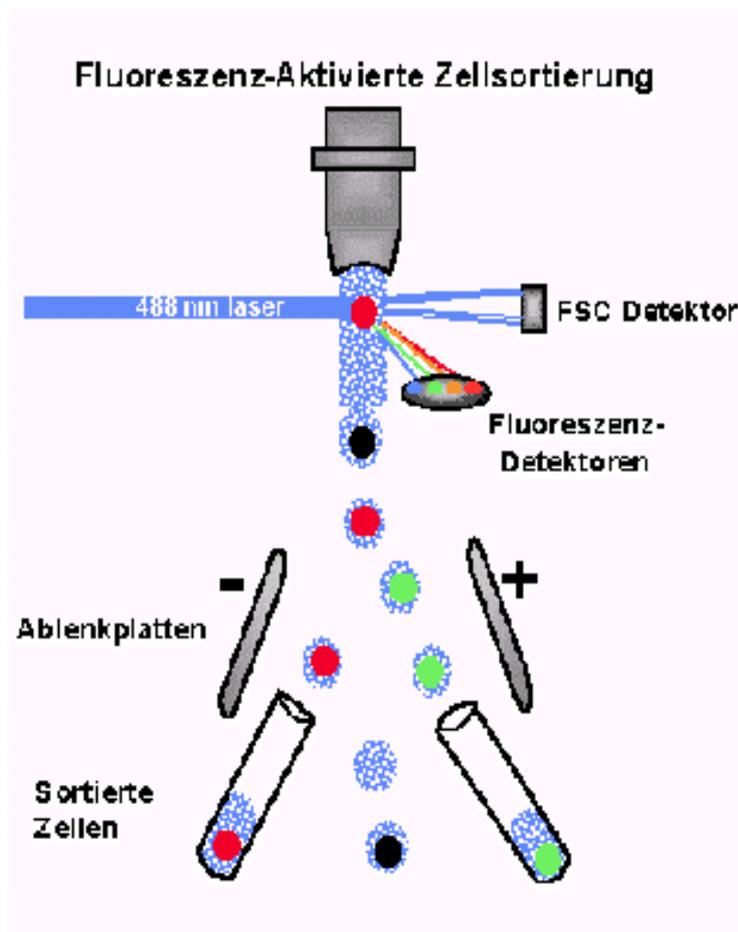


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau eines Durchflußzytometers. Es werden mAbs (monoklonale Antikörper) verwendet, die an Oberflächenrezeptoren von Leukozyten binden. An diese mAbs werden nun Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, die Laserlicht von 488 nm absorbieren und Licht einer anderen Wellenlänge emittieren, welches mit Hilfe von Fluoreszenzkanälen detektiert wird. Das Maß der Vorwärtsstreuung („forward scatter“, FSC) wird durch das Zellvolumen bestimmt. Auf diese Weise ist eine Selektion von Zellen anhand verschiedener Oberflächenmarker möglich (Bauer und Bohm, 1996).

Durchführung:

- Aus Blut werden PBMC gewonnen (siehe Testansatz).
- Zur Subklassifizierung der T-Lymphozyten werden fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper bzw. mAbs-Kombinationen verwendet, die gegen die Epitope CD3+, CD4+ und CD8+ und die zu untersuchenden Chemokinrezeptoren und Oberflächenmoleküle (CLA, CCR4 und CXCR3) gerichtet sind (siehe Färbevorgang)
- In dem FACS Gerät erfolgt eine genaue, computergesteuerte Typisierung der Leukozytensubpopulation nach Volumen, Granularität und Oberflächenrezeptoren (je nach verwendeten mAbs). Die spezifische Licht-Wellenlänge wird vom Gerät erkannt und als Ereignis auf dem Monitor dargestellt. Die Zellanalyse ist quantitativ, schnell und sicher.

In unserer Arbeit verwendeten wir nur kryokonserviertes Material, das bei – 80 Grad Celsius in RPMI Medium gelagert wurde. Frühere Studien konnten belegen, dass es keine signifikanten Unterschiede bei der Verwendung von Frischblut im Vergleich zur kryokonserviertem Material gibt. Das RPMI Medium enthielt 10 % FCS und 10 % DMSO. Wir verwenden einen drei Farben Durchflusszytometer. Es wurden jeweils 5×10^5 mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert. Nach dem Färben wurden die Zellen mit CytifixTM Buffer (BDTM) fixiert. Die Analyse erfolgte mittels eines FACScan Durchflußzytometers und CellQuest Software (BDTM). Die weitere Bearbeitung erfolgte mit WinMDI 2.8 Software.

Genauere Durchführung des Färbevorganges:

- 10 µl PBMC wurden vorsichtig in einem Wasserbad von 50°C aufgetaut und in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Es kam jeweils eine bestimmte Menge des zu untersuchenden fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpers dazu, anschließend folgte eine Inkubation von 10 Minuten im Dunkeln bei Zimmertemperatur. Ein exaktes Färbeschema mit den verwendeten Antikörpern und der jeweiligen Mengenangabe ist in Abbildung 14 abgebildet.

- 1 ml Lyse Puffer wurde in jedes Röhrchen gefüllt, es erfolgte eine erneute Inkubation für 5 Minuten.
- Anschließend wurden die Röhrchen für 5 Minuten bei 2000/UPS zentrifugiert und der Überstand verworfen.
- Die Röhrchen wurden mit 3 ml FACS FLOW aufgefüllt und erneut bei 2000/UPS für weitere 5 Minuten zentrifugiert, dann wurde der Überstand dekantiert.
- Es folgte die Messung der Probe mittels des Durchflußzytometers. Pro Ansatz verwendeten wir etwa 10.000 Zellen.

Röhrchen	Kanal 1	Menge	Kanal 2	Menge	Kanal 3	Menge
Flurochrom	PerCP		PE		FITC	
1	CD4	4 ul	CD3	3 ul	CD8	3 ul
2	CD3	3 ul	CCR4	5 ul	CLA	5 ul
3	CD4	4 ul	CCR4	5 ul	CLA	5 ul
4	CD8	3 ul	CCR4	5 ul	CLA	5 ul
5	CXCR3	5 ul	CD4	4 ul	CD8	3 ul

Abbildung 14: Diese Tabelle zeigt das Färbeschema mit Mengenangabe der verwendeten Antikörper CD3, CD4, CD8 (CD=cluster of differentiation), CLA (kutanes Lymphozyten Antigen), CCR4 (CC-Chemokin-Rezeptor 4) und CXCR3 (CXC-Chemokin-Rezeptor 3) mit genauen Mengenangaben in den Färbungen PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein), PE (R-Phycoerythrin) und FITC (Fluorescein-Isothiocyanat). Da wir ein Dreifarben Durchflußzytometer verwendeten, konnten wir auch drei verschiedene Oberflächenmoleküle bei einem Färbevorgang detektieren.

3.4. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA sind hochsensible immunologische Nachweisverfahren basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion. Mit Hilfe des ELISA können Proteine, Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zu Nutze, die an den nachzuweisenden Stoff (Antigen) binden. In der vorliegenden Arbeit wurde der ELISA zur Detektion des Chemokins TARC/CCL17 im peripheren Blut bei LE Patienten angewandt.

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) entwickelte sich aus dem Radioimmunoassay (RIA) und wurde zuerst von ENGVALL und PERLMANN für die quantitative Bestimmung von Antigenen (1971) bzw. von Antikörpern (1972) beschrieben. Das Prinzip des ELISA beruht darauf, dass sich Antigen-Antikörper-Reaktionen durch Markierung einer dieser beiden Komponenten mit einem Enzym sichtbar machen lassen, indem die Enzymaktivität durch eine Farbreaktion gemessen wird. Auf diese Weise können Antigene und Antikörper qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Wir verwendeten ein Quantikine Kid (R&D Systems) um humanes TARC/CCL17 Protein im Serum von LE Patienten zu detektieren. Es handelte sich um einen quantitativen Sandwich-ELISA, bei dem eine Mikrotiterplatte mit einem monoklonalem Antikörper, der spezifisch für TARC ist, bereits vorbeschichtet war. Auf diese Platte wurde Patientenserum pipettiert. In dem Serum vorhandenes TARC wurde an die immobilisierten Antikörper gebunden. Es folgte ein Waschvorgang, bei dem alle nicht gebundenen Substanzen entfernt wurden. Als nächstes wurde ein Enzymgebundener polyklonaler Antikörper, der spezifisch für TARC ist, hinzugefügt und es folgte ein weiterer Waschvorgang. Nun kam eine Substratlösung dazu, die eine Färbung proportional zu der Menge des TARC ermöglichte. Die Intensität dieser Farbentwicklung konnte gemessen werden und ermöglichte eine Aussage über die Menge des vorhandenen TARC im verwendeten Patientenserum (Abbildung 15).

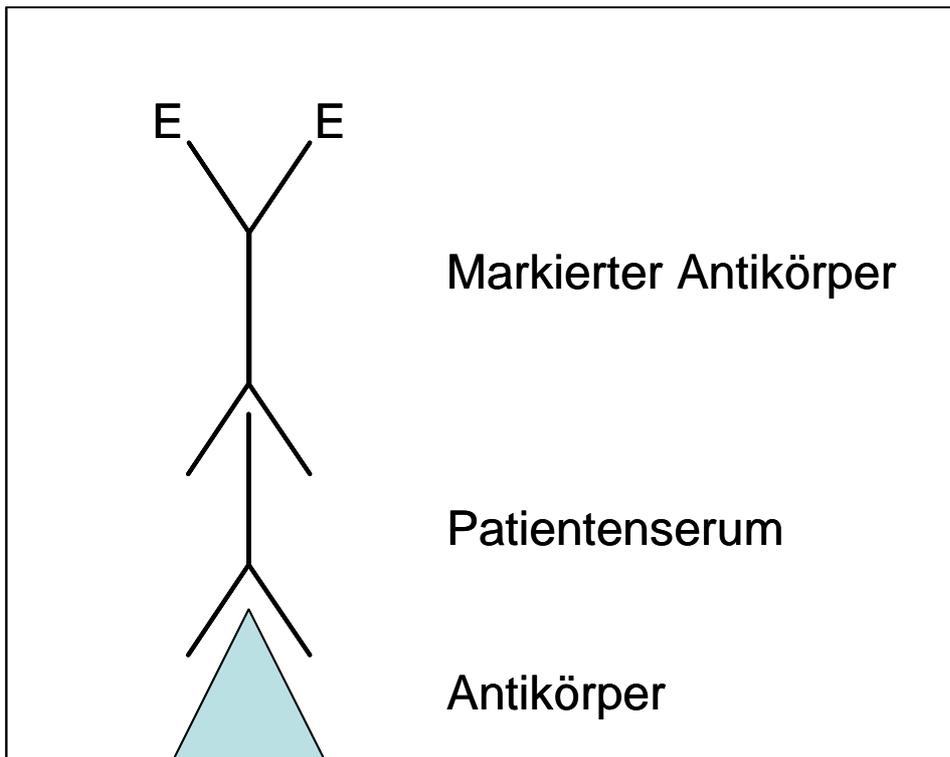


Abbildung 15: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Eine Mikrotiterplatte ist mit einem Antikörper vorbeschichtet, Patientenserum wird dazugegeben, das entsprechende Antigen bindet an den Antikörper. Durch Zugabe eines markierten Antikörpers kann mit Hilfe einer Farbreaktion die Menge des Antigens im Patientenserum bestimmt werden.

3.5. Statistik:

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des SPSS™ Computer-Programms (Version 11) durchgeführt. Die Expression der verschiedenen Marker wurde mit nicht-parametrischen Tests erhoben. Der Kruskal-Wallis Test wurde verwendet um die Unterschiede in den Gruppen darzustellen, der ungepaarte Mann-Whitney U-Test um die Gruppen miteinander zu vergleichen. Die Unterschiede wurden als signifikant angesehen bei $p < 0,05$ und als hoch-signifikant bei $p < 0,01$.

4. Ergebnisse

Ein wesentliches Merkmal des kutanen LE, einer Autoimmunerkrankung unbekannter Ätiologie, ist die Infiltration von T-Lymphozyten in die Haut. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren auf zirkulierenden T-Zellen untersucht.

4.1. Erhöhte Anzahl zirkulierender CLA+ T-Lymphozyten

Wir untersuchten die Expression des Zelloberflächenmarkes CLA auf zirkulierenden T-Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie. Die Lymphozyten wurden zuvor aus dem peripheren Blut von Patienten/Probanden isoliert. Dabei wurden unterschiedliche Kollektive untersucht, die sich wie folgt zusammensetzten: lokalisierter chronisch diskoider LE (ICDLE) n=5, disseminierter chronisch diskoider LE (dCDLE) n=4, subakut kutaner LE (SCLE) n=11, systemischer LE (SLE) n=5, gesunde Kontrollgruppe n=5, Psoriasis n=5, Herpes Zoster n=5.

Verwendet wurden die monoklonalen Antikörper CLA FITC (HECA452), CD3 PE/PerCP (SK7), CD4 PerCP (SK3), CD8 FITC (SK1), CD8 PerCP (SK7), alle von BD Pharmingen™ (Abbildungen 16 und 17).

CLA exprimierende T-Zellen waren bei Lupus erythematodes Patienten signifikant erhöht (Abbildung 18). Die höchste Zahl CLA exprimierender Lymphozyten fanden wir beim CDLE. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl CD4+ CLA+ T-Zellen bei Patienten, die an disseminierten CDLE erkrankt waren im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe. Auch bei den Psoriasispatienten konnte eine signifikant erhöhte Zellpopulation CD4+ CLA+ T-Zellen festgestellt werden. Etwa 15% der CD4+ T-Zellen trugen bei diesen beiden Patientengruppen CLA auf ihrer Oberfläche. Im Vergleich dazu waren nur ca. 7,5% der CD4+ T-Zellen der Kontrollgruppe CLA positiv. Bei den anderen untersuchten LE-Formen ICDLE, SCLE und SLE konnte keine signifikante Erhöhung der Anzahl CLA+ T-Lymphozyten festgestellt werden.

Besonders auffällige Ergebnisse zeigten sich bei der CD8 positiven T-Zell-Population. Wir fanden bei Patienten mit dCDLE hoch signifikant erhöhte Werte von zirkulierenden

CD8+ T-Zellen, die CLA exprimieren. Knapp 25% der CD8 Lymphozyten trugen bei dieser Patientengruppe auch CLA auf ihrer Oberfläche, während nur ca. 2,5% der CD8+ T-Lymphozyten der gesunden Kontrollgruppe CLA positiv waren.

Ebenfalls signifikante erhöhte Werte dieser Zellpopulation fanden wir beim SCLE, hier waren jedoch maximal 12% der CD8+ Lymphozyten CLA positiv und bei der Psoriasis mit ca. 10 % CD8+ CLA+ T-Lymphozyten. Die anderen Zellpopulationen waren nicht signifikant erhöht.

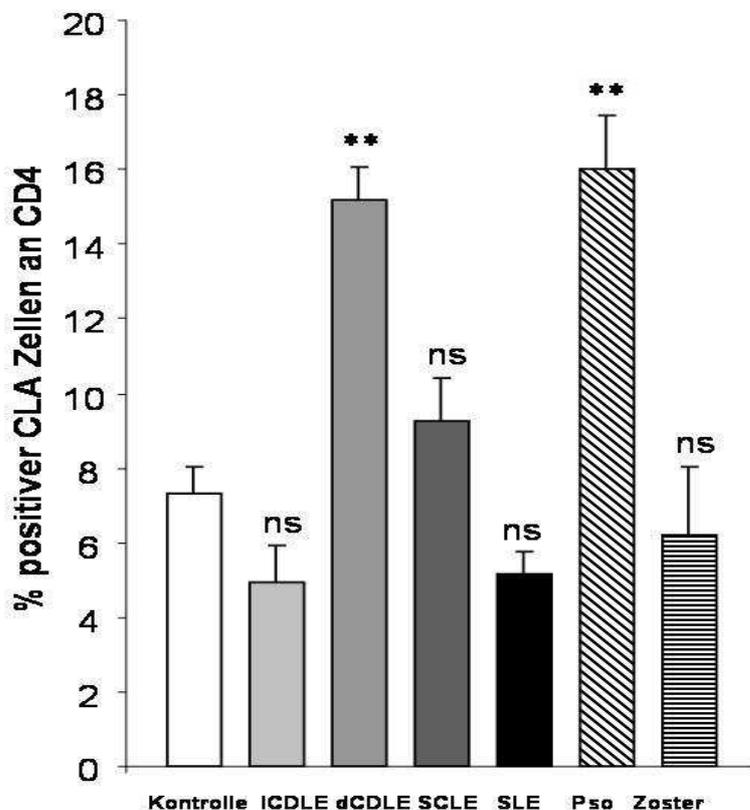


Abbildung 16: CLA (kutanes Lymphozyten Antigen) Expression auf CD4+ T-Zellen in Prozent bei verschiedenen Lupus erythematodes Formen und Dermatosen. Die durchschnittliche Prozentzahl von CD4+ T-Lymphozyten, die CLA exprimieren, wird angezeigt (* $p < 0.05$ = signifikant; ** $p < 0.01$ = hoch signifikant; ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, ICDLE = lokalisierter chronisch diskoider LE (Lupus erythematodes), dCDLE = disseminierter chronisch diskoider LE, SCLE = subakuter kutaner LE, SLE = systemischer LE, Pso = Psoriasis, Zoster = Herpes Zoster).

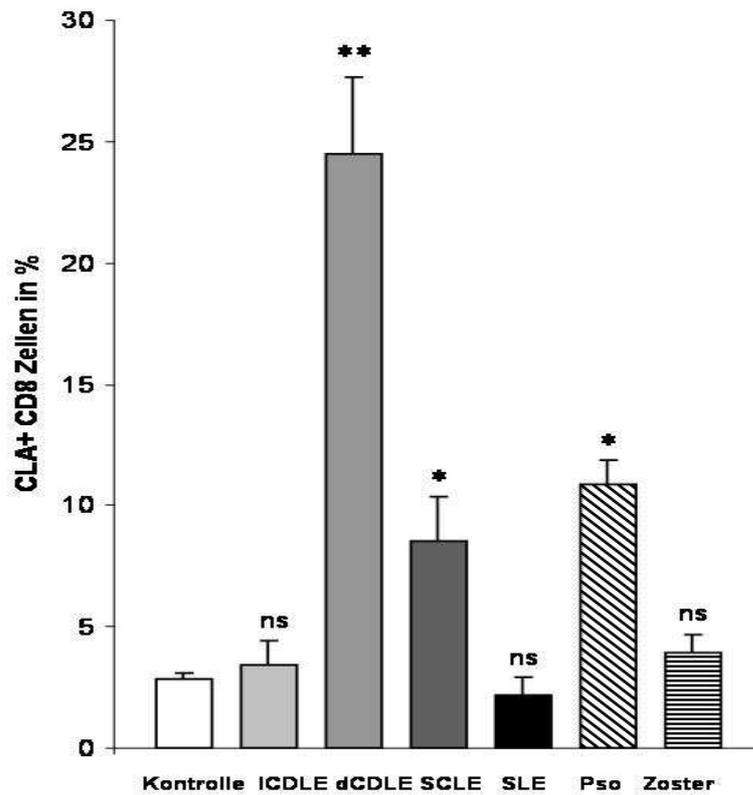


Abbildung 17: CLA (kutanes Lymphozyten Antigen) Expression auf CD8+ T-Zellen in Prozent bei verschiedenen Lupus erythematodes Formen und Dermatosen. Die durchschnittliche Prozentzahl von CD8+ T-Lymphozyten, die CLA exprimieren, wird angezeigt (* $p < 0.05$ = signifikant; ** $p < 0.01$ = hoch signifikant; ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, ICDLE = lokalisierter chronisch diskoider LE (Lupus erythematodes), dCDLE = disseminierter chronisch diskoider LE, SCLE = subakut kutaner LE, SLE = systemischer LE, Pso = Psoriasis, Zoster = Herpes Zoster).

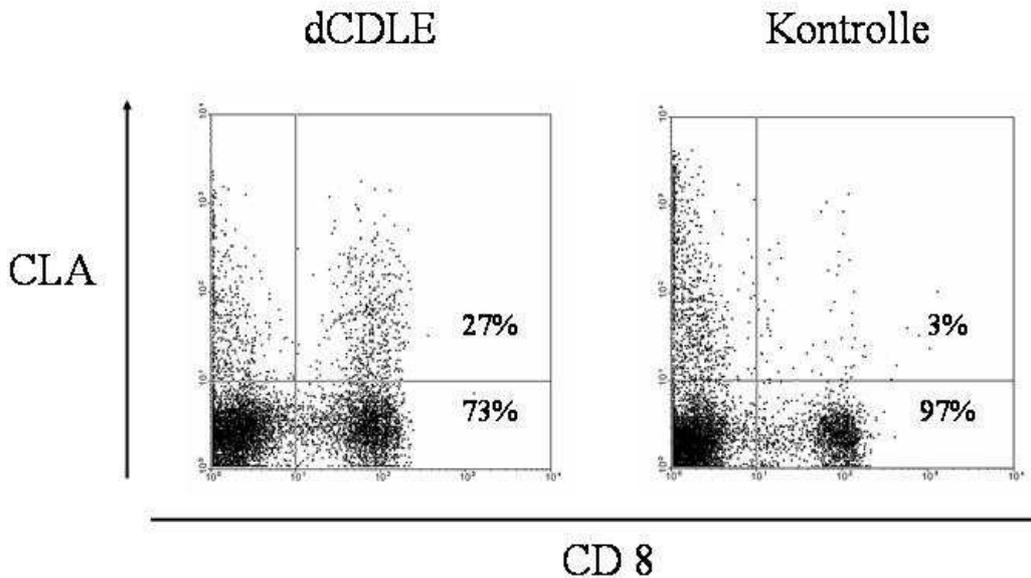


Abbildung 18: Expression von CLA auf T-Lymphozyten

Diese Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Expression des Oberflächenmarkers CLA (kutanes Lymphozyten Antigen) auf CD8 positiven T-Zellen anhand einer Durchflußzytometrie. Das Ergebnis entspricht dem eines an disseminierten chronisch diskoiden Lupus erythematodes (dCDLE) erkrankten Patienten und der einer gesunden Kontrollperson. Bei einem Erkrankten entspricht der Anteil CD8+ CLA+ T-Lymphozyten im peripheren Blut ca. 27 %, bei einem gesunden Probanden nur ca. 3%. Die Anzahl der CD8+ CLA+ T-Lymphozyten eines CDLE Patienten ist somit signifikant erhöht im Vergleich zu einem gesunden Probanden.

4.2. Erhöhte Anzahl zirkulierender CCR4+ T-Lymphozyten

Wir untersuchten die Expression des homöostatischen Chemokinrezeptors CCR4 auf peripheren T-Lymphozyten anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen. Die Lymphozyten wurden zuvor aus dem peripheren Blut von Patienten/Probanden isoliert. Dabei wurden unterschiedliche Kollektive untersucht, die sich wie folgt zusammensetzten: lokalisierter chronisch diskoider LE (ICDLE) n=5, disseminierter chronisch diskoider LE (dCDLE) n=4, subakut kutaner LE (SCLE) n=11, systemischer LE (SLE) n=5, gesunde Kontrollgruppe n=5, Psoriasis n=5, Herpes Zoster n=5.

Verwendet wurden die monoklonalen Antikörper CCR4 PE (1G1), CD3 PE/PerCP (SK7), CD4 PerCP (SK3), CD8 FITC (SK1), CD8 PerCP (SK7), alle von BD Pharmingen™ (Abbildungen 19 und 20).

CCR4 exprimierende T-Zellen waren bei Lupus erythematoses Patienten signifikant erhöht (Abbildung 21). Eine im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant erhöhte Expression von CCR4 auf CD4+ T-Lymphozyten fanden wir bei dCDLE und Herpes Zoster Patienten. Etwa 55% der zirkulierenden CD4+ T-Lymphozyten dieser Patientengruppe waren CCR4 positiv, während diese Zellsubpopulation bei der gesunden Kontrollgruppe nur einem Anteil von etwa 25% entsprach. Auch bei den anderen untersuchten Dermatosen zeigte sich zwar eine geringere, aber dennoch eine signifikant erhöhte Expression von CCR4 auf CD4+ T-Zellen. Demnach war die Prozentzahl von zirkulierenden CD4+ T-Lymphozyten, die CCR4 exprimieren, bei allen untersuchten Hauterkrankungen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Eine hoch signifikant erhöhte Expression von CCR4 auf CD8+ T-Lymphozyten fanden wir beim dCDLE. Knapp 60 % der zirkulierenden T-Zellen trugen den Chemokinrezeptor auf ihrer Oberfläche. Bei der Kontrollgruppe fanden wir nur etwa 10% CD8+ CCR4+ T-Lymphozyten im peripheren Blut. Ebenfalls erhöhte Werte der CCR4 Expression fanden wir bei SCLE und Herpes Zoster Patienten, die jedoch mit ca. 30 % CD8+ CCR4+ T-Zellen bei SCLE Patienten und ca. 25% CD8+CCR4+ T-Zellen bei Herpes Zoster Patienten deutlich geringer ausfielen, als bei dCDLE Patienten. Die übrigen untersuchten Patientenkollektive zeigten keine signifikant erhöhte Expression von CCR4 auf den untersuchten T-Zellen. Die höchste CCR4 Expression fanden wir demnach sowohl auf CD4+, als auch auf CD8+ T-Zellen bei dCDLE Patienten.

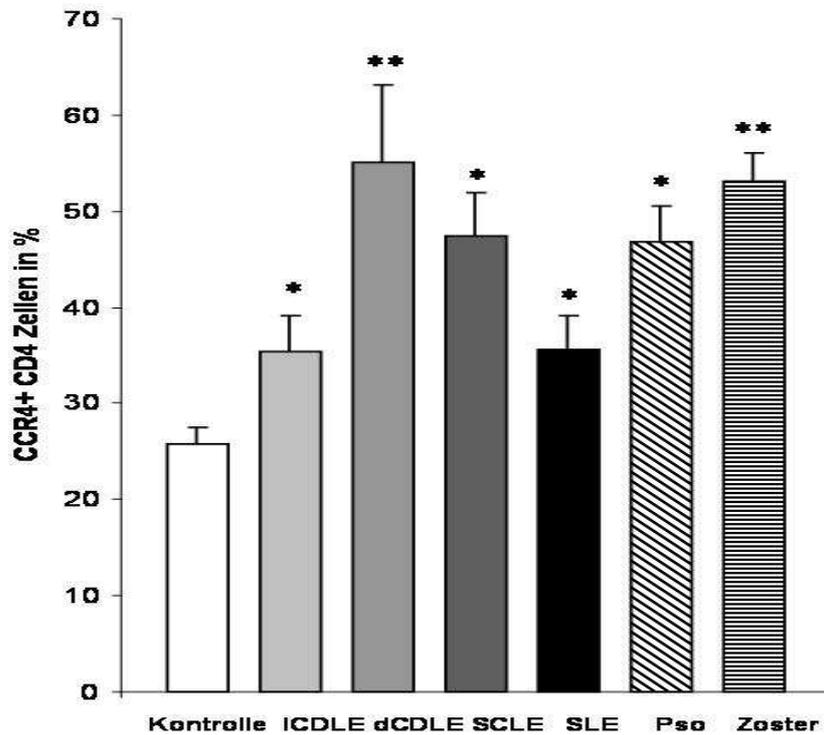


Abbildung 19: CCR4 (CC Chemokinrezeptor 4) Expression auf CD4+ T-Zellen in Prozent bei verschiedenen Lupus erythematoses Formen und Dermatosen. Die durchschnittliche Prozentzahl von CD4+ T-Lymphozyten, die CCR4 exprimieren wird angezeigt (* $p < 0.05$ = signifikant; ** $p < 0.01$ = hoch signifikant; ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, ICDLE = lokalisierter chronisch diskoider LE (Lupus erythematoses), dCDLE = disseminierter chronisch diskoider LE, SCLE = subakut kutaner LE, SLE = systemischer LE, Pso = Psoriasis, Zoster = Herpes Zoster).

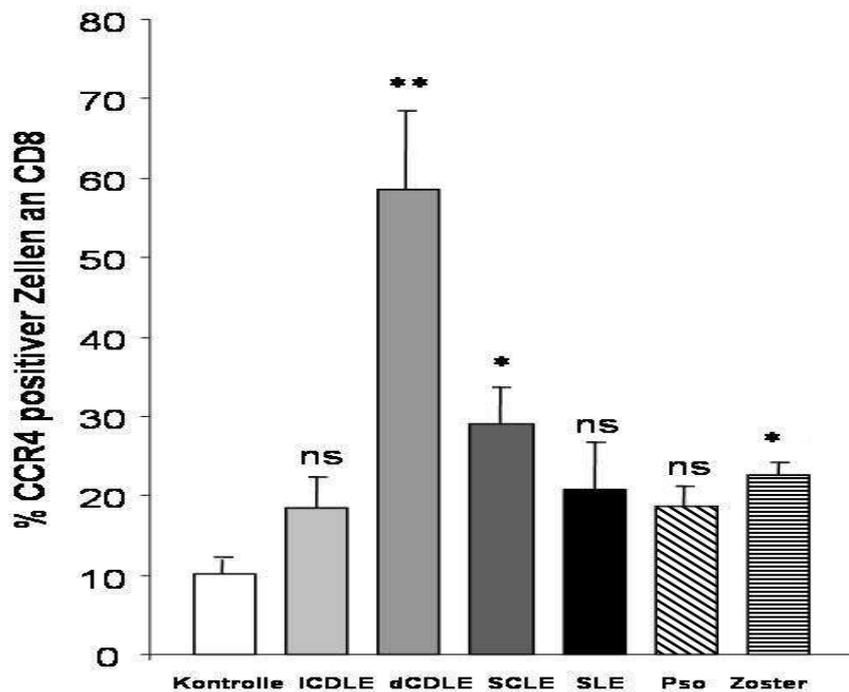


Abbildung 20: CCR4 (CC Chemokinrezeptor 4) Expression auf CD8+ T-Zellen in Prozent bei verschiedenen Lupus erythematodes Formen und Dermatosen. Die durchschnittliche Prozentzahl von CD8+ T-Lymphozyten, die CCR4 exprimieren wird angezeigt (* $p < 0.05$ = signifikant; ** $p < 0.01$ = hoch signifikant; ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, ICDLE = lokalisierter chronisch diskoider LE (Lupus erythematodes), dCDLE = disseminierter chronisch diskoider LE, SCLE = subakut kutaner LE, SLE = systemischer LE, Pso = Psoriasis, Zoster = Herpes Zoster).

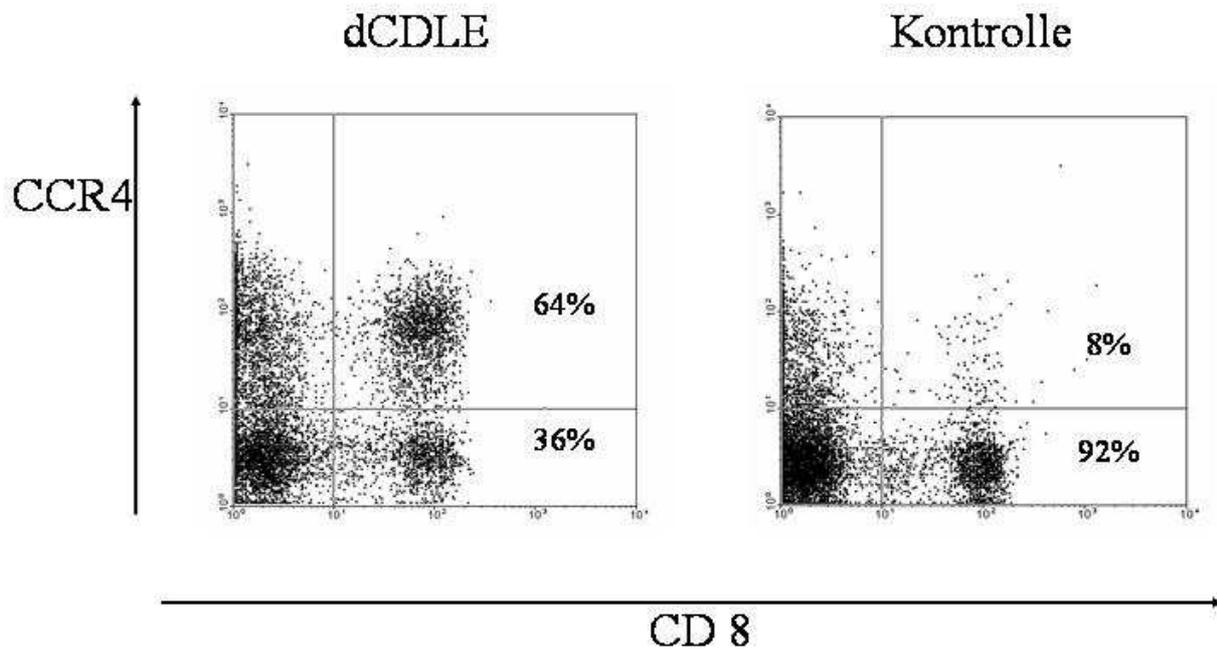


Abbildung 21: Diese Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis der Expression des CC-Chemokinrezeptors CCR4 auf CD8 positiven T-Zellen anhand einer Durchflußzytometrie. Das Ergebnis entspricht dem eines an disseminierten chronisch diskoiden Lupus erythematodes (dCDLE) erkrankten Patienten und der einer gesunden Kontrollperson. Bei einem Erkrankten entspricht der Anteil CD8+ CCR4+ T-Lymphozyten ca. 64 %, bei einem gesunden Probanden nur ca. 8%. Die Anzahl der CCR4+ CD8+ T-Lymphozyten eines LE Patienten ist somit hoch signifikant erhöht im Vergleich zu einem gesunden Probanden.

4.3. Erhöhter Serumspiegel des CCR4 Liganden TARC/CCL17

Da wir erhöhte Werte von CCR4 auf zirkulierenden Lymphozyten bei CLE Patienten fanden, untersuchten wir auch die Expression des CCR4 Liganden TARC/CCL17 von Lupus erythematodes Patienten im Serum mittels ELISA.

Wir fanden bei allen untersuchten LE-Formen einen signifikant erhöhten Serum TARC Spiegel im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Während der Serum TARC Spiegel bei gesunden Probanden etwa bei 150 mg/μl lag, fanden wir bei den untersuchten CLE-Subtypen Werte, die bei 350 mg/μl lagen und bei SLE mit etwa 450 mg/μl am höchsten TARC Serum Werte (Abbildung 22).

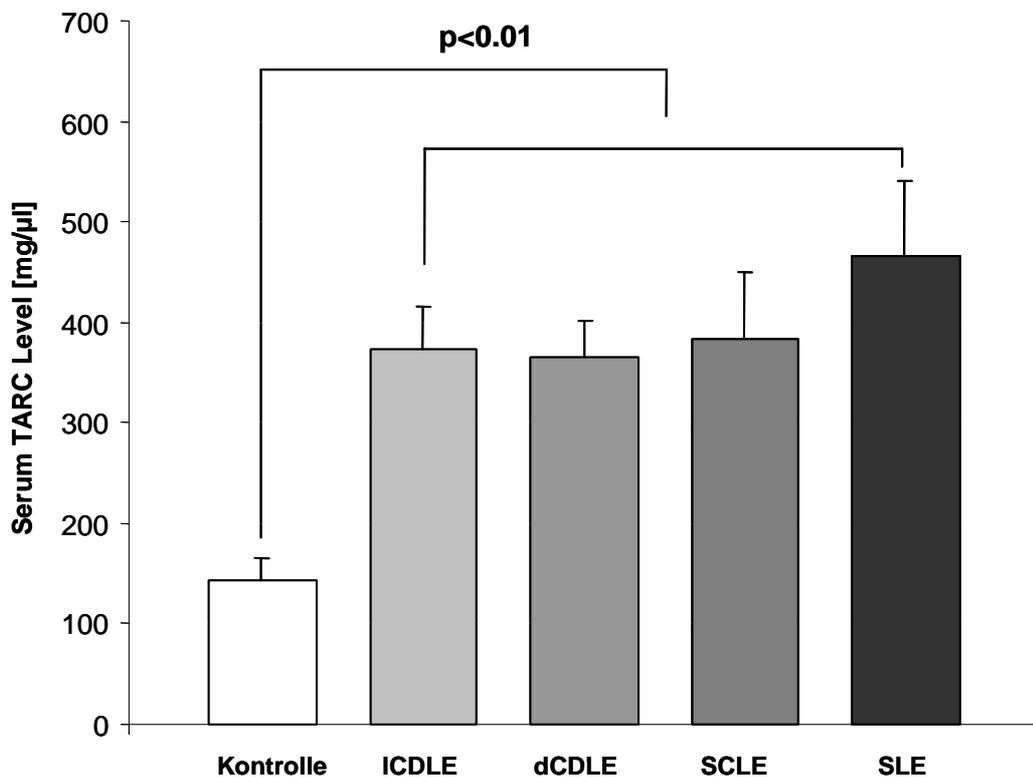


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Serum TARC (Thymus and Activation Regulated Chemokine) Level mittels ELISA (Enzyme Linked Immunsorbent Assay) bei verschiedenen Manifestationsformen des Lupus erythematodes (LE). Wir fanden erhöhte TARC/CCL17 Serumwerte bei allen untersuchten LE-Formen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (ICDLE = lokalisierter chronisch diskoider LE, dCDLE = disseminierter chronisch diskoider LE, SCLE = subakut kutaner LE, SLE = systemischer LE).

4.4. Erhöhte Anzahl zirkulierender CLA+ und CCR4+ T-Lymphozyten

Nachdem wir die Einzelexpression des Adhäsionsmoleküls CLA und des Chemokinrezeptors CCR4 auf T-Lymphozyten untersucht und dargestellt haben, interessierte uns zusätzlich die Coexpression der beiden Oberflächenmoleküle auf zirkulierenden T-Lymphozyten. Die Messung erfolgte auch hier mittels Durchflusszytometrie. Die Lymphozyten wurden zuvor aus dem peripheren Blut von Patienten/Probanden isoliert. Dabei wurden unterschiedliche Kollektive untersucht, die sich wie folgt zusammensetzten: lokalisierter chronisch diskoider LE (ICDLE) n=5, disseminierter chronisch diskoider LE (dCDLE) n=4, subakut kutaner LE (SCLE) n=11, systemischer LE (SLE) n=5, gesunde Kontrollgruppe n=5, Psoriasis n=5, Herpes Zoster n=5.

Verwendet wurden die monoklonalen Antikörper CLA FITC (HECA452), CCR4 PE (1G1), CD3 PE/PerCP (SK7), CD4 PerCP (SK3), CD8 FITC (SK1), CD8 PerCP (SK7), alle von BD Pharmingen™ (Abbildungen 23 und 24).

Eine signifikant erhöhte Zahl von T-Zellen, die sowohl CLA als auch CCR4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, fanden wir bei dCDLE und Psoriasis Patienten. Etwa 12% der CD4+ T-Zellen dieser beiden Patientengruppen waren auch Träger von CLA und CCR4. Im Vergleich dazu betrug die Zellpopulation der CD4+ CLA+ CCR4+ T-Lymphozyten bei der gesunden Kontrollgruppe nur ca. 5%. Die anderen untersuchten Patientengruppen zeigten keine signifikant erhöhten Werte dieser Zellpopulation.

Bei den CD8+ T-Lymphozyten fanden wir eine beeindruckend erhöhte Anzahl CCR4 und CLA positiver T-Zellen bei dCDLE Patienten. Fast 20 % der zirkulierenden CD8+ T-Lymphozyten exprimierten bei dieser Patientengruppe beide Moleküle auf ihrer Oberfläche. Ein wesentlich geringerer Prozentsatz von gerade 2% war bei der gesunden Kontrollgruppe positiv für die beiden Marker. Ebenfalls eine signifikante Erhöhung von CD8+ CLA+ CCR4+ T-Zellen fanden wir außerdem beim SCLE und der Psoriasis. Allerdings waren hier nur ca. 5 % der zirkulierenden CD8+ Lymphozyten auch CCR4 und CLA positiv. Die anderen untersuchten Gruppen zeigten keine erhöhten Werte.

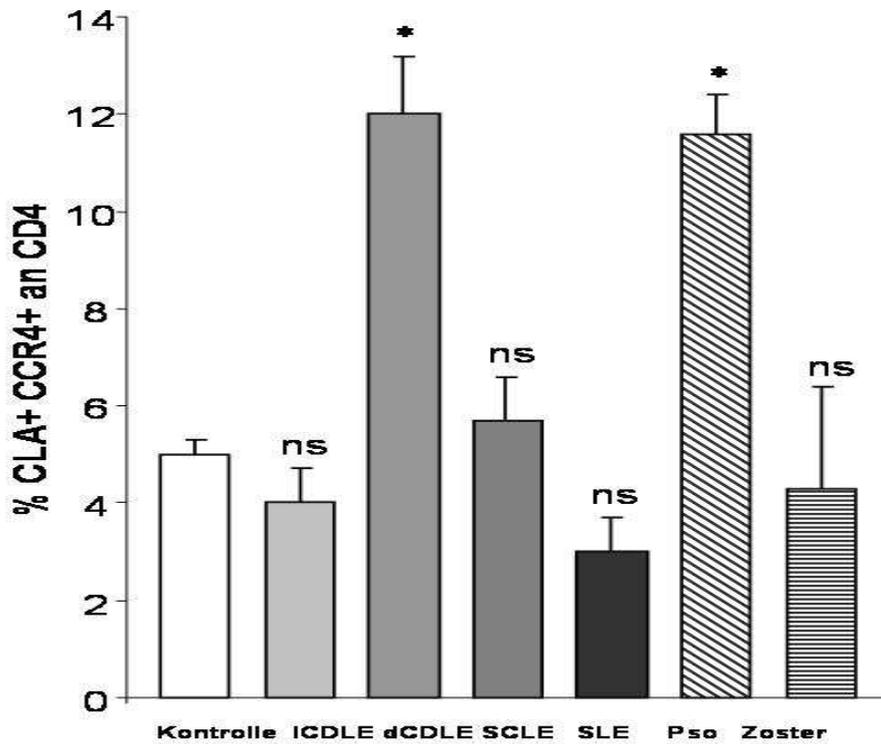


Abbildung 23: Expression von CLA (kutanes Lymphozyten Antigen) und CCR4 (CC Chemokinrezeptor) auf CD4+ T-Zellen in Prozent bei verschiedenen Lupus erythematodes Formen und Dermatosen. Die durchschnittliche Prozentzahl von CD4+ T-Lymphozyten, die CLA und CCR4 exprimieren, wird angezeigt (* $p < 0.05$ = signifikant; ** $p < 0.1$ = hoch signifikant; ns = nicht signifikant, ICDLE = lokalisierter chronisch diskoider LE (Lupus erythematodes), dCDLE = disseminierter chronisch diskoider LE, SCLE = subakut kutaner LE, SLE = systemischer LE, Pso = Psoriasis, Zoster = Herpes Zoster).

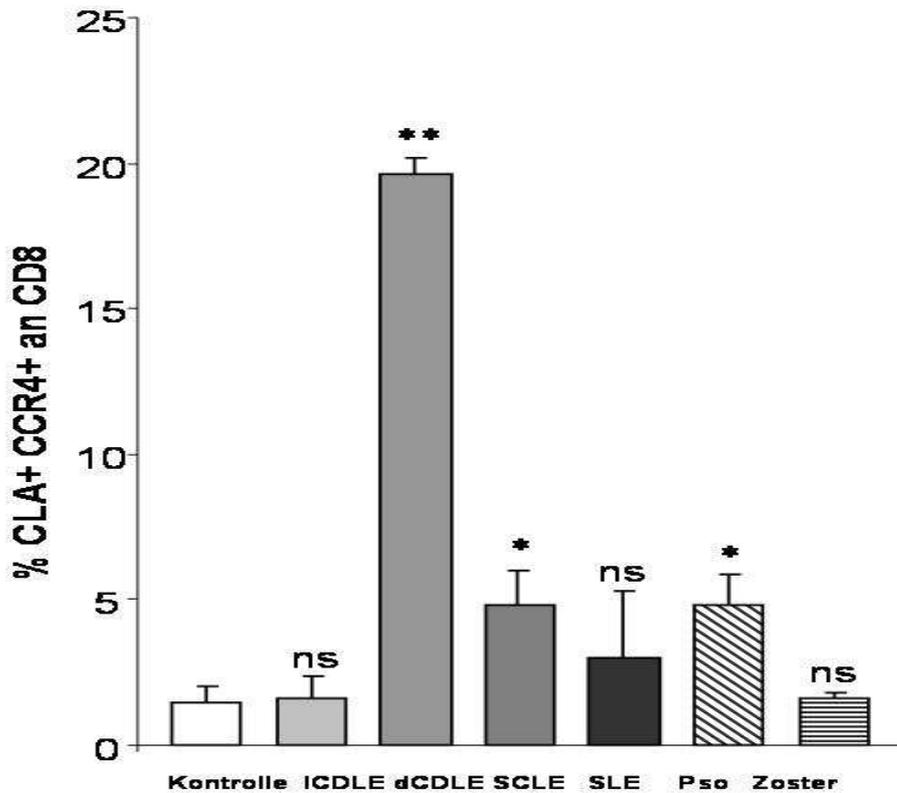


Abbildung 24: Expression von CLA (kutanes Lymphozyten Antigen) und CCR4 (CC-Chemokinrezeptor) auf CD8+ T-Zellen in Prozent bei verschiedenen Lupus erythematodes Formen und Dermatosen. Die durchschnittliche Prozentzahl von CD8+ T-Lymphozyten, die CLA und CCR4 exprimieren, wird angezeigt (* $p < 0.05$ = signifikant; ** $p < 0.01$ = hoch signifikant; ns = nicht signifikant, ICDLE = lokalisierter chronisch diskoider LE (Lupus erythematodes), dCDLE = disseminierter chronisch diskoider LE, SCLE = subakut kutaner LE, SLE = systemischer LE, Pso = Psoriasis, Zoster = Herpes Zoster).

4.5. Verminderte Anzahl zirkulierender CXCR3+ T-Lymphozyten

Wir untersuchten die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 auf zirkulierenden T-Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie. Die Lymphozyten wurden zuvor aus dem peripheren Blut von Patienten/Probanden isoliert. Dabei wurden unterschiedliche Kollektive untersucht, die sich wie folgt zusammensetzten: lokalisierter chronisch diskoider LE (ICDLE) $n=5$, disseminierter chronisch diskoider LE (dCDLE) $n=4$, subakut kutaner LE (SCLE) $n=11$, gesunde Kontrollgruppe $n=5$.

Verwendet wurden die monoklonalen Antikörper CXCR3 PE (1C6), CD3 PE/PerCP (SK7), CD4 PerCP (SK3), CD8 FITC (SK1), CD8 PerCP (SK7), alle von BD PharmingenTM.

Bei der gesunden Kontrollgruppe waren etwa 38 % der peripheren CD4+ T-Zellen CXCR3 positiv. Bei allen untersuchten Patientengruppen fanden wir eine verringerte Anzahl CD4+ CXCR3+ T-Zellen. Eine signifikante Reduktion der Expression von CXCR3 auf CD4+ T-Lymphozyten war beim dCDLE und beim SCLE zu beobachten. Nur etwa 22% der untersuchten T-Zellen dieser Patientengruppe exprimierten CD4 und CXCR3 auf ihrer Oberfläche. Diese beiden Lupus-Subtypen zeichnen sich durch eine extensive Hautbeteiligung aus.

Beim disseminierten narbenbildenden CDLE fanden wir eine stark erniedrigte Zahl von zirkulierenden CD8+ CXCR3+ T-Lymphozyten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Beim Kontrollkollektiv waren knapp 50 % der CD8+ T-Lymphozyten auch CXCR3+. Beim dCDLE exprimierten nur knapp 20 % der CD8+ T-Lymphozyten auch CXCR3 auf ihrer Oberfläche. Bei ICDLE und SCLE Patienten fanden wir keine signifikanten Abweichungen des Expressionsverhalten von CXCR3 auf CD8+ T-Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 25).

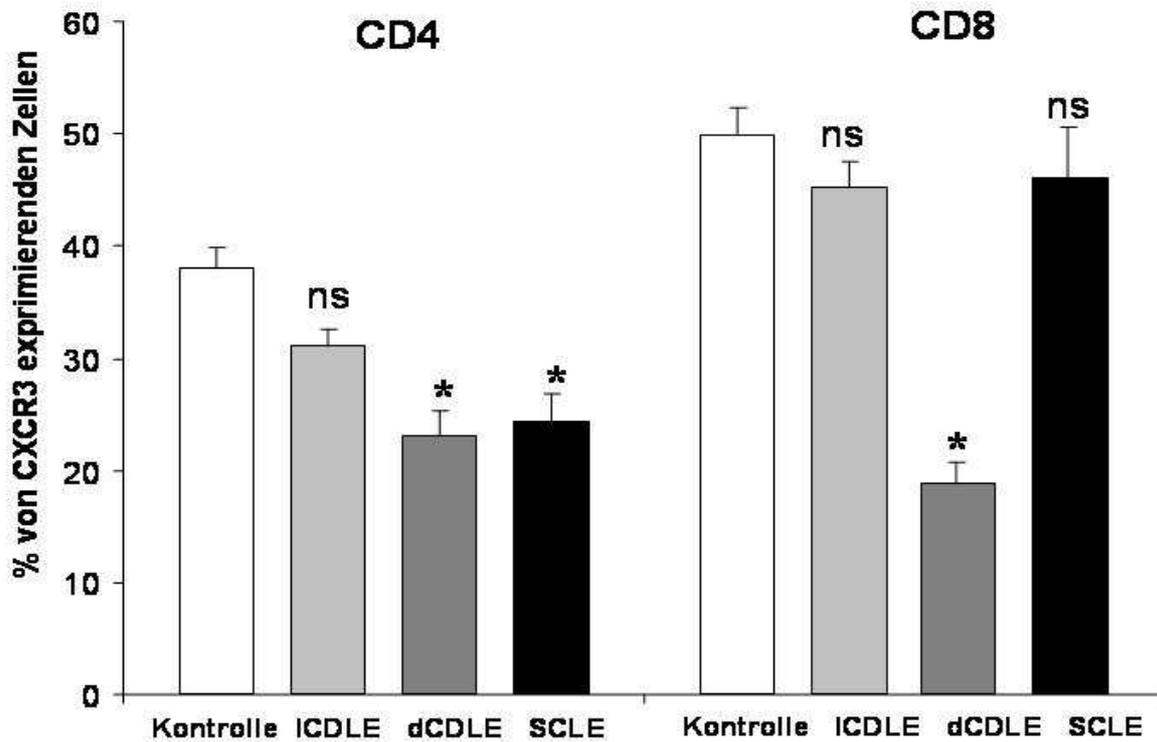


Abbildung 25: Expression von CXCR3 (CXC Chemokinrezeptor 3) auf CD4+ und CD8+ T-Zellen in Prozent bei verschiedenen Formen des Lupus erythematosus (LE). Die durchschnittliche Prozentzahl von CD4+ oder CD8+ T-Lymphozyten, die CXCR3 exprimieren, wird angezeigt (* $p < 0.05$ = signifikant; ns = nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe, ICDLE = lokalisierter chronisch diskoider LE, dCDLE = disseminierter chronisch diskoider LE, SCLE = subakut kutaner LE).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren auf peripheren T-Lymphozyten bei Lupus erythematodes Patienten untersucht. Als Methode verwendeten wir die Durchflußzytometrie, die einen besonderen Stellenwert bei der Analyse von peripheren Blutzellen und heute einen hohen diagnostischen Standard erreicht hat. Untersucht wurde die Expression des Adhäsionsmoleküls CLA und die des Chemokinrezeptors CCR4, der ein Vertreter der homöostatischen Rezeptoren ist, auf CD4+ und CD8+ zirkulierenden T-Zellen. Weiter untersuchten wir die Expression des Rezeptors CXCR3, der zu den proinflammatorischen Chemokinrezeptoren gezählt wird, ebenfalls auf CD4+ und CD8+ zirkulierenden T-Lymphozyten. Ergänzend untersuchten wir die Expression des CCR4 Liganden TARC/CCL17 im Serum von LE-Patienten mittels ELISA. Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine Rolle bei der Positionierung von Zellen des Immunsystems im Organismus indem sie die Zellmigration steuern.

Die Einwanderung von T-Lymphozyten in die Haut ist ein charakteristisches Zeichen des kutanen Lupus erythematodes. Diese Rekrutierung von Lymphozyten in die Haut ist ein sehr komplexer, noch nicht vollständig verstandener Vorgang. Wesentlich beteiligt sind Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Chemokinrezeptoren. Vor diesem Hintergrund erfolgten die Untersuchungen der vorbeschriebenen Lymphozytensubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker und Chemokinrezeptoren. Uns interessierte, ob diese Marker verändert auf zirkulierenden T-Lymphozyten exprimiert werden und möglicherweise eine Rolle bei der Migration von T-Lymphozyten an den Ort der lokalen Entzündung spielen.

In unseren Ergebnissen zeigte sich eine starke Expression der „Skin Homing“ Moleküle CLA und CCR4 auf zirkulierenden T-Lymphozyten bei den kutanen Formen des Lupus erythematodes. Es gab bislang noch keine Studien, die die Bedeutung von CCR4 und CLA auf peripheren T-Zellen beim kutanen Lupus erythematodes aufzeigten.

5.1. Zirkulierende CLA+ T-Lymphozyten bei CLE- Patienten

CLA ist ein Oberflächenmolekül, das von T-Lymphozyten, die sich in der Haut befinden, exprimiert wird. Untersuchungen ergaben, dass etwa 90 % der Hautlymphozyten CLA positiv sind. Der Anteil CLA positiver T-Zellen im peripheren Blut ist bei gesunden Probanden sehr gering. (Homey et al., 2002; Picker et al., 1990). Uns interessierte, ob die Anzahl zirkulierender CLA+ T-Lymphozyten bei CLE Patienten verändert ist.

Unsere Untersuchungen zeigten signifikant erhöhte Werte von CD4+ CLA+ T-Lymphozyten bei Patienten mit dCDLE und Psoriasis im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv. Die höchsten Werte fanden wir jedoch bei der Zellpopulation CD8+ CLA+ T-Lymphozyten beim dCDLE, gering signifikant erhöhte Werte dieser Zellpopulation beim SCLLE und der Psoriasis.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl CD4 positive T-Zellen, als auch CD8 positive T-Zellen CLA auf ihrer Oberfläche exprimieren. Interessanterweise konnten wir bei fast 25% der CD8 T-Zellen bei dCDLE Patienten CLA auf der Oberfläche nachweisen.

Wir glauben, dass CLA ein wichtiger Marker für die Migration von T-Zellen in die Haut ist. Bei verschiedenen anderen Erkrankungen wurde diese Bedeutung von CLA bereits eindeutig belegt. Es konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der T-Lymphozyten in der Haut bei Patienten mit Atopischer Dermatitis, Psoriasis und Lichen Planus tatsächlich CLA positiv waren (Nakamura et al., 1998).

Wir glauben, dass sich diese Beobachtungen auf den kutanen LE übertragen lassen und dass CLA auch bei dieser Erkrankung ein wichtiges Molekül für die Lymphozytenmigration ist. Unsere Ergebnisse zeigten eine erhöhte Anzahl CLA+ T-Lymphozyten bei Patienten mit einer akuten Exazerbation des CLE nicht nur, wie bereits bekannt, auf T-Lymphozyten in der Haut, sondern auch auf zirkulierenden T-Lymphozyten. Vor allem der disseminierte chronisch diskoide LE ist gekennzeichnet durch eine hohe Prozentzahl CD8+ CLA+ T-Lymphozyten. Der dCDLE manifestiert sich klinisch mit einer starken Hautbeteiligung in Form von vernarbenden Hautläsionen und einer histologisch nachweisbaren starken Infiltration von T-Zellen in der Haut. Diese Beobachtungen bestärken unsere Hypothese, dass CLA beim kutanen Lupus erythematodes und hier insbesondere bei Formen, die mit einer starken Hautbeteiligung

einhergehen, ein wichtiges Oberflächenmolekül ist. Wir sehen anhand unserer Ergebnisse unsere Hypothese bestätigt, dass das Adhäsionsmolekül CLA möglicherweise bei der Migration von T-Zellen aus Blutgefäßen in läsionale Haut auch bei CLE Patienten eine wichtige Rolle spielt.

5.2. Zirkulierende CCR4+ T-Lymphozyten bei dCDLE Patienten

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir weiterhin die Expression des Chemokinrezeptors CCR4 auf peripheren CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten ebenfalls mittels Durchflußzytometrie und die Verteilung des CCR4 Liganden TARC/CCL17 mittels ELISA im Serum von Patienten mit verschiedenen Manifestationen des LE.

Wir stellten uns die Frage, ob CCR4 und sein Ligand TARC/CCL17 bei CLE Patienten bei der Migration von T-Zellen aus peripheren Blutgefäßen in läsionale Haut beteiligt sind. Wir vermuteten eine erhöhte Expression von CCR4 auf zirkulierenden T-Lymphozyten beim CLE und zwar insbesondere bei Patienten, die ausgeprägte Hautläsionen aufweisen. Unsere Hypothese war, dass die Produktion von TARC/CCL17 und die Expression von CCR4 auf T-Lymphozyten einen biologischen Amplifikationsmarker darstellen, um die Immunantwort in Hautläsionen des CLE anzuleiten.

Wir fanden eine signifikant erhöhte Anzahl CD4+ CCR4+ T-Lymphozyten bei allen untersuchten Dermatosen, die besonders deutlich bei dCDLE und Herpes Zoster Patienten auffiel. Bei den dCDLE Patienten fanden wir ein besonders hervorzuhebendes Ergebnis mit einer beeindruckend erhöhte Subpopulation CD8+ CCR4+ T-Zellen. Fast 60% der untersuchten CD8+ T-Zellen exprimierten CCR4 auf ihrer Oberfläche. Um die pathogenetische Relevanz der CCR4 Expression auf T-Lymphozyten zu bestätigen, untersuchten wir zusätzlich die Anwesenheit des CCR4 Liganden TARC/CCL17 im Serum von CLE Patienten. Wir fanden eine signifikante Erhöhung der TARC Serum Werte ($p < 0.05$) bei allen untersuchten LE Subtypen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Eine mögliche pathogenetische Rolle von CCR4+ T-Zellen ist bei anderen entzündlichen Dermatosen bereits diskutiert worden. Frühere Studien konnten belegen, dass CCR4 und sein Ligand TARC bei verschiedenen Dermatosen ein wichtiges Chemokin-Chemokinrezeptorpaar für die chemotaktische Migration von T-Zellen in die Haut sind. Nakatani et al zeigten, dass CCR4 auf zirkulierenden CD4+ T-Lymphozyten bei Patienten mit atopischer Dermatitis und Psoriasis in erhöhtem Maß exprimiert wird (Nakatani et al., 2001). Die verstärkte Expression des Chemokinrezeptors korreliert bei der Psoriasis mit der Erkrankungsaktivität. Der Chemokinrezeptor CCR4 wurde auch beim systemischen Lupus erythematoses untersucht. Hase et al konnten beim SLE, der ebenfalls mit einer kutanen Beteiligung einhergeht, eine erhöhte Expression von CCR4 auf CD4+ T-Lymphozyten aufzeigen (Hase et al., 2001). Wenzel et al beschäftigten sich mit der Expression des CCR4 Liganden TARC/CCL17 und fanden eine starke Expression des Chemokins in Hautläsionen bei CLE Patienten (Wenzel et al., 2005b). Wir glauben, dass CCR4 nicht nur am kontinuierlichen Lymphozytenfluss im Sinne eines homöostatischen Chemokinrezeptors beteiligt ist, sondern auch im Rahmen eines Entzündungsgeschehens ein wichtiger Marker ist, um T-Zellen bei CLE Patienten in die Haut zu leiten. Aufgrund unserer Ergebnisse vermuten wir, dass der Chemokinrezeptor CCR4 zusammen mit dem korrespondierenden Chemokin TARC/CCL17 eine wichtige Rolle beim CLE spielt. Der Ligand TARC/CCL17 wird verstärkt in CLE Hautläsionen exprimiert, wodurch sich ein Chemokingradient aufbaut. Dieser Chemokingradient ermöglicht es zirkulierenden CCR4 positiven T-Lymphozyten zum Ort der Entzündung in der Haut geleitet zu werden. Wir vermuten, dass die erhöhten TARC Serumwerte ein Ausschwemmen des Chemokins aus der Haut in die Blutgefäße widerspiegelt. Wir sehen unsere Hypothese anhand unserer Ergebnisse bestätigt, dass die Produktion von TARC und die Expression von CCR4 auf T-Zellen möglicherweise einen wichtigen biologischen Verstärkungsmechanismus anzeigen, der entzündliche Antworten beim CLE einleitet. Dies findet vermutlich zum Zeitpunkt der akuten Entzündung statt, in der sich viele Hautläsionen manifestieren. Wir verwendeten in unserer Arbeit ausschließlich Blut von Patienten, die an einer akuten Exazerbation ihrer Erkrankung litten. Besonders hervorzuheben ist die signifikant erhöhte Anzahl CD8+ CCR4+ T-Zellen bei Patienten mit dCDLE, die unter einer starken Hautbeteiligung leiden. Wir glauben, dass diese

Zellen möglicherweise die Expansion von zytotoxischen T-Lymphozyten reflektieren, die verantwortlich ist für die disseminierten narbigen Hautläsionen beim dCDLE.

5.3. Zirkulierende CD8+ CLA+ CCR4+ T-Lymphozyten bei CLE Patienten

Im Folgenden wurde die Coexpression von CLA und CCR4 auf zirkulierenden CD4+ und CD8+ T- Lymphozyten mittels Durchflußzytometrie untersucht. Wir fanden eine Subpopulation von CD8+ CLA+ CCR4+ T-Lymphozyten, die insbesondere bei Patienten mit einem narbigen disseminierten CDLE deutlich signifikant erhöht waren.

Kürzlich berichteten Dudda et al über Rekrutierungsmechanismen, die eine wesentliche Rolle für die Haut spezifische T-lymphozytäre Entzündungsreaktion spielen könnten (Dudda et al., 2004). Die Autoren konnten zeigen, dass die intrakutane, aber nicht die intravasale Injektion von haptengebundenen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark spezifische CD8+ T-Zellen induzieren kann. Diese zytotoxischen CD8+ T-Zellen exprimierten E-Selektin bindende Moleküle (das Maus-Äquivalent für CLA) sowie CCR4 und waren verantwortlich für Effektor-Funktionen bei kutanen Kontaktallergien. Die Autoren vermuteten, dass dies eine entscheidende Bedeutung für die Mikrostruktur der Haut hat. Außerdem soll es für die Anleitung von T-Zellen zum gewebespezifischen „Homing“ durch antigenpräsentierende dendritische Zellen bedeutend sein (Dudda et al., 2004).

Auch wir vermuten, dass beim kutanen Lupus erythematodes dendritische Zellen aus der Haut als antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Rolle spielen. Wir glauben, dass diese Zellen mit apoptotischen Keratinozyten beladen sind und induziert durch UV Irritationen antigenspezifische T-Zellen stimulieren, die CLA und CCR4 auf ihrer Oberfläche tragen. Durch diese Oberflächenmoleküle erhalten die T-Lymphozyten möglicherweise die Fähigkeit, in die entzündliche Haut zu gelangen. Aufgrund der erhöhten Anzahl CD8+ CLA+ CCR4+ T-Zellen bei dCDLE Patienten hypothetisieren wir, dass diese Zellpopulation bei der spezifischen zytotoxischen Destruktion von epidermalen Strukturen und Adnexstrukturen, wie sie beim narbigen dCDLE vorkommen, beteiligt ist. Die lokale Expression von Adhäsionsmolekülen und

Chemokinen wie E-Selektin und TARC/CCL17 unterstützt die Anlockung von diesen aktivierten T-Lymphozyten in die Hautläsionen des CLE. Dies kann vielleicht die überwiegend Haut-orientierte Entzündungsreaktion beim CLE erklären, genauso wie die starke Expression der „Skin-Homing“ Faktoren CLA und CCR4, die sowohl in der Haut, als auch, wie unsere Ergebnisse zeigen, im Blut von CLE Patienten gefunden wird.

5.4. Bedeutung inflammatorischer Chemokinrezeptoren

Ein zentrales Zeichen vieler entzündlicher Hauterkrankungen ist die Einwanderung von T-Lymphozyten in die Dermis und Epidermis. Die Mehrzahl der entsprechenden Krankheitsbilder ist hinsichtlich der Zusammensetzung des Entzündungsinfiltrates und des histologischen Erscheinungsbildes gut charakterisiert. Es ist bisher jedoch wenig über die Mechanismen bekannt, die zu einer Rekrutierung der spezifischen Lymphozytenpopulationen in die Haut führen. Dies gilt insbesondere für nicht infektiöse, autoimmune Erkrankungen der Haut. Der kutane Lupus erythematodes ist der Prototyp einer solchen lymphozytären Autoimmunkrankheit. Die Mechanismen, die für die Migration von Lymphozyten in die Haut verantwortlich sind, waren lange Zeit unklar.

Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit die Expression des inflammatorischen Chemokinrezeptors CXCR3 auf zirkulierenden CD4 und CD8 positiven T-Lymphozyten bei CLE Patienten mittels Durchflußzytometrie. Interessanterweise war die Zahl CXCR3 exprimierender CD4+ T-Lymphozyten im peripheren Blut bei Patienten mit einer akuten Exazerbation des SCLE und dCDLE im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Knapp 40 % der zirkulierenden CD4+ T-Zellen der gesunden Kontrollgruppe exprimierten den Chemokinrezeptor CXCR3, bei dCDLE und SCLE Patienten fanden wir nur knapp 25 % CD4+ CXCR3+ T-Lymphozyten im peripheren Blut. Besonders auffällig war die reduzierte Expression von CXCR3 auf zirkulierenden CD8 positiven T-Zellen bei Patienten, die an einem disseminierten chronisch diskoiden LE erkrankt waren. Wir glauben, dass unsere Ergebnisse die Rekrutierung von CXCR3+ Lymphozyten aus dem zirkulierenden Blut in läSIONALE Haut bei CLE Patienten widerspiegeln.

Schon seit geraumer Zeit ist bekannt, dass CXCR3 ein Zelloberflächen-Chemokinrezeptor ist, der hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, die entzündliches Gewebe infiltrieren (Sallusto et al., 1998). Studien konnten zeigen, dass CXCR3 und sein korrespondierender Ligand IP10/CXCL10 eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Erkrankungen und autoimmunen Reaktionen spielen (Segeer et al., 2004). Deswegen wird CXCR3 zu den inflammatorischen Chemokinrezeptoren gerechnet.

Es wird vermutet, dass die Interaktion zwischen CXCR3+ T-Lymphozyten und IP10/CXCL10 beim SLE zu Gewebsschäden führt (Amoura et al., 2003; Segeer et al., 2004). Interessanterweise konnte auch beim chronisch diskoiden LE eine Relevanz des inflammatorischen Chemokins IP10/CXCL10 festgestellt werden. Flier et al fanden in histologischen Schnitten eine erhöhte Expression von IP10/CXCL10 mRNA in CDLE Läsionen (Flier et al., 2001).

Wir stellten uns die Frage, welche proinflammatorischen Faktoren für die Entzündungsreaktion verantwortlich sein könnten, die beim CLE zu einer Lymphozytenrekrutierung in die Haut führen. Farkas et al untersuchten mit Hilfe von histologischen Schnitten Hautläsionen von LE-Patienten und stellten dabei die Akkumulation eines besonderen Zelltyps fest, der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC). Diese Zellen konnten als Hauptproduzenten des natürlichen Interferons identifiziert werden konnte (Farkas et al., 2001). Marschner et al beschäftigten sich ebenfalls mit diesem Zelltyp und konnten herausfinden, dass eine Stimulation dieser plasmazytoiden dendritischen Zellen durch Komplexe aus anti-DNA-Antikörpern und DNA im Plasma von Patienten mit Lupus erythematodes für die erhöhte IFN- α Produktion verantwortlich ist (Marschner et al., 2005). Patienten mit einer akuten Exazerbation des kutanen LE zeigen die typischen Zeichen einer kräftigen Typ I IFN Produktion. Dazu gehören klinische Zeichen wie Fieber, Abgeschlagenheit, Arthralgie und Myalgie (Ronblom und Alm 2001). Es ließen sich erhöhte IFN-Level beim akuten LE sowohl im Serum als auch in Hautläsionen nachweisen (Fah et al., 1995; Ytterberg und Schnitzer 1982). Interferon alpha gehört zu den inflammatorischen Botenstoffen, sie können Th1 basierte Immunantworten verstärken. Aktuelle Publikationen zeigen, dass Typ I IFN die lokale T-zelluläre Inflammation anleiten können (Wenzel et al., 2005c). Typ I Interferone sind in der Lage, viele Cytokine zu induzieren, einschließlich das Interferon

induzierte Protein 10 (IP10/CXCL10) (Clark-Lewis et al., 2003). IP10 kann T-Zellen, die den Chemokinrezeptor CXCR3 exprimieren, in die Haut rekrutieren.

Unsere Hypothese lautet, dass die lokale IFN-Produktion durch plasmazytoide dendritische Zellen beim kutanen LE zu einer Expression zahlreicher Chemokine und Zytokine führt. Dies führt möglicherweise auch zu einer Induktion von IP10/CXCL10 und somit zu einem Aufbau eines Chemokingradienten in der Haut, wodurch eine Rekrutierung von CXCR3+ T-Lymphozyten in die läsionale Haut ermöglicht wird. Nachdem Flier et al eine erhöhte Expression von IP10/CXCL10 in CDLE Hautläsionen nachweisen konnten, gelang es Wenzel et al 2005 eine Akkumulation des entsprechenden Chemokinrezeptors CXCR3 auf T-Lymphozyten in der Haut von CLE Patienten nachzuweisen (Flier et al. 2001, Wenzel et al. 2005c). Wir glauben, dass die reduzierte Zahl CXCR3+ T-Lymphozyten bei CLE Patienten die Rekrutierung von CXCR3+ Lymphozyten aus dem zirkulierenden Blut in die Haut widerspiegeln. Unterstützt wird diese Vermutung durch die bereits erwähnte Akkumulation von CXCR3 positiven Zellen in entzündlicher Haut bei CLE Patienten. In unseren Ergebnissen zeigte sich die reduzierte Anzahl CXCR3 positiver T-Zellen insbesondere beim chronisch diskoiden LE und beim subakut kutanen LE. Diese beiden CLE Subtypen sind durch ausgeprägte Hautläsionen gekennzeichnet, was eine starke Rekrutierung von T-Lymphozyten in die läsionale Haut anzeigt. Wir vermuten, dass T-Lymphozyten über den inflammatorischen Chemokinrezeptor CXCR3 auf ihrer Oberfläche und angelockt durch das entsprechende Chemokin IP10/CXCR10, das sich verstärkt in entzündlichen Hautläsionen exprimiert wird, in die Haut rekrutiert werden. Dementsprechend kann während einer akuten Exazerbation der Erkrankung eine Reduktion von CXCR3+ T-Zellen im peripheren Blut beobachtet werden.

Besonders beeindruckend war die deutlich signifikante Reduktion von CD8+ CXCR3+ T-Zellen bei dCDLE Patienten. Wir glauben, dass dieses Ergebnis die spezifische Rekrutierung von zytotoxischen CD8+ CXCR3+ T-Zellen aus dem Blut in die Hautläsionen reflektiert. Bestärkt wird unsere Vermutung durch die klinische Manifestation des CDLE mit disseminierten narbigen Hautläsionen, die möglicherweise durch genau diese Zellpopulation hervorgerufen wird.

6. Zusammenfassung

Der kutane Lupus erythematoses ist eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung der Haut mit unklarer Ätiologie. Die Erkrankung umfasst verschiedene Subtypen mit variablem Verlauf und zeigt eine große Vielfalt von klinischen Manifestationen. Hautinfiltrierende T-Zellen scheinen eine wichtige Rolle zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Faktoren untersucht, die an der Einwanderung von Lymphozyten in die Haut beteiligt sind. Wir verwendeten Material in Form von PBMC („Peripheral Blood Mononuclear Cells“) von 25 Lupus erythematoses Patienten mit verschiedenen Manifestationen der Erkrankung.

Wir untersuchten die Expression des Adhäsionsmoleküls CLA, des homöostatischen Chemokinrezeptors CCR4 und des inflammatorischen Chemokinrezeptors CXCR3 auf CD4 und CD8 positiven T-Zell-Populationen mittels Durchflußzytometrie. Zusätzlich untersuchten wir das Vorkommen des CCR4 Liganden TARC/CCL17 im Serum von CLE Patienten mittels ELISA.

Wir fanden eine signifikant erhöhte Anzahl zirkulierender CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, die CLA und CCR4 exprimierten, bei dCDLE-Patienten, einer Patientengruppe, die unter ausgeprägten vernarbenden Hautläsionen leidet. Weiter beobachteten wir eine signifikante Erhöhung der TARC/CCL17 Serum Werte bei allen untersuchten LE Subtypen. Die Anzahl zirkulierender CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, die den Chemokinrezeptor CXCR3 auf ihrer Oberfläche exprimierten, war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bei Patienten mit SCLE und dCDLE signifikant reduziert.

Wir glauben aufgrund unserer Ergebnisse, dass die Marker CLA und CCR4 zusammen mit dem korrespondierenden Chemokin TARC/CCL17 eine wichtige Rolle für das „Skin Homing“ und somit für die Rekrutierung von T-Zellen in entzündliche Hautläsionen des CLE haben. Bei anderen entzündlichen Hauterkrankungen wie der Atopischen Dermatitis ist bekannt, dass CCR4 und TARC für die Rekrutierung von T-Lymphozyten eine Rolle spielen. Wir vermuten, dass die beiden Moleküle auch beim CLE für die Lymphozytenrekrutierung relevant sind. Studien haben belegt, dass das Chemokin TARC/CCL17 verstärkt in CLE-Läsionen exprimiert wird. Die erhöhten TARC Serum Werte spiegeln möglicherweise ein Ausschwemmen des Chemokins aus läsionaler Haut in das Blutsystem wider.

Die reduzierte Anzahl zirkulierender CXCR3+ T-Zellen könnte die Rekrutierung von Lymphozyten via CXCR3 aus dem Blut in läsionale Haut anzeigen. In Hautläsionen von LE-Patienten akkumulieren plasmazytoide dendritische Zellen, die kürzlich als die hauptsächlichsten natürlichen Interferon produzierenden Zellen identifiziert wurden. Wir vermuten, dass beim CLE eine Typ I Interferon induzierte Entzündungsreaktion stattfindet, die eine verstärkte Produktion von inflammatorischen Chemokinen wie IP10/CXCL10 induziert. Es baut sich ein Chemokingradient auf, der zu einer Rekrutierung von CXCR3 positiven T-Lymphozyten in die Haut führt. Daher lässt sich zum Zeitpunkt einer akuten Inflammation eine Reduktion von CXCR3+ T-Lymphozyten im peripheren Blut messen.

Ein weiteres und besseres Verstehen der Lymphozytenrekrutierung beim CLE könnte zur Optimierung der vorhandenen Strategien oder zur Entdeckung neuer Strategien beim therapeutischen Vorgehen gegen den CLE führen.

7. Publikationsliste

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in die folgenden Publikationen mit eingegangen:

Wenzel J, Henze S, Worenkamper E, Basner-Tschakarjan E, Sokolowska-Wojdylo M, Steitz J, Bieber T, Tuting T

Role of the chemokine receptor CCR4 and its ligand thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17 for lymphocyte recruitment in cutaneous lupus erythematosus.
J Invest Dermatol 2005 ;124: 1241-1248.

Wenzel J, Worenkamper E, Freutel S, Henze S, Haller O, Bieber T, Tuting T.

Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus.
J Pathol 2005; 205: 435-442.

Sonstige Publikation:

Wenzel J, Henze S, Braehler S, Bieber T, Tuting T.

The expression of human leukocyte antigen-DR and CD25 on circulating T cells in cutaneous lupus erythematosus and correlation with disease activity.
Exp Dermatol 2005;14: 454-459.

8. Quellen

Akdis M, Klunker S, Schliz M, Blaser K, and Akdis CA. Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on human CD4(+) and CD8(+) Th2 cells. *Eur J Immunol* 2000, 30: 3533-3541

Amoura Z, Combadiere C, Faure S, Parizot C, Miyara M, Raphael D, Ghillani P, Debre P, Piette JC, and Gorochov G. Roles of CCR2 and CXCR3 in the T cell-mediated response occurring during lupus flares. *Arthritis Rheum* 2003, 48: 3487-3496

Andrew DP, Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y, Murphy K, Campbell JJ, Butcher EC, and Wu L. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J Immunol* 2001, 166: 103-111

Bacman D, Ostendorf B, Megahed M, Ruzicka T, Schneider M, and Kuhn A. [Bullous systemic lupus erythematosus]. *Hautarzt* 2004, 55: 392-395

Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001, 250: 91-104

Bauer R and Bohm I. Flow cytometry in dermatology. *Hautarzt* 1996, 47: 561-578

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

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

Bonsmann G, Schiller M, Luger TA, and Stander S. Terbinafine-induced subacute cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 2001, 44: 925-931

Campbell JD and HayGlass KT. T cell chemokine receptor expression in human Th1- and Th2-associated diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000, 48: 451-456

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

Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, and Loetscher P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* 2003, 278: 289-295

Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG, and Gilkeson GS. Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998, 41: 1714-1724

Dudda JC, Simon JC, and Martin S. Dendritic cell immunization route determines CD8+ T cell trafficking to inflamed skin: role for tissue microenvironment and dendritic cells in establishment of T cell-homing subsets. *J Immunol* 2004, 172: 857-863

Fabbi P, Cardinali C, Giomi B, and Caproni M. Cutaneous lupus erythematosus: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 2003, 4: 449-465

Fah J, Pavlovic J, and Burg G. Expression of MxA protein in inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem* 1995, 43: 47-52

Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, and Jahnsen FL. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 2001, 159: 237-243

Ferenczi K, Fuhlbrigge RC, Pinkus J, Pinkus GS, and Kupper TS. Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2002, 119: 1405-1410

Flier J, Boorsma DM, van Beek PJ, Nieboer C, Stoof TJ, Willemze R, and Tensen CP. Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J Pathol* 2001, 194: 398-405

Fotoarchiv der Klinik und Poliklinik für Dermatologie Universitätsklinik Bonn, 2006

Furukawa F, Kashihara-Sawami M, Lyons MB, and Norris DA. Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J Invest Dermatol* 1990, 94: 77-85

Gouldson P, Dean MK, Snell CR, Bywater PR, Gkoutos G, Reynold CA. Lipid-facing correlated mutations and dimerization in G-protein coupled receptors. *Protein Eng.* 2001, 14:759-67.

Hase K, Tani K, Shimizu T, Ohmoto Y, Matsushima K, and Sone S. Increased CCR4 expression in active systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol* 2001, 70: 749-755

Hess E. Drug-related lupus. *N Engl J Med* 1988, 318: 1460-1462

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997, 40: 1725

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

- Inaoki M, Sato S, Shirasaki F, Mukaida N, and Takehara K. The frequency of type 2 CD8+ T cells is increased in peripheral blood from patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Immunol* 2003, 23: 269-278
- Janeway CA, Jr. and Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002, 20: 197-216
- Jones SM, Dixey J, Hall ND, and McHugh NJ. Expression of the cutaneous lymphocyte antigen and its counter-receptor E-selectin in the skin and joints of patients with psoriatic arthritis. *Br J Rheumatol* 1997, 36: 748-757
- Kallinich T, Muche JM, Qin S, Sterry W, Audring H, and Kroczeck RA. Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 2003, 121: 1045-1052
- Kuhn A, Sonntag M, Richter-Hintz D, Oslislo C, Megahed M, Ruzicka T, and Lehmann P. Phototesting in lupus erythematosus tumidus--review of 60 patients. *Photochem Photobiol* 2001, 73: 532-536
- Lawrence MB and Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991, 65: 859-873
- Leung DY, Gately M, Trumble A, Ferguson-Darnell B, Schlievert PM, and Picker LJ. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995, 181: 747-753
- Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, and Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1995, 182: 1301-1314
- Liesegang TJ. Herpes zoster virus infection. *Curr Opin Ophthalmol* 2004, 15: 531-536
- Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E, and Moser B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 1998, 28: 3696-3705
- Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, and Moser B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 1996, 184: 569-577
- Marschner A, Rothenfusser S, Hornung V, Prell D, Krug A, Kerkmann M, Wellisch D, Poeck H, Greinacher A, Giese T, Endres S, and Hartmann G. CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005, 35: 2347-2357
- Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, Orozco R, Copeland NG, Jenkins NA, McEvoy LM, and Zlotnik A. CTACK, a skin-associated chemokine that

preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96: 14470-14475

Moser JM, Altman JD, and Lukacher AE. Antiviral CD8+ T cell responses in neonatal mice: susceptibility to polyoma virus-induced tumors is associated with lack of cytotoxic function by viral antigen-specific T cells. *J Exp Med* 2001, 193: 595-606

Nakamura K, Yasaka N, Asahina A, Kato M, Miyazono K, Furue M, and Tamaki K. Increased numbers of CD68 antigen positive dendritic epidermal cells and upregulation of CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) expression on these cells in various skin diseases. *J Dermatol Sci* 1998, 18: 170-180

Nakatani T, Kaburagi Y, Shimada Y, Inaoki M, Takehara K, Mukaida N, and Sato S. CCR4 memory CD4+ T lymphocytes are increased in peripheral blood and lesional skin from patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107: 353-358

Nakayama F, Teraki Y, Kudo T, Togayachi A, Iwasaki H, Tamatani T, Nishihara S, Mizukawa Y, Shiohara T, and Narimatsu H. Expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen regulated by a set of glycosyltransferases in human T cells: involvement of alpha1, 3-fucosyltransferase VII and beta1,4-galactosyltransferase I. *J Invest Dermatol* 2000, 115: 299-306

Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, and Yoshie O. Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J Immunol* 2003, 170: 1136-1140

Nawata M, Seta N, Yamada M, Sekigawa I, Lida N, and Hashimoto H. Possible triggering effect of cytomegalovirus infection on systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2001, 30: 360-362

Nickoloff BJ and Nestle FO. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2004, 113: 1664-1675

Ohshima K, Karube K, Kawano R, Tsuchiya T, Suefuji H, Yamaguchi T, Suzumiya J, and Kikuchii M. Classification of distinct subtypes of peripheral T-cell lymphoma unspecified, identified by chemokine and chemokine receptor expression: Analysis of prognosis. *Int J Oncol* 2004, 25: 605-613

Parodi A, Caproni M, Cardinali C, Bernacchi E, Fuligni A, De Panfilis G, Zane C, Papini M, Veller FC, Vaccaro M, and Fabbri P. Clinical, histological and immunopathological features of 58 patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. A review by the Italian group of immunodermatology. *Dermatology* 2000, 200: 6-10

Parodi A and Rebora A. ARA and EADV criteria for classification of systemic lupus erythematosus in patients with cutaneous lupus erythematosus. *Dermatology* 1997, 194: 217-220

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

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

Picker LJ. Regulation of tissue-selective T-lymphocyte homing receptors during the virgin to memory/effector cell transition in human secondary lymphoid tissues. *Am Rev Respir Dis* 1993, 148: S47-54

Power CA, Clemetson JM, Clemetson KJ, and Wells TN. Chemokine and chemokine receptor mRNA expression in human platelets. *Cytokine* 1995, 7: 479-482

Pramatarov KD. Drug-induced lupus erythematosus. *Clin Dermatol* 1998, 16: 367-377

Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, and Mackay CR. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 1998, 101: 746-754

Rider JR, Ollier WE, Lock RJ, Brookes ST, and Pamphilon DH. Human cytomegalovirus infection and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1997, 15: 405-409

Ronnblom L and Alm GV. An etiopathogenic role for the type I IFN system in SLE. *Trends Immunol* 2001, 22: 427-431

Rottman JB, Smith TL, Ganley KG, Kikuchi T, and Krueger JG. Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin alphaEbeta7 in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. *Lab Invest* 2001, 81: 335-347

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, and Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998, 187: 875-883

Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000, 18: 593-620

Samson M, Soularue P, Vassart G, and Parmentier M. The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CCR1 to CC-CCR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p24 region of chromosome 3. *Genomics* 1996, 36: 522-526

Segeer S, Banas B, Wornle M, Schmid H, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Kiss E, Nelson PJ, Schlondorff D, and Grone HJ. CXCR3 is involved in tubulointerstitial injury in human glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2004, 164: 635-649

Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, and Campbell JJ. CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood* 2003, 101: 1677-1682

Sontheimer RD. Subacute cutaneous lupus erythematosus: 25-year evolution of a prototypic subset (subphenotype) of lupus erythematosus defined by characteristic cutaneous, pathological, immunological, and genetic findings. *Autoimmun Rev* 2005, 4: 253-263

Sontheimer RD. Subacute cutaneous lupus erythematosus: a decade's perspective. *Med Clin North Am* 1989, 73: 1073-1090

Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989, 44: 93-151

Tebbe B. Clinical course and prognosis of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Dermatol* 2004, 22: 121-124

Tedder TF, Steeber DA, Chen A, and Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J* 1995, 9: 866-873

Verhaegh M, Beljaards R, Veraart J, Hoekzema R and Neumann M. Adhesion molecule expression in basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol* 1998, 8: 252-255

Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, and Larsen CG. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J Invest Dermatol* 2000, 115: 640-646

Wakugawa M, Nakamura K, Kakinuma T, Onai N, Matsushima K, and Tamaki K. CC chemokine receptor 4 expression on peripheral blood CD4+ T cells reflects disease activity of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2001, 117: 188-196

Wenzel J, Henze S, Brahler S, Bieber T, and Tuting T. The expression of human leukocyte antigen-DR and CD25 on circulating T cells in cutaneous lupus erythematosus and correlation with disease activity. *Exp Dermatol* 2005a, 14: 454-459

Wenzel J, Henze S, Worenkamper E, Basner-Tschakarjan E, Sokolowska-Wojdylo M, Steitz J, Bieber T, and Tuting T. Role of the chemokine receptor CCR4 and its ligand thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17 for lymphocyte recruitment in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 2005b, 124: 1241-1248

Wenzel J, Worenkamper E, Freutel S, Henze S, Haller O, Bieber T, and Tuting T. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol* 2005c, 205: 435-442

Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, Andrew DP, Wu L, and Briskin M. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol* 2001, 166: 5145-5154

Yamada M, Yagita H, Inoue H, Takanashi T, Matsuda H, Munechika E, Kanamaru Y, Shirato I, Tomino Y, Matsushima K, Okumura K, and Hashimoto H. Selective accumulation of CCR4+ T lymphocytes into renal tissue of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2002, 46: 735-740

Yell JA, Mbuagbaw J, and Burge SM. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 1996, 135: 355-362

Ytterberg SR and Schnitzer TJ. Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982, 25: 401-406

9. Lebenslauf

Stephanie Henze

Staatsangehörigkeit deutsch

Konfession evangelisch

Familienstand verheiratet

Ausbildung

1984 bis 1988, Grundschule Köln Müngersdorf

1988 bis 1997, Gymnasium Liebfrauenschule Köln, Abitur

1997 bis 2000 Ausbildung zur Hotelkauffrau Dorint Hotel Köln

SS 2000 bis WS 2005/2006 Medizinstudium an der
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

25. April 2005 bis 26.03.2006 Praktisches Jahr

Physikum April 2002

Erstes Staatsexamen März 2003

Zweites Staatsexamen März 2005

Drittes Staatsexamen April 2006