

**Histologische Analyse der Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren
sowie des Adhäsionsmoleküls „cutaneous lymphocyte-associated antigen“ (CLA)
beim kutanen Lupus erythematodes.**

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

Eva Wörenkämper
aus Attendorn

2010

**Histologische Analyse der Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren
sowie des Adhäsionsmoleküls „cutaneous lymphocyte-associated antigen“ (CLA)
beim kutanen Lupus erythematodes.**

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

Eva Wörenkämper
aus Attendorn

2010

Anfertigung mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. J. Wenzel
2. Gutachter: Prof. Dr. H.P. Fischer

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.03.2010

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie des Universitätsklinikums
Bonn

Direktor Prof. Dr. med. Dr. ès sci. T. Bieber

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis:	6
1. Einleitung	9
1.1. Das Krankheitsbild des Lupus erythematodes	9
1.1.1. Der kutane Lupus erythematodes	10
1.1.2. Der Systemische Lupus erythematodes (SLE)	17
1.2. Das Kontrollkollektiv: Psoriasis und Herpes simplex	24
1.2.1. Psoriasis	24
1.2.2. Herpes simplex	24
1.3. Mechanismen der Rekrutierung von Lymphozyten in die Haut	24
1.3.1. Strukturelemente der Adhäsion von Lymphozyten	25
1.3.2. Chemokine und ihre Rezeptoren	28
1.3.3. Pro-inflammatorische Faktoren im entzündlich veränderten Gewebe	30
1.3.4. Die Rekrutierung der Lymphozyten in die Haut – das Modell des Skin-Homing	31
1.4. Lymphozytenmarker, Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Chemokinrezeptoren, die in die Untersuchung mit eingingen	36
1.4.1. Charakterisierung des zellulären Infiltrates	36
1.4.2. Das Adhäsionsmolekül CLA	38
1.4.3. Die Rolle von Chemokinen und ihrer Rezeptoren bei Entzündungen	39
1.4.3.1. Die homöostatischen Faktoren: CCR4 und TARC/CCL17	40
1.4.3.2. Die pro-inflammatorische Faktoren: CXCR3 und CXCL10/IP10	42
1.4.4. MxA – Marker für eine Interferon-Typ-I-Beteiligung	43
2. Fragestellung der Arbeit	45
3. Material und Methoden	46
3.1. Material	46
3.1.1. Paraffinblöcke	46
3.1.2. Material für die immunhistologischen Färbungen	47
3.2. Methoden	48
3.2.1. Immunhistochemische Färbung von formalinfixiertem Gewebe	48
3.2.1.1. Vorbehandlung der Paraffinschnitte	48

Inhaltsverzeichnis	Seite
3.2.1.2. Grundprinzipien immunhistochemischer Färbemethode	49
3.2.1.3. Färbemethoden	51
3.2.1.3.1. Direkte Methode	51
3.2.1.3.2. Indirekte Methode	51
3.2.1.3.2.1. (Strept-) Avidin-Biotin-Komplex-Methode (LSAB)	52
3.2.1.3.2.2. Polymerkonjugat-Methode (EnVision™)	52
3.2.2. Färbeprotokolle	54
3.2.2.1. Vorbehandlung der Paraffinschnitte	54
3.2.2.2. Protokoll der Färbung nach der LSAB-Methode	54
3.2.2.3. Protokoll der Doppelfärbung CLA und GranzymB	55
3.2.2.4. Protokoll der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit CD8 und CCR4	57
3.2.3. Methoden zur Zellzählung	58
3.2.4. Ausgewertete Daten	58
3.2.5. Statistische Methoden	59
4. Ergebnisse	60
4.1. T-Zellen dominieren das zelluläre Infiltrat in der Haut beim CLE	60
4.2. Nachweis zahlreicher zytotoxischer GranzymB ⁺ -Zellen beim vernarbenden CDLE	68
4.3. Das Adhäsionsmolekül CLA lässt sich im Infiltrat beim kutanen Lupus erythematodes nachweisen	71
4.3.1. Doppelfärbung CLA und GranzymB	74
4.4. In den Hautläsionen beim kutanen Lupus erythematodes lassen sich Lymphozyten mit dem homöostatischen Chemokinrezeptor CCR4 sowie das Chemokin TARC nachweisen	74
4.4.1. Die CD8 ⁺ -zytotoxischen T-Zellen tragen den Chemokinrezeptor CCR4	79
4.5. Die Beteiligung inflammatorischer, durch Interferon-Typ-I induzierbarer Chemokinrezeptoren und Chemokine	80

Inhaltsverzeichnis	Seite
4.5.1. Die deutliche Expression von MxA weist auf eine erhöhte Interferon-Produktion in allen Unterformen des CLE hin	80
4.5.2. Das durch Interferon-Typ-I induzierbare inflammatorische Chemokin CXCL10/IP10 sowie CXCR3-positive-Lymphozyten sind beim kutanen LE nachweisbar	84
5. Diskussion	89
5.1. Dominanz der T-Zellen im zellulären Infiltrat beim kutanen Lupus erythematodes	90
5.2. Beteiligung zytotoxischer GranzymB-positiver Zellen bei den vernarbenden Formen des kutanen Lupus erythematodes	91
5.3. Beteiligung des Adhäsionsmoleküls CLA bei der Zellrekrutierung des kutanen Lupus erythematodes	91
5.4. Die Rolle des homöostatischen Chemokinrezeptors CCR4 und des Chemokins TARC/CCL17 beim kutanen Lupus erythematodes	92
5.5. Die Beteiligung von Interferon-Typ-I als proinflammatorischer Faktor bei der Lymphozytenrekrutierung bei kutanem Lupus erythematodes	94
5.5.1. Der Nachweis einer Interferonbeteiligung anhand der MxA-Expression	94
5.5.2. Anhand des Nachweises des Chemokinrezeptors CXCR3 und seines Liganden CXCL10/IP10 konnte die Beteiligung pro. Inflammatorischer Faktoren beim kutanen Lupus erythematodes gezeigt werden	95
5.6. Ausblick/Therapie	99
6. Zusammenfassung	100
7. Anhang	101
8. Publikationsliste	103
9. Literaturverzeichnis	104

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACLE	Akuter kutaner Lupus erythematodes
ACR	American College of Rheumatology
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zellen
AV-Block	atrioventrikuläre Überleitungsstörung am Herz
BSG	Blut-Senkungs-Geschwindigkeit
CCL	C-Chemokin-Ligand
CCLE	Chronischer kutaner Lupus erythematodes
CCR	C-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation (Systematik der Lymphozyten-Oberflächenmarker)
CDLE	Chronisch diskoider Lupus erythematodes
cDNA	copy DNA
CHLE	Chilblain Lupus erythematodes
CLA	cutaneous lymphocyte-associated antigen
CLE	Kutaner Lupus erythematodes
CXCL	CX-Chemokin-Ligand
CXCL10	= IP10, IFN induced protein 10, Chemokin
CXCR	CX-Chemokin-Rezeptor
CXCR3	Chemokinrezeptor 3 der Cx-Chemokine
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DC	Dendritische Zelle
dCDLE	Disseminierter chronisch diskoider Lupus erythematodes
DIF	Direkte Immunfluoreszenz

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEZ	Dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ESL	E-Selektin-Ligand
EZ	Endothelzelle
Fab	Fragment antigen-binding (Antigen-bindendes Fragment)
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter)
Fc	Fragment crystallisable
FFPE	mit Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
GALT	Darmassoziierte lymphatische Gewebe
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GrB	GranzymB, zytotoxisches Molekül
HEV	Postkapilläre Venolen mit hochprismatischem Endothel
HLA	Human leukocyte antigen
HSV	Herpes-simplex-Virus
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICLE	Intermittierend kutaner Lupus erythematoses
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
ICAM-1,2	= CD54, Intercellular Cell Adhesion Molecule 1,2; ein Mitglied der Immunglobulinfamilie
I-TAC	= CXCL11, IFN-inducible T-cell alpha-chemoattractant, Chemokin
ICDLE	Lokalisierter chronisch diskoider Lupus erythematoses
ICLE	Intermittierend chronischer Lupus erythematoses
LE	Lupus erythematoses
LEP	Lupus erythematoses profundus
LET	Lupus erythematoses tumidus
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen -1

LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode
MAdCAM	Mucosa-addressing cell adhesion molecule
MALT	Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe
MCP1	Monocyte chemoattractant protein
MDC	Makrophage-derived chemokine
MHC	Hauptkompatibilitätskomplex
MIG	= CXCL9, Monokine induced by IFN
mRNA	Massenger-Ribonukleinsäure
MxA	Antivirales Mx Protein A, spezifischer Typ-I-IFN-Marker
NK	Natürliche Killerzelle
PBL	Zirkulierende Lymphozyten (peripheral blood lymphocytes)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM-1	Platelet endothelial adhesion molecule
pH	pH-Wert
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
RNA	Ribonukleinsäure
SCLE	Subakut kutaner Lupus erythematodes
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SSA/Ro	antinukleäres Antigen
TARC	= CCL17, Thymus-and activation-regulates chemokine
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VZV	Varizella-Zoster-Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Der Lupus erythematoses (LE) ist eine Autoimmunerkrankung, die sich klinisch sehr variabel darstellt. Die Manifestationsformen reichen von der rein kutanen Form des LE (CLE) bis hin zum systemischen LE (SLE) mit Beteiligung innerer Organe. Allerdings treten häufig Übergangs- und Mischformen auf. So werden Hautmanifestationen bei bis zu 70% der SLE-Patienten beobachtet, und einige CLE- Subtypen, wie z. B. der SCLE, werden häufig von milden systemischen Symptomen wie Myalgien und Arthralgien begleitet.

Histologisch ist der kutane Lupus erythematoses durch das Bild der so genannten „Interface Dermatitis“ charakterisiert: Lymphozyten dringen im Bereich der basalen Epidermis in das Endothel ein (dermo/epidermales „Interface“) und führen zur Apoptose-Induktion basaler Keratinozyten. Dies zeigt sich durch eine hydrophische Auflockerung und der Ausbildung sog. Kolloidkörperchen.

Der Mechanismus und die Regulation der Migration von Lymphozyten in die Haut sind weiterhin schlecht verstanden. In den vergangenen Jahren erlangte man neue Kenntnisse über die Rolle von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren und die Mechanismen der gerichteten Migration von Lymphozyten in verschiedene Gewebe (in der Literatur auch als „Skin-Homing“ bezeichnet).

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche dieser Faktoren in der Haut beim kutanen Lupus erythematoses zu finden sind und somit an der Rekrutierung von Lymphozyten in der Haut beteiligt sein können. Als Vergleichskollektive dienten Patienten mit einer Schuppenflechte (Psoriasis) sowie Patienten mit Herpes simplex.

1.1. Das Krankheitsbild des Lupus erythematoses

Der LE umfasst ein Spektrum verschiedener mit Autoimmunphänomenen assoziierter Krankheitsbilder. Diese treten sowohl als eine auf die Haut beschränkte Form (z. B. diskoider Lupus erythematoses, DLE) als auch in Form einer Multisystemerkrankung (systemischer Lupus erythematoses, SLE) auf. Die verschiedenen Krankheitsbilder, die zum LE gezählt werden, lassen sich nach Symptomen, Verlauf und Prognose voneinander trennen. Gemeinsamkeiten im klinischen Bild, in Laborbefunden, Zwischenformen und Übergängen sprechen aber für ihre Zusammengehörigkeit (Braun-Falco, 1965).

Die Prävalenz der systemischen Erkrankung in Mitteleuropa liegt bei etwa 40/100.000 Einwohnern (Johnson et al., 1995). Konkrete Zahlen zur rein kutanen Form, die nach Schätzungen 6-10-fach häufiger vorkommt, liegen zur Zeit nicht vor (Jiménez et al., 2003).

Ätiologisch spielen wahrscheinlich genetische Faktoren, Alter und Geschlecht eine prädisponierende Rolle. Verschiedene äußere Einflüsse wie Licht, Medikamente oder Infektionen führen dann zur Manifestation. Nach neueren Untersuchungen scheinen Fehlregulationen der Apoptose sowie die Störungen der Interaktion dendritischer Zellen, Makrophagen und Lymphozyten eine Rolle zu spielen (Herrmann et al., 2000).

Charakteristisch für den Lupus erythematoses ist das Auftreten verschiedener Regulationsstörungen des humoralen und zellulären Immunsystems, wie zum Beispiel das Auftreten von Autoantikörpern und Störungen der zellulären Immunantwort (Tan, 1989). Die Autoantikörper sind vor allem gegen Antigene der Zellkerne gerichtet (= Antinukleäre Antikörper (ANA)), aber auch Autoantikörper gegen andere Strukturen, wie z. B. Blutzellen oder Epithelien, kommen vor. Diese Störungen im zellulären Immunsystem findet man sowohl bei B- als auch bei T-Lymphozyten (Lahita, 1992).

Bei den Veränderungen der Haut werden nach Gilliam und Sontheimer (Gilliam und Sontheimer, 1981; Sontheimer et al., 1981) unspezifische von spezifischen Hauterscheinungen unterschieden. Zu den unspezifischen Hauterscheinungen, die häufig mit einem SLE assoziiert sind, zählen periunguale Teleangiektasien, Thrombophlebitis oder das Raynaud-Syndrom (Costner et al., 2003; Provost, 2004). Die spezifischen kutanen Manifestationen sind für eine Form des LE charakteristisch und je nach Form des kutanen LE unterschiedlich.

1.1.1. Der kutane Lupus erythematoses

Definition und Einteilung

Der unter dem Begriff „kutaner Lupus erythematoses“ werden Varianten des LE zusammengefasst, die sich v.a. an der Haut manifestieren. Aufgrund neuer Erkenntnisse wurde 2004 die Einteilung der kutanen Formen nach Gilliam und Sontheimer von 1981 aktualisiert. Unterschieden werden der akute CLE (ACLE), der subakute CLE (SCLE), der chronische CLE (CCLE) und der intermittierende CLE (ICLE) (Kuhn A. et al., 2004; Gilliam und Sontheimer, 1981; Sontheimer et al., 1981). Die

Unterscheidung erfolgte nach genetischen, immunserologischen, klinischen und histopathologischen Gesichtspunkten.

Kutaner Lupus erythematoses (CLE): Düsseldorfer Klassifikation. (Modifiziert nach Kuhn A., 2004)
Akuter kutaner Lupus erythematoses (ACLE)
Subakuter kutaner Lupus erythematoses (SCLE)
Chronischer kutaner Lupus erythematoses (CCLE) <ul style="list-style-type: none"> • Diskoider Lupus erythematoses (CDLE) • Lupus erythematoses profundus (LEP) • Chilblain Lupus erythematoses (CHLE)
Intermittierender kutaner Lupus erythematoses (ICLE) <ul style="list-style-type: none"> • Lupus erythematoses tumidus (LET)

Tab. 1: Klassifikation des kutanen Lupus erythematoses

Ätiologie und Pathogenese

Als Auslöser des kutanen LE werden Umweltfaktoren, wie z. B. UV-Strahlung (Kuhn und Beissert, 2005) und Medikamente (ACE-Hemmer, Hydrochlorothiazid, Terbinafine) (Bonsmann et al., 2001; Sontheimer, 2005), diskutiert. Außerdem scheinen genetische Faktoren eine prädisponierende Rolle zu spielen. Man stellte z. B. bei Patienten mit SCLE eine Assoziation mit HLA-A1, -B8 und -DR3 fest (Sontheimer, 2005). Man nimmt an, dass bei dem kutanen LE potentiell autoreaktive Lymphozyten beteiligt sind, da sich histologisch in den Hautläsionen eine T-Zell- dominierte Entzündungsreaktion im Bereich der epidermo-dermalen Junktionszone, sog. „Interface-Dermatitis“, zeigt. Außerdem sind periadnexielle und perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate typisch (Tebbe et al., 1995).

Es konnte z. B. gezeigt werden, dass nach UV-Exposition der Haut von Patienten mit CLE die Zahl apoptotischer Zellen signifikant erhöht ist. Nach neueren Untersuchungen könnten Störungen der Apoptose bzw. bei der Phagozytose apoptotischer Zellen sowie Störungen bei der Interaktion zwischen Makrophagen, dendritischen Zellen und Lymphozyten Auslöser der Krankheit sein (Kuhn et al., 2006).

Das Erkrankungsalter liegt meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, kann aber in jedem Alter auftreten. Der LET tritt häufiger bei Männern auf, die anderen Formen zeigen sich eher beim weiblichen Geschlecht (Kuhn et al., 2000; Tebbe und Orfanos, 1997).

Die Diagnose erfolgt anhand klinischer, serologischer und histologischer Untersuchungen, meist in Kombination mit einer direkten Immunfluoreszenz-Untersuchung (DIF). Charakteristisch ist hierbei das sogenannte „Lupus-Band“, welches durch Ablagerungen von Immunglobulinen (v. a. IgG, aber auch IgM und IgA) und Komplement (C3) entlang der dermoepidermalen Grenzzone entsteht.

Bei Patienten mit kutanen Manifestationen des LE lassen sich in 20-80% der Fälle Antinukleäre Antikörper (ANA) nachweisen. Die Spezifität der Antikörper ist kaum bekannt. Antikörper gegen SSA/Ro und SSB/La sind häufig. Diese scheinen in der Pathogenese eine Rolle zu spielen. SSA/Ro- und SSB/Ro-Antikörper werden auf der Oberfläche von Keratinozyten exprimiert, wenn diese z. B. durch UV-Strahlung in Apoptose übergehen. Ein Zusammenhang mit der Photosensibilität vieler Patienten wird hier vermutet (Kawashima et al., 1994). Andere Antikörper, wie anti-dsDNA oder anti-Sm sind seltener und eher mit Organmanifestationen assoziiert (Wenzel et al., 2001).

Die Formen des kutanen Lupus erythematodes

1) Chronisch kutaner Lupus erythematodes (CCLE)

Zum chronisch kutanen Lupus erythematodes zählt man den chronisch diskoiden Lupus erythematodes (CDLE), den Lupus erythematodes profundus (LEP) sowie den Chilblain Lupus erythematodes. Im Folgenden wird insbesondere auf die häufigste Form, den CDLE, eingegangen.

Der CDLE ist die häufigste kutane LE-Form (etwa 75% aller Fälle) (Kind und Goerz, 1987). Gekennzeichnet ist er durch scharf begrenzte, vernarbende Plaques, die v. a. im Gesicht, Nacken, Kapitilium und Dekolleté lokalisiert sind. Der Verlauf ist chronisch und heilt mit Atrophie und Narbenbildung ab. Auch Haarfollikel werden irreversibel zerstört, so dass eine vernarbende Alopezie des Kopfhaares oder der Augenbrauen auftritt. Typisch ist das Tapeziernagelphänomen, bei dem sich die scheibenförmigen Hautveränderungen mit zentraler Keratose schmerzhaft von der Haut abheben lassen.

Auch Schleimhautbeteiligungen sind möglich. Je nach Ausprägung unterscheidet man eine lokalisierte (ICDLE) und eine disseminierte (dCDLE) Variante.

Bestimmte ethnische Gruppen werden nicht bevorzugt. Es wird eine genetische Prädisposition angenommen. Eine Assoziation wird mit HLA-B27, -B8, -Cw7, -DR2, -DR3 und Dqw1 in wechselnder Kombination beschrieben (Knop et al., 1990), (Sontheimer et al., 1981). Antinukleäre Antikörper (ANA) sind in 20-30% der Fälle zu finden.

Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer. Die Erstmanifestation erfolgt meist im mittleren Erwachsenenalter (Knop et al., 1990). Der Verlauf ist meist günstig, die häufig auftretenden Vernarbungen sind allerdings kosmetisch störend. Ein Übergang zum SLE tritt in 5% der Fälle auf (Tebbe, 2004). Pathogenetisch wird vermutet, dass die Läsionen des CDLE v. a. durch T-Lymphozyten und weniger durch Autoantikörper oder Immunkomplexe induziert werden (Tebbe et al., 1995). Als auslösender Faktor wird v. a. ultraviolettes Licht diskutiert (Braun-Falco, 1965). Nach neuesten Erkenntnissen scheint Interferon-Typ-I, welches von plasmazytoiden dendritischen Zellen produziert wird, eine Rolle zu spielen (Farkas et al., 2001).

Histologisch zeigt der CDLE eine Interface-Dermatitis mit Vakuolisierung der Basalmembran, nekrotischen Keratinozyten und Lymphozyten in der Junktionszone (Parodi et al., 2000), (David-Bajar und Davis, 1997). Das Korneum ist hyperkeratotisch, in der Dermis zeigen sich sowohl an der Oberfläche als auch in der Tiefe perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate. Die Haarfollikel weisen häufig Hornpfropfe in den Follikelostien (Tapeziernagelphänomen) auf (Beutner et al., 1991).

In der direkten Immunfluoreszenz lassen sich in 50-90 % bandförmige Ablagerungen von Immunglobulinen (IgG, häufig auch IgM) sowie Komplement entlang der dermoepidermalen Grenzzone nachweisen.



Abb. 1: Typische scheibenförmige („diskoide“) Läsionen der Kopfhaut eines Patienten mit chronisch diskoiden Lupus erythematoses (CDLE). Die Läsion mit einem Durchmesser von 5 cm ist scharf begrenzt. Es zeigt sich eine zentrale Vernarbung und Zerstörung der Haarfollikel in Form einer Alopezie des Kopfhaares.

2) Subakut kutaner Lupus erythematoses (SCLE)

Der SCLE wurde erstmals 1979 von Sontheimer et al. beschrieben (Sontheimer et al., 1979). Der SCLE zeigt klinisch erythemasquamöse, nicht vernarbende, papulosquamöse und/oder anuläre Hautläsionen, die hauptsächlich im Bereich der oberen Körperhälfte auftreten. Außerdem findet man milde extrakutane Manifestationen, wobei Gelenkbeschwerden im Vordergrund stehen. Seltener treten Fieber, allgemeines Krankheitsgefühl, Myalgien und das Raynaud-Phänomen auf. Bei etwa der Hälfte der Patienten sind mehr als 4 ACR-Kriterien positiv (Callen, 1993); selten kommt es zu einer ZNS- oder Nierenbeteiligung (Sontheimer, 1989). Insgesamt hat er eine gute Prognose. Der SCLE ist oft deutlich durch UV-Licht provozierbar (Kuhn et al., 2001). Die Hauterscheinungen sind oft an sonnenexponierten Stellen zu finden. Beim SCLE kommt es zu keiner Narbenbildung, es können aber vitiligoartige Hypopigmentierungen zurückbleiben (Milde et al., 1994).

Im aktiven Krankheitsstadium sind die Blut-Senkungs-Geschwindigkeit (BSG) und weitere Entzündungsparameter (Hypergammaglobulinämie, Komplementveränderungen) fast immer erhöht (Goerz et al., 1990; Lehmann et al., 1990; Sontheimer, 1989).

Der SCLE macht etwa 10% aller LE-Fälle aus. Er tritt bevorzugt bei der weißen Bevölkerung auf. Immungenetisch kommen gehäuft HLA-B8 sowie -DR2 und -DR3 vor (Johansson-Stephansson et al., 1989; Sontheimer et al., 1982; Watson et al., 1991). Der Verlauf ist schubweise rezidivierend. Nur 10-15% der Patienten entwickeln einen SLE. Bei einigen der Patienten lassen sich anti-SSA/Ro-Antikörper nachweisen. Da diese auch diaplazentar übertragen werden, können Neugeborene von Müttern mit SCLE einen neonatalen Lupus erythematoses mit ähnlichen Hautveränderungen zeigen (Gensch et al., 2005). Dieser bildet sich nach einigen Monaten zurück, es kann jedoch zu einem AV-Block kommen, welcher die Implantation eines Schrittmachers notwendig macht.

Pathogenetisch spielen beim SCLE wahrscheinlich SSA- und SSB-Antigene eine entscheidende Rolle. Sie werden unter dem Einfluss von UVB-Licht auf der Oberfläche von Keratinozyten exprimiert, so dass die entsprechenden Autoantikörper damit reagieren und die Gewebeschädigung einleiten können (Furukawa et al., 1990; Lopez-Longo et al., 1997). ANA sind bei 90% der Patienten nachweisbar.

Histologisch zeigt sich eine Interface-Dermatitis mit verbreiteter Basalmembran, junktionalen Lymphozyten und basalen nekrotischen Keratinozyten (Crowson und Magro, 2001). Weiterhin kann eine Verhornung der Epidermis auftreten. In der Umgebung von Gefäßen zeigen sich dichte lymphozytäre Infiltrate.

In der direkten Immunfluoreszenz zeigen sich Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement in den Hautläsionen bei 60-86%, in der nicht geschädigten Haut bei 26-36% (David-Bajar und Davis, 1997; Parodi et al., 2000). Das typische Lupus-Band kann aber auch fehlen.



Abb. 2: Typische gyrierte Hautläsionen eines Patienten mit Subakut kutanem Lupus erythematoses (SCLE). Es zeigen sich hier 2-3 cm große gerötete, ringförmig verlaufende Hautläsionen ohne Narbenbildung.

3) Akut kutaner Lupus erythematoses (ACLE)

Der akut kutane Lupus erythematoses zeigt sich in Form des typischen Schmetterlingserythems oder als generalisierte Form mit Hautveränderungen außerhalb des Gesichtes. Er tritt bei 20-60% der Patienten mit SLE auf. Nach Sonnenexposition ist die Manifestation deutlich erhöht (Cervera et al., 1993).

Die lokalisierte Form zeigt sich als Schmetterlingserythem mit relativ begrenztem symmetrischem Erythem an Wangen und Nasenrücken mit Aussparung der Nasolabialfalten. Bei der generalisierten Form zeigen sich tiefrote Maculae und Papeln, die konfluieren. Dabei kann der gesamte Körper samt Händen und Füßen befallen sein. Die Krankheitsaktivität ist bei der generalisierten Form höher.

Der ACLE heilt ohne Narbenbildung ab, eine Hyperpigmentierung kann vorübergehend bestehen. Im akuten Schub kann es zu einer Beteiligung der Nasen- und Mundschleimhaut kommen (Brennan et al., 2005).

Histologische Veränderungen sind beim ACLE häufig schwach ausgeprägt mit leichter Interface-Dermatitis und Vakuolisierung der Basalmembranzzone (David-Bajar und Davis, 1997; Parodi et al., 2000). In den Schleimhautveränderungen lassen sich ähnliche Morphologien nachweisen wie bei einer Interface-Dermatitis; sie werden daher als Interface-Mukositis bezeichnet (Jorizzo et al., 1992). Durch die direkte Immunfluoreszenz lässt sich das typische Lupus-Band meist darstellen.

1.1.2. Der Systemische Lupus erythematoses (SLE)

Definition

Beim systemischen Lupus erythematoses handelt es sich um eine chronisch entzündliche Systemerkrankung des Gefäßbindegewebes mit Organ- und Hautbeteiligung. Alle Organe des Körpers können befallen sein. Charakteristisch ist die Störung des Immunsystems, vor allem das Auftreten multipler Autoantikörper. Das klinische Bild ist außerordentlich vielfältig, die Symptome können interindividuell, aber auch intraindividuell mit dem Krankheitsverlauf in ihrer Ausprägung variieren (Vitali et al., 1992).

Klinische Symptomatik

Die häufigsten Symptome sind (Tan et al., 1982):

- Fieber (bei 90%)
- Gelenkschmerzen und -entzündungen (bei 85%)
- Hauterscheinungen (bei 80%, in 25% bereits initial): Typisch ist ein unscharf begrenztes, oft symmetrisches, makulöses bis urtikarielles Erythem im Gesicht (Schmetterlingserythem), z. T. finden sich uncharakteristische disseminierte Exantheme auch im Bereich von Brust und Rücken. Bei einem Teil der Patienten treten Haarausfall und Schleimhautulzera auf.
- Nierenbeteiligung (bei 60%): v. a. Mikrohämaturie/Albuminurie. In 15% der Fälle führen diese zu Nierenfunktionseinschränkungen.
- Generalisierte Lymphknotenschwellungen (bei 50%)
- Pleuritis (bei 59%)
- Raynaud-Symptomatik (bei 35%)
- Lungenbeteiligung (bei 30%)
- Orale und genitale Schleimhautbeteiligung (bei 20%): Erytheme, Ulzera
- Peri- und Myokarditis (bei 25%)
- Hepatosplenomegalie (bei 25%)
- ZNS-Beteiligung (bei 25%): Krämpfe, Psychosen
- Abdominelle Beschwerden (bei 20%)

Labor:

Charakteristisch sind folgende laborchemische Auffälligkeiten (Parodi und Rebora, 1997; Tan et al., 1982):

- BSG-Erhöhung (90%)
- γ -Globulin-Erhöhung (80%)
- Anämie (75%)
- Thrombozytopenie und Komplementerniedrigung
- Auftreten von Autoantikörpern und zellulären Immunstörungen

Autoantikörper (AK) (Tan, 1989; Tan et al., 1982)

Das Krankheitsbild des Lupus erythematodes ist besonders durch das Auftreten bestimmter Autoantikörper gekennzeichnet.

- Antinukleäre Antikörper (ANA):
Diese sind gegen verschiedene Zellkernbestandteile gerichtet. 90% der SLE-Patienten haben Autoantikörper dieser Gruppe. Positive ANA beweisen keinen SLE, ein negativer Befund schließt ihn weitgehend aus.
- Antikörper gegen native Doppelstrang-DNA (ds-DNA):
Diese treten bei 40-90% (je nach Krankheitsphase) der SLE-Patienten auf, bei anderen LE-Typen fast nicht. Vor einem Krankheitsschub kommt es oft zu einem deutlichen Anstieg des Titers. Bei klinischen Remissionen können die Anti-DNA-Titer unter die Nachweisgrenze fallen (Smeenk et al., 1990).
- Anti-Sm-AK
Antikörper gegen dieses nukleäre Antigen finden sich bei 10-30% der Patienten und gelten als spezifisch. Meist sind sie assoziiert mit einer Nieren- und ZNS-Beteiligung.
- Anti-SSA/Ro- und anti-SSB/La-Antikörper
Bei 40-60% der SLE-Patienten sind diese Antikörper nachweisbar und bei gemeinsamem Auftreten oft mit einer mildereren Verlaufsform assoziiert. Eine Kombination von anti-SSA/Ro mit anti-DNA-AK oder anti-Sm-AK hat oft einen schweren Verlauf zur Folge.

- Antikörper gegen Histone
Diese Antikörper treten bei 20% der SLE-Patienten auf. Sie sind nicht krankheitsspezifisch, weisen aber auf einen durch Medikamente assoziierten LE hin.
- Anti-Cardiolipin-AK
Anti-Cardiolipin-AK sind bei 30-40% der LE-Patienten zu finden. Meist liegt dann ein sekundäres Antiphospholipidsyndrom vor.
- Antikörper gegen ribosomale Ribonukleoproteine (rRNP, snRNP)
Sie sind bei 30-40% der SLE-Patienten nachweisbar, v. a. aber bei ZNS-Beteiligung und Psychosen (Williamson et al., 1983).
- Organ- und zellspezifische Autoantikörper:
Hier handelt es sich v. a. um AK gegen Erythrozyten, Leukozyten oder Thrombozyten, oder auch im Bereich der Magenschleimhaut, der Schilddrüse und im Muskel-/Nervengewebe.

Zellimmunologische Störungen beim SLE:

- Leukozytopenie (Camussi et al., 1982)
- Lymphozytopenie (Rivero et al., 1978)
- Störungen im T-Zell-System (verminderte T-Zell-Antwort auf Antigene, verminderte Generation zytotoxischer Zellen, gesteigerte HLA-DR- und Fas-Antigenexpression CD4-positiver T-Zellen. Verminderte IL2-ausgelöste Proliferation) (Cao et al., 2005; Scheinberg und Cathcart, 1974)
- Störung im B-Zell-System (erhöhte Anzahl aktiver B-Zellen, polyklonale B-Zell-Aktivierung, Hypergammaglobulinämie) (Gilliam und Hurd, 1976; Noguchi et al., 1992)
- Veränderung der Zytokinmuster (IL2- und Interferon- γ -Produktion vermindert, erhöhte B-Zell-stimulatorische IL4-, IL5- und IL6-Produktion)

Histologie und Immunhistopathologie

Histopathologie:

Bei der histologischen Betrachtung kutaner Effloreszenzen beim SLE zeigt sich eine verbreiterte, evtl. aufgesplitterte PAS-positive (Period-Schiff-Säure) Basalmembran, ein

Ödem im Korium und ein lymphozytäres, v. a. periadnexiell und perivaskulär angeordnetes Infiltrat.

Die Epidermis des systemischen LE zeigt weniger Veränderungen als der kutane LE: Möglich ist eine Basalzelldegeneration, Hyper-/Parakeratose sowie eine Atrophie. Eine leukozytoklastische Vaskulitis zeigt sich selten (Moutsopoulos et al., 1980).

Immunhistopathologie:

In der direkten Immunfluoreszenz ist beim SLE eine bandförmig im Bereich der Basalmembran vorhandene Ablagerung von IgG, IgM oder IgA zu erkennen sowie Komplementfaktoren (C1, C3) (= Lupusband) (dos Santos et al., 1988). Beim SLE zeigt sich dieses Lupus-Band auch in unbefallener Haut.

Diagnose des SLE:

Die Diagnose des SLE wird gestellt, wenn vier oder mehr Kriterien (ARA-Kriterien) des American College of Rheumatism (ACR) erfüllt sind (Tan et al., 1982). Zur Zeit wird diese Methode der Diagnosestellung allerdings kontrovers diskutiert. Es ist durchaus möglich, dass ein Patient vier dieser Kriterien erfüllt, ohne eine wirklich systemische Manifestation des LE zu haben. Die Kriterien scheinen anhand verschiedener Studien zu unspezifisch (Parodi und Rebora, 1997). Die Diagnose sollte daher anhand eines sicheren viszeralen Nachweises gestellt werden.

Die Kriterien sind nachfolgend aufgelistet:

- Schmetterlingserythem: Erythem, das sich im Gesicht meist über den Wangen und der Nase schmetterlingsförmig ausbreitet
- Kutaner LE: rote Plaques mit follikulären Hyperkeratosen, Pigmentverschiebungen und Atrophie im Gesicht oder anderen chronisch lichtexponierten Bereichen
- Lichtempfindlichkeit: Die Symptomatik verstärkt sich bei Lichteinwirkung
- Schleimhautulzera: meist schmerzlose Ulzera an Nasen-, Pharynx-, Larynx-, oder Mundschleimhaut
- Arthritis: nicht deformierende Arthritis zweier oder mehrerer peripherer Gelenke mit Schmerzen, Schwellungen und Ergüssen
- Serositis:

- Pleuritis, diagnostiziert durch die typische Anamnese oder den typischen Befund (Pleurareiben/Pleuraerguß) oder
- Perikarderguss, diagnostiziert durch EKG, Perikardreiben oder Sonographie
- Nierenbeteiligung
 - Proteinurie über 0,5g/24h oder
 - Perikarderguss aus Erythrozyten, Leukozyten oder Epithelien
- ZNS-Beteiligung: Krampfanfälle, Chorea minor und andere unklare neurologische oder psychiatrische Syndrome
- Hämatologische Befunde
 - Hämolytische Anämie oder
 - Zwei- oder mehrfach nachgewiesene Leukozytopenie ≤ 4000 Zellen/ μl
 - bzw. Lymphozytopenie ≤ 1500 Zellen/ μl oder
 - Thrombozytopenie $\leq 100000/\mu\text{l}$
- Immunologische Befunde:
 - anti-dsDNA-Antikörper erhöht oder
 - anti-Sm-Antikörper nachweisbar oder
 - falsch positive Lues-Serologie für mehr als 6 Monate
- Antinukleäre Antikörper: ANA-Titer $\geq 1:160$

Ätiologie und Pathogenese:

Bei der Pathogenese des SLE spielen wahrscheinlich genetische Faktoren eine Rolle, da sowohl eine familiäre Häufung (9%) als auch ein gehäuftes Auftreten bei monozygoten Zwillingen beschrieben sind (Block et al., 1975, {Sullivan, 2000 #327}). Assoziationen bestehen mit den HLA-Typen HLA-B8, -DR2, -DR3 und DQ2 (Green et al., 1986). Folgende Genloci werden mit dem SLE in Verbindung gebracht:

Genort	Kandidatengene
1q23	CRP, FCGR2B, FCGR2A, FCGR3A, FCGR3B
1q25-31	Nicht bekannt
1q41-42	PARP, TLR5
2q35-37	PDCD1
4p16-15.2	Nicht bekannt
6p11-21	MHC Klasse II: DRB1 MHC Klasse III: TNF- α , C2, C4
12q42	Nicht bekannt
16q12-13	OAZ

Tab. 2: Übersicht über die Gene, die wahrscheinlich mit dem systemischen Lupus erythematoses in Verbindung stehen (Wakeland et al., 2001, Rahman, 2008 #329).

Weitere Faktoren, die diskutiert werden:

- Hormonelle Faktoren (Gynäkotropie, Verschlechterung in der Schwangerschaft und unter Östrogentherapie) (Cooper et al., 1998)
- UV-Strahlung (Exazerbation kutaner oder systemischer Symptome nach Sonnenexposition) (Aharon-Maor und Shoenfeld, 1998)
- Medikamente (z. B. Hydralazin, Hydantoinderivate, D-Penicillamin, Isoniazid und Procainamid) (Pramatarov, 1998)
- Infektionen, z. B. durch das Zytomegalie-Virus oder das Epstein-Barr-Virus (Rider et al., 1997; Tsai et al., 1995)
- Störung bei der Pathogenese apoptotischer Zellen und Induktion einer Autoimmunreaktion über die Präsentation nukleärer Antigene durch dendritische Zellen. Nachfolgend erfolgt eine Aktivierung von T-Lymphozyten und Produktion von Autoantikörpern durch B-Lymphozyten (Casciola-Rosen et al., 1996; Herrmann et al., 2000).
- Modifiziertes Modell der Ätiopathogenese des SLE nach Herrmann et al. (Herrmann et al., 2000): Normalerweise werden apoptotische Zellen in einer frühen Phase des apoptotischen Zelltodes von Makrophagen phagozytiert. Nach Herrmann et al. ist diese Phagozytose bei SLE-Patienten jedoch beeinträchtigt,

es erfolgt keine vollständige Phagozytose der zugrunde gegangenen Zellen durch die Makrophagen (Herrmann et al., 2000). Es kommt daher zur teilweisen Aufnahme von Zellantigenen in dendritischen Zellen. Nachfolgend erfolgt über die Kaskade der spezifischen Immunantwort eine Antigen-Präsentation nukleärer Zellantigene durch die dendritischen Zellen an die T-Lymphozyten. Diese wiederum lösen über die Ausschüttung von Zytokinen eine lokale Entzündungsreaktion aus und stimulieren B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern gegen körpereigene Zellantigene.

- Graham et al. fanden heraus, dass beim SLE eine Fehlregulation der IFN-Typ-I-Produktion besteht. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Fehler des Transkriptionsfaktors IRF5 (IFN regulatory factor) zu einer Überexpression von Interferon führt (Graham et al., 2007).

1.2. Das Kontrollkollektiv: Psoriasis und Herpes simplex

Im Kontrollkollektiv wurde die Expression der verschiedenen Rezeptoren und Chemokine an der Haut gesunder Patienten, an der Haut bei Patienten mit Psoriasis oder Herpes simplex untersucht. Im Folgenden sind die Erkrankungen Psoriasis und Herpes simplex kurz erläutert.

1.2.1. Psoriasis

Die Psoriasis vulgaris ist eine familiär gehäuft auftretende entzündliche Dermatose. Klinisch zeigt sich eine Entzündung und Schuppung der Haut. Mikroskopisch ist die Erkrankung charakterisiert durch epidermale Hyperplasie, Parakeratose, intra-epidermale Akkumulation von Neutrophilen und Infiltration der Dermis und Epidermis mit mononukleären Zellen (MNCs), vor allem Lymphozyten. Die weltweite Prävalenz liegt zwischen 0,6 bis 4,8 Prozent.

Für die Kontrollgruppe wurde die Psoriasis ausgewählt, da man vermutet, dass es sich pathophysiologisch auch hier um eine Autoimmunerkrankung unter dem Einfluss von T-Lymphozyten handelt (Austin et al., 1999). In anderen Arbeiten konnten hier lymphozytäre Infiltrate in entzündlich veränderter Haut nachgewiesen werden (Chong et al., 2004). Eine genauere Untersuchung des T-Zell Infiltrates bei der Psoriasis zeigte, dass es sich bei dem Großteil der intra-dermalen Zellen um CD8 positive (Paukkonen et

al., 1992) und bei den Zellen der Dermis um CD4 positive-Zellen handelt (Bos et al., 1989). Die CD8⁺-Zellen scheinen aber für die Pathogenese bedeutender zu sein. Typisch ist auch ein erhöhtes Turnover der Epidermis sowie eine Überexpression des Keratins (Nickoloff und Nestle, 2004). Außerdem zeigte sich eine Beteiligung von CXCR3 und CCR4 bei der transendothelialen Migration der T-Zellen in die Dermis bei der Psoriasis. Speziell CXCR3 scheint die Einwanderung der T-Zellen in die Epidermis zu regulieren (Rottman et al., 2001).

1.2.2. Herpes simplex

Zur Familie der Herpes-simplex-Viren gehören der Humane-Herpes-Virus-1 (HSV-1), HSV-2, Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus und HSV-6, -7 und -8.

Eine typische klinische Manifestation des HSV-1 ist der Herpes labialis, mit typischer Bläschenbildung der Mundschleimhaut. Aber auch Infektionen z. B. der Augen und des ZNS treten auf.

Die Infektion beginnt mit einem akuten Ausbruch und massiver Vermehrung der Viren in den Keratinozyten und anderen Bereichen der Dermis. Herpesviren können im Verlauf über axonale Wanderung das Gehirngewebe infizieren (Strelow und Leib, 1995). In den Ganglien kann der Virus nach Abklingen der akuten Infektion dauerhaft persistieren und auch nach Jahren wieder einen Krankheitsausbruch hervorrufen. Verschiedene Chemokine sind dort lange Zeit nachweisbar. Auch eine Akkumulation von CD4⁺ und CD8⁺-Lymphozyten (Chen et al., 2000) und Beteiligung von Interferon- γ konnte gezeigt werden. Es scheint dabei eine Beteiligung von Interferon- γ an der Lyse von Keratinozyten durch zytotoxische T-Zellen zu geben (Brehm et al., 1997).

1.3. Mechanismen der Rekrutierung von Lymphozyten in die Haut

Leukozyten zirkulieren ständig zwischen Blut und Gewebe. Sowohl für die Rekrutierung von Lymphozyten in Entzündungsgewebe als auch zur Rezirkulation ist die Extravasation dieser Zellen durch Endothel nötig (Butcher und Picker, 1996).

Über den Mechanismus und die an der Rekrutierung von T-Lymphozyten beteiligten Strukturen war lange Zeit wenig bekannt. In den letzten Jahren wurden aber viele beteiligte Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Rezeptoren näher charakterisiert, so

dass ein Modell des in der Literatur als „Skin-Homing“ bezeichneten Vorgangs erstellt werden konnte (Butcher und Picker, 1996; Robert und Kupper, 1999). Damit die Migration der Lymphozyten gerichtet abläuft, sind in diesen Prozess Adhäsionsmoleküle wie Selektine, Integrine, verschiedene vaskuläre Liganden und auch die Chemokine und ihre korrespondierenden Rezeptoren involviert.

Die im Blut vorhandenen Lymphozyten müssen zunächst Kontakt zur Gefäßwand bekommen. Dieser Vorgang wird Adhäsion genannt. Anschließend erfolgt eine durch verschiedene Chemokine und deren Rezeptoren gesteuerte Wanderung des Lymphozyten durch die Gefäßwand. Im Gewebe findet dann wiederum eine Migration der Lymphozyten zum Ort der Entzündung statt.

Die Faktoren, die für die Rekrutierung eine Rolle spielen, sind im Folgenden genauer beschrieben. Im Anschluss wird ein Modell dieses Rekrutierungsvorgangs vorgestellt.

1.3.1. Strukturelemente der Adhäsion von Lymphozyten

Dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (DMEZ)

DMEZ bilden in den kleineren Gefäßen der Haut eine normalerweise für zirkulierende Lymphozyten undurchlässige Schicht. Im Rahmen von Immunreaktionen können die DMEZ Veränderungen ihrer Oberflächenproteinstruktur durchmachen, die als Signale für zirkulierende Lymphozyten fungieren, und so zu deren Aktivierung und Rekrutierung in die Haut führen (Pober et al., 2001).

DMEZ exprimieren MHC-Typ-I- und Typ-II-Moleküle, deren einzige bekannte Funktion in der Präsentation von Peptiden an T-Zellen besteht (Page et al., 1992). Regelmäßig kommen passierende T-Zellen mit diesen Strukturen in Kontakt, v. a. im Bereich der Kapillaren und postkapillären Venolen. Hier ist der Gefäßdurchmesser kleiner als der der Lymphozyten (PBL), was zu einem regelmäßigen Oberflächenkontakt führt. In In-vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass naive T-Zellen diese Engstellen ohne Reaktion passieren (Wagner, 1984), spezifische Gedächtnis-T-Zellen aber auf allogene Endothelzellen mit Zytokinproduktion und Proliferation reagieren (Epperson und Pober, 1994).

Bei einem Kontakt mit aktivierten Lymphozyten bzw. den von diesen sezernierten Molekülen (Zytokinen) werden auch die DMEZ aktiviert. Dies führt zu einer Steigerung ihrer Fähigkeit, PBL zu rekrutieren. Die aktivierten DMEZ exprimieren induzierbare

Leukozytenadhäsionsmoleküle wie E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 (Pober et al., 2001). PBL, die den Oberflächenmarker CLA tragen, binden an E-Selektin.

Unter nichtentzündlichen Bedingungen ist die VCAM-1-Expression nur im Bereich venöser EZ zu beobachten. Bei Entzündung tritt die VCAM-1-Expression auch im Bereich der Kapillarschlingen papillärer Gefäße auf und führt zu einer Rekrutierung $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-exprimierender Zellen, die auch das Cadherin-bindende Integrin $\alpha 4\beta 7$ tragen (Pober et al., 2001).

Selektine

Zur Familie der Selektine gehören drei Typen von Zelloberflächen-Glykoproteinen: E-, L- und P-Selektine (Ley, 2003). Die Bezeichnung „Selektin“ bezieht sich auf die biochemische Grundstruktur dieser Proteine, welche eine „Lektin“-Domäne haben, und auf ihre Funktion, die „selektive“ Zellinteraktion (Bevilacqua et al., 1993).

Die Selektine und Selektinliganden dienen den aktivierten Effektor- und zentralen Gedächtnis-T-Zellen dazu, dass sie spezifisch Zielorgane erreichen (sog. „homing“). E-Selektine haben eine wichtige Funktion bei entzündlichen Vorgängen in der Haut, L-Selektine für das Pankreas und die Speicheldrüsen und P-Selektine für das Lamina-propria-Kompartiment des Gastrointestinaltraktes (Ley, 2003; Ley und Kansas, 2004).

L-Selektin wird von Leukozyten (Granulozyten, Monozyten sowie den meisten Lymphozyten) exprimiert. Es bindet an Bestandteile verschiedener Plasmamembran-Proteine und Proteoglykane des Endothels, wie CD34, MadCam-1 und Gly-CAM-1. Gefäße exprimieren immer CD34, die Selektinligandenbestandteile werden jedoch erst unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL1) hinzugefügt (Pober et al., 2001).

E-Selektin wird unter Normalbedingungen nur in den Mikrogefäßen der Haut exprimiert (Keelan et al., 1994). Durch Einwirkung proinflammatorischer Zytokine wird es stark hochreguliert (Ley, 2003). Eine zentrale Rolle für kutane Entzündungen spielt die Interaktion zwischen E-Selektin und seinem Liganden CLA (cutaneous lymphocyte antigen) (Fuhlbrigge et al., 1997).

P-Selektin wird in den alpha-Granula von Blutplättchen und in Weibel-Palade-Bodies von Endothelzellen gespeichert und von aktivierten Endothelzellen und Plättchen auf die Oberfläche transloziert. PSGL-1 (P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1) ist der wichtigste P-

Selektin-Ligand. PSGL-1 wird von adhärenenten Leukozyten und Leukozytenfragmenten in der Entzündung präsentiert (Sperandio et al., 2003) und ist bei der Rekrutierung von Neutrophilen beteiligt (Xia et al., 2002).

Integrine

Integrine sind für die feste Bindung von Leukozyten an das Endothel nach dem sog. Rolling verantwortlich (Bevilacqua et al., 1993). Lymphozyten verwenden das β 2-Integrin LFA-1 (α L β 2 oder CD11aCD18), um an das endothelständige ICAM-1 (=CD54, ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie) zu binden (Tonnesen, 1989). Die Rate des konstitutionell vom Endothel gebildeten ICAM-1 kann durch proinflammatorische Zytokine (TNF, IL-1) deutlich gesteigert werden (Dustin et al., 1986). Eine andere Gruppe von Integrinen, die α 4-Integrine (CD49d), findet man auf Leukozyten. Sie vermitteln eine feste Bindung mit dem Endothel. Diese bilden Adhäsionsmoleküle in Paarung, entweder mit β 1-Integrinen (CD29), was zur Bildung des VLA-4 führt, oder mit α 7 (Bildung von LPAM-1). Sowohl VLA-1 als auch LPAM-1 binden an das „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1). Auch hier ist, wie beim ICAM-1, die Basisexpression auf dem Endothel gering, wird aber bei Entzündung hochreguliert (Pober et al., 2001). Durch die Bindung zwischen den Integrinen, v. a. zwischen LFA-1 und ICAM-1, die deutlich stärker ist als die Selektin-Bindung, wird ein weiteres Rolling gestoppt (Pober et al., 2001). Die Zellen haften flach am Endothel und wandern langsam weiter, bis eine Zell-Junktion erreicht ist, durch die sie durch die Gefäßwand migrieren können. Die LFA-1/ICAM-1-Interaktion scheint auch an diesem Stadium beteiligt zu sein. ICAM-1 wird nach Stimulation diffus auf dem Endothel exprimiert, darauf kommt es aber zu einer Konzentrierung der Expression auf die interzellulären Junktionszonen (Bradley und Pober, 1996). Auch die Interaktion von VLA-4 und LPAM-1 scheint nicht nur der festen Zellbindung zu dienen. Sie hat eine wichtige Funktion für die initiale Bindung und das Rolling der Leukozyten am Endothel (Gimbrone, 1989). LPAM-1 bindet auch an die CS-1-Domäne des Fibronektins und vermittelt so neben der Endothelbindung auch eine spätere Adhäsion an Fibronektinen, die von Keratinozyten exprimiert werden (Schechner et al., 1999).

1.3.2. Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine und ihre Rezeptoren haben zahlreiche Funktionen bei der Entwicklung, Reifung und Funktion des Immunsystems, der Organentwicklung und Angiogenese. Außerdem übernehmen sie die Positionierung von T- und B-Zellen sowie dendritischer Zellen im Körper.

Chemokine sind chemotaktisch aktive Zytokine. Bei Zytokinen handelt es sich um kleine Proteine (~25 kDa), die als Reaktion auf einen Aktivierungsreiz von verschiedenen Zellen im Körper freigesetzt werden und durch Bindung an spezifische Rezeptoren verschiedene Reaktionen auslösen.

Chemokine haben die Eigenschaft, Zellen mit den passenden Rezeptoren dazu zu veranlassen, entlang eines Konzentrationsgradienten zur Quelle der freigesetzten Chemokine zu wandern (Chemotaxis). Auch andere Moleküle, wie bestimmte Lipide oder Nukleotide, haben im Organismus chemotaktische Funktionen, wirken aber weniger spezifisch auf ihre Zielzellen (Chensue, 2001).

Strukturell erfolgt die Einteilung aufgrund der Aminosäuresequenz im aminoterminalen Bereich: Die CC-Chemokine besitzen zwei benachbarte Cysteine, bei den CXC-Chemokinen sind die entsprechenden Cysteinreste durch eine andere Aminosäure getrennt. Liegen drei Aminosäuren zwischen den Cysteinresten bezeichnet man die Chemokine entsprechend als CX₃C-Chemokine (Zlotnik und Yoshie, 2000). CC-Chemokine binden dabei an CC-Rezeptoren und CXC-Chemokine entsprechend an CXC-Rezeptoren.

Die Rezeptoren der Chemokine gehören zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie bestehen aus sieben membranüberspannenden, hydrophoben Domänen, deren Verbindung durch jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen erfolgt. Die Bindung der Chemokine erfolgt über die extrazelluläre aminoterminalen Region. Die Verbindung zum G-Protein erfolgt über die carboxyterminale Region. Im Ruhezustand sind Rezeptor und G-Protein aber nicht assoziiert. Bindet ein Chemokin an den Rezeptor, erfolgt eine Konformitätsänderung des Rezeptors und Interaktion mit dem G-Protein. Das aktivierte G-Protein aktiviert daraufhin Enzyme, wie die Phospholipase C oder die Phosphoinositol-3-Kinase. Es folgen eine Kaskade Phosphorylierungen und Aktivierungen anderer Kinasen, welche dann auf die Zellfunktionen wie z. B. Adhäsion und Chemotaxis wirken (Chensue, 2001).

Bei der Interaktion von Chemokinrezeptoren und ihren Liganden besteht ein hohes Maß an Redundanz und Bindungs-Promiskuität. Es existieren häufig mehrere Liganden, die hochaffin an einen Rezeptor binden und umgekehrt kann ein Chemokin mehrere Rezeptoren besitzen.

Funktionell kann man die Chemokine in homöostatische (konstitutiv exprimierte) und inflammatorische (induzierbare) Chemokine unterteilen. Die ersten sind dauerhaft in gewissen Konzentrationen in bestimmten Geweben vorhanden, wie z. B. CCR4 oder CCR10. Inflammatorische Chemokine, wie CXCL9, CXCL10/IP10 oder CXCL12, dagegen werden während einer entzündlichen Reaktion auf einen Stimulus hin hochreguliert (Kunkel und Butcher, 2002).

Am Beispiel des homöostatischen Chemokins CXCL12 konnte gezeigt werden, dass bei entzündlichen Prozessen ihre Expression induzierbar ist (Nanki et al., 2000).

Chemokine können von verschiedensten Zellen des Körpers als Reaktion auf bakterielle oder virale Infektionen und chemische oder physikalische Einflüsse gebildet werden. Sie wirken vor allem als Chemotraktoren für Leukozyten, Monozyten, neutrophile Zellen und andere Effektorzellen aus dem Blut. Sie locken diese zum Ort der Entzündung, wo sie benötigt werden.

Die so genannten Homing-Chemokine werden konstant im Bereich des lymphoiden Gewebes gebildet und dienen der Reifung, Differenzierung und Aktivierung von Lymphozyten (Baggiolini, 2001).

Typischerweise findet man auf TH1-Lymphozyten vor allem die Rezeptoren CCR5 und CXCR3. Die TH2-T-Lymphozyten tragen meist die Rezeptoren CCR3 und CCR4, um die T-Zell-Differenzierung und Funktionssteuerung zu regulieren (Luster, 1998).

Die folgende Tabelle zeigt die bisher bekannten Chemokine und Rezeptoren:

Rezeptor	Ligand
CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23
CCR2	CCL2, CCL7, CCL8, CCL13, CCL16
CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL16, CCL24, CCL26, CCL28
CCR4	CCL17, CCL22
CCR5	CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL11, CCL14, CCL16

CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27, CCL28
CXCR1	CXCL6, CXCL7, CXCL8
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8
CXCR3-A	CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR3-B	CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
CXCR6	CXCL16
CXCR7	CXCL12
XCR1	XCL1, XCL2
CX3CR1	CX ₃ CL1
CCX-CKR	CCL19, CCL21, CCL25
D6	CCL2, CCL3L1, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL17, CCL22
DARC/Duffy	CCL2, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL16, CCL17, CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL11, CXCL13

Tab. 3: Übersicht über die bisher bekannten humanen Chemokine und Rezeptoren (Allen et al., 2007)

1.3.3. Pro-inflammatorische Faktoren im entzündlich veränderten Gewebe

Als Auslöser solcher immunologischer Vorgänge werden Interferone, v. a. Typ-I-Interferon vermutet (Tough, 2004). Die Interferone werden in zwei Gruppen unterteilt: die Typ-I-Interferone ($\alpha/\beta/\delta/\kappa/\tau/\omega$) und das Typ-II-Interferon (γ) (Akbar et al., 2000; Biron, 2001). Rezeptor all dieser Interferone ist der IFN- α/β R (Mogensen et al., 1999). Typ-I-Interferon kann von allen kernhaltigen Zellen produziert werden (Goodbourn et al., 2000), aber nur wenige Zellen sind in der Lage, große Mengen dieser Interferone zu

bilden (Fitzgerald-Bocarsly, 1993). Diese werden als „plasmacytoide“ dendritische Zellen (pDC) bezeichnet (Cella et al., 1999; Siegal et al., 1999).

Typ-I-Interferon induziert die Expression von über 300 Proteinen, die antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Funktionen besitzen (de Veer et al., 2001), (Der et al., 1998). Dabei bewirkt Interferon-Typ-I die Aktivierung dendritischer Zellen sowie die Stimulation und Differenzierung antigenspezifischer T-Zellen (Kamath et al., 2005; Tough, 2004). Außerdem erfolgt eine Aktivierung des Immunsystems durch Hochregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen (Bikoff et al., 1991).

Die am besten untersuchten Proteine, deren Produktion durch Typ-I-Interferon angeregt wird, sind die antiviralen Mx-Proteine (Weber et al., 2004) wie z. B. das MxA-Protein.

1.3.4. Die Rekrutierung der Lymphozyten in die Haut – das Modell des Skin-Homing

Leukozyten zirkulieren ständig zwischen Blut und Gewebe. Sowohl für die Rekrutierung von Lymphozyten in Entzündungsgewebe als auch zur Rezirkulation ist die Extravasation dieser Zellen durch Endothel nötig (Butcher und Picker, 1996).

Über den Mechanismus und die an der Rekrutierung von T-Lymphozyten beteiligten Strukturen war lange Zeit wenig bekannt. In den letzten Jahren wurden aber viele beteiligte Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Rezeptoren näher charakterisiert, so dass ein Modell des in der Literatur als „Skin-Homing“ bezeichneten Vorgangs erstellt werden konnte (Butcher und Picker, 1996).

Grundsätzlich lässt sich der Vorgang der Lymphozytenrekrutierung in zwei Phasen unterteilen.

In der ersten Phase, der transendothelialen Extravasation, binden die zirkulierenden Lymphozyten an die Gefäßwand und durchwandern diese. Die zweite Phase besteht in der gerichteten Migration im entzündeten Gewebe entlang eines Chemokingradienten.

1. Phase – die transendotheliale Extravasation

Die Extravasation von T-Zellen in das Gewebe erfolgt über eine genau regulierte Kaskade von Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen mit ihren Liganden und Chemokin-Chemokinrezeptor-Wechselwirkungen (Campbell und Butcher, 2000; Robert und Kupper, 1999) .

An diesem Vorgang beteiligte Strukturen sind Endothelzellen, Adhäsionsmoleküle, v. a. Selektine und Integrine, Chemokine und Chemokinrezeptoren.

Die Extravasion der Lymphozyten lässt sich in folgende Schritte unterteilen:

(1) Initialer Kontakt

Um Kontakt mit dem Endothel zu bekommen, müssen die Leukozyten den Axialstrom des Gefäßes verlassen und die Fließgeschwindigkeit im Blutgefäß muss sich verringern. Im Entzündungsprozess werden dann Mediatoren freigesetzt, die die Gefäße erweitern und die Endothelzellen (DMEZ) veranlassen Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, an denen die Leukozyten locker haften.

Lange Zeit wurde angenommen, dass in der Haut CLA für die Bindung peripherer Lymphozyten an E-Selektine in postkapillären Venolen verantwortlich ist (Fuhlbrigge et al., 1997). Dies konnte auch auf 90% aller hautständigen T-Zellen identifiziert werden. Im Vergleich dazu fand man nur 5-10% in anderen Geweben (Picker et al., 1990). Es ist heute bekannt, dass CLA ein guter Marker für Skin-homing-Lymphozyten ist, aber nicht unmittelbar an der Hautrekutierung beteiligt ist (Mizukawa et al., 2001; Wagers et al., 1998).

(2) Rolling

Durch den Einfluss verschiedener Entzündungsmediatoren, wie z. B. Histamin, werden unterschiedliche Selektine (E-, P- und L-Selektine) vermehrt auf der Oberfläche von Endothel oder Lymphozyten exprimiert (Ley, 2003). Diese bilden mit ihren Liganden (PSGL-1, ESL) lockere Bindungen aus. Durch die Strömung werden sie aber immer wieder vom Endothel losgerissen, so dass ein Rollen entlang der Gefäßwand mit wechselndem Kontakt zwischen Lymphozyt und Endothel entsteht, das so genannte „Rolling“ (Pober et al., 2001; Vestweber und Blanks, 1999).

(3) Aktivierung

Im Rahmen einer Entzündung produziert das Endothel direkt oder das darunter liegende Gewebe proinflammatorische Chemokine. Beim Rolling bekommt der Lymphozyt Gelegenheit, mittels seiner Rezeptoren an diese Chemokine zu binden, und er wird aktiviert. In der Haut ist hier vor allem die Interaktion des von CLA-positive-Lymphozyten exprimierten Chemokinrezeptors CCR4 und seines Liganden TARC/CCL17 von Bedeutung. Dieser wird konstitutiv von EZ der postkapillären Venolen der Haut exprimiert (Campbell et al., 1999).

(4) Feste Bindung

Die aktivierten Lymphozyten bilden v. a. über die Integrine LFA-1, VCAM-1 oder ICAM-1,2 eine Integrinbindung mit dem Endothel aus (Bevilacqua et al., 1993). Diese ist nun deutlich fester als die Selektin-Bindung, so dass die Lymphozyten nicht mehr vom Blutstrom abgerissen werden (Pober et al., 2001). Das Endothel exprimiert konstitutionell ICAM-1 in niedriger Konzentration. Diese kann aber durch proinflammatorische Zytokine (TNF, IL-1) deutlich gesteigert werden (Dustin et al., 1986).

Auch α 4-Integrine (CD49d) vermitteln eine feste Bindung zwischen Lymphozyten und Endothel. Diese bilden Adhäsionsmoleküle entweder mit β 1-Integrinen (CD29), was zur Bildung von VLA-4 führt, oder mit α 7, was zur Bildung von LPAM-1 führt. Diese beiden, VLA-1 und LPAM-1, binden an das „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1). Ähnlich wie beim ICAM-1 findet man eine geringe Basisexpression des Endothels, die bei Entzündung deutlich gesteigert werden kann (Pober et al., 2001). Die Aktivierung der Lymphozyten bewirkt eine Konformationsänderung. Sie legen sich dachziegelartig auf das Endothel und wandern langsam zu einer Zell-Junktion. Auch bei diesem Vorgang scheint die LFA-1/ICAM-1-Interaktion eine große Rolle zu spielen, da ICAM-1 nach Stimulation zunächst diffus auf der Endotheloberfläche exprimiert wird, sich darauf aber an den interzellulären Junktionszonen konzentriert (Bradley und Pober, 1996).

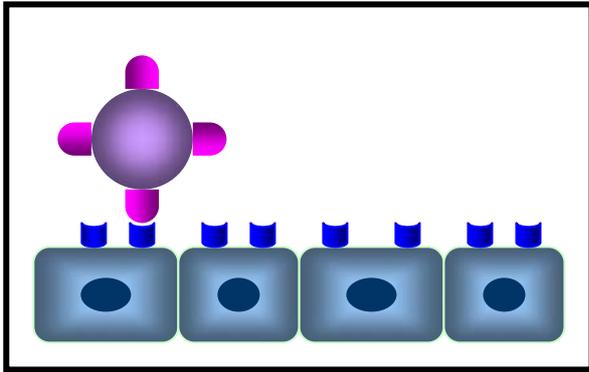
(5) Transendotheliale Migration

Die Haftung der Leukozyten auf endotheliales ICAM-1 und PECAM-1 (platelet endothelial adhesion molecule) bewirkt eine Kontraktion der Endothelzellen, welche dann den Leukozyten ermöglicht durch diese Lücken das Gefäß zu verlassen (Leukozytentransmigration) (Luscinskas et al., 2002). Aber nicht nur die durch Adhäsionsmoleküle erreichte Bindung der Lymphozyten führt zur transendothelialen Migration. Ein Lymphozyt kann die Endothelbarriere nur durchwandern, wenn er Rezeptoren aufweist, deren Chemokine dort lokal exprimiert werden (Ebert et al., 2005). Sie gelangen in das umliegende Gewebe, in dem sie chemotaktisch an den Entzündungsort geleitet werden (Chong et al., 2004).

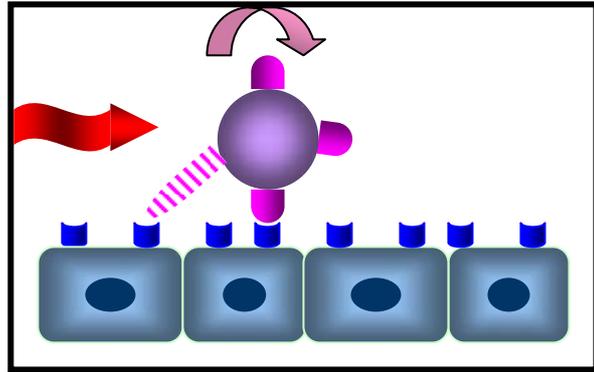
	Erstkontakt	Rolling	Aktivierung	feste Adhäsion
Lymphozyt	sLex, ESL, a4b1(VLA-4)	L-Selektin, PSGL-1, ESL	CCR-4	aLb2(LFA-1), a4b1(VLA-4), a4b7
Endothel	E-Selektin VCAM-1	sLex P-Selektin E-Selektin	TARC/CCL27	ICAM-1, -2, VCAM-1, MAdCAM-1

Tab. 4: Lymphozyten- und endothelständige Faktoren, die für die Rekrutierung von Lymphozyten in den verschiedenen Phasen des „Skin homings“ von Bedeutung sind (Shiohara und Mizukawa, 2005)

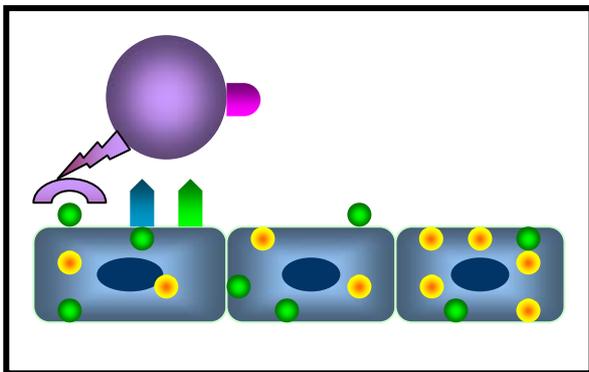
Modell der Lymphozytenextravasion



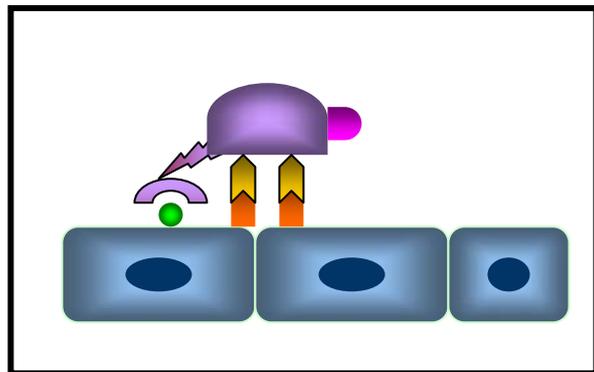
1. Phase: Initialer Kontakt



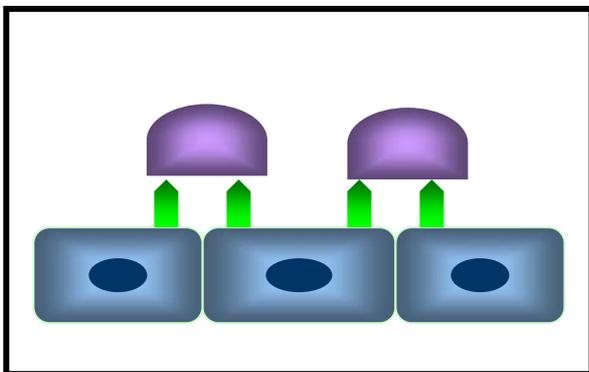
2. Phase: Rolling



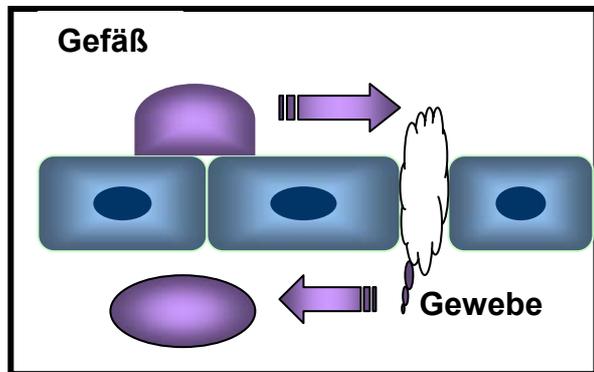
3. Phase: Aktivierung



4. Phase: a) Feste Adhäsion



4. Phase: b) Wanderung zur interzellulären Zone



5. Phase: Transmigration

Zeichenerklärung:



Abb. 3: Modell der Lymphozytentransmigration (modifiziert nach Butcher und Picker, 1996)

2. Phase: Migration der Lymphozyten im Gewebe

Die Migration der Lymphozyten im Gewebe verläuft gerichtet entlang des Verteilungsmusters der dort gebildeten Chemokine (Chemokingradient). Beteiligt sind dabei die auf der Oberfläche der Lymphozyten exprimierten Chemokinrezeptoren.

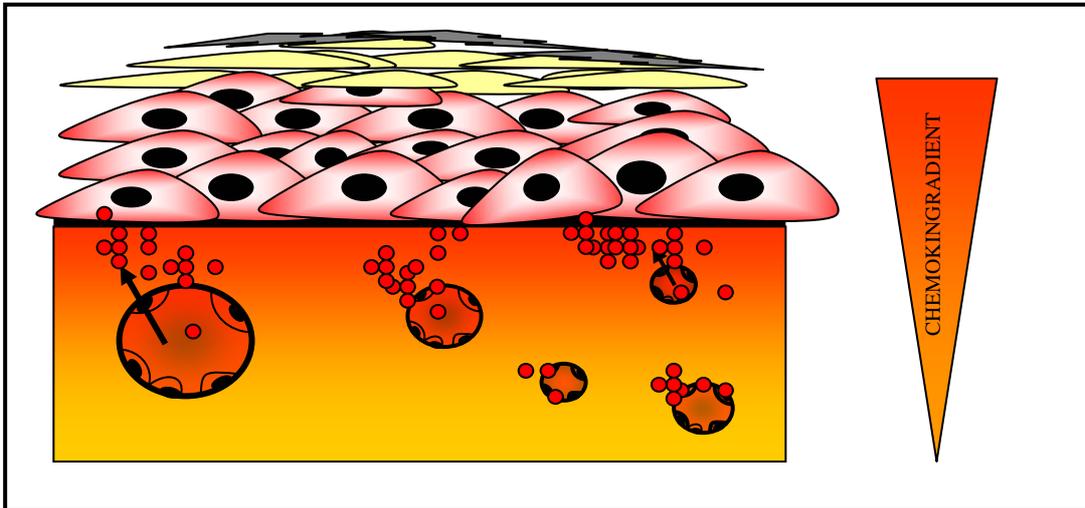


Abb. 4: Darstellung der Migration der Lymphozyten: Die Lymphozyten wandern entlang der Konzentration an Chemokinen aus dem Gefäß heraus gerichtet in die Haut (modifiziert nach Butcher und Picker, 1996).

1.4. Lymphozytenmarker, Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Chemokinrezeptoren, die in die Untersuchung mit eingingen.

1.4.1. Charakterisierung des zellulären Infiltrates

Leukozyten sind die Zellen des Immunsystems und an der Abwehr von Infektionen, Allergien, Entzündungen und Autoimmunreaktionen beteiligt. Jeder Leukozyt trägt charakteristische Oberflächenmoleküle, welche seine Interaktion im Rahmen der Immunreaktionen ermöglichen. Zunächst sollte das zelluläre Infiltrat der entzündlich veränderten Hautläsionen bei kutanem Lupus erythematodes charakterisiert werden. Dies erfolgte anhand der Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 und GranzymB.

CD3 (T-Zellen)

Alle ausgereiften T-Zellen tragen das Oberflächenmolekül CD3. Die weitere Unterscheidung der Untergruppen erfolgt über zusätzliche Oberflächenmoleküle.

Man unterteilt die T-Zellen in zwei große Untergruppen: die zytotoxischen T-Zellen, die vor allem an der zellulären Immunabwehr beteiligt sind, und die Gruppe der regulatorischen T-Zellen, die die Aktivität der B-Zellen und anderer Zellen reguliert.

CD4 (T-Helfer-Zellen)

CD4 ist ein transmembranäres Glykoprotein und gehört zur Familie der Immunglobuline. Es hat vier extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen. CD4 ist eines der Oberflächenmoleküle von T-Zellen. T-Zellen tragen meist entweder CD4 oder CD8, aber nie beide. CD4 interagiert mit Zellen, die das MHC-II-Molekül tragen.

Eine große Gruppe der regulatorischen T-Zellen wird T-Helfer-Zellen genannt. Diese exprimieren CD4. Die T-Helfer-Zellen werden anhand der Oberflächenmoleküle und der Chemokine, die sie freisetzen, wiederum in die TH1- und die TH2-Zellen unterteilt. TH1-Zellen sind beteiligt an verzögerten Immunreaktionen und können die Mithilfe der B-Zellen bewirken. TH2-Zellen aktivieren die Antikörperproduktion und beeinflussen die Aktivität eosinophiler Granulozyten. Inzwischen kennt man auch eine weitere Gruppe, die Th3-Zellen. Die genaue Funktion ist noch unklar. Sie scheinen aber eher eine supprimierende Funktion auf z. B. die Lymphozytenfunktion zu haben (Bach, 2001; Shinkai et al., 2002).

CD8 positive T-Zellen

CD8 besteht aus zwei Polypeptidketten. CD8 bindet an Zellen, die MHC-I-Moleküle an ihrer Oberfläche exprimieren. Nahezu alle zytotoxischen T-Zellen exprimieren CD8, daher ist dies ein geeigneter Marker, um CD8-Zellen im Gewebe oder Blut zu identifizieren.

CD20 (B-Zellen)

CD20 ist ein spezifisches Oberflächenmolekül der B-Lymphozyten. Über 95% der B-Zellen tragen diese Struktur, daher ist es einer der am häufigsten verwendeten B-Zell-Marker. B-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von

Autoimmunerkrankungen. Sie produzieren Autoantikörper, sekretieren Cytokine und präsentieren Antigene.

CD68 (Makrophagen)

Das CD68-Antigen ist ein 110-kD-Typ-I-Membran-Glykoprotein, welches hauptsächlich in Lysosomen, aber auch auf Zelloberflächen zu finden ist. Eine hohe Expression weisen Monozyten im Blut sowie Gewebsmakrophagen auf. CD68 konnte des Weiteren auf verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen werden.

Untersuchungen der CD68-Expression auf Zellen bei verschiedenen Hauterkrankungen, wie Psoriasis vulgaris, Lichen ruber planus oder discoidem Lupus erythematoses, zeigten eine deutlich erhöhte Expression dieses Antigens. Außerdem konnte eine Assoziation der Expression von MCP1 (monocyte chemoattractant protein) und der Häufung CD68-positiver Zellen nachgewiesen werden. Es wird daher angenommen, dass die Expression von MCP-1 in der Epidermis eine Rekrutierung CD68-positiver Zellen auslöst (Nakamura et al., 1998).

GranzymB (zytotoxische Lymphozyten)

GranzymB ist eine Serin-Protease, die in den Granula aktivierter zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen vorkommt. Das Molekül wird freigesetzt durch antigenspezifische Stimulation von T-Zell-Rezeptoren und dringt in die Zielzellen über Perforin-abhängige Porenbildung der Zellmembran ein und löst dort eine DNA-Fragmentierung aus und leitet die Apoptose ein (Wowk und Trapani, 2004) .

Es konnte nachgewiesen werden, dass GranzymB eine Rolle bei der Gewebszerstörung bei Autoimmunerkrankungen spielt. Außerdem konnte es in hohen Konzentrationen im Plasma und in der Gelenkflüssigkeit bei der rheumatoiden Arthritis gefunden werden. Auch hier wird eine Beteiligung in der Pathogenese vermutet (Ronday et al., 2001). GranzymB stellt somit einen wichtigen Marker für zytotoxische T-Zellen dar.

1.4.2. Das Adhäsionsmolekül CLA

CLA (Cutaneous lymphocyte antigen) ist ein Carbohydrat-Epitop, welches 90% der am T-Zell-Homing beteiligten T-Lymphozyten exprimieren, wogegen nur 10-15% der zirkulierenden T-Zellen diese Struktur an der Oberfläche tragen. Das Adhäsionsmolekül

CLA eignet sich somit sehr gut als Marker zur Darstellung einer Rekrutierung von Lymphozyten (Berg et al., 1991; Homey und Bunemann, 2004; Picker et al., 1990). Die Expression von CLA wird durch verschiedene Cytokine wie z. B. IL-12 induziert (Leung et al., 1995).

CLA auf T-Zellen bildet mit E-Selektin auf entzündetem dermale Epithel ein Rezeptor-Liganden-Paar, das selektiv die T-Zell-Extravasation in chronisch entzündeter Haut reguliert (Berg et al., 1991; Chong et al., 2004; Picker et al., 1991; Picker et al., 1994). E-Selektin wird außer an den Gefäßen der Haut auch in anderen entzündlichen Bereichen verschiedener Organsysteme exprimiert, so dass die CLA/E-Selektin-Interaktion nicht hautspezifisch ist (Groves et al., 1991; Homey und Bunemann, 2004). Es müssen somit andere Strukturen für die hautspezifische Rekrutierung von Lymphozyten verantwortlich sein.

Man fand heraus, dass CLA⁺-Lymphozyten, die in die Haut rekrutiert wurden ebenfalls CCR4 exprimieren (Campbell et al., 1999), welches TARC/CCL17 bindet und bei dem Übergang des rollenden in das statische Stadium der Lymphozytenrekrutierung eine Rolle spielt. Außerdem exprimieren sie CCR10 (Homey et al., 2002), welches ebenfalls eine chemotaktische Wirkung auf CLA⁺-Zellen hat (Morales et al., 1999).

1.4.3. Die Rolle von Chemokinen und ihren Rezeptoren bei Entzündungen

Funktionell kann man die Chemokine in homöostatische (konstitutiv exprimierte) und pro-inflammatorische (induzierbare) Chemokine unterteilen.

Die Expression der pro-inflammatorischen Chemokine ist, wie bereits oben erwähnt, bei entzündlichen Vorgängen induzierbar. Sie werden von zahlreichen Zellen exprimiert, um die Effektorzellen des Immunsystems in den Bereich der Entzündung zu rekrutieren. Je nach Rezeptor können sie dabei gezielt verschiedene Zelltypen anlocken. Zum Beispiel werden aktivierte T-Lymphozyten und B-Zellen chemotaktisch von Liganden des CXCR3-Rezeptors rekrutiert (Loetscher et al., 1996; Park et al., 2002).

Die Effekte inflammatorischer Chemokine im Rahmen von Entzündungen sind in vielen Beispielen belegt. Bei Autoimmunerkrankungen, wie z. B. dem Lupus erythematodes, tritt eine starke Immunantwort gegen ein körpereigenes Antigen auf, was zahlreiche klinische Manifestationen zur Folge hat. Bei dieser chronisch entzündlichen Erkrankung werden Lymphozyten durch Autoantigene und Antigen-präsentierende Zellen (APC) in

den betroffenen Organen bzw. in der Haut aktiviert. Darauf werden inflammatorische Chemokine gebildet, die wiederum Lymphozyten rekrutieren und so den chronischen Verlauf der Erkrankung fördern.

1.4.3.1. Die homöostatische Faktoren: CCR4 und TARC/CCL17

CCR4 ist ein G-Protein gekoppelter sieben-transmembran-Rezeptorkomplex, der spezifisch für Liganden wie TARC/CCL17 (thymus-activation-regulates chemokine) und MDC (makrophage-derives chemokine) ist. TARC/CCL17 wird vor allem von Antigen präsentierenden Zellen (APC), wie zum Beispiel dendritischen Zellen, sezerniert (Imai et al., 1997; Imai et al., 1998; Vulcano et al., 2001).

Auf aktivierten Endothelzellen führt die Bindung zwischen CCR4 und seinem Ligand TARC/CCL17 zur Förderung der T-Zell-Extravasation in Folge der Stimulation durch Integrin-abhängige Adhäsion von CLA⁺ Zellen an das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) (Campbell et al., 1999; Schon et al., 2003; Soler et al., 2003).

In verschiedenen Arbeiten konnte die Expression von CCR4 vor allem auf CLA⁺-CD4⁺-T-Zellen dargestellt werden, welche an der Interaktion der Gedächtnis-T-Zellen mit dem Gefäßendothel der entzündeten Haut beteiligt sind. Auf intestinalen Gedächtnis T-Zellen konnte dagegen keine vermehrte Expression von CCR4 gefunden werden, so dass eine Spezifität für die Haut wahrscheinlich ist (Campbell et al., 1999; Kunkel et al., 2002)

Vor allem TH2-Zellen exprimieren CCR4. Diese beginnen dann auf Stimulation mit IL-2 mit der Produktion von IL-4 und IL-5 (Imai et al., 1999). Anhand anderer Studien konnte aber CCR4 auf allen Gedächtnis T-Zellen nachgewiesen werden, die CLA exprimieren, somit auf TH1- als auch TH2-Zellen und anderen Gruppen von systemischen Gedächtnis-T-Zellen {Campbell et al., 1999}.

Es scheint bei der Regulation des T-Zell-Rollings und der Extravasation verschiedene Möglichkeiten zu geben, bei denen CCR4 und auch CCR10 eine große Rolle spielen. Beide Wege können alleine die Einwanderung der T-Zellen regulieren und nur die Blockierung beider führt zu einer Blockierung der T-Zell-Rekrutierung (Reiss et al., 2001). Es wird vermutet, dass CCR4 und seine Liganden in das initiale Rekrutment der T-Zellen in die entzündete Dermis beteiligt sind, aber nicht in die Epidermis (Rottman et al., 2001).

Erkrankungen, bei denen eine vermehrte Expression von CCR4 gezeigt wurde, sind Atopische Dermatitis (typische TH2-Krankheit) (Biedermann et al., 2002; Nakatani et al., 2001; Wakugawa et al., 2001), Psoriasis (Inaoki et al., 2003; Rottman et al., 2001) und kutane T-Zell-Lymphome (Ferenczi et al., 2002; Kallinich et al., 2003).

Die CCR4-Expression in CLE wurde bisher nicht näher untersucht. Beim aktivierten SLE konnte aber eine erhöhte Expression auf CD4⁺-T-Lymphozyten gefunden werden (Hase et al., 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die CCR4-Expression signifikant mit der Serumkonzentration von IL-10 und die Serumkonzentration von IL-10 mit der Aktivität des SLE korreliert (Hase et al., 2001; Lacki et al., 1997).

TARC (Thymus-and-activation-regulated chemokine)/CCL17 bindet an den CCR4-Rezeptor (Imai et al., 1997). Dieses Chemokin wird von Antigen präsentierenden Zellen wie z. B. dendritischen Zellen (Imai et al., 1997; Imai et al., 1998; Lieberam und Forster, 1999; Vulcano et al., 2001), aber auch Keratinozyten bei entzündlichen Prozessen synthetisieren (Vestergaard et al., 2000). Die Produktion von TARC/CCL17 durch Monozyten konnte durch Stimulation mit GM-CSF oder IL-3 vor allem in Gegenwart von IL-4 hervorgerufen werden (Imai et al., 1999).

TARC/CCL17 induziert eine Integrin-abhängige Adhäsion von CLA⁺-T-Zellen an ICAM-1 *in vitro*. Da TARC/CCL17 in postkapillären Venolen detektiert wurde, konnte man vermuten, dass die Extravasation von T-Zellen in die Haut durch die Interaktion von CLA mit E-Selektin, CCR4 mit TARC/CCL17 und Leukozyten-Funktions-Antigen (LFA-1) mit ICAM-1 reguliert wird. TARC/CCL17 konnte sowohl im Blut als auch in der Haut bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden (Ferenczi et al., 2002). Da ebenfalls ICAM-1 und E-Selektin in den CTCL-Läsionen erhöht war (Fivenson und Nickoloff, 1992), untermauert dies die Annahme, dass diese Faktoren bei der Extravasation von Skin-Homing-T-Zellen in die CTCL-Läsionen von Bedeutung sind.

Imai et al. fanden zusätzlich heraus, dass die Produktion von TARC/CCL17 und MDC durch APC in dem erkrankten Gebiet zu einer chemotaktischen Migration der zirkulierenden CCR4 exprimierenden T-Zellen führt (Imai et al., 1998). Rekrutierte TH2-Zellen können Cytokine wie IL-3, IL-4 und Granulozyten-Makrophagen-Colony-stimulierenden Faktor (GM-CSF) sezernieren, die wiederum die Produktion von TARC/CCL17 durch APC steuern.

Es wird vermutet, dass CCR4 und TARC/CCL17 bei der Pathogenese immunologischer Erkrankungen eine Rolle spielen, da CCR4 und TARC/CCL17 sowohl bei Atopischer Dermatitis (Vestergaard et al., 2000) als auch bei Psoriasis in den Hautläsionen vermehrt exprimiert werden (Rottman et al., 2001).

Bei Atopischer Dermatitis fand man eine TARC/CCL17 Expression in der basalen Epidermis, was die Rolle dieser Chemokine bei der Einwanderung von CCR4 exprimierenden TH2- Zellen untermauert (Vestergaard et al., 1999). Die Konzentration korrelierte mit der Schwere der Erkrankung (Kakinuma et al., 2003 a). Auch beim SLE fand man erhöhte Plasma-Level bei aktiver Erkrankung (Kallinich et al., 2003).

1.4.3.2. Die pro-inflammatorische Faktoren: CXCR3 und CXCL10/IP10

CXCR3 ist ein G-Protein-gekoppelter sieben-transmembran-Rezeptor der CX-Familie. Seine Liganden sind die Chemokine CXCL10/IP10 (IFN induced protein 10), MIG („Monokine induced by IFN/CXCL9) und I-TAC (IFN-inducible T-cell alpha-chemoattractant/CXCL11) (Cole et al., 1998; Loetscher et al., 1996).

Die Aktivierung von CXCR3 mit den Liganden CXCL10/IP10, MIG und I-TAC führt zur Chemotaxis aktivierter T-Zellen in entzündliche Läsionen (Cole et al., 1998; Liao et al., 1995; Loetscher et al., 1996; Taub et al., 1993). Typ-I-Interferon ist in der Lage, alle drei Liganden zu induzieren (Clark-Lewis et al., 2003; Padovan et al., 2002; Taylor et al., 2004).

Der Rezeptor wird von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen exprimiert (Qin et al., 1998), wobei die Expression auf TH1-Zellen deutlich höher ist als auf TH2-Zellen (Annunziato et al., 1998; Bonecchi et al., 1998; Loetscher et al., 1998; Sallusto et al., 1998). Dies zeige sich vor allem, wenn ebenfalls die Aktivitätsoberflächenmarker CD25 und CD69 vorhanden sind (Qin et al., 1998). Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die Signale durch CXCL10/IP10 und MIG einen bedeutenden Mechanismus für die selektive Rekrutierung der aktivierten T-Zellen bzw. Effektor-T-Zellen darstellen, die dafür bekannt sind, dass sie bevorzugt in entzündlichem Gewebe akkumulieren (Mackay, 1993). Auch die Beobachtung, dass CXCR3 IL-2-stimulierte T-Zellen dazu aktiviert, an ICAM-1 und VCAM-1 zu binden, spricht für die Beteiligung an der Rekrutierung von T-Zellen in entzündetes Gewebe (Piali et al., 1998). Die Reaktion auf CXCL10/IP10 und MIG,

kombiniert mit der Expression der Liganden für E- und P-Selektin, bewirkt die Migration von TH1- und TH0-Zellen in die entzündlichen Areale (Austrup et al., 1997).

Die Expression von CXCR3 ist deutlich erhöht bei entzündlichen Erkrankungen, wie Sarkoidose (Agostini et al., 1998), auf Lymphozyten in der Umgebung von Blutgefäßen im Entzündungsbereich bei Rheumatoider Arthritis (Qin et al., 1998) oder auf CLA⁺-Lymphozyten in der Haut bei Psoriasis (Rottman et al., 2001).

Bezogen auf den Lupus erythematodes wurde die Interaktion zwischen CXCR3 exprimierenden T-Zellen und CXCL10/IP10 mit der Gewebeerstörung beim SLE in Zusammenhang gebracht (Amoura et al., 2003; Segerer et al., 2004).

CXCL10/IP10 steht für Interferon-inducible protein of 10kDa, d. h. die kodierende mRNA hat ein Gewicht von 10kDa. Die Expression von CXCL10/IP10 wurde in verschiedenen Geweben wie z. B. Gehirn, Auge, Lunge, Lymphknoten, Leber, Herz, Blutgefäßen usw. nachgewiesen. CXCL10/IP10 trat dort meist im Rahmen einer Infektion oder Entzündung auf. Somit sind auch verschiedenste Zelltypen (Endothelzellen, Keratinozyten, Monozyten, Astrozyten oder Epithelzellen des respiratorischen Systems) in der Lage, CXCL10/IP10 zu sezernieren (Farber, 1990).

Eine deutlich erhöhte Expression tritt bei TH1-medierten entzündlichen Erkrankungen auf, wie z. B. bei Psoriasis (Gottlieb et al., 1988) oder Sarkoidose (Agostini et al., 1998). Dort spielt es eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung aktivierter Effektor-T-Zellen in das entzündete Gewebe.

CXCL10/IP10 wirkt chemotaktisch auf aktivierte T-Zellen (vor allem CD4⁺-TH1-Zellen) und NK-Zellen durch Bindung an den Chemokinrezeptor CXCR3 (Bonecchi et al., 1998; Loetscher et al., 1996; Maghazachi et al., 1997; Sallusto et al., 1998; Taub et al., 1993). Weiterhin induziert CXCL10/IP10 die Adhäsion aktivierter T-Zellen an VCAM und ICAM (Piali et al., 1998), steigert die IFN γ -Produktion von CD4⁺-TH1-Lymphozyten und verhindert die IL-8, FGF- und VEGF-induzierte Angiogenese (Arenberg et al., 1997). Induziert wird CXCL10/IP10 durch Typ-I (IFN- α/β)- und Typ-II (IFN γ)-Interferon (Luster et al., 1985; Meller et al., 2005; Narumi et al., 1992).

1.4.4. MxA - Marker für eine Interferon-Typ-I-Beteiligung

MxA ist eine ubiquitär auftretende cytoplasmatische GTPase mit antiviraler Aktivität, besonders gegen RNA-Viren (Haller und Kochs, 2002). Es ist assoziiert mit Membranen

des glatten endoplasmatischen Retikulums und kann an Elemente des Zytoskeletts wie Aktin und Tubulin sowie verschiedene andere zelluläre Proteine binden (Accola et al., 2002; Horisberger, 1992).

Die Expression von MxA wird vor allem durch IFN α/β induziert. Die schnelle spezifische Induzierbarkeit ermöglicht die Verwendung von Mx-Proteinen als Marker für die Synthese von Interferon-Typ-I (Haller und Kochs, 2002). Die MxA-Expression konnte in verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen gefunden werden, in denen Typ-I-Interferon pathophysiologisch eine Rolle spielt, wie z. B. virale Infektionen (Varizella Zoster, Herpes simplex), Lichen ruber planus und Lupus erythematoses (Fah et al., 1995). Außerdem wurde Interferon-Typ-I als Induktor TH1-vermittelter Immunreaktionen beschrieben (Klimpel et al., 1990). Beim LE wurden entsprechend anderen Untersuchungen eine starke läsional abhängige Expression von MxA in der entzündeten Epidermis und den dermalen Entzündungsgebieten gefunden, und zwar in allen CLE-Untergruppen (Fah et al., 1995; Farkas et al., 2001; Ronnblom und Alm, 2001).

2. Fragestellung der Arbeit

Das Einwandern von Lymphozyten in die Haut stellt einen wichtigen Prozess in der Pathogenese von entzündlichen Dermatosen dar. Trotz zahlreicher neuer Erkenntnisse bezüglich des Mechanismus der Zellmigration, die besonders die Funktion der Chemokine und ihrer Rezeptoren betreffen, sind viele Fragen weiterhin unbeantwortet. Insbesondere war nicht bekannt, inwieweit beim kutanen Lupus erythematoses Adhäsionsmoleküle und Chemokine an der Rekrutierung von Lymphozyten in die Haut beteiligt sind.

Die spezifische Fragestellung dieser Arbeit lautet, welche Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Rezeptoren exprimiert sind und somit an der Rekrutierung von Lymphozyten beim kutanen Lupus erythematoses beteiligt sein können. Im Speziellen wurde das entzündliche Infiltrat durch Verwendung monoklonaler Antikörper charakterisiert (CD3, CD4, CD8, CD20, CD68) sowie die Expression des für die Haut zentralen Adhäsionsmoleküls CLA dargestellt. Weiterhin wurden der homöostatische Chemokinrezeptor CCR4 und sein Ligand TARC/CCL17 untersucht. Im Anschluss wurde eine mögliche Beteiligung des Interferonsystems (MxA als IFN-induziertes Protein, das IFN-regulierte Chemokin CXCL10/IP10 und sein Rezeptor CxCR3) untersucht sowie das Verteilungsmuster zytotoxischer Proteine (GranzymB) auf potentiellen Effektorzellen dargestellt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Paraffinblöcke

Für die histologischen Untersuchungen wurden Paraffinblöcke mit Gewebeproben von Patienten verwendet, die im Zeitraum von 1990 bis 2004 im Rahmen der Routinediagnostik entnommen wurden. Alle Proben stammen von Patienten, die in der Autoimmunsprechstunde der Klinik für Dermatologie der Universität Bonn über längere Zeit betreut wurden. Die Diagnosestellung bezüglich der jeweiligen Hauterkrankung erfolgte anhand klinischer, histologischer und immunhistologischer Standardkriterien im Rahmen der Autoimmunsprechstunden.

Alle Hautproben wurden den Patienten zu diagnostischen Zwecken entnommen, zu einem Zeitpunkt eines akuten Auftretens, bevor eine Behandlung begonnen wurde.

Es wurden die Daten von 25 Patienten aufgenommen. Die Gruppe der Patienten mit Lupus erythematoses umfasst 14 Patienten, die Kontrollgruppe 11 Patienten.

Die Gruppe der Patienten mit Lupus erythematoses setzte sich wie folgt zusammen: Patienten mit subakut kutanem LE (SCLE) (n=4), mit systemischem LE (SLE) (n=4), mit disseminiert chronisch discoidem LE (CDLE) (n=6). Das Kontrollkollektiv setzte sich zusammen aus gesunden Patienten (n=5), Patienten mit Psoriasis (n=3) sowie Herpes-simplex-Virus (n=3).

Das Alter der Patienten betrug zwischen 18 und 89 Jahren. Alle waren mitteleuropäischer Abstammung.

Alle Patienten waren mit der Verwendung der Hautproben für wissenschaftliche Untersuchungen einverstanden. Es liegt eine Bestätigung der Ethik-Kommission (Lfd. Nr. 090/04) bezüglich des Antrags zur „Untersuchung zu migratorischen und immunregulatorischen Eigenschaften kutaner T-Zellen bei verschiedenen Erkrankungen der Haut“ vor.

3.1.2. Material für die immunhistologischen Färbungen

Puffer und Lösungen

- LSAB2™ staining kit von Dako, Hamburg, Germany
- Envision™ System von Dako, Hamburg, Germany
- PBS-Spüllösung (Phosphate Buffered Saline) (Dulbecco und Vogt, 1954)
- Mayer's Hämalaun-Lösung

Antikörper

- CLA : HECA 452; BD Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.
- CD3: F7238; Dako, Hamburg, Germany
- CD4: 1f6; Novocastra, Newcastle upon Tyne, U.K.
- CD8: C8/144B; Dako, Hamburg, Germany
- CD20: L26; Dako, Hamburg, Germany
- CD68: PGM1; Dako, Hamburg, Germany
- CCR4: 1G1, biotin, BD Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.
- TARC/CCL17: ETR01, from R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.
- TRITC-conjugated anti-mouse: Dako, Hamburg, Germany
- FITC-labeled rabbit-streptavidin: Dako, Hamburg, Germany
- CXCL10/IP10: Clone 33036, R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.
- CXCR3: 1C6, PharMingen™, San Diego, CA, U.S.A.
- GranzymB: GrB-7; Dako, Hamburg, Germany
- MxA: M143; Prof. O. Haller, University of Freiburg, Germany
- Mikroskop: Olympus BH2
- Kamera: Olympus DP 70 Digital Camera System

3.2. Methoden

3.2.1. Immunhistochemische Färbung von formalinfixiertem Gewebe

Als Grundlage für die Gewebeschnitte wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Hautbiopsien verwendet. Diese wurden wie unter 3.2.1.1. beschrieben vorbehandelt.

Die anschließende immunhistochemische Färbung ist unter 3.2.1.2. erläutert. Eine immunhistochemische Färbung besteht prinzipiell aus drei Schritten: der Gewebevorbehandlung, der Antikörperinkubation und der Visualisierung der Reaktion.

3.2.1.1. Vorbehandlung der Paraffinschnitte:

1) Paraffinschnitte:

Alle Färbungen wurden an Formalin (97% w/v Formaldehyd)- fixiertem und in Paraffin gebettetem Gewebematerial durchgeführt.

Formalin zeigt eine gute Durchdringungsfähigkeit des Gewebes und bewahrt die zytomorphologischen Details bzw. die Immunlokalisation der Antigene, bei minimaler Antigenmaskierung.

Der Nachweis mancher Antigene ist nach Fixierung in formaldehydhaltigen Fixantien nicht mehr möglich, sie können aber durch geeignete Vorbehandlung, z. B. durch proteolytische und/oder hitzeinduzierte Antigenmaskierung wieder nachweisbar sein.

Formaldehyd reagiert in erster Linie mit basischen Aminosäuren, wobei es zur Bildung quervernetzender Hydroxymethylenbrücken kommt. Monoklonale Antikörper binden an ein spezielles Epitop eines Immunogens. Wenn Formalin mit den Aminosäuren des betreffenden Epitops reagiert (Epitopstruktur zerstört), kann der Antikörper nicht mehr binden (irreversibel).

Auch physikalische Einflüsse, wie Hitzeeinwirkung bei der Paraffineinbettung (50-60 °C), können Epitope zerstören.

2) Antigenmaskierung (Epitop-Retrieval)

Ergebnis der formalininduzierten Konformationsänderung von Epitopen kann ein partieller oder vollständiger Verlust der Immunreaktivität sein, auch „Maskierung“ des Antigens genannt.

Ein erster Ansatz, die Immunreaktivität wieder zu verbessern, war der Einsatz proteolytischer Enzyme, deren Andauung versteckte Determinanten freilegte bzw. wieder zugänglich machte. Enzyme bringen jedoch das Risiko mit sich, dass sie Epitope zerstören.

Shi et al. (1991) berichteten von einer neuen Methode zur Wiederherstellung der Immunreaktivität in FFPE-Gewebeschnitten (Shi et al., 1991). Diese Methode setzte Pufferlösungen mit verschiedenen Metallen und Erhitzen mit Mikrowellen ein. Einen weiteren Fortschritt erlangten Cattoretti et al. (1993), die anstatt Metalllösungen einen Citratpuffer pH 6,0 verwendeten (Cattoretti et al., 1993). Iczkowski et al. (1999) kombinierten Dampfhitze mit Proteaseandauung, wodurch das Färbeergebnis im Vergleich zu nur einer dieser Methoden verbessert wurde (Iczkowski et al., 1999).

Das Prinzip der Antigendemaskierung beruht auf der unterschiedlich langen Einwirkung von Hitze auf FFPE-Gewebeschnitte in wässrigem Medium. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte werden die Objektträger in eine wässrige Lösung eingetaucht, die üblicherweise als „Retrieval-Lösung oder -Puffer“ (Retrieval Solution / Buffer) bezeichnet wird. Eingelegt in die Retrieval-Lösung werden die Gewebeschnitte der Hitzewirkung ausgesetzt, z. B. in Mikrowellenöfen, Wasserbädern, Dampfgeräten oder Autoklaven. Die meisten AR-Methoden arbeiten bei Temperaturen um 95-99°C für 10 bis 60 Minuten. Wichtig ist eine anschließend langsame Abkühlung über 10 bis 20 Minuten, da einige Antigene keine schnelle Abkühlung vertragen. Der genaue Wirkmechanismus der AR-Methode ist noch nicht geklärt. Einen Teil der Schäden, die durch die Formalinfixierung entstanden sind, scheint die Hitze rückgängig zu machen. Dass es durch die Hitze nicht zur Denaturierung kommt, ließe sich dadurch erklären, dass die durch Formalin entstandenen Querbrücken zum Teil erhalten bleiben und die Proteine stabilisieren.

3.2.1.2. Grundprinzipien immunhistochemischer Färbemethoden

Das Prinzip aller immunhistochemischen Färbeverfahren beruht auf einer Komplexbildung zwischen den jeweiligen Antigenen und den dazugehörigen spezifisch bindenden Antikörpern. Diese Antigen-/Antikörperkomplexe werden durch Kopplung der Antikörper mit verschiedenen Markersystemen im Gewebe sichtbar gemacht (Avrameas, 1972). Prinzipiell unterscheidet man eine direkte und eine indirekte

Nachweismethode. Bei der „direkten Methode“ reagiert ein enzymmarkierter Primärantikörper mit dem Gewebeantigen. Bei der „indirekten Methode“ reagiert ein enzymmarkierter Sekundärantikörper mit einem unkonjugierten Primärantikörper, der an ein Gewebeantigen gebunden ist.

Die durch Coons (1950) eingeführte Kopplung von Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) an einen Antikörper steht am Beginn der immunhistologischen Nachweisverfahren (Coons und Kaplan, 1950). Der Vorteil dieser Immunfluoreszenzmethode ist ihre hohe Sensitivität und Spezifität.

Immunoenzymatische Verfahren nutzen Enzym-Substratreaktionen, um farblose Chromogene in gefärbte Endprodukte umzuwandeln. Mit Hilfe von enzymgekoppelten Antikörpern wird eine Antigen-Antikörperreaktion nun sichtbar.

Enzyme beschleunigen chemische Reaktionen; ihre katalytische Wirkung kann sehr hoch sein (Taylor, 1978).

Die Auswahl eines geeigneten Enzyms wird durch folgende Kriterien bestimmt:

- Hohe Spezifität und Umsatzrate
- Hohe Stabilität bei Raumtemperatur
- Konjugierbarkeit ohne Aktivitätsverlust (Avrameas, 1972)
- Das gebundene Enzym soll in wässriger Lösung stabil sein.
- Eine endogene Enzymaktivität sollte die antigenspezifische Färbung nur minimal stören.
- Das Endprodukt der enzymatischen Reaktion sollte leicht nachweisbar und stabil sein.
- Meerrettichperoxidase und alkalische Phosphatase erfüllen die meisten dieser Kriterien.

1) Peroxidase-Verfahren

Das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) (MW 40 kD) wird aus der Wurzel der Meerrettichpflanze gewonnen.

HRP besitzt eine eisenhaltige Hämgruppe (Hämatin) als aktives Zentrum und ist in Lösung braun gefärbt. Hämatin bildet mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) einen Komplex unter Anwesenheit eines Elektronendonors, wobei der Komplex anschließend in Wasser (H_2O) und molekularem Sauerstoff (O_2) zerfällt. HRP kann verschiedene Substanzen

(Elektronendonator) oxidieren. Eine Zugabe von Wasserstoffperoxid im Überschuss bewirkt eine Eliminierung der endogenen Peroxidaseaktivität, wodurch die unspezifische Färbung des Hintergrundes verringert wird (Taylor, 1978).

Es gibt verschiedene Elektronendonoren, die durch Oxidation in gefärbte und unlösliche Produkte umgewandelt und daher Chromogene genannt werden.

Das Chromogen muss spezifisch für das jeweilige Enzymsubstrat sein und zu einem stabilen, farbigen Endprodukt präzipitieren, das gut unter dem Lichtmikroskop sichtbar ist. Auch sollte das Reaktionsprodukt mit den in der Histologie gebräuchlichen Gegenfärbungen kompatibel sein, bei der Dehydrierung und dem Eindecken nicht verblassen sowie die enzymatische Aktivität nicht beeinträchtigen (Taylor, 1978).

Am häufigsten gebräuchlich ist das 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Es polymerisiert in Anwesenheit der Peroxidase und H_2O_2 zu einem braunen Endprodukt. Nachteilig ist die immer wieder diskutierte Kanzerogenität (Taylor, 1978).

2) Alkalische Phosphatase (AP)

Die Alkalische Phosphatase wird aus Kälberdarm gewonnen (MW 100kD). AP spaltet bei der Phosphatase-Färbemethode Naphtholphosphatester (Substrat) hydrolytisch in Phenolverbindungen und Phosphate. Die Phenole reagieren mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogenen) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe.

3.2.1.3. Färbemethoden

3.2.1.3.1. Direkte Methode

Ein enzymmarkierter Primärantikörper reagiert mit dem Gewebeantigen. Mit der nachfolgenden Chromogen-Substrat-Reaktion wird dieser dann sichtbar gemacht.

Dadurch, dass nur ein Antikörper beteiligt ist und so keine Signalverstärkung auftritt, wird diese Methode heute nur bei stark exprimierten Antigenen angewandt (siehe Abb. 5a).

3.2.1.3.2. Indirekte Methode

Hier bindet zuerst ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Der enzymmarkierte Sekundärantikörper ist gegen die Immunglobulinfraktion der Spezies

(Maus, Kaninchen) gerichtet, von der der Primärantikörper (jetzt das Antigen) stammt (2-Schritt-Methode). Das anschließend zugegebene Chromogensubstrat lässt ein Farbprodukt entstehen (siehe Abbildung 5).

Diese Methode bietet einige Vorteile. Eine Vielzahl von Primärantikörpern aus einer Tierspezies können mit einem einzigen markierten Sekundärantikörper reagieren wodurch eine Signalverstärkung erreicht wird (Boenisch, 2000).

3.2.1.3.2.1. (Strept-)Avidin-Biotin-Komplex-Methode (LSAB)

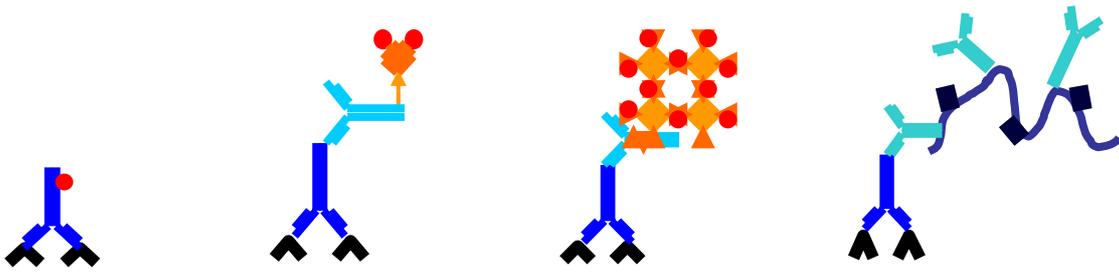
Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein noch sensitiveres Verfahren. Es basiert auf der Fähigkeit von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) und Avidin (Hühnereiweiß), vier Moleküle des Vitamins Biotin binden zu können (Boenisch, 2000).

Der unkonjugierte Primärantikörper wird mit dem biotinmarkierten (biotinylierten) Sekundärantikörper gekoppelt. Daran wird wiederum entweder ein (Strept-)Avidin-Biotin-Enzymkomplex gekoppelt (sog. ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) bzw. SABC-Methode (StreptAvidin-Biotin-Complex)). Bei der sog. LSAB-Methode (Labelled StreptAvidin-Biotin-Methode) ist Streptavidin direkt an das Enzym Peroxidase gekoppelt und kann ohne Komplexbildung an den biotinylierten Sekundärantikörper binden. Bei beiden Methoden erfolgt zum Schluss die Farbreaktion mit der Substrat-Chromogen-Lösung (siehe Abbildung 5).

3.2.1.3.2.2. Polymerkonjugat-Methode (EnVision™)

An den unkonjugierten Primärantikörper wird als Sekundärantikörper ein Dextranmolekül gekoppelt, an das wiederum ca. 70 Enzymmoleküle und ca. 10 Moleküle Sekundärantikörper konjugiert sind (EnVision™-Polymer).

Man hat so ein noch schnelleres und sensitiveres Verfahren, das außerdem eine geringe Neigung zu unspezifischen Hintergrundfärbungen aufweist (siehe Abbildung 5).



a: direkte Methode b: ABC-Methode c: LSAB-Methode d: EnVision™-Methode

Zeichenerklärung



Abb. 5 a-d: Darstellung von Markierungsprinzipien immunhistochemischer Untersuchungsmethoden. Modifiziert nach Boenisch (2000).

a: Bei der direkten Methode reagiert der enzymmarkierter Primärantikörper direkt mit dem Gewebeantigen. Über das gebundene Peroxidase-Enzym kann der Antikörper sichtbar bemacht werden.

b: Der unkonjugierte Primärantikörper bindet an das Gewebeantigen. An den Primärantikörper wiederum bindet der biotinmarkierten (biotinylierten) Sekundärantikörper. Daran wird wiederum ein (Strept-)Avidin-Biotin-Enzymkomplex gekoppelt (sog. ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex)), welcher mehrere Peroxidase-Enzyme bindet. Dies führt zu einer Verstärkung des Signals.

c: Bei der sog. LSAB-Methode (Labelled StreptAvidin-Biotin-Methode) ist Streptavidin direkt an das Enzym Peroxidase gekoppelt und kann ohne Komplexbildung an den biotinylierten Sekundärantikörper binden.

d: An den unkonjugierten Primärantikörper wird als Sekundärantikörper ein Dextranmolekül gekoppelt, an das wiederum ca. 70 Enzymmoleküle und ca. 10 Moleküle Sekundärantikörper konjugiert sind (EnVision™-Polymer), was zu einer deutlichen Wirkverstärkung führt.

3.2.2. Färbeprotokolle

3.2.2.1. Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Antikörper/Spezies	pH-Wert	Dampfgerar 10 min. (95°)	Vorbehandlung mit Proteinase K (10 Minuten)	Verdünnung
CD3; Maus	pH9	X	X	1:20
CD4; Maus	pH9	X	-	1:10
CD8; Maus	pH6,1	X	-	1:10
CLA; Maus	pH6,1	X	X	1:20
CD20; Maus	pH6,1	X	-	1:100
CD68 (PG-M1); Maus	pH6,1	X	-	1:100
CCR4; Maus	pH9	X	X	1:50
TARC/CCL17; Ziege	pH9	X	X	1:10
CXCL10/ IP10; Maus	pH6,1	X	X	1:25
CXCR3; Maus	pH6,1	X	X	1:100
MxA; Maus	-	-	-	1:100
GranzymeB; Maus	pH6,1	X	X	1:100

Tab. 5: Vorbehandlung der Paraffinschnitte je nach verwendetem Antikörper

3.2.2.2. Protokoll der Färbung nach der LSAB-Methode

Die Färbung erfolgte in einer feuchten Kammer um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

1. Entparaffinieren und Rehydrieren der Paraffinschnitte

- Paraffinschnitte 3x3 min. in Xylol eintauchen, dann 3x2 min. in 100% Ethanol, dann je 1x1 min. in 96%, 96%, 70%, 70% Ethanol, dann 1x5 min. in PBS tauchen

2. Vorbehandlung:

- evtl. (s. Tabelle 5) mit Proteinase K 10 min. vorbehandeln, anschließend Objektträger mit PBS spülen

- Gewebeschnitte in pH6,1 bzw. pH9-Pufferbad (s. Tabelle 5) stellen und 10 min. darin kochen. 10 min. abkühlen lassen und anschließend Objektträger mit PBS spülen

3. Inkubation des Primärantikörpers:

- Primärantikörper auftragen (Anti-Human-Mausantikörper) (100 µl/Schnitt)
- 1 h in der feuchten Kammer inkubieren, anschließend Objektträger mit PBS spülen

4. Inkubation des Sekundärantikörpers (anti-Maus und anti-Kaninchen; LSAB2-Kit):

- Biotinylierten Sekundärantikörper (LSAB link) auftragen (100 µl/Schnitt)
- 15 min. inkubieren, anschließend Objektträger mit PBS spülen
- AP (LSAB AP) auftragen und 15 min. einwirken lassen
- Objektträger mit PBS spülen

5. Bindung des Enzym-Substratkomplexes:

- Fast Red (Fuchsin + Chromogen System)
 - Peroxidase markiertes Envision-Polymer auftragen (100µl/Schnitt) und 20 min. einwirken lassen, anschließend spülen mit PBS

6. Kernfärbung mit Mayer´s Hämalaun-Lösung für 5 Minuten und Bläuen unter fließendem Leitungswasser

7. Eindecken

Da es sich bei dem Primärantikörper gegen TARC/CCL17 um einen Anti-human-Ziegenantikörper handelt, wurde der Sekundärantikörper des LSAB2-Kits durch einen biotynilierten anti-Ziegenantikörper ersetzt. Der weitere Ablauf ist identisch.

3.2.2.3. Protokoll der Doppelfärbung CLA und GranzymB

Bei dieser Färbung geht es um den gleichzeitigen Nachweis von zwei Antigenen. Die Visualisierung von CLA erfolgt durch Peroxidase mit DAB als Chromogen (braun) und die Visualisierung von GranzymB durch alkalischer Phosphatase mit Fast Red als Chromogen (rot).

Die Färbung erfolgte in einer feuchten Kammer um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

1. Entparaffinieren und Rehydrieren der Paraffinschnitte

- Paraffinschnitte 3x3 min. in Xylol eintauchen, dann 3x2 min. in 100% Ethanol, dann je 1x1 min. 96%, 96%, 70%, 70% Ethanol, dann 1x5 min. in PBS

2. Vorbehandlung:

- mit Proteinase K 10 min. vorbehandeln, anschließend Objektträger mit PBS spülen
- Gewebeschnitte in pH6,1 stellen und 10 min. darin kochen, 10 min. abkühlen lassen und anschließend Objektträger mit PBS spülen

3. Inkubation mit erstem Primärantikörpers (GranzymB):

- Primärantikörper auftragen (GranzymB Anti-Human-Mausantikörper) (ca. 100 µl/Schnitt)
- 1 h in der feuchten Kammer inkubieren, anschließend mit PBS spülen

4. Inkubation mit erstem Sekundärantikörper

- Anti-Maus-Antikörper (LSAB-Link) auftragen und 15 min. einwirken lassen, anschließend Objektträger mit PBS spülen
- AP (LSAB AP) auftragen und 15 min. einwirken lassen, anschließend Objektträger mit PBS spülen
- Fast Red (Fuchsin + Chromogen System)
 - Peroxidase markiertes Envision-Polymer auftragen und 20 min. einwirken lassen, anschließend spülen mit PBS

5. Inkubation des zweiten Primärantikörpers (CLA)

- Primärantikörper auftragen (CLA Anti-Human-Mausantikörper) (ca. 100 µl/Schnitt)
- 1 h in der feuchten Kammer inkubieren, anschließend Objektträger mit PBS spülen

6. Inkubation mit zweitem Sekundärantikörper

- Peroxydase-markiertes Polymer auftragen und 30 min inkubieren, anschließend mit PBS spülen
- DAB-Substratchomogen auftragen und 2 x 5 min. einwirken lassen, anschließend mit PBS spülen

7. Kernfärbung mit Mayer´s Hämalaun-Lösung für 5 Minuten und Bläuen unter fließendem Leitungswasser

8. Eindecken

3.2.2.4. Protokoll der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit CD8 und CCR4

Die Färbung erfolgte in einer feuchten Kammer um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

1. Entparaffinieren und Rehydrieren der Paraffinschnitte

- Paraffinschnitte 3x3 min. in Xylol eintauchen, dann 3x2 min. in 100% Ethanol, dann je 1x1 min. 96%, 96%, 70%, 70% Ethanol, dann 1x5 min. in PBS

2. Vorbehandlung der Paraffinschnitte:

- In Pufferlösung Paraffinschnitt für CD8 (pH6,1) bzw. CCR (pH9) im Dampfgerar 10 min. bei ca. 99°C aufheizen, dann 10 min. abkühlen lassen und mit PBS spülen
- Paraffinschnitt für CCR4 mit Proteinase K 10 min. inkubieren, anschließend spülen mit PBS

3. Ersten Primärantikörper (anti-CD8 Maus anti-human) auftragen(ca. 100 µl/Schnitt)

- 1h inkubieren → lichtgeschützt!, anschließend spülen mit PBS

4. Ersten Sekundärantikörper (TRITC Anti-Maus) auftragen (ca. 100 µl/Schnitt)

- ½ h inkubieren → lichtgeschützt!, anschließend spülen mit PBS

5. Zweiten Primärantikörper (anti-CCR4-Biotin Maus-anti-human) auftragen (ca. 100 µl/Schnitt)

- 1h inkubieren → lichtgeschützt!, anschließend spülen mit PBS

6. Zweiten Sekundärantikörper (SA- FITC anti-Biotin (Streptavidin)) auftragen (ca.

- 100 µl/Schnitt)
- 1h inkubieren → lichtgeschützt!, anschließend spülen mit PBS

7. Eindecken und lichtgeschützt aufbewahren

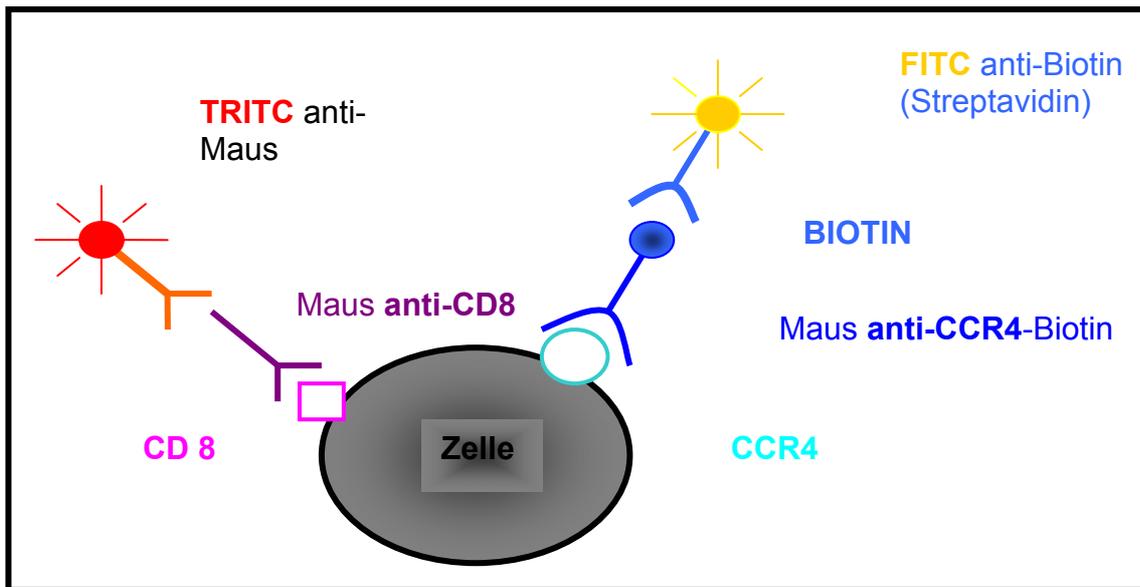


Abb. 6: Schematische Darstellung der Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD8 und CCR4

3.2.3. Methoden zur Zellzählung

Die Rezeptor-exprimierenden Zellen wurden mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop (Typ Olympus BH2) ausgezählt.

Die Expression des Cytokins TARC/CCL17, CXCL10/IP10 und MxA wurden semiquantitativ im Lichtmikroskop bestimmt (0 = keine Expression, + = schwache Expression, ++ = mittelstarke Expression, +++ = starke Expression).

3.2.4. Ausgewertete Daten

Es wurden folgende Daten evaluiert:

1. Personenbezogene Daten zur Beschreibung des Patientenkollektivs:
 - Geschlecht
 - Alter
 - Diagnose
2. Antikörper
 - anti-CD3 (T-Lymphozyten)
 - anti-CD4 (T-Helferzellen)
 - anti-CD8 (T-Zellen)

- anti-CD20-Antikörper (B-Zellen)
- anti-CD68-Antikörper (Makrophagen)
- anti-GranzymB-Antikörper (zytotoxische Lymphozyten)
- anti-CLA-Antikörper (hautspezifisches Adhäsionsmolekül auf Lymphozyten)
- anti-CCR4-Antikörper (Chemokinrezeptor)
- anti-TARC/CCL17-Antikörper (Chemokin, welches an CCR4 bindet)
- anti-CXCR3-Antikörper (Chemokinrezeptor)
- anti-CXCL10/IP10-Antikörper (durch Interferone induzierbares Chemokin)
- anti-MxA-Antikörper (durch Interferon-I induzierbares Protein)

3.2.5. Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Anwendung des Statistikprogramms SPSSTM 11.0. (Statistical Program for Social Sciences, Chicago).

Die Expression der verschiedenen Marker wurde anhand nicht-parametrischer 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 $p < 0,01$.

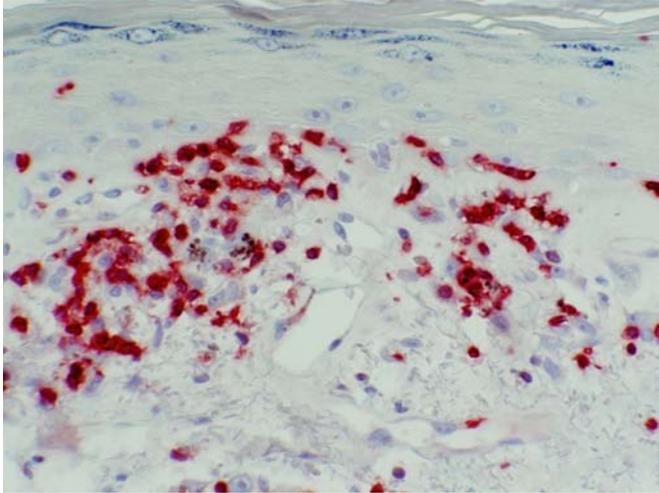
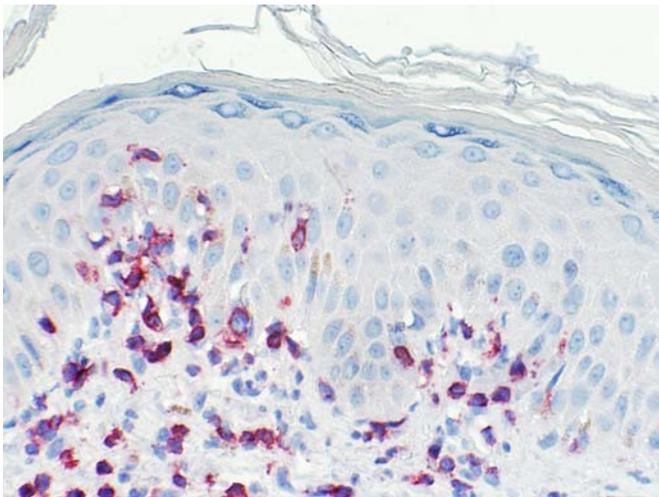
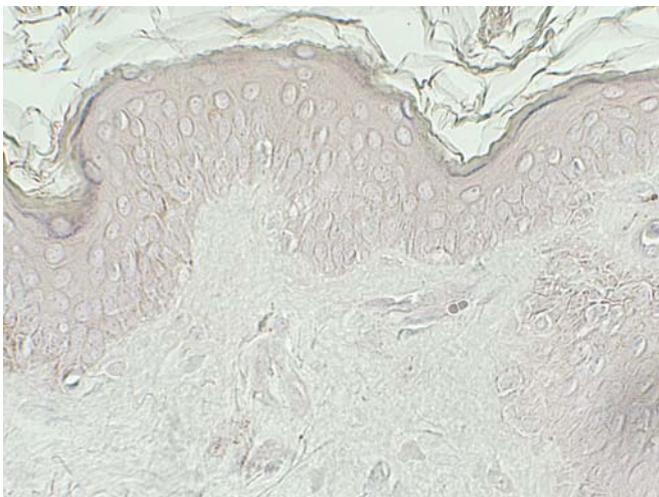
4. Ergebnisse

4.1. T-Zellen dominieren das zelluläre Infiltrat in der Haut beim CLE

Die Charakterisierung des zellulären Infiltrates in den Hautläsionen der verschiedenen Formen des Lupus erythematodes erfolgte anhand immunhistologischer Färbungen mit anti-CD3-, anti-CD4-, anti-CD8-, anti-CD20- und anti-CD68-Antikörpern. Untersucht wurden dabei Hautschnitte der unterschiedlichen LE-Formen sowie als Kontrollgruppen Psoriasis, Herpes simplex und gesunde Haut.

In den Hautläsionen zeigte sich eine dichte Infiltration von T-Zellen im Bereich der Junktionszone sowie perivaskulär. Das entzündliche Infiltrat bestand dabei hauptsächlich aus CD3⁺-T-Lymphozyten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Zahl der CD3⁺-T-Lymphozyten vor allem bei den kutanen, aber auch bei der systemischen LE-Form signifikant erhöht. Auffallend war die kräftige Expression der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen besonders bei den kutanen Formen und dort vor allem bei den vernarbenden Formen (ICDLE und dCDLE). Die Zahl der CD8⁺-T-Zellen lag dabei knapp über dem Anteil der CD4⁺-Zellen. Auffällig war weiterhin die Lokalisation der CD8⁺-T-Zellen v. a. im Bereich der Haarfollikel sowie der Interface-Zone. Auch die Zahl der CD68⁺-Zellen war im Vergleich zur gesunden Haut erhöht.

Ein signifikanter Unterschied der B-Zell-Infiltration (anti-CD20) stellte sich nicht dar.

CD3**a Chronisch diskoider LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 7:**

Expression von CD3

a-c: Repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 400-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 400-fach)

c: Gesunde Haut (Vergrößerung 400-fach).

Die immunhistologisch rot gefärbten Zellen (Fast Red) sind CD3 positiv.

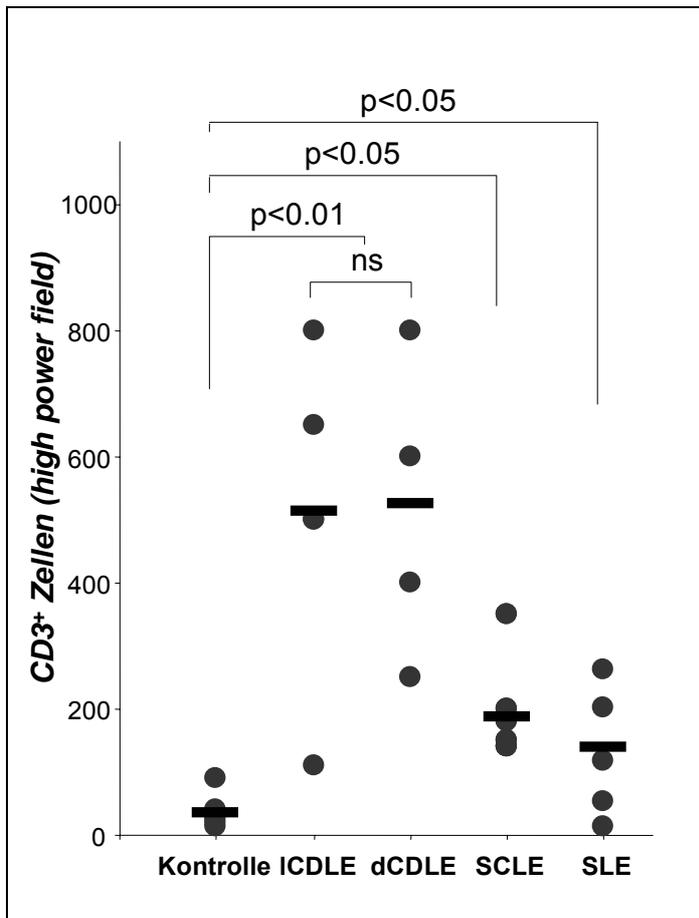
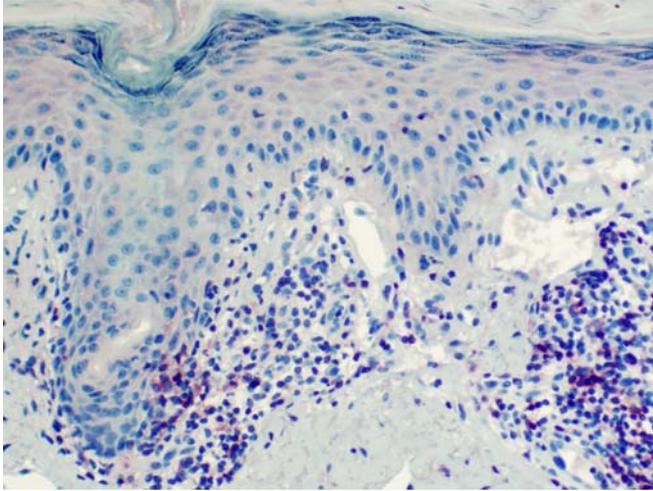
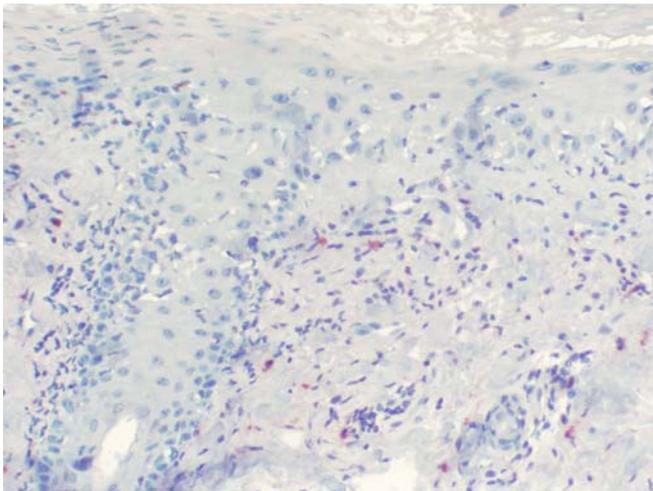
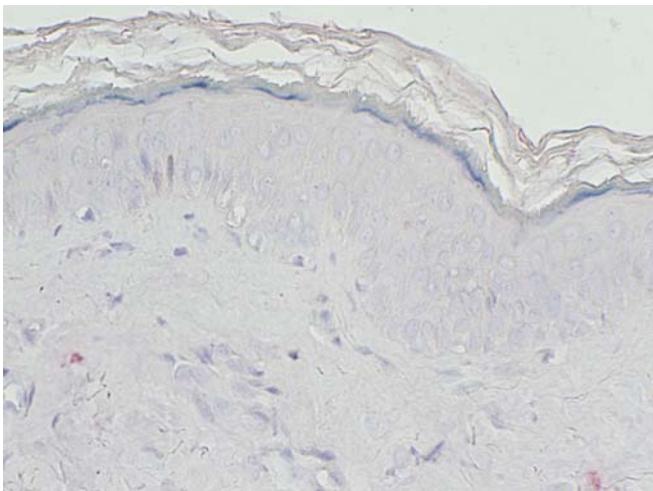


Abb. 8:

Statistische Auswertung der CD3-positiven Lymphozyten in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematodes und gesunder Haut.

Die Rezeptor-exprimierenden Zellen wurden mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop gezählt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert.

Es zeigt sich ein signifikant erhöhtes Zellinfiltrat bei den verschiedenen LE-Formen im Vergleich zur Kontrollgruppe, v. a. bei den vernarbenden Formen (ICDLE und dCDLE).

CD4**a Chronisch diskoider LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 9:**

Expression von CD4 in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses (LE) und gesunder Haut.

a-c: Repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 200-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 200-fach)

c: gesunde Haut (Vergrößerung 200-fach)

Die immunhistologisch rot (Fast Red) gefärbten Zellen sind CD4 positiv.

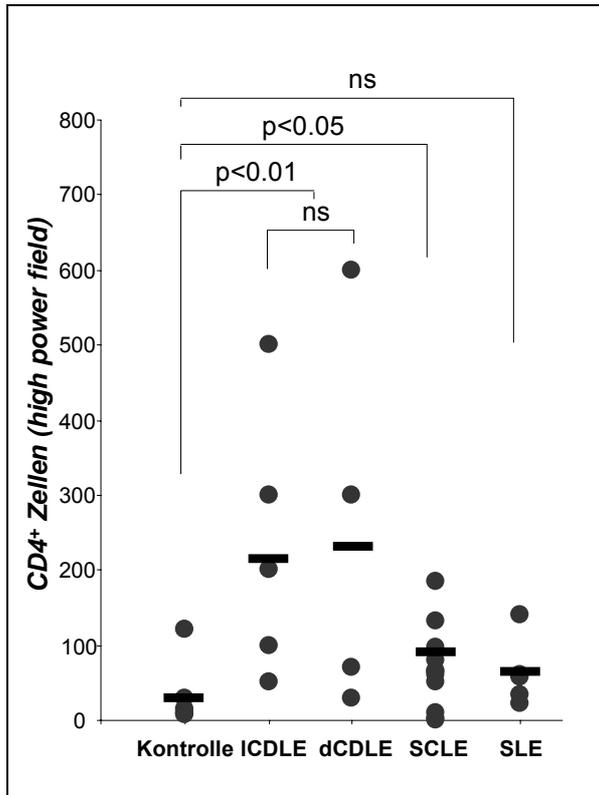


Abb. 10:

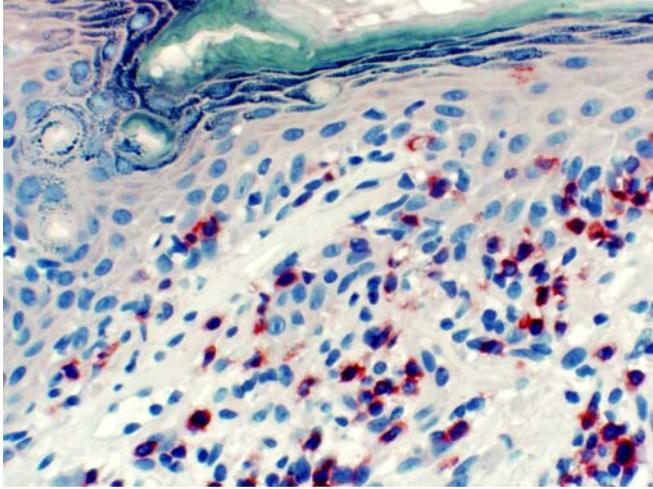
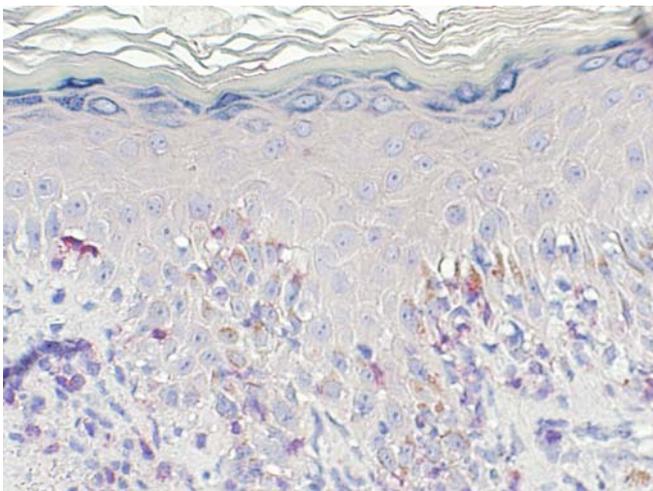
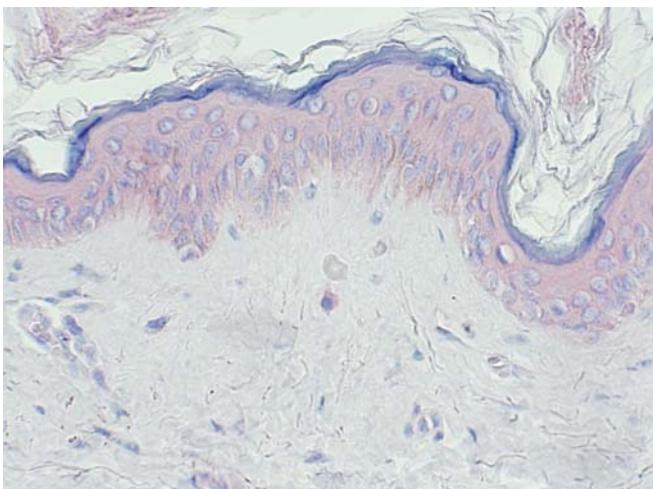
Statistische Auswertung der CD4-positiver Lymphozyten in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematosus (LE) und gesunder Haut.

Die Rezeptor-exprimierenden Zellen wurden mit der High-Power-Field-Methode

(Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert.

Es zeigt sich ein signifikant erhöhtes Zellinfiltrat bei den verschiedenen LE-Formen im Vergleich zur Kontrollgruppe, v. a. bei den vernarbenden Formen (ICDLE und dCDLE).

CD8**a Chronisch diskoider LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 11:**

Expression von CD8 in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses (LE) und gesunder Haut.

a-c: Repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 400-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 400-fach)

c: Gesunde Haut (Vergrößerung 400-fach)

Die immunhistologisch rot (Fast Red) gefärbten Zellen sind CD8 positiv.

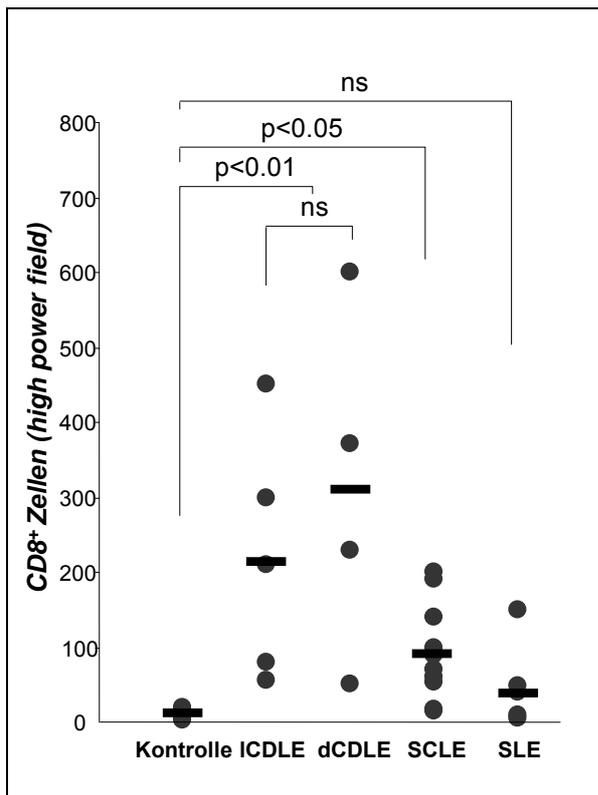
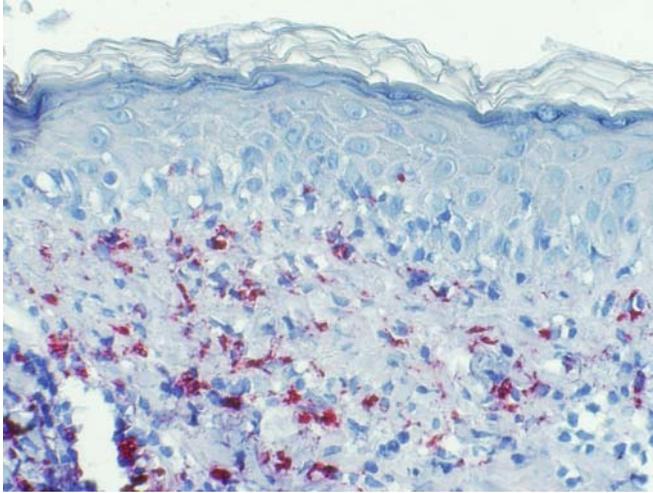
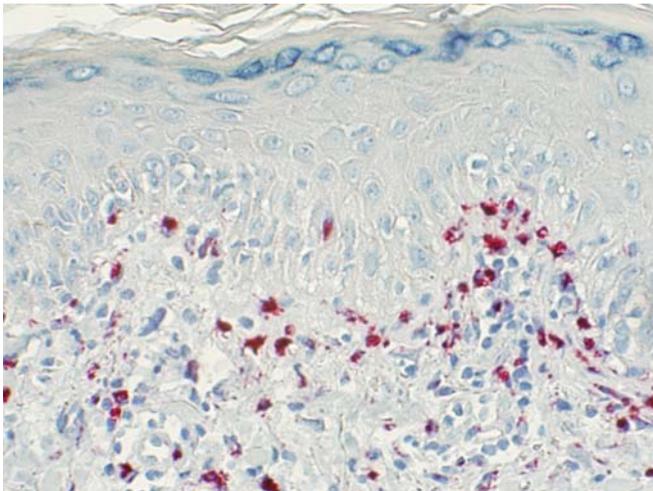
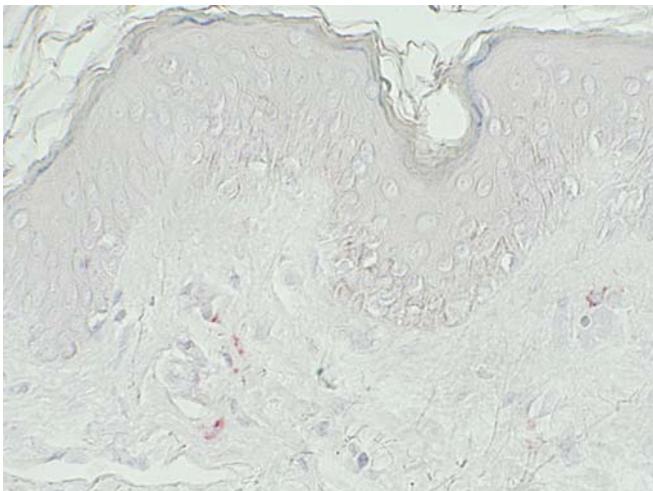


Abb. 12:

Statistische Auswertung der CD8⁺-Lymphozyten in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses (LE) und gesunder Haut.

Die Rezeptor-exprimierenden Zellen wurden mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert.

Es zeigt sich ein signifikant erhöhtes Zellinfiltrat bei den verschiedenen LE-Formen im Vergleich zur Kontrollgruppe, v. a. bei den vernarbenden Formen (ICDLE und dCDLE).

CD68**a Chronisch diskoider LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 13:**

Expression von CD68 in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses (LE) und gesunder Haut.

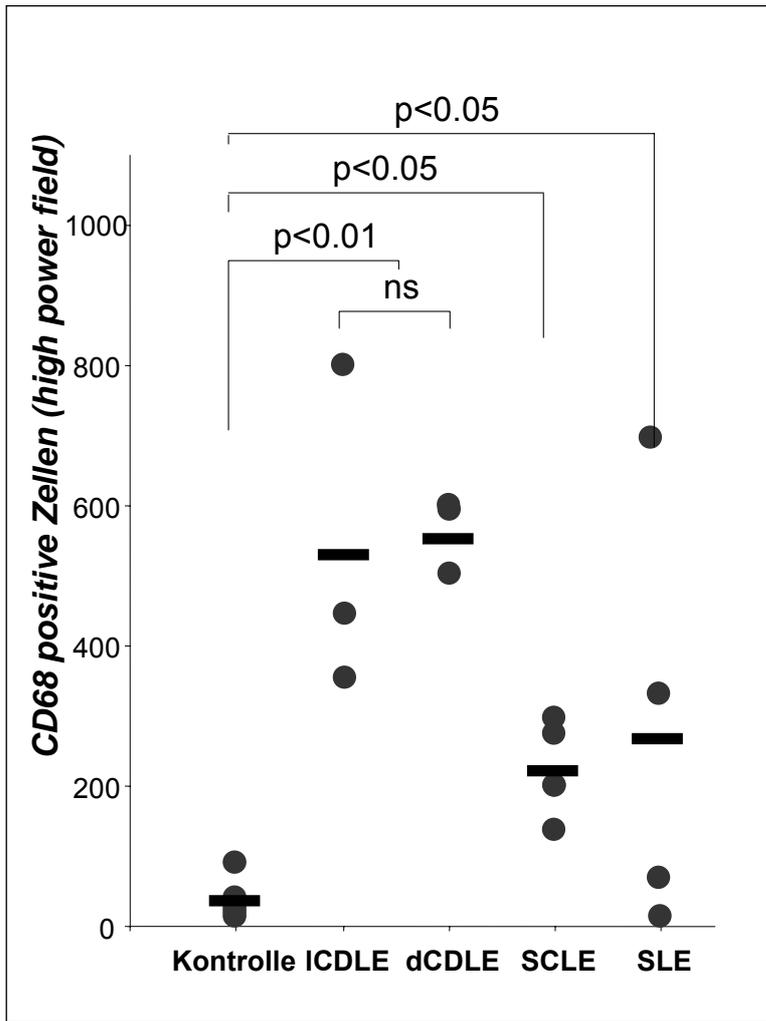
Repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 400-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 400-fach)

c: Gesunde Haut (Vergrößerung 400-fach).

Die immunhistologisch rot gefärbten Zellen sind CD68 positiv.

**Abb. 14:**

Statistische Auswertung der CD68⁺-Lymphozyten in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses (LE) und gesunder Haut.

Die Rezeptor-exprimierenden Zellen wurden mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert.

Es zeigt sich ein signifikant erhöhtes Zellinfiltrat bei den verschiedenen LE-Formen, v. a. bei den vernarbenden Formen (ICDLE und dCDLE).

4.2. Nachweis zahlreicher zytotoxischer GranzymB-positiver Zellen beim vernarbenden CDLE

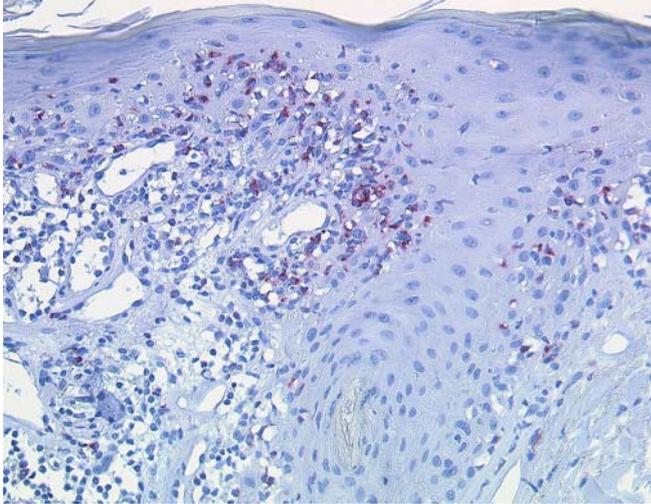
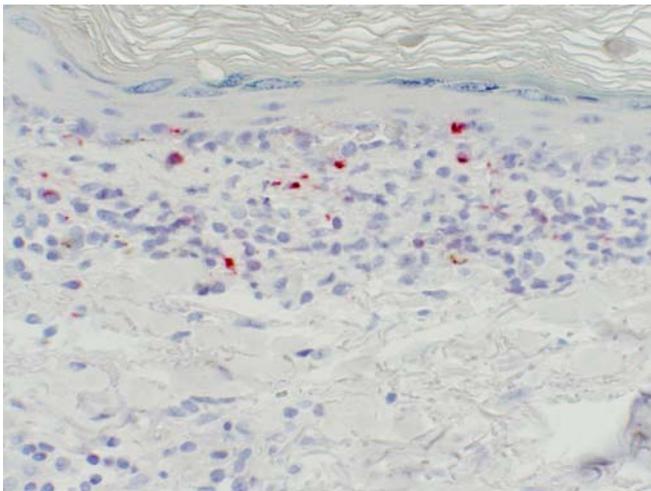
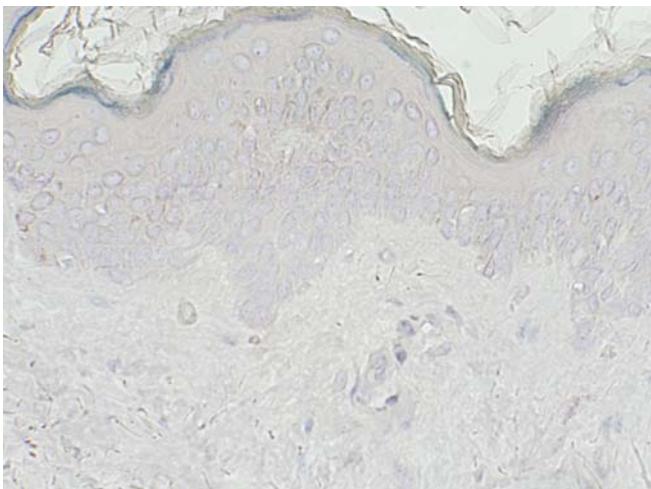
Da die Haut vor allem bei den vernarbenden Formen des kutanen LE eine starke Gewebszerstörung aufweist, wurden die Hautproben ebenfalls auf den zytotoxischen Marker GranzymB untersucht.

GranzymB wurde in den vernarbenden Formen des LE (ICDLE und dCDLE) in signifikant erhöhter Anzahl gefunden. Ein signifikanter Unterschied innerhalb dieser beiden Formen ließ sich nicht feststellen.

Die erhöhte GranzymB-Expression bei chronisch discoidem LE war assoziiert mit einer entzündlichen Infiltration sowohl epidermal als auch adnexal sowie einer Gewebszerstörung in Form einer basalhydrophischen Degeneration und Kolloidkörperchen.

Die GranzymB-Expression in den Hautläsionen bei dem nicht vernarbenden SCLE war zwar niedriger als in den vernarbenden Formen, aber immer noch signifikant höher als in den Kontrollen bei gesunder Haut.

Kein signifikanter Unterschied bezüglich des Auftretens von GranzymB zeigte sich bei dem SLE ohne kutane Manifestation verglichen mit gesunder Haut.

GranzymB**a Chronisch disseminierter LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 15:**

Expression von GranzymB in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses und gesunder Haut.

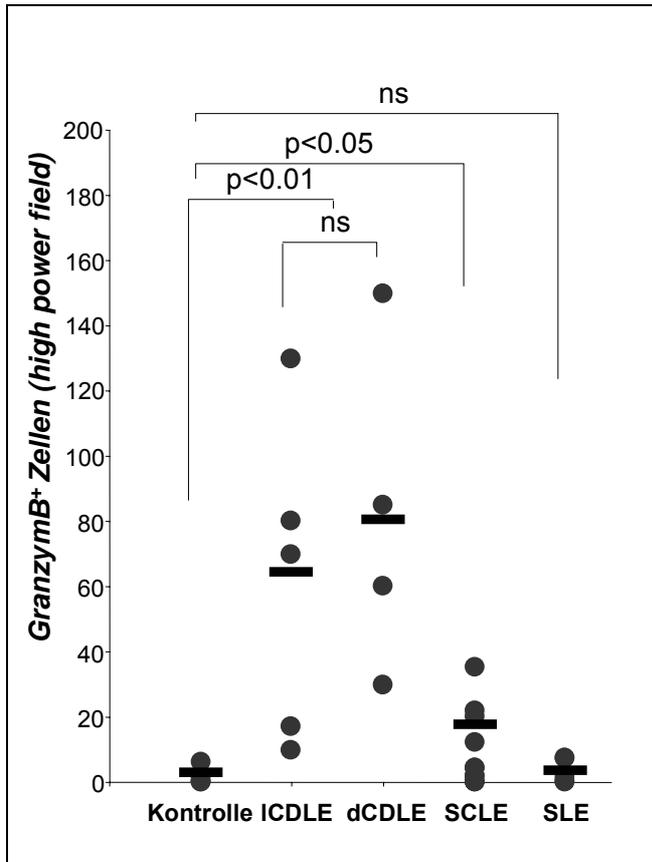
a-c: Repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 400-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 400-fach)

c: Gesunde Haut (Vergrößerung 400-fach)

Die immunhistologisch rot (Fast Red) gefärbten Zellen sind GranzymB positiv.

**Abb. 16:**

Statistische Auswertung der GranzymB-positiven-Zellen in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematosus (LE) und gesunder Haut.

Die Rezeptor-exprimierenden Zellen wurden mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert.

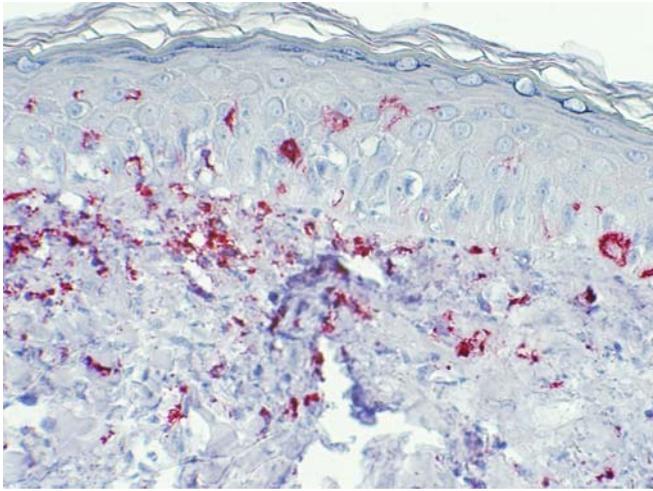
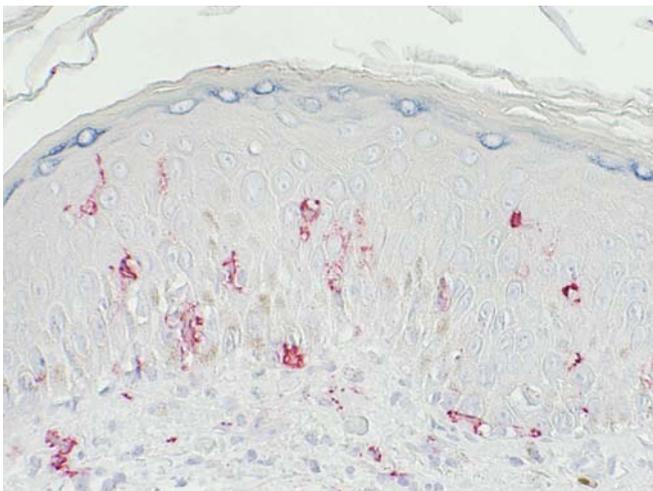
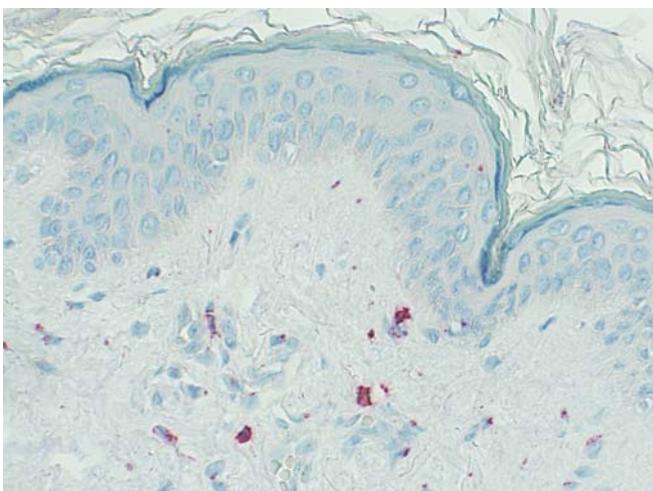
Die Patienten mit Chronisch disseminiertem LE (CDLE) zeigen eine signifikant erhöhte Expression von GranzymB ($p < 0.01$), verglichen mit anderen LE Subtypen und gesunden Kontrollen.

4.3. Das Adhäsionsmolekül CLA lässt sich im Infiltrat beim kutanen Lupus erythematosus nachweisen

CLA (cutaneous lymphocyte antigen) ist ein Oberflächenmarker, der auf Lymphozyten exprimiert wird, die den Blutkreislauf verlassen, um in die Haut zu wandern.

Die Zahl der CLA-positiven Zellen war bei allen Formen des kutanen Lupus erythematosus signifikant erhöht. Eine signifikant erhöhte Expression beim systemischen LE im Vergleich zu den Kontrollen war nicht nachzuweisen.

Innerhalb der Unterformen des kutanen LE zeigte sich vor allem bei den vernarbenden Formen des CDLE eine große Zahl CLA-positiver Zellen.

CLA**a Chronisch disseminierter LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 17:**

Expression des Cutaneous lymphocyte antigen (CLA) Lymphozyten in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses (LE) und gesunder Haut.

a-c: repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 400-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 400-fach)

c: Gesunde Haut (Vergrößerung 400-fach). Die rot gefärbten Zellen sind CLA-positiv.

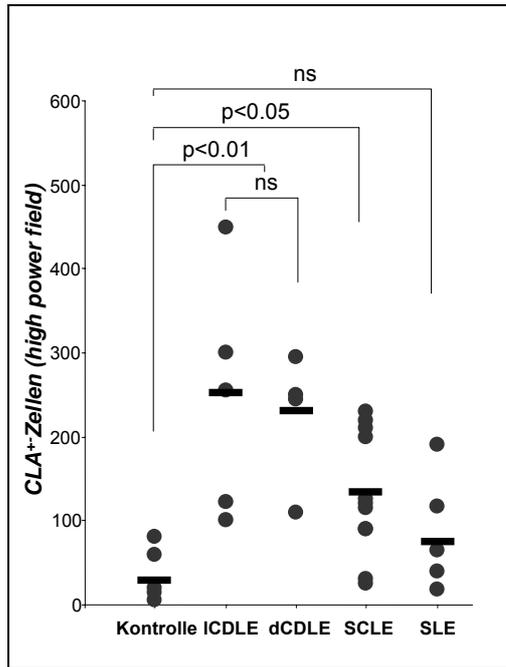


Abb. 18:

Statistische Auswertung der CLA-positiven Zellen in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses (LE) und gesunder Haut.

Die Rezeptor-exprimierenden Zellen wurden mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop gezählt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert.

Die CLA-Expression ist signifikant erhöht bei den kutanen LE-Formen im Vergleich zur gesunden Haut.

4.3.1. Doppelfärbung CLA und GranzymB

Es konnte eine große Zahl CLA⁺-GranzymB⁺-(doppelpositiver)-Lymphozyten in den vernarbenden Formen ICDLE und dCDLE gefunden werden. Die Zahl war im Vergleich zu den nicht vernarbenden Formen und zu den Kontrollen signifikant erhöht.

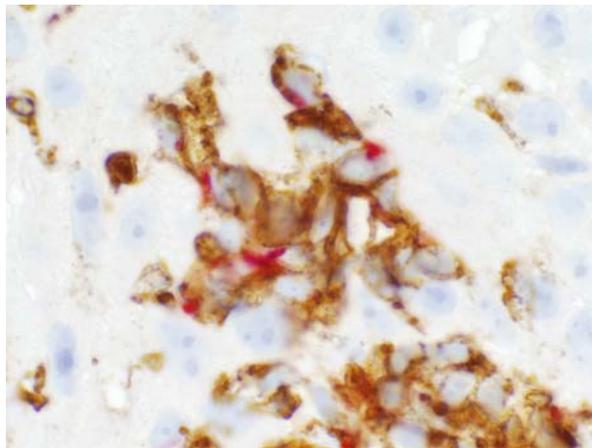


Abb. 19: Doppelfärbung GranzymB und CLA

Immunhistochemische Doppelfärbung mit CLA (braun, Oberflächenmarker) und GranzymB (typische intrazelluläre Granula, rot) bei einem Patienten mit CDLE.

4.4. In den Hautläsionen beim kutanen Lupus erythematoses lassen sich Lymphozyten mit dem homöostatischen Chemokinrezeptor CCR4 sowie das Chemokin TARC/CCL17 nachweisen

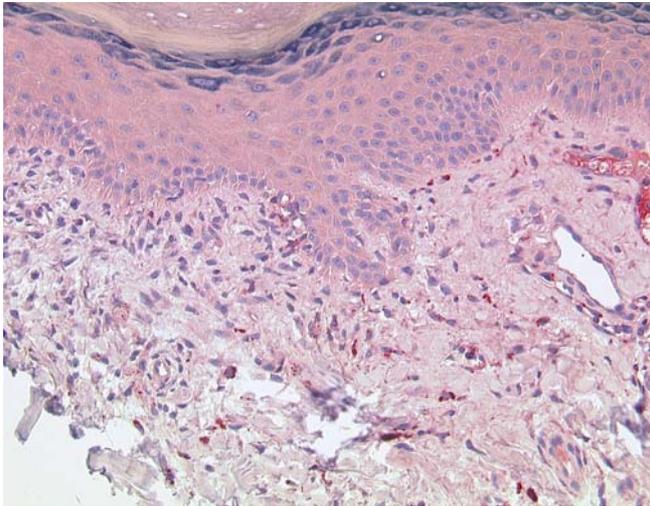
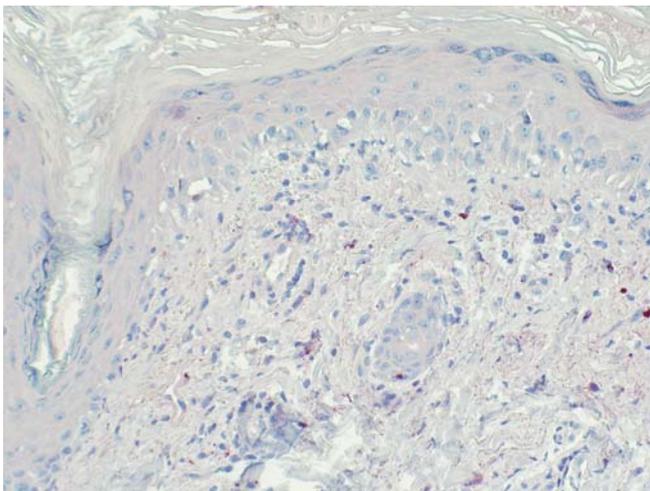
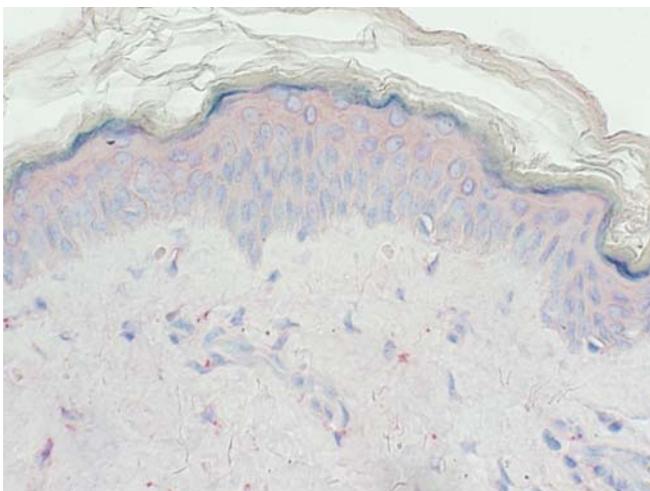
Um zu klären, ob die Einwanderung potentiell autoreaktiver Lymphozyten bei der Pathogenese des Lupus erythematoses eine bedeutende Rolle spielt, wurde die Expression des Chemokinrezeptors CCR4 und des Chemokins TARC/CCL17 in der Haut bei CLE anhand von immunhistochemischen Färbungen untersucht.

Die immunhistochemische Analyse der CCR4-Expression ergab eine signifikant erhöhte Anzahl CCR4⁺-Lymphozyten in allen untersuchten Formen des LE (Abb.11). Gleichzeitig fand man hier eine starke läsionale Expression des korrespondierenden Chemokins TARC/CCL17.

Auffällig war dabei eine im Vergleich zur gesunden Haut des Kontrollkollektives signifikant erhöhte Anzahl CCR4⁺-Zellen ($p < 0.01$) v. a. in Läsionen des disseminiert chronisch discoiden LE (dCDLE), einer Variante des CLE mit typischerweise

großflächigen Vernarbungen. In den Läsionen ließen sich CCR4⁺-zytotoxische T-Zellen darstellen, die basal in die Bereiche des Epithels einwanderten, in denen sich apoptotische Keratinozyten, erkennbar an der basalhydrophischen Degeneration, zeigten.

Die TARC/CCL17-Expression war entsprechend kräftig in den vernarbenden Formen des CDLE und SCLE, vor allem im oberen Epidermisbereich und perivaskulär.

CCR4**a Chronisch disseminierter LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 20:**

Expression des Chemokinrezeptors CCR4 in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses und gesunder Haut.

a-c: repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 400-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 400-fach)

c: Gesunde Haut (Vergrößerung 400-fach)

Die rot (Fast Red) gefärbten Zellen sind CCR4-positiv. Die Zahl der CCR4-positiven Lymphozyten in der Epidermis ist in allen Formen des kutanen Lupus erythematoses (LE) erhöht.

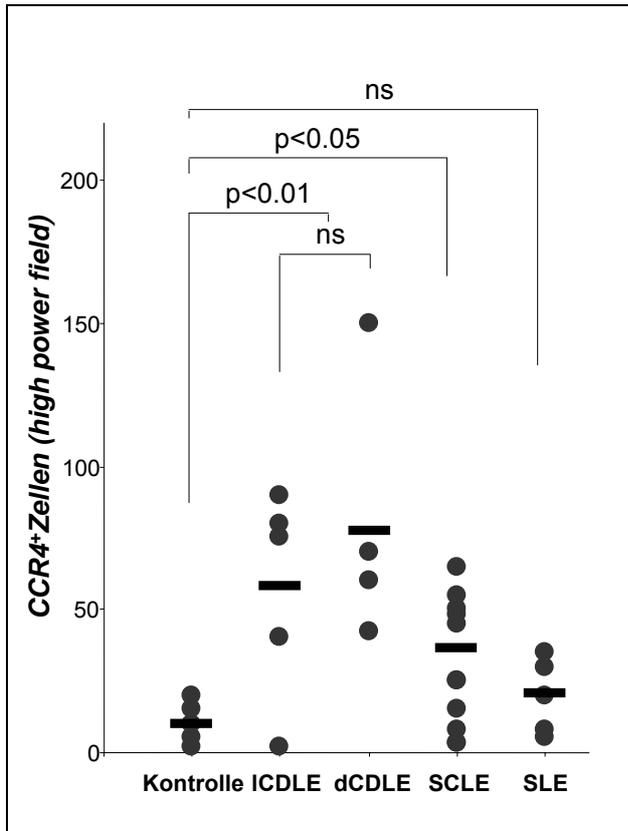
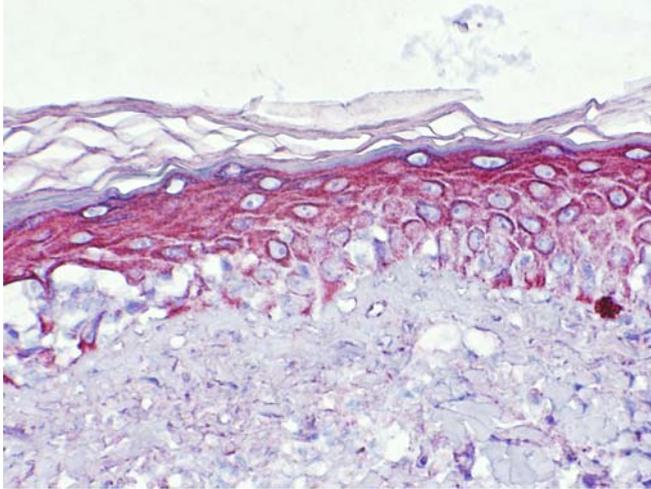
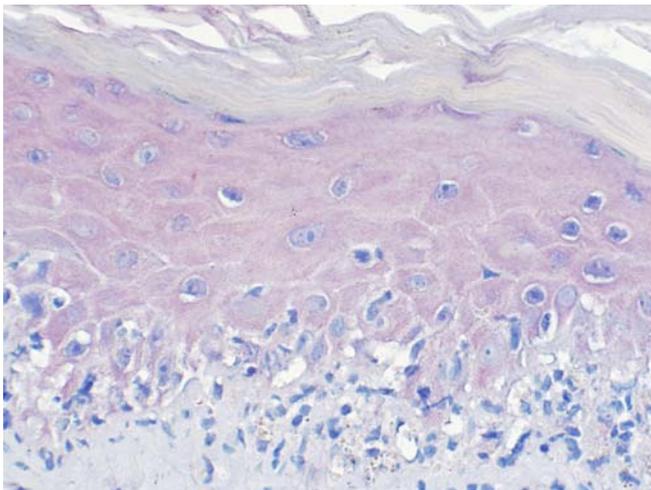
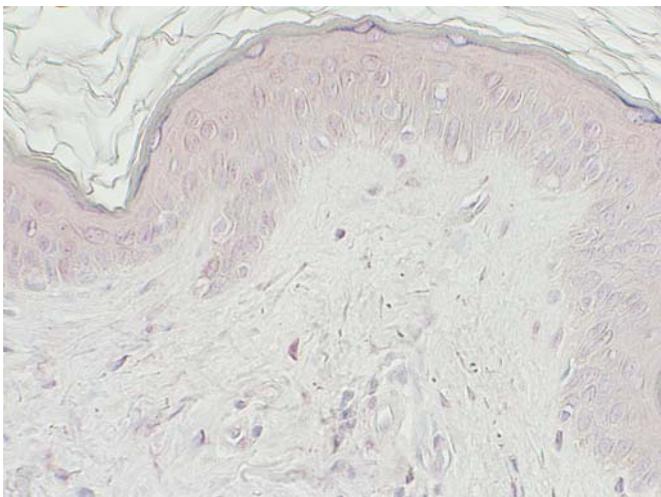


Abb. 21:

Statistische Auswertung der CCR4-positiven Lymphozyten in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses und gesunder Haut.

Die Rezeptor-exprimierenden Zellen wurden mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert.

Es zeigt sich eine erhöhte Zahl von CCR4-positiven Zellen bei allen Lupusformen, signifikant erhöht bei den vernarbenden Formen ICDLE und dCDLE.

TARC/CCL17**a Chronisch disseminierter LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 22:**

Expression des Chemokins TARC/CCL17 in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses und bei gesunder Haut.

a-c: repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 400-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 400-fach)

c: Gesunde Haut (Vergrößerung 400-fach)

In den Hautläsionen beim kutanen LE zeigt sich eine hohe Expression des Chemokins TARC/CCL17 (rot) im Bereich der Epidermis und Dermis, v. a. im Endothelbereich.

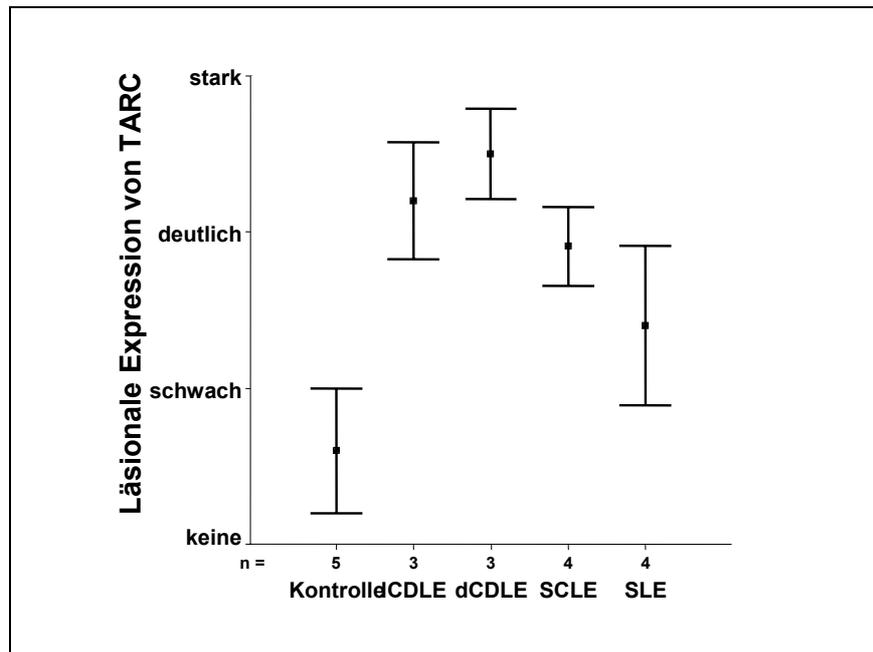


Abb. 23:

Statistische Auswertung der Expression von TARC/CCL17 bei den verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematodes und der Kontrollgruppe. Die Expression von TARC/CCL17 wurde semiquantitativ mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Expression von TARC/CCL17 bei allen Lupusformen, insbesondere bei den vernarbenden Formen dCDLE und ICDLE.

4.4.1. Die CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen tragen den Chemokinrezeptor CCR4

Um die vermehrte Expression von CCR4-Rezeptoren auf läSIONALen CD8⁺ T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) darzustellen, wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung durchgeführt (CD8 (FITC, grün)/CCR4 (TRITC, rot)). Dabei zeigte sich eine Infiltration der oberen Dermis mit CD8⁺-Lymphozyten, die CCR4 exprimieren (gelb, \rightarrow), vor allem bei Patienten mit disseminiertem CDLE (dCDLE). Es ließ sich erkennen, dass die zytotoxischen T-Zellen basal in den Epithelbereich eindringen.

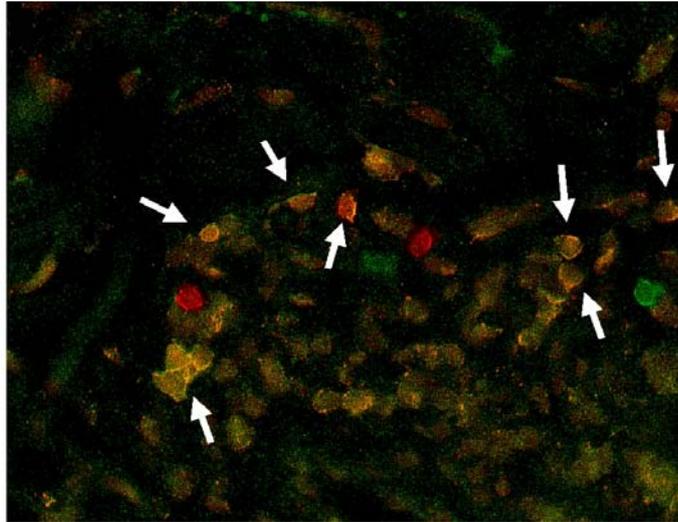


Abb. 24: Immunhistochemische Doppelfärbung (Originalvergrößerung: 400-fach) mit Darstellung der Oberflächenmarker CD8 und CCR4. Die markierten Zellen tragen sowohl des Oberflächenmarker CD8 als auch CCR4.

4.5. Die Beteiligung inflammatorischer, durch Interferon-Typ-I induzierbarer Chemokinrezeptoren und Chemokine

Nachdem am Beispiel von CCR4 und TARC/CCL17 eine Beteiligung der homöostatischen Faktoren der Lymphozytenrekrutierung nachgewiesen wurde, erfolgte die Untersuchung auf proinflammatorische Faktoren. Von besonderem Interesse war, ob die beim systemischen LE bekannten, durch Interferon induzierbaren Chemokinrezeptoren, wie z. B. CXCL10/IP10 und das zugehörige Chemokin CXCR3, beteiligt sind.

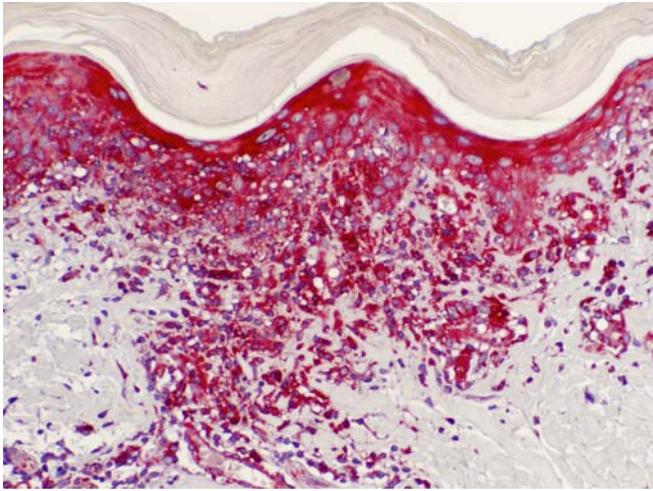
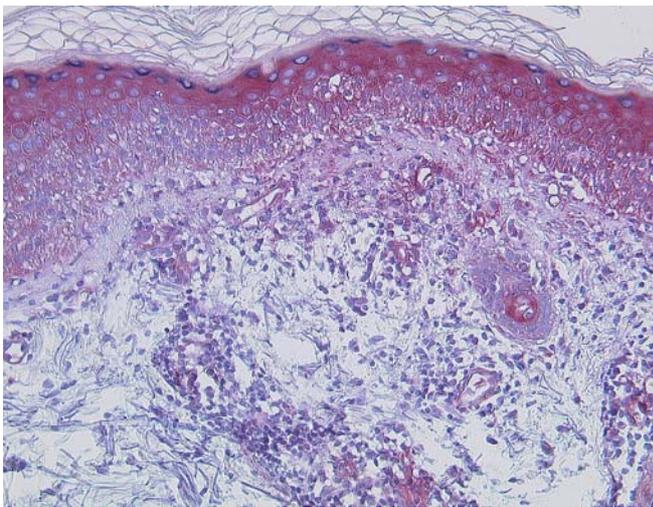
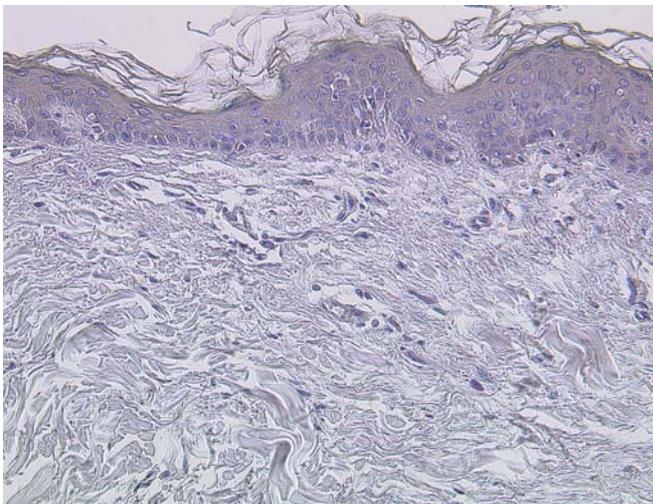
4.5.1. Die deutliche Expression von MxA weist auf eine erhöhte Interferonproduktion in allen Unterformen des CLE hin

Der Nachweis einer Interferonproduktion im Gewebe erfolgte indirekt über die immunhistochemische Markierung von MxA, einem intrazellulären Protein, welches durch IFN- α/β induzierbar ist. Es stellt somit einen guten Marker für die lokale Interferonproduktion im Gewebe dar (Fah et al., 1995).

Die immunhistochemische Darstellung erfolgte mit einem monoklonalen anti-MxA-Antikörper.

Es konnte dabei ein deutlicher läsionaler Nachweis von MxA in der Dermis und Epidermis erbracht werden, und zwar in allen CLE-Formen. Besonders deutlich (+++) trat die MxA-Expression bei Hautläsionen des CDLE auf.

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden vernarbenden Formen, dem ICDLE und dCDLE. Beim SCLE war die Expression signifikant niedriger (++ oder +++), allerdings noch deutlich erhöht im Vergleich zu den Kontrollgruppen (0, +) (Abb. 14).

MXA**a Chronisch disseminierter LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 25:**

Expression von MxA in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematodes und gesunder Haut.

a-c: Repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 200-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 200-fach)

c: Gesunde Haut (Vergrößerung 200-fach).

In den Hautläsionen beim kutanen LE zeigt sich eine hohe Expression des Interferon-induzierbaren Proteins MxA (rot markierte Zellen).

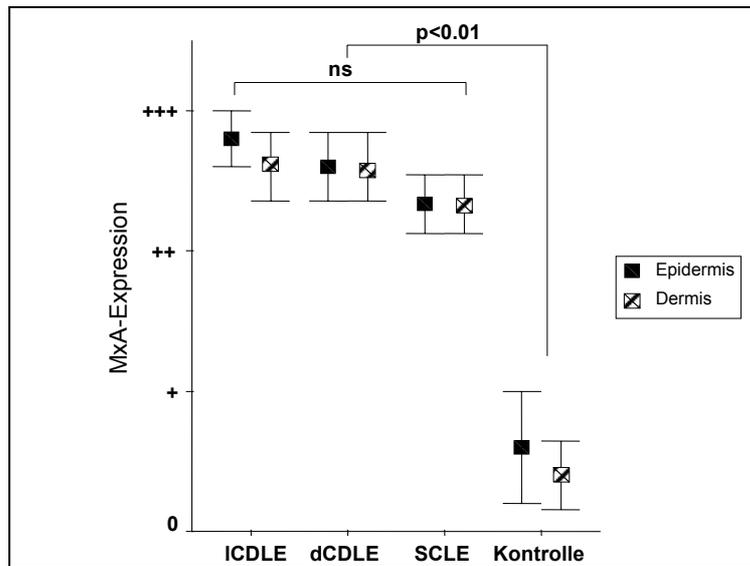


Abb. 26:

Statistische Auswertung der Expression von MxA in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses und gesunder Haut. Die Expression von MxA wurde semiquantitativ mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop ermittelt (0: nicht exprimiert, +: schwach exprimiert, ++: mäßig exprimiert, +++: stark exprimiert). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

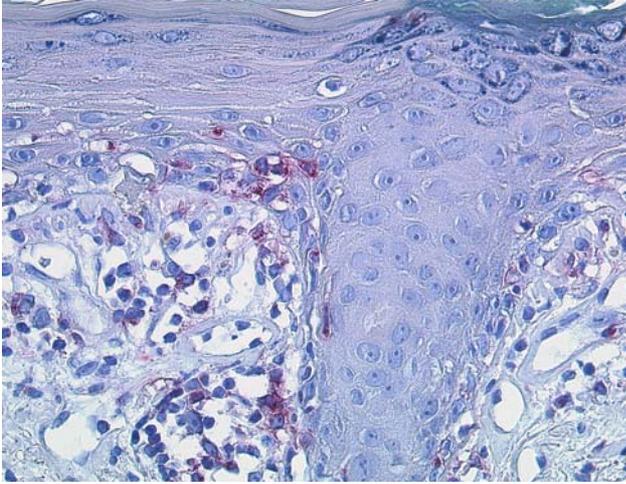
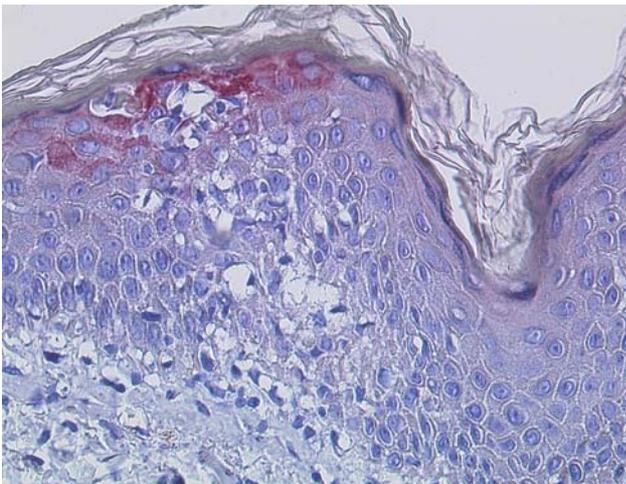
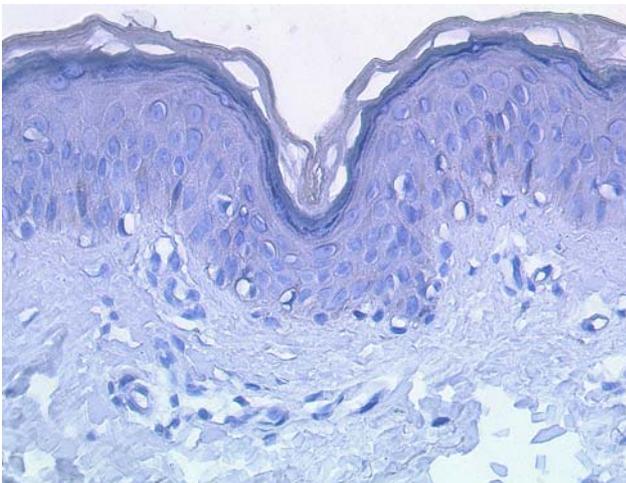
Es zeigt sich eine deutlich erhöhte MxA-Expression bei allen Formen des kutanen Lupus erythematoses, signifikant erhöht bei der vernarbenden Formen ICDLE und dCDLE.

4.5.2. Das durch Interferon-Typ-I induzierbare inflammatorische Chemokin CXCL10/IP10 sowie CXCR3⁺-Lymphozyten sind beim kutanen LE nachweisbar

Immunhistochemisch wurde die Expression des durch Interferon-Typ-I induzierbaren Chemokins CXCL10/IP10 sowie des korrespondierenden Chemokinrezeptors CXCR3 untersucht.

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine deutliche Expression von CXCL10/IP10 in CDLE- und SCLE-Läsionen. Diese fanden sich vor allem in Form punktförmiger Häufungen, konzentriert an Haarfollikeln und im Bereich der Grenzzone zwischen entzündlichen Zellen und der basalen Keratinozytenschicht.

Bei der immunhistochemischen Färbung des Oberflächenrezeptors CXCR3 stellte sich eine deutlich erhöhte Expression von CXCR3⁺-Lymphozyten in allen CLE-Läsionen heraus, verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe. Auch bei der Psoriasis war die Zahl der CXCR3⁺-Lymphozyten signifikant höher, in etwa den Ergebnissen der Hautläsionen des SCLE entsprechend.

CXCL10/IP10**a Chronisch disseminierter LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 27:**

Expression des Chemokins CXCL10/IP10 in verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses und gesunder Haut.

a-c: repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 400-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 400-fach)

c: Gesunde Haut (Vergrößerung 400-fach).

In den Hautläsionen beim kutanen Lupus erythematoses zeigt sich eine deutliche Expression des Chemokins CXCL10/IP10 (rot markierte Zellen) in allen Formen.

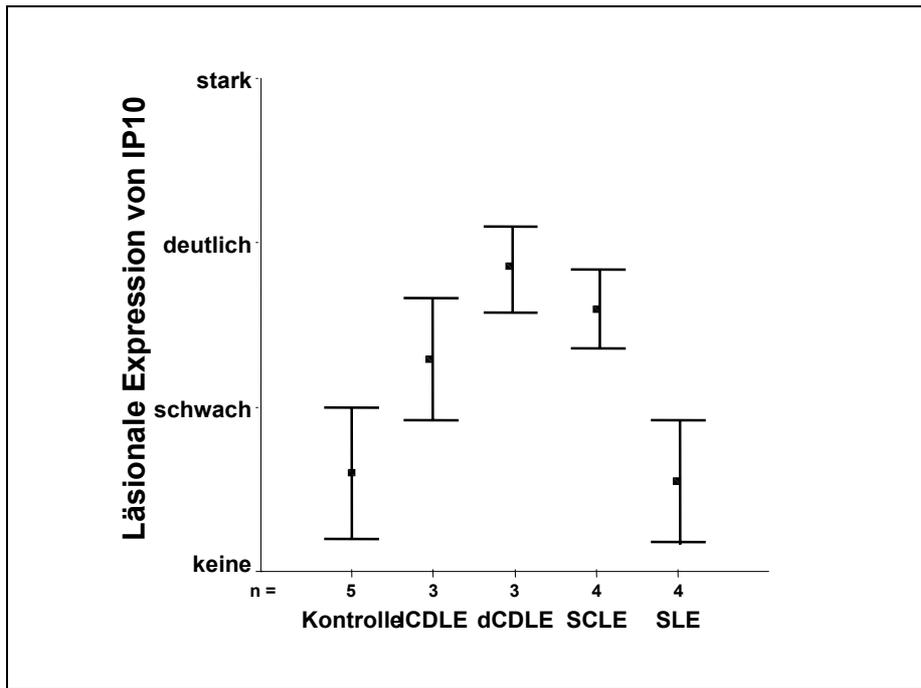
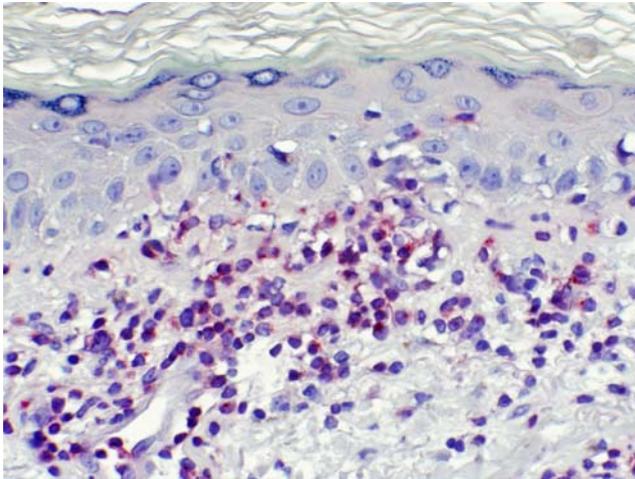
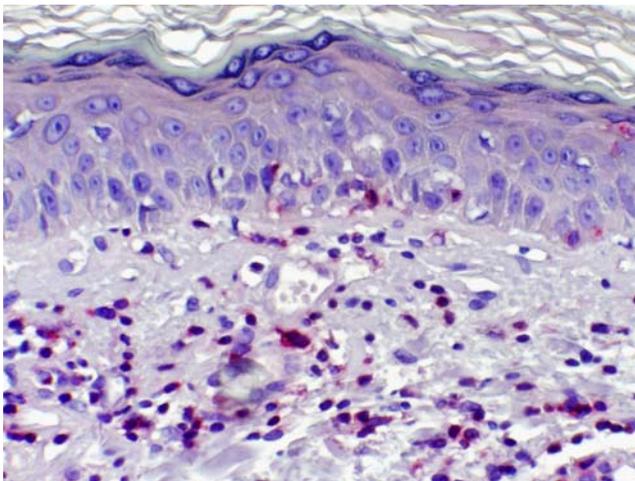
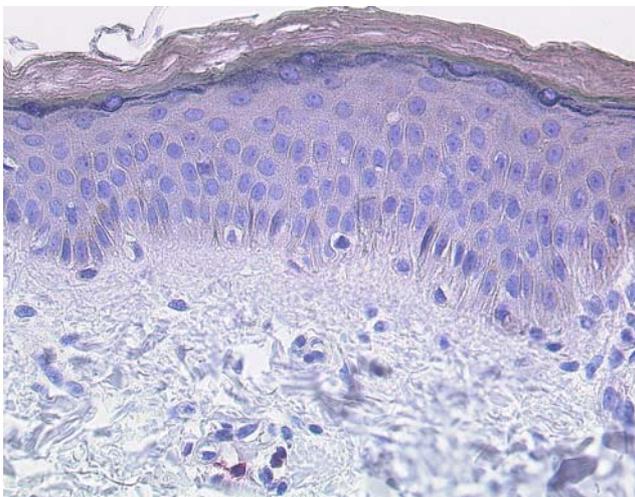


Abb. 28:

Statistische Auswertung der Expression von CXCL10/IP10 in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses und gesunder Haut.

Die Expression von CXCL10/IP10 wurde semiquantitativ mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikant erhöhte Expression bei allen Formen des kutanen Lupus erythematoses.

CXCR3**a Chronisch disseminierter LE (CDLE)****b Subakut kutaner LE (SCLE)****c Gesunde Haut****Abb. 29:**

Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematoses und gesunder Haut.

a-c: Repräsentativer Ausschnitt eines immunhistochemisch gefärbten Hautpräparates.

a: CDLE (Vergrößerung 400-fach)

b: SCLE (Vergrößerung 400-fach)

c: Gesunde Haut (Vergrößerung 400-fach).

Die rot (Fast Red) gefärbten Zellen sind CXCR3-positiv. Die Zahl der CXCR3-positiven Lymphozyten in der Epidermis ist in allen Formen des kutanen Lupus erythematoses erhöht.

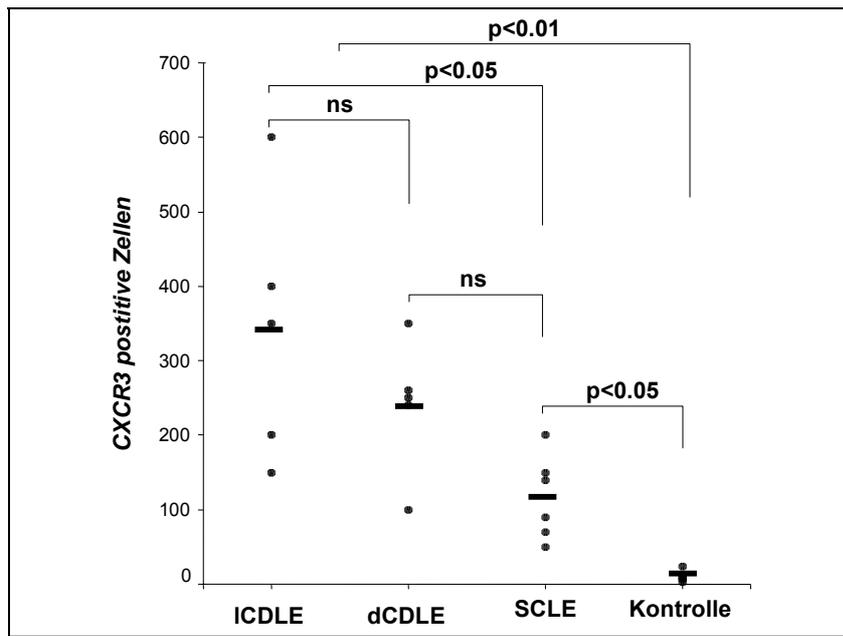


Abb. 30:

Statistische Auswertung der CXCR3-positiven Lymphozyten in der Haut bei verschiedenen Formen des kutanen Lupus erythematodes und gesunder Haut.

Die Rezeptor-exprimierenden Zellen wurden mit der High-Power-Field-Methode (Vergrößerung 200-fach) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Die Querbalken repräsentieren den Mittelwert.

Eine erhöhte Expression von CXCR3 findet sich bei allen Lupusformen, signifikant erhöht bei den vernarbenden Formen ICDLE und dCDLE.

5. Diskussion

Charakteristisch für viele entzündliche, infektiöse oder tumoröse Erkrankungen der Haut ist eine Infiltration von Lymphozyten. Die verschiedenen Zellinfiltrate sind inzwischen bei zahlreichen Erkrankungen gut untersucht. Die Mechanismen und der Auslöser der Zellrekrutierung sind aber meist kaum bekannt. Sie sind Gegenstand der aktuellen Forschung, mit dem Ziel, neue therapeutische Ansätze zur Behandlung dieser Erkrankungen zu finden.

In der Vergangenheit konnte die Funktion einer Reihe von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und deren Rezeptoren im Zusammenhang mit der Rekrutierung von Zellen aufgeklärt werden. Der kutane Lupus erythematodes gilt als Prototyp einer hautbezogenen lymphozytären Autoimmunerkrankung. Während bei vielen entzündlichen Erkrankungen, insbesondere dem systemischen Lupus erythematodes, das zelluläre Infiltrat und die an der Rekrutierung der Lymphozyten beteiligten Faktoren weitgehend bekannt sind, ist dies beim kutanen Lupus erythematodes nur unzureichend aufgeklärt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden anhand immunhistologischer Untersuchungen bei erkrankter Haut von Patienten mit kutanem Lupus erythematodes die Adhäsionsmoleküle, die eine Interaktion der Lymphozyten mit der Gefäßwand vermitteln, damit diese nachfolgend das Gefäß verlassen können, wie auch die beteiligten Chemokine und Chemokinrezeptoren, die eine gerichtete Migration der Lymphozyten in die entzündliche veränderte Haut ermöglichen, untersucht.

Darüber hinaus stellte sich zusätzlich die Frage, ob sich im Gewebe Faktoren nachweisen lassen, die Entzündungsreaktionen auslösen und somit die Rekrutierung der Lymphozyten initiieren. Da Typ-I-Interferon als bedeutender proinflammatorischer Faktor bei Entzündungsreaktionen bekannt ist, folgte die immunhistologische Untersuchung auf MxA, einem durch Interferon-Typ-I spezifisch induzierbaren Protein, sowie dem interferoninduzierbaren Chemokin CXCL10/IP10 und seinem Rezeptor CXCR3.

5.1. Dominanz der T-Zellen im zellulären Infiltrat beim kutanen Lupus erythematodes

Zunächst erfolgte eine Charakterisierung des zellulären Infiltrates mittels monoklonaler Antikörper gegen CD3, CD4, CD8, CD20 und CD68.

Die durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen der Hautläsionen bei CLE-Patienten zeigten eine dichte Infiltration von T-Zellen im Bereich der Junktionszone, im perivaskulären Bereich sowie in der Umgebung der Hautanhangsgebilde, wo die Zellen in das Epithel eindringen. Dies bestätigt das Ergebnis früherer Studien (Tebbe et al., 1995; Velthuis et al., 1990), in denen eine dichte T-Zell-Infiltration der Haut bei Patienten mit kutanem LE beschrieben wurde.

Es zeigte sich eine deutliche Dominanz der T-Zellen (CD3⁺). Bei der genaueren Differenzierung übertraf die Zahl der T-Helfer-Zellen (CD4⁺) leicht die der CD8⁺-Zellen. Auffallend war, dass bei den vernarbenden Formen des kutanen LE das Infiltrat hauptsächlich aus CD8⁺-T-Zellen bestand. Diese Zellen waren vor allem im Bereich der Hautanhangsgebilde, Haarfollikel und der Interfacezone lokalisiert. In diesen Bereichen liegt ebenfalls ein Großteil der Hautstammzellen. Eine durch die CD8⁺-T-Zellen bedingte Zerstörung in diesen Bereichen ist möglicherweise mit dem Auftreten der Hautvernarbungen assoziiert. Diese Ergebnisse bezüglich der Zusammensetzung des zellulären Infiltrates stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeiten beim SLE und CLE weitgehend überein (Kuhn et al., 2002; Parodi et al., 2000; Tebbe et al., 1995). Die Beteiligung von CD8⁺-T-Lymphozyten bei Autoimmunerkrankungen konnte auch bei anderen Krankheitsbildern, wie dem Autoimmundiabetes und Polymyositis sowie anderen vernarbenden Hauterkrankungen, gezeigt werden (Nishio et al., 2001; Russell et al., 1984; Van Voorhis et al., 1997; Zhang et al., 2002). Das in dieser Arbeit dargestellte vermehrte Auftreten CD68⁺-Zellen in den entzündlich veränderten Hautproben der verschiedenen Formen des kutanen LE entspricht den Ergebnissen früherer Arbeiten bei Haut von Patienten mit discoidem LE (Nakamura et al., 1998).

5.2. Beteiligung zytotoxischer GranzymB-positiver Zellen bei den vernarbenden Formen des kutanen Lupus erythematoses

Es ist bekannt, dass Keratinozyten im Rahmen von Entzündungen zugrunde gehen, was sich histologisch durch Nachweis einer typischen basalhydropischen Degeneration sowie das Vorliegen von Kolloidkörperchen nachweisen lässt. Da die Haut vor allem bei den vernarbenden Formen des kutanen LE diese starke Gewebszerstörung aufweist, wurde die Haut auf zytotoxische GranzymB-positive Effektorzellen hin untersucht.

Die Protease GranzymB befindet sich in den Granula aktivierter T-Zellen und natürlichen Killerzellen und führt zur Zerstörung von Zellmembranen. Das Enzym wurde bereits für die Gewebeerstörung bei verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht. GranzymB konnte z. B. im Plasma und in der Synovialflüssigkeit bei rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden (Ronday et al., 2001). Die Beteiligung von GranzymB wurde auch für den Krankheitsverlauf bei der Polymyositis, dem autoimmunen Diabetes (Nishio et al., 2001; Zhang et al., 2002) und bei vernarbenden Hautläsionen (Russell et al., 1984; Teymoortash et al., 2004; Van Voorhis et al., 1997) verantwortlich gemacht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass vor allem bei den vernarbenden Formen des kutanen LE (ICDLE und dCDLE) eine erhöhte Expression des zytotoxischen Moleküls GranzymB auftritt. Auch hier zeigte sich eine entzündliche Infiltration sowohl epidermal als auch adnexal mit einer deutlichen Gewebszerstörung im histologischen Bild. Es ist somit eine Beteiligung von GranzymB bei der Zerstörung in vernarbender Haut bei Patienten mit kutanem Lupus erythematoses wahrscheinlich. Da die zytotoxischen Lymphozyten v.a. im Bereich von Haarfollikeln infiltrierten, könnte insbesondere deren Destruktion, und die damit verbundene Zerstörung der dort lokalisierten Hautstammzellen, für die klinische Narbenbildung beim CDLE verantwortlich sein.

5.3. Beteiligung des Adhäsionsmoleküls CLA bei der Zellrekrutierung des kutanen Lupus erythematoses

Im Folgenden wurde die Beteiligung von Adhäsionsmolekülen anhand des cutaneous lymphocyte antigen (CLA) nachgewiesen, durch deren Hilfe die im Blut zirkulierenden Lymphozyten Kontakt zur Gefäßwand bekommen, diese anschließend durchdringen und

ins Gewebe gelangen (Tietz et al., 1998). CLA ist ein für die Haut spezifisches Adhäsionsmolekül.

Bei anderen Erkrankungen mit entzündlichen Zellinfiltraten der Haut, wie der atopischen Dermatitis, Psoriasis vulgaris, Lichen ruber planus oder kutanen T-Zell-Lymphomen, konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der T-Zellen CLA als Adhäsionsmolekül an ihrer Oberfläche tragen.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass bei den kutanen Formen des Lupus erythematoses, und dort vor allem bei den vernarbenden Formen, die Zahl der CLA⁺-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöht ist. Es ist somit nahe liegend, dass das Adhäsionsmolekül CLA für die Pathophysiologie des kutanen Lupus erythematoses eine bedeutende Rolle bei der Zellrekrutierung von Lymphozyten in die Haut spielt. Beim Systemischen Lupus erythematoses zeigte sich keine signifikant erhöhte CLA-Expression, diese LE-Variante geht aber auch in der Regel mit deutlich geringeren entzündlichen Hautinfiltrationen einher.

Zusätzlich konnte anhand der Doppelfärbung von CLA und GranzymB die Beteiligung von hautspezifischen CLA⁺ zytotoxischen Lymphozyten in den CLE-Hautläsionen nachgewiesen werden.

5.4. Die Rolle des homöostatischen Chemokinrezeptors CCR4 und des Chemokins TARC/CCL17 beim kutanen Lupus erythematoses

Es ist bekannt, dass CLA⁺-Lymphozyten häufig den Chemokinrezeptor CCR4 exprimieren. Dessen Ligand TARC/CCL17 wird konstitutiv von Endothelzellen der postkapillären Venolen der Haut synthetisiert. Durch die Bindung von CCR4 und TARC/CCL17 erfolgte die Aktivierung der Lymphozyten und leitet nachfolgend die transendotheliale Migration ein (Campbell et al., 1999). Durch die Expression dieses homöostatischen Chemokinrezeptors CCR4 erfolgt bei vielen entzündlichen Hauterkrankungen die Rekrutierung autoreaktiver Lymphozyten in die Haut. Dies konnte bereits bei der atopischen Dermatitis, Psoriasis und bei kutanen T-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden (Ferenczi et al., 2002; Inaoki et al., 2003; Kallinich et al., 2003; Nakatani et al., 2004). Auch beim Systemischen Lupus erythematoses konnte eine erhöhte CCR4-Expression auf CD4⁺-Lymphozyten nachgewiesen werden (Hase et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression von CCR4 bei der kutanen Form des Lupus erythematoses analysiert. In den untersuchten Hautproben aller LE-Subtypen ließ sich eine hohe Anzahl CCR4⁺-Zellen nachweisen.

Am deutlichsten war die Expression von CCR4 hierbei in den vernarbenden Formen des kutanen LE (ICDLE und dCDLE). Die CCR4⁺-Zellen drangen basal in die Epithelbereiche ein, die histologisch eine basalhydrophische Degeneration zeigten, was typisch für den Untergang von Keratinozyten ist. Es ist somit möglich, dass der CCR4-Rezeptor eine bedeutende Rolle bei der Migration der gewebserstörenden Zellen, insbesondere in vernarbenden Hautläsionen, bei Patienten mit kutanem Lupus erythematoses spielt.

Da die Beteiligung des Chemokinrezeptors CCR4 immunhistologisch nachgewiesen werden konnte, wurde nachfolgend untersucht, welche Zellen diesen Rezeptor an ihrer Oberfläche exprimieren. Aufgrund der Dominanz von CD8⁺-T-Zellen im entzündlichen Infiltrat der Hautläsionen beim kutanen LE war anzunehmen, dass diese Zellen den CCR4-Rezeptor exprimieren. Anhand der hier durchgeführten immunhistochemischen Doppelfärbung bestätigte sich, dass die CD8⁺-Lymphozyten den CCR4-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen.

Weiterhin wurde die Expression des CCR4-Liganden TARC/CCL17 als Beispiel eines inflammatorischen Chemokins analysiert. Die Beteiligung des Chemokins TARC/CCL17 wurde bereits bei anderen entzündlichen Hauterkrankungen wie Atopischer Dermatitis (Hijnen et al., 2004) und Mycosis fungoides (Kakinuma et al., 2003 a; Kakinuma et al., 2003 b) gezeigt. Beim SLE konnte eine Korrelation der Krankheitsaktivität mit dem erhöhten Plasmalevel an TARC/CCL17 nachgewiesen werden (Kallinich et al., 2003).

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine signifikant erhöhte Expression von TARC/CCL17 v. a. im Endothelbereich der Hautläsionen bei kutanem LE dargestellt werden. Auch hier zeigte sich wieder eine besonders starke Expression bei den vernarbenden LE-Formen.

Anhand der hier dargestellten Expressionsmuster ist es möglich dass eine lokale Produktion des homöostatischen Chemokins TARC/CCL17 zu einer Rekrutierung der CCR4 tragenden CD8⁺-Lymphozyten in die entzündlich veränderten Hautbereiche beim kutanen Lupus erythematoses führt. Diese zytotoxische Zellpopulation kann demzufolge

besonders bei den vernarbenden LE-Formen für eine gesteigerten gewebtsdestruierenden Entzündungsreaktion verantwortlich sein.

5.5. Die Beteiligung von Interferon-Typ-I als proinflammatorischer Faktor bei der Lymphozytenrekrutierung bei kutanem Lupus erythematodes

Während zunächst die möglicherweise an der Rekrutierung der Lymphozyten selbst beteiligten Faktoren analysiert wurden, wurde im Weiteren untersucht, welche Faktoren diese Rekrutierung auslösen könnten, also zu den entzündlichen Veränderungen in der Haut führen. Nahe liegend war eine Beteiligung von Interferon-Typ-I, da anhand anderer Arbeiten gezeigt werden konnte, dass Interferone eine zelluläre Entzündungsreaktion hervorrufen und verstärken können. Dies konnte bereits bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen gezeigt werden. Auch beim kutanen LE konnten Interferon-Typ-I-positive Zellen nachgewiesen werden (Farkas et al., 2001; Ronnblom und Alm, 2001). Typ-I-Interferone sind wichtiger proinflammatorischer Faktor einer TH1-gerichteten Immunreaktionen (Klimpel et al., 1990).

5.5.1. Der Nachweis einer Interferonbeteiligung anhand der MxA-Expression

Ein geeigneter Marker zum histologischen Nachweis einer Interferonbeteiligung ist MxA, ein durch Interferon- α/β induzierbares Protein (Fah et al., 1995; Haller und Kochs, 2002). MxA wurde bereits bei verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen nachgewiesen, bei denen eine Interferonbeteiligung angenommen wurde wie z.B. dem Herpes simplex.

In dieser Arbeit konnte ein deutlicher läsionaler Nachweis von MxA in der Dermis und Epidermis erbracht werden, und zwar in allen CLE-Formen. Besonders deutlich trat die MxA-Expression bei Hautläsionen des CDLE auf. Diese Ergebnisse passen gut zu den früheren Daten einer MxA-Expression beim Lupus erythematodes (Fah et al., 1995). Als Produzenten des Interferons kommen v.a. sog „natürliche IFN-produzierende“ plasmazytoide dendritische Zellen in Frage, die von Farkas et al in großer Anzahl in CLE Hautläsionen gefunden wurden (Farkas et al., 2001).

5.5.2. Anhand des Nachweises des Chemokinrezeptors CXCR3 und seines Liganden CXCL10/IP10 konnte die Beteiligung pro-inflammatorischer Faktoren beim kutanen Lupus erythematodes gezeigt werden

Da die Beteiligung homöostatischer Chemokine und Rezeptoren am Beispiel von TARC/CCL17 und CCR4 sowie ein Auftreten proinflammatorischer Faktoren wie Interferone gezeigt werden konnten, stellte sich die Frage, ob auch Chemokine und Chemokinrezeptoren nachweisbar sind, denen eine Beteiligung an proinflammatorischen Reaktionen zugewiesen wird. Geeignet schien dabei CXCR3 und sein Chemokin CXCL10/IP10, deren Beteiligung an IFN-vermittelten inflammatorischen Erkrankungen bereits nachgewiesen wurde (Segeer et al., 2004). CXCR3 wird vor allem auf aktivierten T-Zellen exprimiert und weist auf ein TH1-gerichtete Immungeschehen hin (Sallusto et al., 1998). CXCR3 wurde bereits bei der Lupus-Nephritis beim SLE beschrieben (Segeer et al., 2004). CXCR3 und seine Liganden CXCL10/IP10, CXCL9 und CXCL11 wurden in entzündlich veränderter Haut bei verschiedenen Erkrankungen und auch beim chronisch discoiden LE nachgewiesen (Flier et al., 2001). Interferon- α induziert die Produktion proinflammatorischer Chemokine wie CXCL10/IP10 oder CXCL9/MIG durch dendritische Zellen, die dann die Lymphozyten, welche den Oberflächenrezeptor CXCR3 tragen, in das Gewebe rekrutieren (Clark-Lewis et al., 2003).

Die bisher nur für den SLE beschriebene Beteiligung von Interferon ist möglicherweise als Ursache für das Auftreten Influenza-ähnlicher Symptome, wie Fieber und Abgeschlagenheit, bei Patienten mit kutanem LE im aktiven Stadium verantwortlich. Bei klinischen Beobachtungen der 90er Jahre waren unter Interferontherapien Symptome aufgetreten, die denen eines akuten Schubes eines SLE mit Fieber, Arthralgien, Abgeschlagenheit und Myalgien glichen. Bei LE-Patienten konnte außerdem ein erhöhter Interferon-Spiegel im Blut nachgewiesen werden (Fah et al., 1995; Ronnblom und Alm, 2001).

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen zeigte sich ein deutliches Infiltrat von CXCR3⁺-Zellen in allen untersuchten Formen des LE. Auch bei den Untersuchungen der Haut bei Psoriasis-Patienten zeigte sich eine erhöhte Anzahl CXCR3⁺-Zellen. Dies stimmt mit den

Ergebnissen von Rottman J.B. et al. (2001) überein, bei denen eine Beteiligung von TH1-Zellen bei der Psoriasis nachgewiesen wurde (Rottman et al., 2001).

Bei der Untersuchung der Haut bezüglich des korrespondierenden, durch Interferon induzierbaren Chemokins CXCL10/IP10 zeigte sich eine deutliche Expression von CXCL10/IP10 in CDLE- und SCLE-Läsionen. Diese fanden sich vor allem in Form punktförmiger Häufungen, konzentriert an Haarfollikeln und im Bereich der Grenzzone zwischen entzündlichen Zellen und der basalen Keratinozytenschicht, also in dem Bereich, in den die zytotoxischen Lymphozyten migrieren. Dies entspricht den Beobachtungen von Flier et al. bezüglich der Expression von CXCL10/IP10 mRNA (Flier et al., 2001).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass Interferon-Typ-I eine TH1-lymphozytäre Entzündungsreaktion hervorruft. Hierbei wird im Gewebe unter Einfluss von Interferon-Typ-I die Bildung von CXCL10/IP10 induziert, um dann CXCR3⁺-Lymphozyten ins Gewebe zu rekrutieren. Dieses wird durch die Ergebnisse von Meller et al. unterstützt, die anhand der Untersuchung der mRNA-Expression in der Haut bei kutanem LE eine gesteigerte Transkription der CXCR3-Liganden CXCL 9, 10 und 11 nachweisen konnten (Meller et al., 2005).

Bei den hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine auffallend hohe Expression von CXCL10/IP10 und CXCR3 bei CDLE-Läsionen, was möglicherweise die Vernarbungen der Haut erklärt.

Anhand der Doppelfärbung des mit der Interferonproduktion assoziierten Rezeptors CXCR3 und des Markers für zytotoxische T-Zellen GranzymB konnte ein vermehrtes Auftreten von CXCR3⁺ zytotoxischen Zellen nachgewiesen werden. Eine Beteiligung an der Rekrutierung von zytotoxischen Zellen besonders bei den vernarbenden Formen dCDLE und ICDLE unter Interferoneinfluss ist somit wahrscheinlich.

Anhand der immunhistologisch nachgewiesenen Beteiligung von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren und der Erkenntnisse im Rahmen andere Arbeiten lässt sich ein Modell der Funktion dieser Strukturen erstellen (s. Abb. 17). Aufgrund verschiedener Einflüsse wie Licht, Medikamente, Infektionen oder Genen kommt es in der Haut läsional zu einer vermehrte Interferon-Typ-I-Produktion. Diese führt zu einer Induktion der MxA- und CXCL10/IP10-Produktion. Die erhöhte Konzentration des Chemokins CXCL10/IP10 führt zu eine Einwanderung von CXCR3⁺-

Lymphozyten. Anhand der durchgeführten Doppelfärbung von CXCR3 und GranzymB konnte gezeigt werden, dass es sich hier um zytotoxische T-Zellen handelt. Diese führen dann möglicherweise zu der histologisch erkennbaren basalhydrophischen Degeneration und Zellapoptose. Der Zelluntergang führt dann zu einer zusätzlichen Produktion proinflammatorischer Cytokinen, was die Entzündungsreaktion aufrechterhält. Weiterhin produzieren die eingewanderten dendritischen Zellen zusätzlich Interferon-Typ-I. Die CXCR3⁺-Lymphozyten können aus ihren Granula CXCL10/IP10 freisetzen, was wiederum zu einer Rekrutierung weiterer CXCR3⁺-Lymphozyten führt. Es kommt somit zu einer sich selbst aufrechterhaltenden Entzündungsreaktion in der Haut.

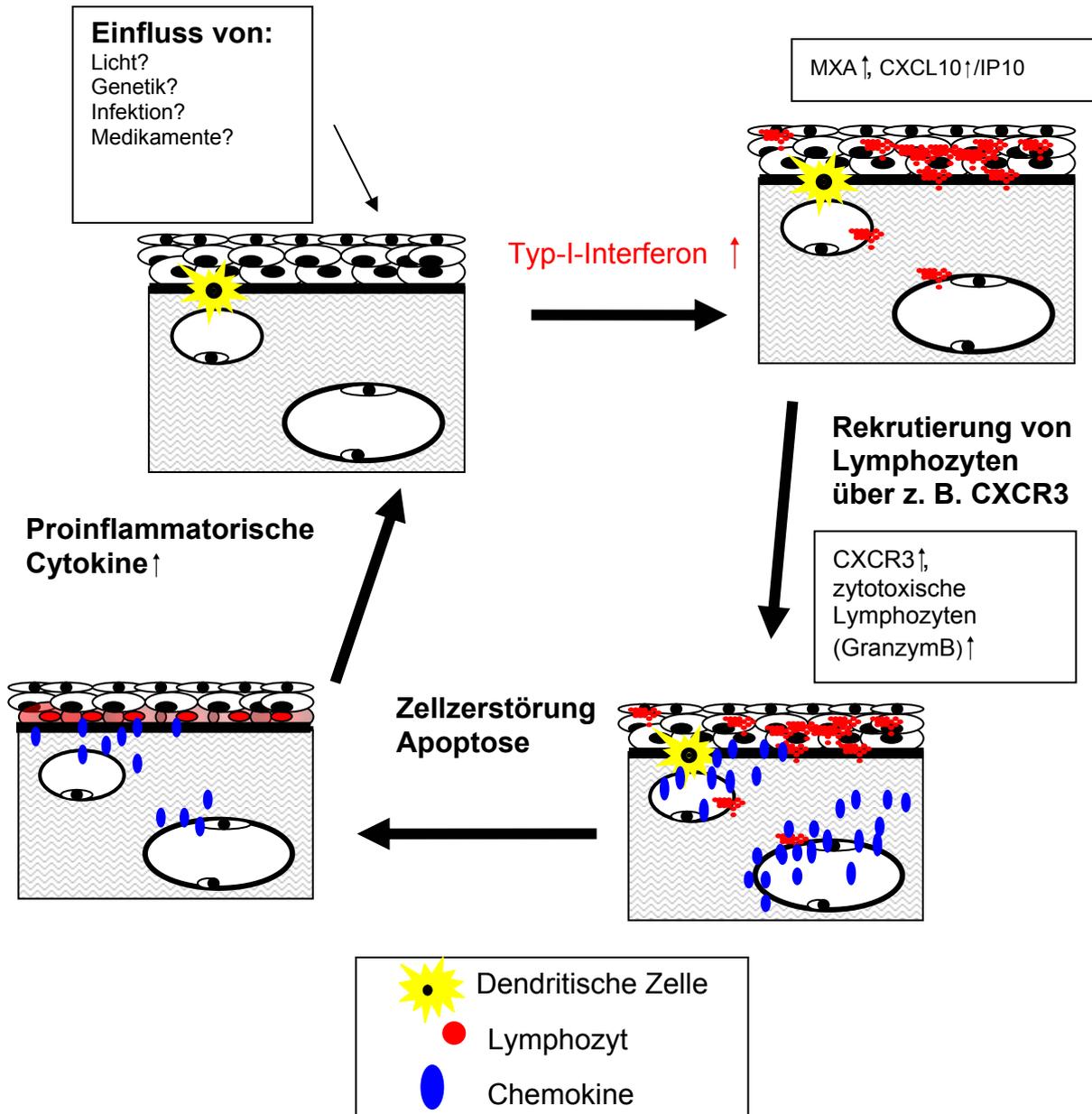


Abb. 31: Modell eines proinflammatorischen „circulus vitiosus“ beim CLE (modifiziert nach (Wenzel und Tuting, 2007))

Ein noch unbekannter Reiz führt zu einer läSIONalen Expression von Interferon-Typ-I in der Haut. Interferon-Typ-I wiederum steigert die Produktion antiviraler Proteine wie MxA und der Chemokine CXCL9 und 10. Diese wiederum sind Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3. Es kommt so zu einer Rekrutierung CXCR3⁺-Lymphozyten und dendritischer Zellen. Durch verschiedene Mechanismen kommt es dann zu einer weiteren sich selbst verstärkenden Rekrutierung weiterer Zellen was eine chronische entzündliche Veränderung der Haut aufrechterhält.

5.6. Ausblick/ Therapie:

Die selektive Blockade der Rekrutierung von Leukozyten zu Entzündungsorten durch die Hemmung der Bindungsfähigkeit von Chemokinrezeptoren hat sich in einigen Erkrankungsmodellen als effektives Therapeutikum herausgestellt (Proudfoot, 2002). Ein therapeutischer Ansatz mit bereits langjähriger klinischer Anwendung, deren Rationale aber jetzt erst Schritt für Schritt verstanden wird, ist das Medikament Methotrexat (MTX), welches beim CLE erfolgreich eingesetzt wurde, ohne dass der Wirkmechanismus bekannt war. Forschungsergebnisse zeigen, dass Methotrexat die Bindung CLA⁺-Lymphozyten an das Endothel hemmt und so die Migration Lymphozyten in die Haut verhindert (Johnston et al., 2005; Sigmundsdottir et al., 2004; Wenzel et al., 2005).

Auch das Anti-Malaria-Medikament Chloroquine wurde seit Jahrzehnten zur Therapie des CLE und SLE erfolgreich eingesetzt ohne dass der Wirkmechanismus bekannt war (Ku et al., 2004; Wozniacka und McCauliffe, 2005). Im Rahmen von in vitro-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Chloroquine die Aktivierung peripherer dendritischer Zellen durch SLE-Immunkomplexe inhibiert (Lovgren et al., 2006).

Die Etablierung neuer zielgerichteter Medikamente in Form einer Anti-Interferon Therapie oder dem gezielten Einsatz von Antikörpern, welche die Oberflächenrezeptoren blockieren und so z.B. eine Rekrutierung entzündlicher Zellen verhindern, sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Ein Beispiel ist das Medikament Efalizumab, ein Antikörper gegen CD11a. Dieser blockiert die Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 und verhindert so eine Migration der Lymphozyten in die Haut. Die Wirkung konnte bereits an Hautläsionen des CLE und der Dermatomyositis gezeigt werden (Clayton et al., 2006; Huber et al., 2006).

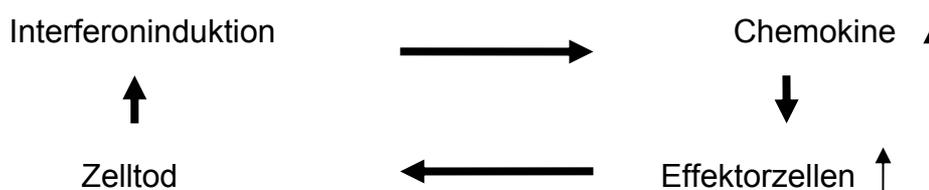
6. Zusammenfassung

Der kutane Lupus erythematodes ist eine Autoimmunerkrankung der Haut, die durch das Bild einer „Interface Dermatitis“ gekennzeichnet ist. Hierbei infiltrieren Effektor-T-Zelle, die keratinozytäre Antigene erkennen, die basale Epidermis und induzieren hier eine keratinozytäre Apoptose.

Die Pathomechanismen des CLE und die Entstehung dieser Zellinfiltrate waren bisher wenig verstanden. Insbesondere war unklar, wie es genau zur Rekrutierung dieser Effektorzellen in die Haut kommt, und welche proinflammatorischen Mechanismen hierbei von zentraler Bedeutung sind.

In der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass beim CLE zahlreiche Adhäsionsmoleküle (z. B. CLA) und Chemokine (z. B. TARC/CCL17, CXCL10/IP10) sowie deren Rezeptoren (z. B. CCR4, CXCR3) in den Hautläsionen nachweisbar sind und somit möglicherweise an dem Prozess des „skin homing“ teilnehmen: Typ-I-Interferon konnte als wichtiger proinflammatorischer Faktor des CLE nachgewiesen werden. Dies könnte auch sehr gut die bekannten, aber bisher nicht verstandenen grippeähnlichen Symptome (Fieber, Abgeschlagenheit) bei CLE-Patienten mit großflächigen Läsionen erklären.

Es ist davon auszugehen, dass ein komplexer, IFN-assoziiertes, proinflammatorischer sich selbst verstärkender Prozess existiert, der zur chronischen Entzündung in der Haut führt.



Die in dieser Arbeit beschriebenen Kenntnisse bezüglich der beteiligten Rezeptoren und Chemokine ermöglicht ein besseres Verständnis der beschriebenen Autoimmunerkrankung und bieten in Zukunft Ansatzpunkte in diese Prozesse gezielt einzugreifen und somit das Auslösen, die Unterhaltung und das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern.

7. Anhang

Übersicht der histologischen Auswertung:

Diagnose	CD3	CD4	CD8	CD20	CD68	CLA
Gesunde Haut	27	14	2	0	34	80
	15	8	7	1	2	6
	20	10	10	0	4	15
	90	120	20	2	100	60
	40	30	8	0	18	20
Herpes simplex	140	10	15	0	350	45
	200	150	20	4	200	45
	530	3	110	12	700	200
Psoriasis	250	60	35	0	250	65
	420	50	50	2	30	120
	400	280	300	60	150	140
SCLE	350	65	200	4	280	200
	180	10	100	3	300	120
	150	80	100	7	200	200
	200	0	15	8	140	25
dCDLE	350	270	130	24	420	270
	250	600	50	32	800	100
	400	30	370	10	380	300
ICDLE	650	100	450	450	600	120
	500	120	80	80	600	250
	800	50	400	150	500	450
SLE	15	60	50	15	50	60
	55	35	4	5	35	15
	200	3	110	12	700	200
	250	140	150	3	280	190

Diagnosen	GranB	CCR4	MxA	TARC	CXCR3	CXCL10/IP10
Gesunde Haut	0	20	0	0	2	++
	0	2	0	+	6	0
	1	5	0	0	9	0
	0	50	1	++	24	0
	1	4	0	+	6	0
Herpes simplex	0	3	+	+	40	+
	30	0	+++	++	0	+
	50	13	++	++	60	+
Psoriasis	0	40	++	0	5	+
	1	65	+	+	150	+
	40	6	++	++	90	+
SCLE	22	60	+++	+	90	++
	0	3	+++	0	2	+
	0	25	++	++	150	+
	4	8	+++	0	3	+
dCDLE	90	80	+++	+	120	++
	60	150	+++	0	200	++
	150	40	+++	+	100	+
ICDLE	80	40	+++	+++	400	0
	10	75	+++	+++	700	0
	10	2	+++	+++	350	+
SLE	7	4	0	+++	20	0
	0	40	+	++	50	+
	50	13	++	++	60	+
	1	0	+	+	15	0

Tab. 6: Auswertung der histologischen Präparate der Haut bei den verschiedenen Erkrankungen. Die Auszählung erfolgte am Lichtmikroskop. Die Zellen wurden jeweils pro HPF (bei einer Vergrößerung x 200) ausgezählt. Die Stärke der Expression der Chemokine MxA, TARC und CXCL10/IP-10 wurde semiquantitativ ermittelt (0: nicht exprimiert, +: schwach exprimiert, ++: mäßig exprimiert, +++: stark exprimiert).

8. Publikationsliste

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit waren Bestandteil folgender Publikationen:

- Wenzel J, Wörenkämper E, Freutel S, Henze S, Haller O, Bieber T et al. Enhanced type I interferon signaling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. J Pathol. 2005 Mar;205(4):435-42.
- Wenzel J, Henze S, Wörenkämper E, Basner-Tschakerjan E, Wojdylo M, Steitz J et al. Role of the chemokine receptor CCR4 and its ligand thymus- and activation-regulated chemokine/CCR17 for lymphocyte recruitment in cutaneous lupus erythematosus. J Invest Dermatol. 2005 Jun;124(6):1241-8.
- Wenzel J, Uerlich M, Wörenkämper E, Freutel S, Bieber T, Tüting T et al. Scarring skin lesions of discoid lupus erythematosus are characterized by high numbers of skin-homing cytotoxic lymphocytes associated with strong expression of the type I interferon-induced protein MxA; Br J Dermatol. 2005 Nov;153(5):1011-5

9. Literaturverzeichnis

- Accola MA, Huang B, Al Masri A, McNiven MA. The antiviral dynamin family member, MxA, tubulates lipids and localizes to the smooth endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2002; 277: 21829-21835
- Agostini C, Cassatella M, Zambello R, Trentin L, Gasperini S, Perin A, Piazza F, Siviero M, Facco M, Dziejman M, Chilosi M, Qin S, Luster AD, Semenzato G. Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. *J Immunol* 1998; 161: 6413-6420
- Aharon-Maor A, Shoenfeld Y. The role of ultraviolet light, and sun and fluorescent light, in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Harefuah* 1998; 135: 295-299
- Akbar AN, Lord JM, Salmon M. IFN-alpha and IFN-beta: a link between immune memory and chronic inflammation. *Immunol Today* 2000; 21: 337-342
- Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 787-820
- Amoura Z, Combadiere C, Faure S, Parizot C, Miyara M, Raphael D, Ghillani P, Debre P, Piette JC, Gorochov G. Roles of CCR2 and CXCR3 in the T cell-mediated response occurring during lupus flares. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3487-3496
- Annunziato F, Galli G, Cosmi L, Romagnani P, Manetti R, Maggi E, Romagnani S. Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *Eur Cytokine Netw* 1998; 9: 12-16
- Arenberg DA, Poverini PJ, Kunkel SL, Shanafelt A, Strieter RM. In vitro and in vivo systems to assess role of C-X-C chemokines in regulation of angiogenesis. *Methods Enzymol* 1997; 288: 190-220
- Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and TH1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 752-759
- Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, Hamann A. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997; 385: 81-83
- Avrameas S. Enzyme markers: their linkage with proteins and use in immunohistochemistry. *Histochem J* 1972; 4: 321-330

- Bach JF. Non-Th2 regulatory T-cell control of Th1 autoimmunity. *Scand J Immunol* 2001; 54: 21-29
- Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001; 250: 91-104
- Berg EL, Yoshino T, Rott LS, Robinson MK, Warnock RA, Kishimoto TK, Picker LJ, Butcher EC. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 1991; 174: 1461-1466
- Beutner EH, Blaszczyk M, Jablonska S, Chorzelski TP, Kumar V, Wolska H. Studies on criteria of the European Academy of Dermatology and Venerology for the classification of cutaneous lupus erythematosus. I. Selection of clinical groups and study factors. *Int J Dermatol* 1991; 30: 411-417
- Bevilacqua PC, Johnson KA, Turner DH. Cooperative and anticooperative binding to a ribozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 8357-8361
- Biedermann T, Schwarzler C, Lametschwandtner G, Thoma G, Carballido-Perrig N, Kund J, de Vries JE, Rot A, Carballido JM. Targeting CLA/E-selectin interactions prevents CCR4-mediated recruitment of human Th2 memory cells to human skin in vivo. *Eur J Immunol* 2002; 32: 3171-3180
- Bikoff EK, Jaffe L, Ribaldo RK, Otten GR, Germain RN, Robertson EJ. MHC class I surface expression in embryo-derived cell lines inducible with peptide or interferon. *Nature* 1991; 354: 235-238
- Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity* 2001; 14: 661-664
- Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Christian CL. Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. *Am J Med* 1975; 59: 533-552
- Boenisch T. *Handbuch Immunhistochemischer Färbemethoden*. Hamburg: DakoCytomation GmbH, 2003
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998; 187: 129-134

- Bonsmann G, Schiller M, Luger TA, Stander S. Terbinafine-induced subacute cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 925-931
- Bos JD, Hagensmaars C, Das PK, Krieg SR, Voorn WJ, Kapsenberg ML. Predominance of "memory" T cells (CD4+, CDw29+) over "naive" T cells (CD4+, CD45R+) in both normal and diseased human skin. *Arch Dermatol Res* 1989; 281: 24-30
- Bradley JR, Pober JS. Prolonged cytokine exposure causes a dynamic redistribution of endothelial cell adhesion molecules to intercellular junctions. *Lab Invest* 1996; 75: 463-472
- Braun-Falco O. [On the morphology and pathogenesis of scleroderma and systemic lupus erythematosus]. *Dtsch Med Wochenschr* 1965; 90: 2269-2274
- Brehm MA, Bonneau RH, Knipe DM, Tevethia SS. Immunization with a replication-deficient mutant of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) induces a CD8+ cytotoxic T-lymphocyte response and confers a level of protection comparable to that of wild-type HSV-1. *J Virol* 1997; 71: 3534-3544
- Brennan MT, Valerin MA, Napenas JJ, Lockhart PB. Oral manifestations of patients with lupus erythematosus. *Dent Clin North Am* 2005; 49: 127-141, ix
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272: 60-66
- Callen JP. Cutaneous vasculitis and other neutrophilic dermatoses. *Curr Opin Rheumatol* 1993; 5: 33-40
- Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 336-341
- Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L, Butcher EC. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 1999; 400: 776-780
- Camussi G, Tetta C, Segoloni G, Coda R, Vercellone A. Localization of neutrophil cationic proteins and loss of anionic charges in glomeruli of patients with systemic lupus erythematosus glomerulonephritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1982; 24: 299-314
- Cao TM, Wong RM, Sheehan K, Laport GG, Stockerl-Goldstein KE, Johnston LJ, Shizuru JA, Negrin RS, Lowsky R. CD34, CD4, and CD8 cell doses do not influence engraftment, graft-versus-host disease, or survival following myeloablative human leukocyte antigen-identical peripheral blood allografting for hematologic malignancies. *Exp Hematol* 2005; 33: 279-285

- Casciola-Rosen L, Rosen A, Petri M, Schlissel M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 1624-1629
- Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C, Becker MH, Poggi S, Bifulco C, Key G, D'Amato L, Sabattini E, Feudale E, et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 1993; 171: 83-98
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5: 919-923
- Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Domenech I, Aydintug AO, Jedryka-Goral A, de Ramon E, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72: 113-124
- Chen SH, Garber DA, Schaffer PA, Knipe DM, Coen DM. Persistent elevated expression of cytokine transcripts in ganglia latently infected with herpes simplex virus in the absence of ganglionic replication or reactivation. *Virology* 2000; 278: 207-216
- Chensue SW. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 821-835, table of contents
- Chong BF, Murphy JE, Kupper TS, Fuhlbrigge RC. E-selectin, thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17, and intercellular adhesion molecule-1 are constitutively coexpressed in dermal microvessels: a foundation for a cutaneous immunosurveillance system. *J Immunol* 2004; 172: 1575-1581
- Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, Loetscher P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* 2003; 278: 289-295
- Clayton TH, Ogden S, Goodfield MD. Treatment of refractory subacute cutaneous lupus erythematosus with efalizumab. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54: 892-895
- Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Neote K. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on

activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 1998; 187: 2009-2021

Coons AH, Kaplan MH. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 1950; 91: 1-13

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

Costner M, Sontheimer RD, Provost TT. Lupus erythematosus. In: Sontheimer RD and Provost TT, eds. *Cutaneous manifestations of rheumatic diseases*. Baltimore: Williams and Wilkins, 2003: 16-64

Crowson AN, Magro C. The cutaneous pathology of lupus erythematosus: a review. *J Cutan Pathol* 2001; 28: 1-23

David-Bajar KM, Davis BM. Pathology, immunopathology, and immunohistochemistry in cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6: 145-157

de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 912-920

Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15623-15628

dos Santos RF, Santiago MB, Yoshinari NH, Rodrigues CJ, Cossermelli W. [The direct immunofluorescence skin test in systemic lupus erythematosus. Correlation with the clinical stage of the disease, laboratory changes and nephropathy]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1988; 43: 197-200

Dulbecco R, Vogt M. One-step growth curve of Western equine encephalomyelitis virus on chicken embryo cells grown in vitro and analysis of virus yields from single cells. *J Exp Med* 1954; 99: 183-199

Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986; 137: 245-254

Ebert LM, Schaerli P, Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* 2005; 42: 799-809

- Epperson DE, Pober JS. Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells. *J Immunol* 1994; 153: 5402-5412
- Fah J, Pavlovic J, Burg G. Expression of MxA protein in inflammatory dermatoses. *J Histochem Cytochem* 1995; 43: 47-52
- Farber JM. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 5238-5242
- Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, 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, Kupper TS. Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1405-1410
- Fitzgerald-Bocarsly P. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 1993; 60: 39-62
- Fivenson DP, Nickoloff BJ. Immunodiagnosis in cutaneous T cell lymphoma: how does gene expression of the variable region of the T cell receptor fit into the diagnostic and pathophysiological picture of T cell neoplasia. *J Cutan Pathol* 1992; 19: 1-5
- Flier J, Boorsma DM, van Beek PJ, Nieboer C, Stoof TJ, Willemze R, Tensen CP. Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J Pathol* 2001; 194: 398-405
- Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Armerding D, Kupper TS. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature* 1997; 389: 978-981
- Furukawa F, Kashihara-Sawami M, Lyons MB, 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
- Gensch K, Gudowius S, Niehues T, Kuhn A. [Connective tissue diseases in childhood]. *Hautarzt* 2005; 56: 925-936
- Gilliam JN, Hurd ER. Comparison of circulating T and B lymphocytes in discoid versus systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1976; 6: 149-155

- Gilliam JN, Sontheimer RD. Distinctive cutaneous subsets in the spectrum of lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 1981; 4: 471-475
- Gimbrone MA, Jr. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *J Card Surg* 1989; 4: 180-183
- Goerz G, Lehmann P, Schuppe HC, Lakomek HJ, Kind P. Lupus erythematosus. *Z Hautkr* 1990; 65: 226, 229-234
- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000; 81: 2341-2364
- Gottlieb AB, Luster AD, Posnett DN, Carter DM. Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *J Exp Med* 1988; 168: 941-948
- Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, Plenge RM, Koeth T, Ortmann WA, Hom G, Bauer JW, Gillett C, Burt N, Cunninghame Graham DS, Onofrio R, Petri M, Gunnarsson I, Svenungsson E, Ronnblom L, Nordmark G, Gregersen PK, Moser K, Gaffney PM, Criswell LA, Vyse TJ, Syvanen AC, Bohjanen PR, Daly MJ, Behrens TW, Altshuler D. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 6758-6763
- Green JR, Montasser M, Woodrow JC. The association of HLA-linked genes with systemic lupus erythematosus. *Ann Hum Genet* 1986; 50: 93-96
- Groves RW, Allen MH, Barker JN, Haskard DO, MacDonald DM. Endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in cutaneous inflammation. *Br J Dermatol* 1991; 124: 117-123
- Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 2002; 3: 710-717
- Hase K, Tani K, Shimizu T, Ohmoto Y, Matsushima K, Sone S. Increased CCR4 expression in active systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 749-755
- Herrmann M, Voll RE, Kalden JR. Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunol Today* 2000; 21: 424-426
- Hijnen D, De Bruin-Weller M, Oosting B, Lebre C, De Jong E, Bruijnzeel-Koomen C, Knol E. Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell- attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases: TARC and CTACK are

disease-specific markers for atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 334-340

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

Homey B, Bunemann E. Chemokines and inflammatory skin diseases. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2004; 69-83

Horisberger MA. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol* 1992; 66: 4705-4709

Huber A, Gaffal E, Bieber T, Tuting T, Wenzel J. Treatment of recalcitrant dermatomyositis with efalizumab. *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 254-255

Iczkowski KA, Cheng L, Crawford BG, Bostwick DG. Steam heat with an EDTA buffer and protease digestion optimizes immunohistochemical expression of basal cell-specific antikeratin 34betaE12 to discriminate cancer in prostatic epithelium. *Mod Pathol* 1999; 12: 1-4

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

Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R, Yoshie O, Gray PW. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 1998; 273: 1764-1768

Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol* 1999; 11: 81-88

Inaoki M, Sato S, Shirasaki F, Mukaida N, 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

Jiménez S, Cervera R, Ingelmo M, Font J. The epidemiology of lupus erythematosus. In: Kuhn A, ed. *Cutaneous lupus erythematosus*. Heidelberg: Springer, 2004: 33-44

- Johansson-Stephansson E, Koskimies S, Partanen J, Kariniemi AL. Subacute cutaneous lupus erythematosus. Genetic markers and clinical and immunological findings in patients. *Arch Dermatol* 1989; 125: 791-796
- Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 551-558
- Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Ludviksson BR, Valdimarsson H. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol* 2005; 114: 154-163
- Jorizzo JL, Salisbury PL, Rogers RS, 3rd, Goldsmith SM, Shar GG, Callen JP, Wise CM, Semble EL, White WL. Oral lesions in systemic lupus erythematosus. Do ulcerative lesions represent a necrotizing vasculitis? *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 389-394
- Kakinuma T, Sugaya M, Nakamura K, Kaneko F, Wakugawa M, Matsushima K, Tamaki K. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) in mycosis fungoides: serum TARC levels reflect the disease activity of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 23-30
- Kakinuma T, Wakugawa M, Nakamura K, Hino H, Matsushima K, Tamaki K. High level of thymus and activation-regulated chemokine in blister fluid and sera of patients with bullous pemphigoid. *Br J Dermatol* 2003; 148: 203-210
- Kallinich T, Mucic JM, Qin S, Sterry W, Audring H, 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
- Kamath AT, Sheasby CE, Tough DF. Dendritic cells and NK cells stimulate bystander T cell activation in response to TLR agonists through secretion of IFN-alpha beta and IFN-gamma. *J Immunol* 2005; 174: 767-776
- Kawashima T, Zappi EG, Lieu TS, Sontheimer RD. Impact of ultraviolet irradiation on expression of SSA/Ro autoantigenic polypeptides in transformed human epidermal keratinocytes. *Lupus* 1994; 3: 493-500
- Keelan ET, Harrison AA, Chapman PT, Binns RM, Peters AM, Haskard DO. Imaging vascular endothelial activation: an approach using radiolabeled monoclonal antibodies against the endothelial cell adhesion molecule E-selectin. *J Nucl Med* 1994; 35: 276-281

- Kind P, Goerz G. Clinical aspects and differential diagnosis of cutaneous lupus erythematosus. *Z Hautkr* 1987; 62: 1337-1338, 1341-1332, 1347
- Klimpel GR, Infante AJ, Patterson J, Hess CB, Asuncion M. Virus-induced interferon alpha/beta (IFN-alpha/beta) production by T cells and by Th1 and Th2 helper T cell clones: a study of the immunoregulatory actions of IFN-gamma versus IFN-alpha/beta on functions of different T cell populations. *Cell Immunol* 1990; 128: 603-618
- Knop J, Bonsmann G, Kind P, Doxiadis I, Vogeler U, Doxiadis G, Goerz G, Grosse-Wilde H. Antigens of the major histocompatibility complex in patients with chronic discoid lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 1990; 122: 723-728
- Ku CC, Zerboni L, Ito H, Graham BS, Wallace M, Arvin AM. Varicella-zoster virus transfer to skin by T Cells and modulation of viral replication by epidermal cell interferon-alpha. *J Exp Med* 2004; 200: 917-925
- Kuhn A, Beissert S. Photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2005; 38: 519-529
- Kuhn A, Herrmann M, Kleber S, Beckmann-Welle M, Fehsel K, Martin-Villalba A, Lehmann P, Ruzicka T, Krammer PH, Kolb-Bachofen V. Accumulation of apoptotic cells in the epidermis of patients with cutaneous lupus erythematosus after ultraviolet irradiation. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 939-950
- Kuhn A, Richter-Hintz D, Oslislo C, Ruzicka T, Megahed M, Lehmann P. Lupus erythematosus tumidus--a neglected subset of cutaneous Lupus erythematosus: report of 40 cases. *Arch Dermatol* 2000; 136: 1033-1041
- Kuhn A, Sonntag M, Lehmann P, Megahed M, Vestweber D, Ruzicka T. Characterization of the inflammatory infiltrate and expression of endothelial cell adhesion molecules in lupus erythematosus tumidus. *Arch Dermatol Res* 2002; 294: 6-13
- Kuhn A, Sonntag M, Richter-Hintz D, Oslislo C, Megahed M, Ruzicka T, Lehmann P. Phototesting in lupus erythematosus: a 15-year experience. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: 86-95
- Kuhn A, Ruzicka T. Classification of cutaneous lupus erythematosus. In: Kuhn A, ed. *Cutaneous lupus erythematosus*. Heidelberg: Springer, 2004: 53-57
- Kunkel EJ, Boisvert J, Murphy K, Vierra MA, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Hodge MR, Wu L, Butcher EC, Campbell JJ. Expression of the chemokine receptors

- CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol* 2002; 160: 347-355
- Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 2002; 16: 1-4
- Lacki JK, Leszczynski P, Kelemen J, Muller W, Mackiewicz SH. Cytokine concentration in serum of lupus erythematosus patients: the effect on acute phase response. *J Med* 1997; 28: 99-107
- Lahita RG. Overview of lupus erythematosus. *Clin Dermatol* 1992; 10: 389-392
- Lehmann P, Holzle E, Kind P, Goerz G, Plewig G. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 181-187
- Leung DY, Gately M, Trumble A, Ferguson-Darnell B, Schlievert PM, Picker LJ. Bacterial superantigens induce T cell expression of the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen, via stimulation of interleukin 12 production. *J Exp Med* 1995; 181: 747-753
- Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9: 263-268
- Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 325-335
- Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1995; 182: 1301-1314
- Lieberam I, Forster I. The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2684-2694
- Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 963-969
- Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E, Moser B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3696-3705

- Lopez-Longo FJ, Monteagudo I, Gonzalez CM, Grau R, Carreno L. Systemic lupus erythematosus: clinical expression and anti-Ro/SS-a response in patients with and without lesions of subacute cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6: 32-39
- Lovgren T, Eloranta ML, Kastner B, Wahren-Herlenius M, Alm GV, Ronnblom L. Induction of interferon-alpha by immune complexes or liposomes containing systemic lupus erythematosus autoantigen- and Sjogren's syndrome autoantigen-associated RNA. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1917-1927
- Luscinskas FW, Ma S, Nusrat A, Parkos CA, Shaw SK. The role of endothelial cell lateral junctions during leukocyte trafficking. *Immunol Rev* 2002; 186: 57-67
- Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445
- Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 1985; 315: 672-676
- Mackay CR. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 423-427
- Maghazachi AA, Skalhegg BS, Rolstad B, Al-Aoukaty A. Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G-proteins. *Faseb J* 1997; 11: 765-774
- Meller S, Winterberg F, Gilliet M, Muller A, Lauceviciute I, Rieker J, Neumann NJ, Kubitza R, Gombert M, Bunemann E, Wiesner U, Franken-Kunkel P, Kanzler H, Dieu-Nosjean MC, Amara A, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A, Homey B. Ultraviolet radiation-induced injury, chemokines, and leukocyte recruitment: An amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1504-1516
- Milde P, Goerz G. Depigmentierung bei Lupus erythematoses - klinischer „Clue“ zum subakut kutanen Lupus erythematoses. *Z Hautkr* 1994; 69:123-126
- Mizukawa Y, Shitara K, Yamazaki Y, Teraki Y, Takahashi R, Narimatsu H, Shiohara T. Development and characterization of a monoclonal antibody specific for fucosyltransferase VII (Fuc-TVII): discordant expression of CLA and Fuc-TVII in peripheral CD4+ and CD8+ T cells. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 743-747

- Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uze G. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 1069-1098
- Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, Orozco R, Copeland NG, Jenkins NA, McEvoy LM, 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
- Moutsopoulos HM, Klippel JH, Pavlidis N, Wolf RO, Sweet JB, Steinberg AD, Chu FC, Tarpley TM. Correlative histologic and serologic findings of sicca syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 36-40
- Nakamura K, Yasaka N, Asahina A, Kato M, Miyazono K, Furue M, 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 K, Fujii H, Hasegawa H, Terada M, Arita N, Ito MR, Ono M, Takahashi S, Saiga K, Yoshimoto S, Iwano M, Shiiki H, Saito Y, Nose M. Endothelial adhesion molecules in glomerular lesions: association with their severity and diversity in lupus models. *Kidney Int* 2004; 65: 1290-1300
- Nakatani T, Kaburagi Y, Shimada Y, Inaoki M, Takehara K, Mukaida N, 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
- Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, Yavuz S, Lipsky PE. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2000; 165: 6590-6598
- Narumi S, Wyner LM, Stoler MH, Tannenbaum CS, Hamilton TA. Tissue-specific expression of murine IP-10 mRNA following systemic treatment with interferon gamma. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 27-33
- Nickoloff BJ, Nestle FO. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2004; 113: 1664-1675

- Nishio J, Suzuki M, Miyasaka N, Kohsaka H. Clonal biases of peripheral CD8 T cell repertoire directly reflect local inflammation in polymyositis. *J Immunol* 2001; 167: 4051-4058
- Noguchi M, Iwamori M, Hirano T, Kobayashi S, Hashimoto H, Hirose S, Nagai Y. Autoantibodies to T and B cell lines detected in serum samples from patients with systemic lupus erythematosus with lymphopenia and hypocomplementaemia. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 713-716
- Padovan E, Spagnoli GC, Ferrantini M, Heberer M. IFN-alpha2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 669-676
- Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am J Pathol* 1992; 141: 673-683
- Park MK, Amichay D, Love P, Wick E, Liao F, Grinberg A, Rabin RL, Zhang HH, Gebeyehu S, Wright TM, Iwasaki A, Weng Y, DeMartino JA, Elkins KL, Farber JM. The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamma (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen in vivo. *J Immunol* 2002; 169: 1433-1443
- Parodi A, Caproni M, Cardinali C, Bernacchi E, Fuligni A, De Panfilis G, Zane C, Papini M, Veller FC, Vaccaro M, 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, Rebora A. ARA and EADV criteria for classification of systemic lupus erythematosus in patients with cutaneous lupus erythematosus. *Dermatology* 1997; 194: 217-220
- Paukkonen K, Naukkarinen A, Horsmanheimo M. The development of manifest psoriatic lesions is linked with the invasion of CD8 + T cells and CD11c + macrophages into the epidermis. *Arch Dermatol Res* 1992; 284: 375-379
- Piali L, Weber C, LaRosa G, Mackay CR, Springer TA, Clark-Lewis I, Moser B. The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig. *Eur J Immunol* 1998; 28: 961-972

- Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* 1991; 349: 796-799
- Picker LJ, Martin RJ, Trumble A, Newman LS, Collins PA, Bergstresser PR, Leung DY. Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cells in pulmonary versus cutaneous immune effector sites. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1269-1277
- Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol* 1990; 136: 1053-1068
- Pober JS, Kluger MS, Schechner JS. Human endothelial cell presentation of antigen and the homing of memory/effector T cells to skin. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 941: 12-25
- Pramatarov KD. Drug-induced lupus erythematosus. *Clin Dermatol* 1998; 16: 367-377
- Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 106-115
- Provost TT. Nonspecific cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. In: Kuhn A, ed. *Cutaneous lupus erythematosus*. Heidelberg: Springer, 2004: 93-106
- Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, 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
- Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 2001; 194: 1541-1547
- Rider JR, Ollier WE, Lock RJ, Brookes ST, Pamphilon DH. Human cytomegalovirus infection and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1997; 15: 405-409
- Rivero SJ, Diaz-Jouanen E, Alarcon-Segovia D. Lymphopenia in systemic lupus erythematosus. Clinical, diagnostic, and prognostic significance. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 295-305
- Robert C, Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med* 1999; 341: 1817-1828
- Ronday HK, van der Laan WH, Tak PP, de Roos JA, Bank RA, TeKoppele JM, Froelich CJ, Hack CE, Hogendoorn PC, Breedveld FC, Verheijen JH. Human granzyme B

mediates cartilage proteoglycan degradation and is expressed at the invasive front of the synovium in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2001; 40: 55-61

Ronnblom L, Alm GV. A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. *J Exp Med* 2001; 194: F59-63

Rottman JB, Smith TL, Ganley KG, Kikuchi T, 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

Russell RG, Nasisse MP, Larsen HS, Rouse BT. Role of T-lymphocytes in the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25: 938-944

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

Schechner JS, Edelson RL, McNiff JM, Heald PW, Pober JS. Integrins alpha4beta7 and alphaEbeta7 are expressed on epidermotropic T cells in cutaneous T cell lymphoma and spongiotic dermatitis. *Lab Invest* 1999; 79: 601-607

Scheinberg MA, Cathcart ES. Casein-induced experimental amyloidosis. III. Response to mitogens, allogeneic cells, and graft-versus-host reactions in the murine model. *Immunology* 1974; 27: 953-963

Schon MP, Zollner TM, Boehncke WH. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 951-962

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

Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991; 39: 741-748

Shinkai K, Mohrs M, Locksley RM. Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature* 2002; 420: 825-829

Shiohara T, Mizukawa Y. The immunological basis of lichenoid tissue reaction. *Autoimmun Rev* 2005; 4: 236-241

- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835-1837
- Sigmundsdottir H, Johnston A, Gudjonsson JE, Bjarnason B, Valdimarsson H. Methotrexate markedly reduces the expression of vascular E-selectin, cutaneous lymphocyte-associated antigen and the numbers of mononuclear leucocytes in psoriatic skin. *Exp Dermatol* 2004; 13: 426-434
- Smeenk R, Brinkman K, van den Brink H, Termaat RM, Berden J, Nossent H, Swaak T. Antibodies to DNA in patients with systemic lupus erythematosus. Their role in the diagnosis, the follow-up and the pathogenesis of the disease. *Clin Rheumatol* 1990; 9: 100-110
- Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ. CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood* 2003; 101: 1677-1682
- Sontheimer RD. Subacute cutaneous lupus erythematosus: a decade's perspective. *Med Clin North Am* 1989; 73: 1073-1090
- 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, Maddison PJ, Reichlin M, Jordon RE, Stastny P, Gilliam JN. Serologic and HLA associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1982; 97: 664-671
- Sontheimer RD, Stastny P, Gilliam JN. Human histocompatibility antigen associations in subacute cutaneous lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1981; 67: 312-316
- Sontheimer RD, Thomas JR, Gilliam JN. Subacute cutaneous lupus erythematosus: a cutaneous marker for a distinct lupus erythematosus subset. *Arch Dermatol* 1979; 115: 1409-1415
- Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, Ley K. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med* 2003; 197: 1355-1363
- Strelow LI, Leib DA. Role of the virion host shutoff (vhs) of herpes simplex virus type 1 in latency and pathogenesis. *J Virol* 1995; 69: 6779-6786

- Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; 44: 93-151
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-1277
- Taub DD, Lloyd AR, Conlon K, Wang JM, Ortaldo JR, Harada A, Matsushima K, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* 1993; 177: 1809-1814
- Taylor CR. Immunoperoxidase techniques: practical and theoretical aspects. *Arch Pathol Lab Med* 1978; 102: 113-121
- Taylor WJ, Marchesoni A, Arreghini M, Sokoll K, Helliwell PS. A comparison of the performance characteristics of classification criteria for the diagnosis of psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 34: 575-584
- Tebbe B. Clinical course and prognosis of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Dermatol* 2004; 22: 121-124
- Tebbe B, Mazur L, Stadler R, Orfanos CE. Immunohistochemical analysis of chronic discoid and subacute cutaneous lupus erythematosus--relation to immunopathological mechanisms. *Br J Dermatol* 1995; 132: 25-31
- Tebbe B, Orfanos CE. Epidemiology and socioeconomic impact of skin disease in lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6: 96-104
- Teymoortash A, Tiemann M, Schrader C, Werner JA. Characterization of lymphoid infiltrates in chronic obstructive sialadenitis associated with sialolithiasis. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 300-304
- Tietz W, Allemand Y, Borges E, von Laer D, Hallmann R, Vestweber D, Hamann A. CD4+ T cells migrate into inflamed skin only if they express ligands for E- and P-selectin. *J Immunol* 1998; 161: 963-970
- Tonnesen MG. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 53S-58S
- Tough DF. Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 257-264

- Tsai YT, Chiang BL, Kao YF, Hsieh KH. Detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus genome in white blood cells from patients with juvenile rheumatoid arthritis and childhood systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106: 235-240
- Van Voorhis WC, Barrett LK, Sweeney YT, Kuo CC, Patton DL. Repeated Chlamydia trachomatis infection of Macaca nemestrina fallopian tubes produces a Th1-like cytokine response associated with fibrosis and scarring. *Infect Immun* 1997; 65: 2175-2182
- Velthuis PJ, van Weelden H, van Wichen D, Baart de la Faille H. Immunohistopathology of light-induced skin lesions in lupus erythematosus. *Acta Derm Venereol* 1990; 70: 93-98
- Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K, 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
- Vestergaard C, Yoneyama H, Murai M, Nakamura K, Tamaki K, Terashima Y, Imai T, Yoshie O, Irimura T, Mizutani H, Matsushima K. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest* 1999; 104: 1097-1105
- Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999; 79: 181-213
- Vitali C, Bencivelli W, Isenberg DA, Smolen JS, Snaith ML, Sciuto M, Neri R, Bombardieri S. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 541-547
- Vulcano M, Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struyf S, Transidico P, Bonecchi R, Del Prete A, Allavena P, Ruco LP, Chiabrando C, Girolomoni G, Mantovani A, Sozzani S. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 2001; 31: 812-822
- Wagers AJ, Stoolman LM, Craig R, Knibbs RN, Kansas GS. An sLex-deficient variant of HL60 cells exhibits high levels of adhesion to vascular selectins: further evidence that

- HECA-452 and CSLEX1 monoclonal antibody epitopes are not essential for high avidity binding to vascular selectins. *J Immunol* 1998; 160: 5122-5129
- Wagner T. [Morphologic and immunomorphologic studies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus]. *Patol Pol* 1984; 35: 45-64
- Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 2001; 15: 397-408
- Wakugawa M, Nakamura K, Kakinuma T, Onai N, Matsushima K, 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
- Watson RM, Talwar P, Alexander E, Bias WB, Provost TT. Subacute cutaneous lupus erythematosus-immunogenetic associations. *J Autoimmun* 1991; 4: 73-85
- Weber F, Kochs G, Haller O. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol* 2004; 17: 498-515
- Wenzel J, Brahler S, Bauer R, Bieber T, Tuting T. Efficacy and safety of methotrexate in recalcitrant cutaneous lupus erythematosus: results of a retrospective study in 43 patients. *Br J Dermatol* 2005; 153: 157-162
- Wenzel J, Gerdson R, Uerlich M, Bauer R, Bieber T, Boehm I. Antibodies targeting extractable nuclear antigens: historical development and current knowledge. *Br J Dermatol* 2001; 145: 859-867
- Wenzel J, Tuting T. Identification of type I interferon-associated inflammation in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus opens up options for novel therapeutic approaches. *Exp Dermatol* 2007; 16: 454-463
- Williamson GG, Pennebaker J, Boyle JA. Clinical characteristics of patients with rheumatic disorders who possess antibodies against ribonucleoprotein particles. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 509-515
- Wowk ME, Trapani JA. Cytotoxic activity of the lymphocyte toxin granzyme B. *Microbes Infect* 2004; 6: 752-758
- Wozniacka A, McCauliffe DP. Optimal use of antimalarials in treating cutaneous lupus erythematosus. *Am J Clin Dermatol* 2005; 6: 1-11
- Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest* 2002; 109: 939-950

Zhang Y, O'Brien B, Trudeau J, Tan R, Santamaria P, Dutz JP. In situ beta cell death promotes priming of diabetogenic CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 2002; 168: 1466-1472

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127