

**Typ I Interferon assoziierte Rekrutierung zytotoxischer Lymphozyten
beim Lichen sclerosus et atrophicus
via CXCR3-CXCL10 Interaktion**

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

Christian Merkel
aus Witten
2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Jörg Wenzel
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Walther Kuhn

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.05.2010

**Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie
der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès sci. Thomas Bieber**

Meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1 Einführung in das Krankheitsbild des Lichen sclerosus et atrophicus	8
1.1.1 Definition	8
1.1.2 Klinik	8
1.1.3 Epidemiologie	10
1.1.4 Verlauf und Therapieoptionen	11
1.1.5 Histologie	11
1.1.6 Ätiologie	12
1.1.7 Pathogenese	13
1.2 Chemokine und ihre Bedeutung für Entzündungen in der Haut	15
1.2.1 Definition der Chemokine	15
1.2.2 Funktion der Chemokine	16
1.2.3 Die Rolle von Typ I Interferonen für Entzündungen in der Haut	18
1.2.4 Das Interferon-induzierbare Chemokin IP10 / CXCL10	19
1.2.5 Der Chemokinrezeptor CXCR3 ist der Chemokinrezeptor von IP10 / CXCL10	19
1.3 Die Vergleichsgruppen	21
1.3.1 Der chronisch-diskoide Lupus erythematoses	21
1.3.2 Die atopische Dermatitis	22
1.4 Fragestellung	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Material und Patientenkollektiv	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Verwendete Antikörper	25
2.2.2 Anfertigung der histologischen Schnitte	26
2.2.3 Entparaffinierung der histologischen Schnitte	26
2.2.4 Vorbehandlungen	26
2.2.5 Standardfärbungen	28
2.2.6 Immunhistochemische Färbetechnik	28
2.2.7 Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen	29
2.2.8 Immunhistochemische Doppelfärbungen	30
2.2.9 Anfertigung der immunhistochemischen Doppelfärbungen	31
2.3 Auswertung	31
2.4 Statistische Analyse	31
3. Ergebnisse	33
3.1 Charakterisierung der Leukozyten im entzündlichen Infiltrat des Lichen sclerosus et atrophicus	33
3.2 Anzahl der zytotoxischen Lymphozyten in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus	35

3.3 Expression von MxA als Nachweis einer Typ-1-Interferon Produktion beim Lichen sclerosus et atrophicus	37
3.4 Nachweis der infiltrierenden Lymphozyten, welche beim Lichen sclerosus et atrophicus den Chemokinrezeptor CXCR3 exprimieren	41
3.5 Expression von IP10 / CXCL10 beim Lichen sclerosus et atrophicus	43
3.6 Korrelation der Interferon-assoziierten Marker mit der Anzahl der T-Zellen im entzündlichen Infiltrat	45
4. Diskussion	47
4.1 Starke Dominanz der T-Lymphozyten im inflammatorischen Infiltrat des Lichen sclerosus et atrophicus	47
4.2 Eine hohe Anzahl an zytotoxischen Lymphozyten beim Lichen sclerosus et atrophicus	48
4.3 Die starke Expression von MxA weist auf eine Typ I Interferon Produktion im Lichen sclerosus et atrophicus hin	50
4.4 Die Mehrzahl der infiltrierenden Lymphozyten beim Lichen sclerosus et atrophicus exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR3	52
4.5 Die starke Expression von IP10 / CXCL10 ist verbunden mit der Typ I Interferon Produktion und der Rekrutierung von CXCR3+ Lymphozyten	53
4.6 Die Expression der Interferon-assoziierten Marker korreliert mit der Anwesenheit der T-Zellen	54
4.7 Modell der Pathogenese der chronischen Inflammation im Lichen sclerosus et atrophicus	55
5. Zusammenfassung	57
6. Abbildungsverzeichnis	58
7. Tabellenverzeichnis	59
8. Literaturverzeichnis	60
9. Danksagung	68

Abkürzungsverzeichnis

AD	Atopische Dermatitis
AP	Alkalische Phosphatase
CCR	Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
CDLE	Chronisch diskoider Lupus erythematoses
CLE	Kutaner Lupus erythematoses
CXCR3	Chemokinrezeptor 3 der Cx-Chemokine
DAB	Diaminobenzidinlösung
GrB	Granzym B, zytotoxisches Molekül
HC	healthy skin, gesunde Haut
HE	Hämatoxylin-Eosin-Reaktion, Färbemethode
HLA	human leucocyte antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I-TAC	IFN-inducible T-cell alpha-chemoattractant, Chemokin
IP10	IFN induced protein 10, Chemokin
kDa	Kilo Dalton
LSA	Lichen sclerosus et atrophicus
LSAB	Labelled-Streptavidin-Biotin, Färbemethode
MIG	monokine induced by IFN, Chemokin
MxA	Antivirales Mx-Protein A, spezifischer Typ I IFN Marker
PAS	Periodic-Acid-Schiff-Reaktion, Färbemethode
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
Tia1	Zytotoxisches Molekül (cytotoxic granule-associated RNA-binding protein-like 1)

1. Einleitung

1.1 Einführung in das Krankheitsbild des Lichen sclerosus et atrophicus

1.1.1 Definition

Der Lichen sclerosus et atrophicus ist eine chronisch entzündliche, nicht übertragbare Dermatose mit weitgehend ungeklärter Ätiologie, welche besonders die Genitalregion beider Geschlechter betreffen kann und phasenhaft verläuft. Der LSA ist durch porzellanartige lichenoide Hautveränderungen charakterisiert, welche mit sklerotischen Umwandlungen der betroffenen Hautareale einhergehen. Die Diagnose wird klinisch und histologisch gestellt. Am Ende des neunzehnten Jahrhunderts wurde die Erkrankung zum ersten Mal als eine Variante des Lichen planus beschrieben (Hallopeau, 1889). Gegenwärtig wird der Lichen sclerosus et atrophicus wegen seines charakteristischen Krankheitsbildes und der histologischen Befunde als eine eigenständige Krankheit betrachtet (Braun-Falco et al., 2005; Fritsch, 2004).

1.1.2 Klinik

Charakteristischer makroskopischer Befund des Lichen sclerosus et atrophicus sind gruppierte, ca. 0,5 cm große, elfenbeinfarbene, häufig rauh-hyperkeratotische Papeln. Diese sind zunächst scharf begrenzt und im Hautniveau gelegen. Im Verlauf konfluieren sie zu unregelmäßig konfigurierten Plaques. Seltener weisen diese einen entzündlichen Randsaum auf, besonders im Bereich blutiger Rhagaden. Nach monate- bis jahrelangem chronischem Verlauf kann es zu porzellanartigen atrophischen Flecken oder charakteristischen komedoartigen folliculären Hyperkeratosen kommen.

Der Lichen sclerosus et atrophicus betrifft vorwiegend das Genitale, besonders Vulva oder Präputium und Glans penis. Auch perianale und anale Veränderungen kommen vor. Weitere extragenitale Prädilektionsstellen sind seitliche Halspartien, die Scapulagegend, die Region zwischen und unter den Mammae, die Beugeseiten der Unterarme und die Schultern. Veränderungen an den Schleimhäuten der Wangen oder

des Gaumens sind selten. Die Erkrankung kann genital oder extragenital auftreten. Mischformen aus genitaler und extragenitaler Manifestation sind bekannt.

Die genitalen Veränderungen bestehen ebenfalls aus weißlich-atrophischen Herden. Die atrophische Sklerose kann zu Schrumpfungen und Stenosen führen. Bei Männern tritt sie häufig als eine erworbene Phimose erstmals klinisch in Erscheinung (Jasaitiene et al., 2008). Im weiteren kann eine narbige Schrumpfung im Bereich von Präputium, Frenulum, Glans und Urethralöffnung zur Stenose mit chronischem Harnverhalt führen. Bei Mädchen und Frauen führt der Lichen sclerosus et atrophicus nach jahrelangem Verlauf zum Verstreichen der inneren Labien und zur Verengung des Introitus vaginae. Im Gegensatz zum männlichen Erscheinungsbild führt die Erkrankung hier häufiger zu exzessivem Juckreiz.

Komplikationen neben den Folgen der atrophischen Veränderungen können Rhagaden und Hämorrhagien sein, die eine Neigung zu Superinfektionen haben. Bei Koinzidenz mit Leukoplakien an Vulva oder Penis ist die Entstehung eines spinozellulären Karzinoms möglich (Braun-Falco et al., 2005; Freedberg et al., 2003; Fritsch, 2004).

Die Abbildungen 1 und 2 zeigen charakteristische Hautbefunde des Lichen sclerosus et atrophicus.



Abb. 1: Extragenitale Manifestationen des Lichen sclerosus et atrophicus (Altmeyer und Bacharach-Buhles, 2009)



Abb. 2: Genitale Manifestationen des Lichen sclerosus et atrophicus (Altmeyer und Bacharach-Buhles, 2009)

1.1.3 Epidemiologie

Beim Lichen sclerosus et atrophicus handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Dermatose mit unklarer, wahrscheinlich autoimmuner, Genese. Diese Erkrankung kommt weltweit verbreitet und besonders bei der weißen Bevölkerung vor. Sie kann in jedem Lebensalter bei beiden Geschlechtern auftreten. Sie findet sich häufiger beim weiblichen Geschlecht mit einer Gynäkotropie von 10:1 (Wakelin und Marren, 1997) und hat zwei Erkrankungsgipfel, vorwiegend erkranken postmenopausale Frauen zwischen der fünften und sechsten Lebensdekade, seltener weibliche Kleinkinder und präpubertäre Mädchen. Auch bei erwachsenen Männern kann ein Lichen sclerosus et atrophicus auftreten (Braun-Falco et al., 2005; Fritsch, 2004).

Die genaue Prävalenz ist weitgehend unbekannt, da es wenige epidemiologische Studien zum Lichen sclerosus et atrophicus gibt. Eine ältere Untersuchung aus den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts zeigt eine Inzidenz zwischen 1:300 bis zu 1:1000 Patienten pro Jahr (Wallace, 1971). Eine weitere Studie über eine Kohorte von über 17.000 Frauen in Großbritannien schätzt die Inzidenz der histologisch nachgewiesenen Krankheit bei Patientinnen im Alter von 50-59 Jahren auf 13,7 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Vessey und Lawless, 1984). Eine neuere Studie konnte zeigen, dass von 144 Patientinnen mit Beschwerden an der Vulva neun (7%) an einem

Lichen sclerosus et atrophicus erkrankt waren (Fischer et al., 1995). Bei männlichen Patienten wird die Inzidenz des LSA auf 0,07 % geschätzt (Kizer et al., 2003).

1.1.4 Verlauf und Therapieoptionen

In der Mehrzahl der Fälle kommt es zu einem langsamen, chronischen Verlauf der Erkrankung. Manchmal tritt der Lichen sclerosus et atrophicus schubweise auf, wobei zwischen den einzelnen Schüben jahrelange Ruheperioden liegen können. Partielle und vollständige Rückbildungen wurden beschrieben, besonders bei der juvenilen Form. Die Atrophie bildet sich meist nicht zurück.

Mögliche Therapieoptionen des LSA sind topische Anwendungen von Glukokortikoiden, besonders um den Pruritus genitaler Veränderungen bei Frauen und Kindern zu lindern. Der progrediente Verlauf wird jedoch nicht beeinflusst, eine kausale Therapie ist nicht bekannt. Bei sekundärer Phimose des Mannes ist die Indikation für eine Zirkumzision gegeben, bei der Stenose der Urethralmündung ist die Meatotomie indiziert (Braun-Falco et al., 2005; Freedberg et al., 2003; Fritsch, 2004).

1.1.5 Histologie

Histologische Veränderungen finden sich beim Lichen sclerosus et atrophicus sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis. Zunächst zeigt sich eine Verbreiterung, im Verlauf eine Atrophie der Epidermis mit follikulären Hyperkeratosen. Bei frühen Hautläsionen lässt sich eine Entzündung an der dermo-epidermalen Junctionszone und eine vakuoläre Umwandlung des epidermalen Basalzellagers beobachten (Kerl et al., 2003). Es findet sich eine ausgeprägte lymphozytäre Infiltration in der oberen Dermis und der Epidermis (Freedberg et al., 2003). In der Dermis zeigt sich ein papilläres Ödem mit Abnahme der elastischen Fasern und einem sklerotischen, gläsernen Erscheinungsbild. Durch das Ödem kann es teilweise zu einer subepidermalen Kontinuitätsstörung mit Kapillararrosion und Blutaustritten kommen, die durch die Extravasation von Erythrozyten zu hämorrhagischen Zonen führen (Carli et al., 1991; Carlson et al., 1998; Kerl et al., 2003).

1.1.6 Ätiologie

Beim Lichen sclerosus et atrophicus scheint eine multifaktorielle Genese vorzuliegen, wobei die genaue Ätiologie weitgehend ungeklärt ist.

Es wird davon ausgegangen, dass eine autoimmune Komponente vorliegt, da der Lichen sclerosus et atrophicus häufig im Zusammenhang mit weiteren Autoimmunerkrankungen auftritt. Mehr als 20% der Patienten mit LSA weisen zusätzlich Erkrankungen wie Alopezia areata, Vitiligo, systemischer Lupus erythematoses, Lupus-Pannikulitis, Hyperthyreose, primäre biliäre Zirrhose, perniziöse Anämie und Diabetes mellitus auf (Harrington und Dunsmore, 1981; Kamarashev und Vassileva, 1997; Meyrick et al., 1988). Daraus wird abgeleitet, dass eine Assoziation zu Autoimmunerkrankungen besteht.

Eine Studie konnte zeigen, dass sich bei 49 % der Patienten mit LSA klonal expandierte T-Zellen nachweisen lassen, welche als Antwort auf LSA-assoziierte Antigene angesehen werden können (Lukowsky et al., 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei den betroffenen Patienten organspezifische Antikörper erhöht sind, wobei 40% Schilddrüsenantikörper, Antikörper gegen Parietalzellen oder antinukleäre Antikörper aufwiesen (Carli et al., 1991; Meyrick et al., 1988). Auch diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass es sich um ein Autoimmungeschehen handelt.

Es wurde eine geringfügige familiäre Disposition beschrieben. Die Assoziation des Lichen sclerosus et atrophicus mit verschiedenen HLA-Antigenen wie HLA-DQ7, HLA-DQ8, HLA-DQ9 und HLA-DRB112 weist zudem auf einen genetischen Zusammenhang hin (Gao et al., 2005; Marren et al., 1995).

Kontrovers wird der Zusammenhang mit einer Infektion durch *Borrelia burgdorferi* als ein ätiologischer Faktor diskutiert. In manchen zurückliegenden Studien wurde eine positive Korrelation zwischen der Serologie einer durchgemachten Borrelien-Infektion und dem LSA festgestellt, neuere Studien haben gezeigt, dass dies für Patientinnen in den U.S.A. jedoch nicht zutrifft und somit ein eindeutiger Zusammenhang nicht nachweisbar ist (De Vito et al., 1996; Fujiwara et al., 1997).

Weitere Theorien über die Ätiologie des Lichen sclerosus et atrophicus sind eine gestörte Ausdifferenzierung der Keratinozyten wegen einer gestörten Hormon-Rezeptor-Bindung oder einem Differenzierungsverlust der Basalzellen im Stratum basale der Epidermis sowie eines Defekts des Androgen-Metabolismus bzw. eines Androgen-Rezeptordefekts (Neill et al., 1990). In einigen Fällen wurden niedrige Werte für Dihydrotestosteron und Androstendion im Serum der Patienten beobachtet (Friedrich und Kalra, 1984).

Bei der Lokalisation des Lichen sclerosus et atrophicus spielen vermutlich zudem mechanische Faktoren eine Rolle, da die Prädilektionsstellen den Stellen höchster mechanischer Belastung entsprechen, nämlich bei Männern dem Frenulum, der Ansatzstelle des Präputiums am Sulcus coronarius und bei Frauen den Labia minora. Auch ein Köbner-Phänomen durch isomorphe Reizeffekte liegt vor (Fritsch, 2004).

1.1.7 Pathogenese

Wie die Ätiologie des Lichen sclerosus et atrophicus ist auch die Pathogenese weitgehend ungeklärt.

Neueste Studien konnten zeigen, dass Autoantikörper, welche das extrazelluläre Matrixprotein 1 erkennen, bei der Mehrzahl der Patienten vorhanden sind. Bei diesen handelt es sich um IgG-Antikörper (Oyama et al., 2003 und 2004). Diese Entdeckung stützt die Hypothese, dass es sich beim Lichen sclerosus et atrophicus um eine Autoimmunerkrankung handelt, erneut.

Typischerweise findet sich eine ausgeprägte lymphozytäre Infiltration sowohl von CD4+ als auch CD8+ Lymphozyten in der Dermis und Epidermis. Es wurde dargestellt, dass es sich bei den im Gewebe vorhandenen Lymphozyten um zytotoxische Lymphozyten handelt. Zahlreiche zytotoxische Lymphozyten sind in der gesamten Dermis nachweisbar, sie befinden sich jedoch besonders im Bereich der Degeneration der basalen Keratinozyten und dem Verlust der elastischen Fasern (Gross et al., 2001; Regauer et al., 2002).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Lymphozyten vorwiegend um CD3+ T-Zellen handelt und ungefähr die Hälfte von ihnen CD8-positiv sind (Farell et al., 1999).

Es wird angenommen, dass die beschriebenen Zellen zur Degeneration von Zielstrukturen führen. Allerdings war bisher nicht bekannt, wie diese Effektorzellen aktiviert und an den Ort der Entzündung rekrutiert werden. Hierbei könnten, wie bei anderen Erkrankungen bekannt, Chemokine eine zentrale Rolle einnehmen.

1.2 Chemokine und ihre Bedeutung für Entzündungen in der Haut

Zytokine und Chemokine nehmen eine zentrale Stellung bei der Regulation von Entzündungen der Haut ein. Eine intakte spezifische Immunantwort setzt eine funktionale Kommunikation der Immunzellen untereinander voraus, so dass diese kontrolliert, gesteuert und aufeinander abgestimmt werden. Die Migration von Leukozyten stellt eine essentielle Funktion des Immunsystems dar und ist ebenso Auslöser und Bestandteil fehlgeleiteter Immunreaktionen, die zu Entzündungen in der Haut führen können. Einen bedeutenden Beitrag zu dieser Zell/Zell-Kommunikation leisten sogenannte Zytokine. Chemokine wurden ursprünglich den Zytokinen zugeordnet, sind heute aber als eine separate Einheit anzusehen. Ihr Name setzt sich aus den Begriffen „Chemotaxis“ und „Zytokin“ zusammen (Olson und Ley, 2002).

1.2.1 Definition der Chemokine

Bei den Chemokinen handelt es sich um chemotaktische Proteine mit einem Molekulargewicht von 8 bis 14 kDa bestehend aus 70-130 Aminosäuren, sie sind damit bedeutend kleiner als Zytokine. Ihre Tertiärstruktur wird durch Disulfidbrücken stabilisiert, die sich zwischen kondensierten Cysteinresten ausbilden (Baggiolini et al, 1994 und 1997). Es sind ungefähr 50 verschiedene Chemokine bekannt, welche durch diese gemeinsame Struktur charakterisiert sind (Baggiolini, 2001).

Da sie multifunktional sind, wurde eine systematische Nomenklatur eingeführt, bei der die Chemokine anhand der Position der ersten vier konservierten Cysteine in vier Gruppen eingeteilt werden. Man unterscheidet CXC-, CC-, C- und CX3C-Chemokine. Die CXC-Chemokine sind charakterisiert durch eine Aminosäure, welche sich zwischen dem ersten und zweiten Cystein befindet. Bei der größten Gruppe der CC-Chemokine grenzen die ersten beiden Cysteine direkt aneinander. Die C-Chemokine zeichnen sich durch ein Fehlen des ersten und dritten Cysteins aus. Bisher ist nur das Chemokin Lymphotactin dieser Struktur bekannt. Die CX3C-Chemokine sind charakterisiert durch drei Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen und werden repräsentiert durch das Fraktalkine. Innerhalb der Gruppen weisen die Chemokine eine hohe Homologie der Aminosäuresequenz von 20-70% auf. Diese ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen,

dass Chemokine einer Subfamilie auf einem Genort kodiert sind (Modi und Chen, 1998; Naruse et al., 1996).

Eine Einteilung der Chemokine ist auch funktionell möglich. Man unterscheidet proinflammatorische Chemokine und homöostatische Chemokine. Die proinflammatorischen Chemokine werden von verschiedenen Geweben des Körpers und von Leukozyten sezerniert und fungieren als Mediatoren der Abwehrfunktion bei Infektionen und Entzündungen. Die homöostatischen Chemokine werden permanent gebildet und sind für die Ausreifung, Differenzierung und Aktivierung von Lymphozyten zuständig (Baggiolini 2001).

1.2.2 Funktion der Chemokine

Chemokine besitzen eine bedeutende Funktion bei der Homöostase des Immunsystems und spielen eine zentrale Rolle bei inflammatorischen Ereignissen. Sie werden konstitutiv in definierten Regionen des Körpers, zum Beispiel den Lymphknoten, exprimiert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der gerichteten Rekrutierung von Immunzellen ins Gewebe. Außerdem sind sie an der Entwicklung, Reifung und Aktivierung von Lymphozyten beteiligt. Im Fall eines Entzündungsgeschehens werden sie von immigrierenden Lymphozyten und verschiedenen Gewebszellen, nach Stimulation von Zytokinen oder Toxinen, sezerniert (Baggiolini 2001).

Die Wirkung der Chemokine wird über Rezeptoren vermittelt, welche über sieben Transmembrandomänen verfügen und intrazellulär an G-Proteine gekoppelt sind (Sallusto et al., 1998a). Die Chemokinrezeptoren werden analog zu ihren Liganden als C-, CC-, CXC- oder CX3C-Rezeptoren benannt. Obwohl mittlerweile knapp 50 Chemokine bekannt sind, ist die Anzahl der Rezeptoren mit 19 Subtypen weitaus geringer. Die bisher identifizierten Chemokinrezeptoren sind unterschiedlich im Gewebe und auf Zellen exprimiert. Die verschiedenen Leukozyten weisen unterschiedliche Chemokinrezeptoren auf. Auf keinem der unterschiedlichen Leukozyten befindet sich die gleiche Kombination von Rezeptoren, einige Rezeptoren werden gleichzeitig exprimiert und stets durch andere Rezeptoren ergänzt. Außerdem können gleiche Chemokine an

unterschiedlichen Rezeptoren binden, jedoch unterscheiden sie sich in ihrer Affinität (Baggiolini, 1998 und 2001; Luster, 1998). Durch diese Komplexität wird die Feinregulation des Immunsystems durch die Chemokine verständlich. Für die Interaktion von Chemokin und Rezeptor vermutet man eine hohe Redundanz (Baggiolini, 2001; Thelen, 2001).

Chemokine und ihre Rezeptoren sind an einer Vielzahl biologischer Aktivitäten beteiligt. Ihre hauptsächliche Funktion besteht in der Vermittlung der Extravasation immunkompetenter Zellen und deren Migration anhand eines Chemokingradienten in das betroffene Gewebe. Nach Stimulation des jeweiligen Chemokinrezeptors kommt es zur Migration der Leukozyten, Änderung ihrer Form sowie Freisetzung ihrer Granula bestehend aus zytotoxischen Proteinen, Proteasen und Histaminen (Baggiolini, 2001).

Liegt eine Entzündung vor, werden in dieser Region Chemokine besonders von Thrombozyten und Endothelzellen sezerniert. Die Präsenz der Chemokine führt zum einen zu einem selbstverstärkenden Regelkreis, so dass weitere Chemokine ausgeschüttet werden, zum anderen zu einem Chemokingradienten, der zur Migration der Leukozyten entlang der Endothelzellen zum Ort der Entzündung führt (Springer, 1994). Durch die Chemokine werden auf den Leukozyten Integrine hochreguliert, welche zu einer festen Bindung an das Endothel führen und somit die Extravasation der selben erleichtern (Vaddi und Newton, 1994). Außerdem aktivieren Chemokine die Lyse der Basalmembran durch Matrix-Metallproteinasen (Klier und Nelson, 1999). Durch die beschriebenen Vorgänge wird die Transmigration der immunkompetenten Zellen durch die chemotaktischen Zytokine ermöglicht.

In Abhängigkeit des jeweiligen Chemokins werden die entsprechenden Leukozyten rekrutiert. Chemokine der CC-Gruppe rekrutieren bevorzugt Monozyten und Lymphozyten, die der CXC-Gruppe neutrophile Granulozyten und T-Zellen (Rovin, 2000). Dies verdeutlicht, dass die Chemokine sowohl bei akuten Entzündungen, als auch bei chronischen Erkrankungen eine zentrale Stellung einnehmen.

Chemokine sind von besonderer Bedeutung bei chronischen pathologischen Ereignissen. Sie spielen eine Rolle bei Allergien wie dem allergischen Asthma bronchiale (Lamkhioued et al., 2000), Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose (Zernecke und Weber, 2005), Tumoren (Bottazzi et al., 1992) und metabolischen Erkrankungen (Charo und Ransohoff, 2006). Außerdem nehmen sie eine zentrale Stellung bei Autoimmunerkrankungen ein. Der Einfluss von Chemokinen konnte bei Multipler Sklerose (Simpson et al., 2000) und rheumatoider Arthritis (Koenig et al., 2000) nachgewiesen werden. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass Chemokine auch bei chronisch-entzündlichen Dermatosen beteiligt sind, wie beim diskoiden Lupus erythematodes und Lichen planus (Wenzel et al., 2005a, 2005b und 2006). Diese Erkrankungen ähneln in der Pathogenese und der Immunhistologie dem Lichen sclerosus et atrophicus.

1.2.3 Die Rolle von Typ I Interferonen für Entzündungen in der Haut

Interferone sind Zytokine, die ubiquitär von allen Zellen des Körpers gebildet werden können und bei ihren Zielzellen durch Stimulation von Rezeptoren die Expression zahlreicher Gene induzieren, welche die Immunabwehr unterstützen können (Weber et al., 2004). Sie dienen sowohl der nichtadaptiven Immunabwehr durch unmittelbaren Angriff der Erreger, als auch der Steuerung der adaptiven Immunabwehr durch Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose (Basler und Garcia-Sastre, 2002; Goodbourn et al., 2000). Man unterscheidet zwei Gruppen von Interferonen, die große Gruppe der Typ I Interferone, zu denen die α -, β -, δ -, κ -, τ -, ω -Interferone gehören, und das Typ II Interferon, das γ -Interferon. Plasmazytoide dendritische Zellen besitzen die Potenz, eine große Menge von Typ I Interferonen zu bilden und auszuschütten (Cella et al., 1999; Fitzgerald-Bocarsly, 1993). Diese Typ I Interferone induzieren die Expression einer großen Anzahl von Proteinen mit immunmodulierender Funktion (Goodbourn et al., 2000). Die Anwesenheit der Interferone und der darauf folgenden Ausschüttung weiterer Proteine ist besonders bei viralen Prozessen von Bedeutung, wie die durch Typ I Interferone induzierten antiviralen Mx-Proteine belegen (Weber et al., 2004). Jedoch spielen sie auch eine Rolle bei der

Pathophysiologie entzündlicher Erkrankungen, insbesondere durch die Induktion proinflammatorischer Chemokine.

1.2.4 Das Interferon-induzierbare Chemokin IP10 / CXCL10

Typ I Interferone stimulieren zudem die Expression der Chemokine MIG („monokine induced by IFN“ bzw. CXCL9), IP10 („IFN induced protein 10“ bzw. CXCL10) und I-TAC (IFN-inducible T-cell alpha-chemoattractant“ bzw. CXCL11), welche alle den selben Rezeptor stimulieren.

IP-10 / CXCL10 gehört wie MIG und I-TAC zu den CXC-Chemokinen. IP10 / CXCL10 wurde erstmals aus Monozyten-ähnlichen Zellen geklont (Luster et al., 1985). Das Chemokin kann von einer Vielzahl von Zellen, wie Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Astrozyten und T-Zellen gebildet werden (Liu et al., 2005).

Induziert durch Typ I Interferone rekrutieren die Chemokine IP10, MIG und I-TAC bei einer Entzündung CD8+ Zellen, NK Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen (Cella et al., 1999; Padovan et al., 2002).

1.2.5 Der Chemokinrezeptor CXCR3 ist der Chemokinrezeptor von IP10 / CXCL10

Der humane Chemokinrezeptor CXCR3 ist ein aus 368 Aminosäuren bestehender G-Protein gekoppelter Rezeptor. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einem N-Terminus und drei extrazellulären Schleifen, welche in der Lage sind die entsprechenden Chemokine zu binden. Der Rezeptor besitzt eine Selektivität für die agonistischen Liganden MIG, IP10 und I-TAC (Clark-Lewis et al., 2003). Die drei natürlichen Liganden werden während einer Entzündung durch IFN induziert und haben eine chemotaktische Wirkung auf Lymphozyten. CXCR3 kommt beinahe ubiquitär auf Zellen in chronischen Entzündungen vor, jedoch in unterschiedlich starker Ausprägung. Bevorzugt findet sich eine Expression auf aktivierten T-Zellen, besonders auf Th1-T-Lymphozyten (Loetscher et al., 1996; Qin et al., 1998). Außerdem findet sich der Rezeptor CXCR3 auf NK-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen (Cella et al., 1999; Qin et al., 1998). Diese beschriebenen Zelltypen spielen bei der Pathophysiologie des Lichen sclerosus et atrophicus eine Rolle.

Des Weiteren wirken die Chemokine MIG, IP10 und I-TAC an dem Chemokinrezeptor CCR3 als Antagonisten. Die Liganden dieses Rezeptors wirken vor allem chemotaktisch auf Th2-T-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten. So sind die Chemokine MIG, IP10 und I-TAC in der Lage, die Th1-T-Zellantwort zu verstärken, während die Th2-T-Zellantwort gehemmt wird (Jinquan et al., 1999; Lamkhioued et al., 2003).

1.3 Die Vergleichsgruppen

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden in dieser Studie verschiedene Vergleichsgruppen von Hautproben verwendet. Patienten mit chronisch-diskoidem Lupus erythematoses wurden als Referenz-Kontrolle ausgewählt, da es sich hierbei um eine pathogenetisch und histologisch verwandte Erkrankung handelt. Beim CDLE handelt es sich um eine Typ-I-Interferon vermittelte Entzündung. Histologisch findet sich beim CDLE ebenfalls eine Interface-Dermatitis (Crowson und Magro, 2001; Wenzel et al., 2005a). Als Negativ-Kontrollen wurden Proben gesunder Haut, als auch Hautproben von Patienten mit atopischer Dermatitis verwendet, da es sich hierbei um eine Th2-T-Zell-verursachte Erkrankung im Sinne eines Ekzems handelt (Schuerwegh et al., 1999) .

1.3.1 Der chronisch-diskoide Lupus erythematoses

Beim Lupus erythematoses handelt es sich um eine komplexe Autoimmunerkrankung mit einem breiten Spektrum an klinischen Manifestationen. Man unterscheidet eine systemische (SLE) von einer kutanen Form (CLE), wobei es bei 10-40 % aller Patienten zur Ausprägung sowohl der systemischen, als auch der kutanen Manifestationen kommt. Der chronisch-diskoide Lupus erythematoses (CDLE) stellt die häufigste Form des CLE dar. Klinisch tritt der CDLE durch narbige erythematöse Maculae und Plaques in Erscheinung, die lokalisiert im Kopf- und Gesichtsbereich oder disseminiert am gesamten Körper auftreten können (Crowson und Magro, 2001).

Wie beim Lichen sclerosus et atrophicus ist das histologische Bild des CDLE durch eine Dermatitis an der Grenzschicht mit einer Degeneration der Basalzellschicht und einem ausgeprägten lymphozytären Infiltrat charakterisiert (Crowson und Magro, 2001).

Auch in der Pathogenese ähneln sich die Erkrankungen. Beim CDLE handelt es sich um eine T-Zell-gesteuerte Erkrankung mit der Anwesenheit einer hohen Anzahl von zytotoxischen Lymphozyten (Wenzel et al., 2005c). In aktuellen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass beim CDLE Typ I Interferone zu einer Rekrutierung von Th1-T-Lymphozyten über das Chemokin IP10 / CXCL10 und den Chemokinrezeptor CXCR3 kommt (Wenzel et al., 2005a und 2005b). Durch diese Voruntersuchung ist es möglich, Proben aus Läsionen von CDLE-Patienten als Referenzkontrolle dieser Studie zu verwenden.

1.3.2 Die atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis (Synonym: Neurodermitis) ist eine besonders im Kindesalter erstmalig auftretende Erkrankung. Typisch ist ein schubweiser Verlauf, wobei die Exazerbationen mit einer Hyperaktivität gegen verschiedene endogene und exogene Einflüsse einhergehen. Klinisch tritt die Erkrankung durch Juckreiz, Ekzeme und den chronischen Charakter einer Dermatitis in Erscheinung (Leung und Bieber, 2003). Histologisch findet sich eine Auflockerung der Epidermis zusammen mit einer Infiltration von T-Zellen, Monozyten und Makrophagen. In der akuten Phase zeigt sich eine Anwesenheit von Mastzellen in unterschiedlichen Degranulationsstadien.

Pathogenetisch spielt ein Ungleichgewicht im T-Zell-System eine Rolle. Th2-Zellen dominieren über Th1-Lymphozyten und induzieren über Interleukin 4 und 13 eine IgE-Bildung durch B-Zellen (Schuerwegh et al., 1999). Es kommt zur Aktivierung und Migration von Eosinophilen durch die Erhöhung des IgE-Spiegels. Durch die Anwesenheit der Antikörper kommt es zur Degranulation von Mastzellen und Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, welche zu den charakteristischen allergieähnlichen Symptomen führen. Bei der atopischen Dermatitis handelt es sich um ein Ekzem, einhergehend mit dem typischen histologischen Befund.

Da es sich bei der atopischen Dermatitis auch um eine entzündliche Dermatose handelt, welche sich jedoch in der Ätiologie und der Pathogenese deutlich vom Lichen sclerosus et atrophicus unterscheidet, vor allem da es sich um eine Th2-T-Zell-getriggerte Erkrankung handelt, dienen Proben als Vergleichsparameter dieser Studie.

1.4 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung der Interaktion des Chemokins IP10 / CXCL10 mit seinem Rezeptor CXCR3 bei der Rekrutierung der zytotoxischen Lymphozyten beim Lichen sclerosus et atrophicus untersucht werden. Beim Lichen sclerosus et atrophicus handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Dermatose unklarer Ätiologie. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass es sich beim LSA um eine Autoimmunerkrankung handelt. Besonders die Beobachtung von Autoantikörpern, welche das extrazelluläre Matrixprotein 1 angreifen, bestätigt diese Hypothese (Oyama et al, 2003). In neuesten Studien wurde gezeigt, dass Typ I Interferone die Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen in die Haut über das Chemokin IP10 /CXCL10 und seinen Rezeptor CXCR3 fördern und bei der Pathogenese verschiedener zell-vermittelter autoimmuner Funktionsstörungen der Haut beteiligt sind. Zu diesen Erkrankungen zählen der diskoidale Lupus erythematosus und der Lichen planus (Wenzel et al., 2005a, 2005b und 2006). Der Lichen sclerosus et atrophicus besitzt einige Gemeinsamkeiten mit den genannten Funktionsstörungen der Haut, wie das lymphozytäre Infiltrat und die Interface-Dermatitis. Daher werden ähnliche Mechanismen zur Rekrutierung der Lymphozyten in die Haut beim Lichen sclerosus et atrophicus vermutet. In dieser Arbeit sollen sowohl die T-Lymphozyten nachgewiesen und ihre Lage und ihr Infiltrat charakterisiert werden, als auch zytotoxische Lymphozyten mittels der zytotoxischen Marker Tia1 und GrB gezeigt werden. Im Anschluss werden die Biopsien auf die Anwesenheit von Typ I Interferonen untersucht. Abschließend soll dargestellt werden, ob der Chemokinrezeptor CXCR3 und sein Ligand IP10 / CXCL10 bei den Proben nachweisbar sind und welche Rolle sie bei der Rekrutierung der Lymphozyten in die Läsionen der Haut beim LSA spielen. Ein möglicher selbst-rekrutierender Prozess der Lymphozyten soll herausgearbeitet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material und Patientenkollektiv

Die untersuchten Biopsien stammten aus dem Routineuntersuchungsmaterial des Archivs der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Bonn. Die Proben stammten jeweils von nicht vorbehandelten Hautläsionen und wurden für diagnostische Zwecke entnommen. Sie wurden zuvor bezüglich ihrer histologischen Klassifikation eindeutig bestimmt. Das Archiv des Materials wurde im Rahmen laufender Untersuchungen zu entzündlichen Hauterkrankungen angelegt, die Ethikkommission der Universität Bonn hatte vor Beginn der Studie zugestimmt (Ethik-Votum 090/04).

Die Proben wurden bereits in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden elf Gewebebiopsien aus Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus, fünf von Patienten mit diskoidem Lupus erythematodes und fünf von Patienten mit atopischer Dermatitis in die Arbeit eingeschlossen. Weiterhin wurden Proben gesunder Haut verwendet. Die Hautproben ohne pathologische Veränderungen stammten von Nachexzidaten, die im Rahmen von Sicherheits-Nachexzisionen bei Patienten mit malignem Melanom entnommen wurden. Die Gewebebiopsien aus den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus stammten von sechs Männern und fünf Frauen verschiedener Altersgruppen und beinhalteten sowohl genitale als auch extragenitale Manifestationen. Tabelle 1 zeigt die Patientendaten einschließlich der Lokalisation der Läsionen.

PATIENTENNR.	GESCHLECHT	ALTER IN JAHREN	LOKALISATION / BIOPSIE
01	M	55	Glans Penis
02	F	62	Vulva
03	M	77	Glans Penis
04	M	55	Glans Penis
05	F	76	perianal
06	M	38	Präputium
07	M	29	Präputium
08	F	69	Rücken
09	F	12	Labia majora rechts
10	M	66	Glans Penis
11	F	58	Rücken

Tab. 1: Geschlecht und Alter der Patienten sowie Lokalisation der Gewebeläsionen der verwendeten Biopsien.

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete Antikörper

Zur Bestimmung des inflammatorischen Infiltrats der vorliegenden Gewebebiopsien wurden monoklonale Antikörper spezifisch für CD3, CD4, CD8, CD20 und CD68 verwendet. Die zytotoxische Kapazität der vorliegenden Lymphozyten wurde durch die Verwendung der monoklonalen Antikörper Tia-1 und Granzyme B dargestellt. Anti-CD123 monoklonale Antikörper wurden zum Nachweis von plasmazytoiden dendritischen Zellen verwendet. MxA, IP10 /CXCL10 und CXCR3 wurden zudem als monoklonale Antikörper verwendet. Tabelle 2 zeigt die verwendeten immunhistochemischen Antikörper mit Angabe der entsprechenden Klone, Hersteller sowie der verwendeten Verdünnung.

ANTIKÖRPER	KLON	HERSTELLER	VERDÜNNUNG
CD3	PS1	Beckmann Co	vorverdünnt
CD4	IF6	Novocastra, Newcastle, UK	1:20
CD8	144B	DAKO Cytomation, Hamburg	1:10
CD20	L26	DAKO Cytomation, Hamburg	1:100
CD68	PGM1	DAKO Cytomation, Hamburg	1:100
CD123	7G3	PharMingen, San Diego, USA	1:150
Tia1	26gA10F5	Immunotech, Marseille, Frankreich	1:50
Granzyme B	GrB7	DAKO Cytomation, Hamburg	1:25
MxA	M143	Prof. Haller, Universität Heidelberg	1:100
CXCR3	1C6	PharMingen, San Diego, USA	1:100
IP10 / CXCL10	33036.211	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:25

Tab. 2: Verwendete Antikörper mit zugehörigem Klon, Hersteller und etablierter Verdünnung

Um ein aussagekräftiges Ergebnis der Färbungen zu erreichen, war bei den Antikörpern, welche nicht der Routinediagnostik des histologischen Labors dienen, zunächst eine Etablierung der jeweiligen Verdünnungen notwendig. Eine optimale Verdünnung eines Primärantikörpers ist erreicht, wenn der Antikörper spezifisch im Gewebe und ohne Hintergrundfärbung nachweisbar ist. Es wurden Verdünnungsreihen angefertigt, die Primärantikörper wurden dazu, genau wie bei der endgültigen Konzentration, mit dem gebrauchsfertigen Dako REAL™ Antibody Diluent (Dako Cytomation, Hamburg) verdünnt.

2.2.2 Anfertigung der histologischen Schnitte

Aus dem Archiv der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Bonn wurden die Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcke zur Verfügung gestellt. Es erfolgte die Anfertigung von 4 µm dicken histologischen Schnitten mit dem Mikrotom (Leica RM 2255). Die Gewebeschnitte wurden in einem Wasserbad auf beschichtete Objektträgern (Marienfeld GmbH & Co KG) aufgetragen und vor der weiteren Behandlung über Nacht im Hitzeschrank bei einer Temperatur von 37° C getrocknet.

2.2.3 Entparaffinierung der histologischen Schnitte

Das Entparaffinieren dient der Freilegung der Epitope für die weitergehende immunhistochemische Färbung, da Paraffinreste eine unspezifische Hintergrundfärbung hervorrufen. Hierzu wurden die Schnitte zweimal zwei Minuten in Xylol (Firma Merck) inkubiert, um das Paraffin vollständig aus dem Gewebe herauszulösen. Im Anschluss wurde das Gewebe durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (jeweils zweimal zwei Minuten in Alkohol 100%, -96%, -80%, -70%) und daraufhin in Aqua dest. überführt.

2.2.4. Vorbehandlungen

Es wurden ausschließlich Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Präparate verwendet. Zur dauerhaften Erhaltung der Gewebsstrukturen ist diese Fixierung mit

Formalin notwendig. Jedoch kann sie auch zur Maskierung von Gewebsantigenen und zu dem Verlust von Angriffspunkten der Antikörper führen und daher für falsch-negative Ergebnisse verantwortlich sein. Für die Maskierung der Antigene sind Aldehydvernetzungen und eine sterische Konformationsänderung der dreidimensionalen Struktur der Antigene verantwortlich. Für den korrekten Nachweis zahlreicher Antigene ist daher eine Vorbehandlung Voraussetzung, um durch die Demaskierung die spezifische Antigenmarkierung zu verstärken und eine unspezifische Färbung zu vermeiden.

Es wurden drei verschiedene Verfahren für die Vorbehandlung verwendet.

Zum einen wurde die enzymatische Vorbehandlung angewendet, welche aus einer zehnminütigen Inkubation der Gewebeschnitte mit Proteinase K (1 Tropfen Dako ChemMate™ Proteinase K 40x, 1,6ml Dako ChemMate™ Proteinase K Diluent) besteht. Zum anderen verwendete man die Hitzevorbehandlung zur Antigendemaskierung. Hierzu wurden die Gewebeschnitte für zehn Minuten in einem Dampfgarer bei ca. 90° C inkubiert. Die Schnitte befanden sich hierbei entweder in einem Puffer bei pH6 (Dako Cytomation Target Retrieval Solution pH6) oder pH9 (Dako Cytomation Target Retrieval Solution pH9). Vor der Inkubation wurden die verwendeten Puffer 20 Minuten im Dampfgarer vorgeheizt. Nach der Hitzebehandlung mussten die Gewebeschnitte dreißig Minuten im jeweiligen Puffer abkühlen.

Nach der Vorbehandlung wurden die Schnitte bei allen drei beschriebenen Methoden zweimal für fünf Minuten in Puffer gewaschen.

Die Art des angewendeten Demaskierungsverfahrens ist abhängig vom jeweiligen Antigen und damit vom verwendeten Antikörper. Tabelle 3 zeigt die Vorbehandlungen der verwendeten Primärantikörper.

ANTIKÖRPER	VORBEHANDLUNG
CD3	pH9 und Hitze
CD4	pH9 und Hitze
CD8	pH6 und Hitze
CD20	pH6 und Hitze
CD68	pH6 und Hitze
CD123	pH9 und Hitze
Tia1	pH6 und Hitze
Granzyme B	pH9 und Hitze
MxA	keine Vorbehandlung
CXCR3	Proteinase K
IP10 / CXCL10	pH6 und Hitze

Tab. 3: Vorbehandlungen der verwendeten Antikörper

Vorbehandlungen: pH6 (Dako Cytomation Target Retrieval Solution pH6), pH9 (Dako Cytomation Target Retrieval Solution pH9), Hitze: Inkubation 20 Minuten im Dampfgerar bei ca. 90° C

2.2.5 Standardfärbungen

Für diagnostische Zwecke wurden zunächst Hämatoxylin-Eosin- (HE-), Elastica- und Periodic-acid-Schiff-Reaction- (PAS-) Färbungen angefertigt. Diese wurden standardisiert im Dako Autostainer durchgeführt.

2.2.6 Immunhistochemische Färbetechnik

Bei immunhistochemischen Färbungen werden die direkte und die indirekte Methode unterschieden. Die direkte Methode basiert auf einem Antikörper, der direkt mit einem Markerenzym, z. B. alkalischer Phosphatase, konjugiert ist. Die indirekte Methode ist charakterisiert durch einen ebenfalls spezifischen, jedoch unkonjugierten Primärantikörper, welcher an das Gewebsantigen bindet. Ein mit einem Markerenzym gekoppelter Sekundärantikörper, welcher spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet ist, bindet an ihn. Durch die Enzym-Substrat-Reaktion erhält man ein farbiges Endprodukt. Diese indirekte Färbemethode besitzt eine weitaus höhere Sensitivität gegenüber der direkten.

Das vorliegende Material wurde nach der Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) angefärbt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der hohen Affinität des Streptavidins zu dem wasserlöslichen Vitamin Biotin. Bei Streptavidin handelt es sich um ein auf gentechnischem Weg hergestelltes Glykoprotein, welches aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert wird. Es handelt sich um ein Tetramer mit vier identischen Bindungsstellen für das Biotin.

Zunächst erfolgt die Bindung eines unkonjugierten Primärantikörpers an das zu bestimmende Gewebsantigen. An diesen Primärantikörper wird eine Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper vorgenommen. Im dritten Schritt bindet an den Sekundärantikörper ein enzymmarkierter Streptavidinkomplex. Dieser Komplex ist so ausgerichtet, dass an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Biotinmolekül bindet. Als Enzyme werden Peroxidase oder alkalische Phosphatase, welche für die Farbreaktion bei der Umwandlung eines Substrates verantwortlich sind, verwendet. Die Farbreaktion führt zu einem kontrastreichen roten Produkt am Ort des Zielantigens. Die alkalische Phosphatase besitzt im Gegensatz zur Peroxidase eine höhere Sensitivität aufgrund einer höheren Substrat-Umsatzrate. Jedoch kann sich alkalische Phosphatase auch endogen im vorliegenden Präparat befinden, sodass sie daher vor der Färbung geblockt werden sollte.

2.2.7 Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen

Vorbereitend zur Färbung wurden die histologischen Schnitte wie zuvor beschrieben angefertigt, entparaffiniert und entsprechend der zu untersuchenden Marker vorbehandelt.

Um die endogene alkalische Phosphatase zu blockieren, wurden die Schnitte vor der Färbung zehn Minuten mit dem Dako Endogenous Enzyme Block inkubiert und nach einer zehnminütigen Pufferung mit Tris-Puffer (ein Päckchen Dako Cytomation TBS, 0,5 ml Dako Cytomation Tween 20) mit Aqua dest. vorsichtig abgespült und gewaschen.

Für die Färbung wurde das LSAB[®]2 System-AP (Dako Cytomation, Hamburg) verwendet. Die Färbungen erfolgten im Dako Autostainer.

Zunächst wurden die Objektträger mit den histologischen Schnitten für eine Stunde mit 100 µl der entsprechend charakterisierten und verdünnten Primärantikörper inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit Tris-Puffer folgte 15 Minuten Inkubation mit dem Biotinylated Link. Danach wurden die histologischen Schnitte erneut zweifach mit Tris-Puffer gewaschen und anschließend mit dem Streptavidin-AP inkubiert. Zwischenzeitlich wurde die Substrat-Chromogen-Lösung (Dako Cytomation Fuchsin + Substrate-Chromogen System) angesetzt. Hierzu wurden 120 µl Fuchsin Chromogen mit 120 µl Aktivierungsreagenz in einem Röhrchen für eine Minute gemischt und anschließend mit Fuchsin Substrate Puffer auf 2ml aufgefüllt. Noch einmal wurden die Schnitte mit dem Tris-Puffer zweifach gewaschen und daraufhin zweimal acht Minuten mit der Substrat-Chromogen-Lösung inkubiert.

Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte in Aqua dest. zwischengelagert. Es folgte die manuelle Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer um eine Kernfärbung zu erreichen. Die Schnitte wurden in Leitungswasser für fünf bis zehn Minuten gespült und zum Abschluss zur dauerhaften Konservierung aus dem Wasser heraus mit Merck Kaisers Glyceringelatine und je einem Deckglas versehen.

2.2.8 Immunhistochemische Doppelfärbungen

Zum Nachweis der Expression zweier spezifischer Antikörper eines Gewebeschnittes wurden sequentiell Doppelfärbungen erstellt. Hierzu wurde ergänzend zu der LSAB-Methode zuvor eine Färbung nach dem EnVision System angefertigt.

Dieses System entspricht einer Immunperoxidase-Färbung in zwei Schritten und ist sehr sensitiv. Nach der Inkubation des Primärantikörpers folgt die Reaktion mit dem Sekundärantikörper. Dieser ist mit einem Dextran-Komplex konjugiert, der mit zahlreichen Peroxidase-(HRP) Molekülen gekoppelt ist. Es folgt die Inkubation mit einem Substratsystem, welches aus einer Diaminobenzidinlösung (DAB) und einem wasserstoffperoxidhaltigen Puffer besteht und zu einem farblichen Nachweis führt. Das Substratsystem führt zu einem kontrastreichen braunen Endprodukt.

Im Anschluss an die Färbung nach dem EnVision System folgte die in 2.2.6. beschriebene Anfertigung nach der LSAB-Methode.

2.2.9 Anfertigung der immunhistochemischen Doppelfärbungen

Entsprechend der Beschreibung wurden die histologischen Schnitte zunächst angefertigt, entparaffiniert und je nach verwendetem Antikörper spezifisch vorbehandelt. Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte durch zehninminütige Inkubation mit dem Dako Endogenous Enzyme Block. Es folgte die Spülung der Gewebeschnitte mit Tris-Puffer (ein Päckchen Dako Cytomation TBS, 0,5 ml Dako Cytomation Tween 20) für zehn Minuten und die Zwischenlagerung in Aqua dest..

Zur Färbung wurde das Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse verwendet. Die zu färbenden Schnitte wurden eine Stunde mit dem jeweiligen Primärantikörper bedeckt. Es folgte die zweimalige Waschung mit Tris-Puffer. Anschließend wurden sie für 20 Minuten mit der gebrauchsfertigen EnVision-Lösung inkubiert und danach erneut zweifach gewaschen. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte zweimal fünf Minuten mit der DAB-haltigen Substrat-Arbeitslösung bedeckt, welche zuvor durch das Mischen von 20 µl Dako REAL™ DAB+ Chromogen und 1 ml Dako REAL™ Substrate Buffer angesetzt wurde. Nach erneuter Waschung in Tris-Puffer erfolgte die in 2.2.7 beschriebene Doppelfärbung mit dem Dako LSAB®2 System-AP, Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer und Eindeckelung. Somit färbte sich der erste mit dem EnVision System gefärbte Antikörper braun, der zweite nach der LSAB-Methode gefärbte rot und die Kerne durch die Gegenfärbung blau.

2.3 Auswertung

Alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von mindestens zwei unabhängigen Beobachtern beurteilt. Zur Auswertung und Auszählung wurde das Mikroskop Olympus BH-2 verwendet. Die Zellen wurden durch drei high power fields bei zweihundertfacher Vergrößerung gezählt und der Durchschnittswert ermittelt.

2.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte durch das Programm SPSS Version 15.0 für das Windows Betriebssystem. Es wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet, um die Expression der jeweiligen Antigene in den untersuchten

Krankheitsbildern und den gesunden Kontrollen zu vergleichen. Vergleichende Analysen wurden mittels Spearman's rho angefertigt. Wahrscheinlichkeitswerte unter 0,05 wurden als signifikant (*) angesehen, Wahrscheinlichkeitswerte unter 0,01 als hoch signifikant (**).

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Leukozyten im entzündlichen Infiltrat des Lichen sclerosus et atrophicus

Das entzündliche Infiltrat in den vorliegenden Geweben wurde charakterisiert durch die verwendeten Antikörper gegen CD3, CD4, CD8, CD20 und CD68. Die Zellen wurden wie beschrieben ausgezählt und die Signifikanzen bestimmt.

Antikörper gegen CD3 sind auf allen reifen T-Zellen exprimiert, da die Expression der T-Zell-Rezeptoren von diesem Zelloberflächenprotein abhängig ist. CD4 ist ein Marker für T-Helfer-Zellen, CD8 findet man auf zytotoxischen T-Zellen.

Antikörper gegen CD20 zeigen spezifisch B-Zellen an, CD68-positive Zellen sind Makrophagen.

Die Biopsien des Lichen sclerosus et atrophicus zeigten eine klare Mehrheit der CD3-positiven T-Zellen innerhalb des entzündlichen Infiltrats. Durch weitere Charakterisierung der T-Zellen mittels der Antikörper gegen CD4 und CD8 zeigte sich, dass die Anzahl der T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Zellen nahezu gleich war. Die T-Zellen wurden begleitet durch zahlreiche CD68+ Makrophagen. In den untersuchten Biopsien fand sich nur eine geringe Menge von B-Zellen.

Die Verteilung der Zelltypen im LSA war vergleichbar mit der des chronisch-diskoiden Lupus erythematodes, jedoch war die Anzahl der Zellen im entzündlichen Infiltrat zwei- bis dreifach geringer. Die Proben der gesunden Haut zeigten wie zu erwarten kaum entzündliches Infiltrat. Die Biopsien aus der Vergleichsgruppe der atopischen Dermatitis wiesen ähnlich denen des LSA eine hohe entzündliche Infiltration auf, jedoch mit einer deutlichen Dominanz der Makrophagen.

Diese Expression der untersuchten Marker im Vergleich und die Signifikanzen der untersuchten Biopsien im Vergleich zu denen des Lichen sclerosus et atrophicus veranschaulicht das Diagramm in Abbildung 3.

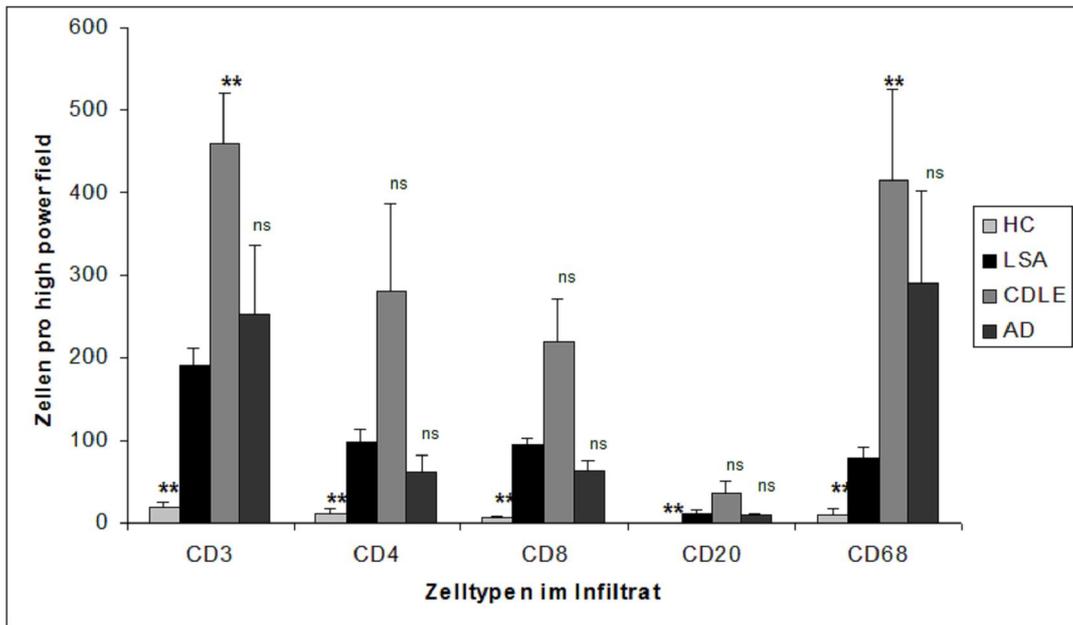


Abb. 3: Expression der Marker CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 in der gesunden Haut (HC), dem Lichen sclerosus et atrophicus (LSA), dem chronisch-diskoiden Lupus erythematosus (CDLE) und der atopischen Dermatitis (AD). Die untersuchten Biopsien wurden mit denen des Lichen sclerosus et atrophicus verglichen und die Signifikanzen bestimmt (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

T-Zellen dominierten deutlich in den inflammatorischen Bereichen des LSA. In der Abbildung 4 sieht man die typische Dominanz und Verteilung der CD3-positiven T-Zellen in den entzündlichen Arealen des Lichen sclerosus et atrophicus.

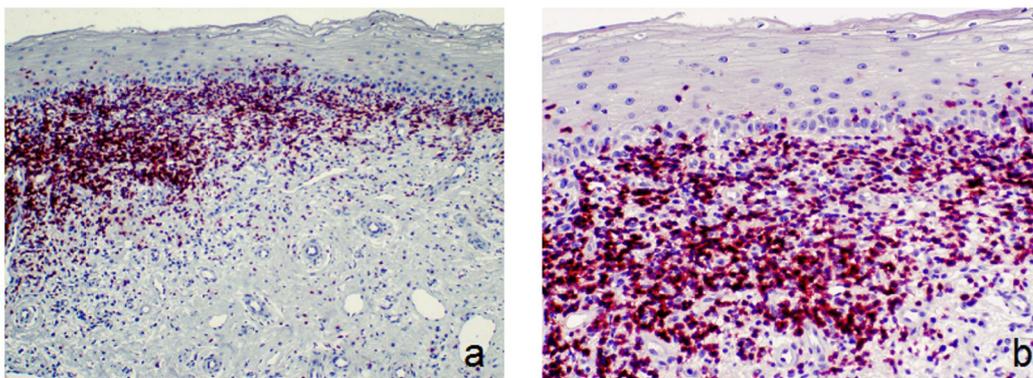


Abb. 4: Repräsentativer Befund CD3-positiver Zellen in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus in 200-facher (a) und 400-facher (b) Vergrößerung.

In der Abbildung 5 sieht man ein repräsentatives Bild von CD8+ zytotoxischen T-Zellen der drei untersuchten Krankheitsbilder und der gesunden Haut. Beim Lichen sclerosus et atrophicus zeigt sich wie beim CDLE eine hohe Anzahl CD8-positiver Zellen und die Lage der zytotoxischen Zellen innerhalb der junktionalen inflammatorischen Zone.

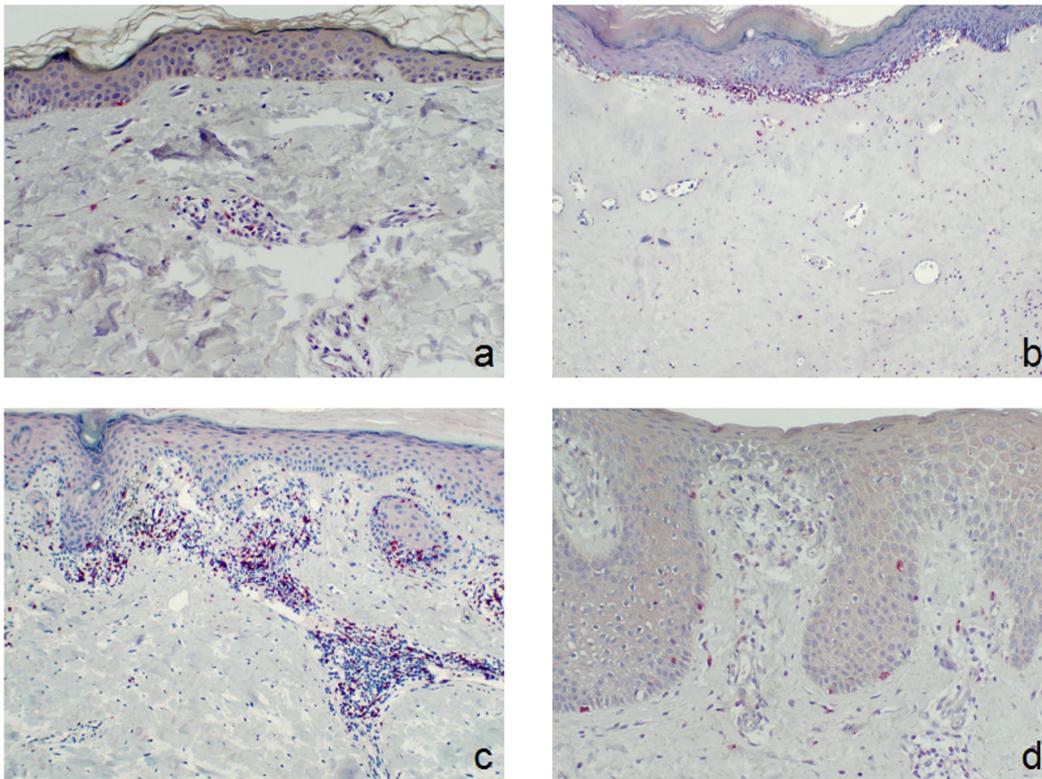


Abb. 5: Anwesenheit der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen in Biopsien der gesunden Haut (a), des Lichen sclerosus et atrophicus (b), des chronisch-diskoiden Lupus erythematosus (c) und der atopischen Dermatitis (d) in 200-facher Vergrößerung.

3.2 Anzahl der zytotoxischen Lymphozyten in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus

Einige zurückliegende Studien haben gezeigt, dass autoreaktive zytotoxische Lymphozyten bei der Pathogenese des Lichen sclerosus et atrophicus eine Rolle spielen. Die Anwesenheit von vielen CD8-positiven T-Lymphozyten bestätigten die Voruntersuchungen. Die zytotoxische Kapazität der infiltrierenden Zellen wurde durch die Anfärbung der Gewebeschnitte mit den zytotoxischen Markern Tia-1 und Granzyme B (GrB) nachgewiesen.

Es zeigte sich eine mittlere bis starke Expression der beiden Marker in den Läsionen des LSA. Die höchste Anzahl der zytotoxischen Marker präsentierte sich in den frühen Läsionen, die charakterisiert sind durch eine dichte Inflammation durch zytotoxische Zellen begleitet von einem Verlust der elastischen Fasern, jedoch mit geringerer Sklerose.

Insgesamt war die Anzahl der Tia-1-positiven Zellen etwa doppelt so hoch wie die der GrB-positiven Zellen.

Erneut ist ein Vergleich der Zellzahlen des Lichen sclerosus et atrophicus zu denen des CDLE möglich, wobei die Expression der Marker beim CDLE stärker ausgeprägt war. In der Negativkontrolle der gesunden Haut befanden sich keine Tia-1+ oder GrB+ Zellen, in den Proben der atopischen Dermatitis fanden sich nur geringfügige Mengen.

In Abbildung 6 sieht man die Expression der Marker Tia-1 und GrB in den untersuchten Hautbiopsien im Vergleich.

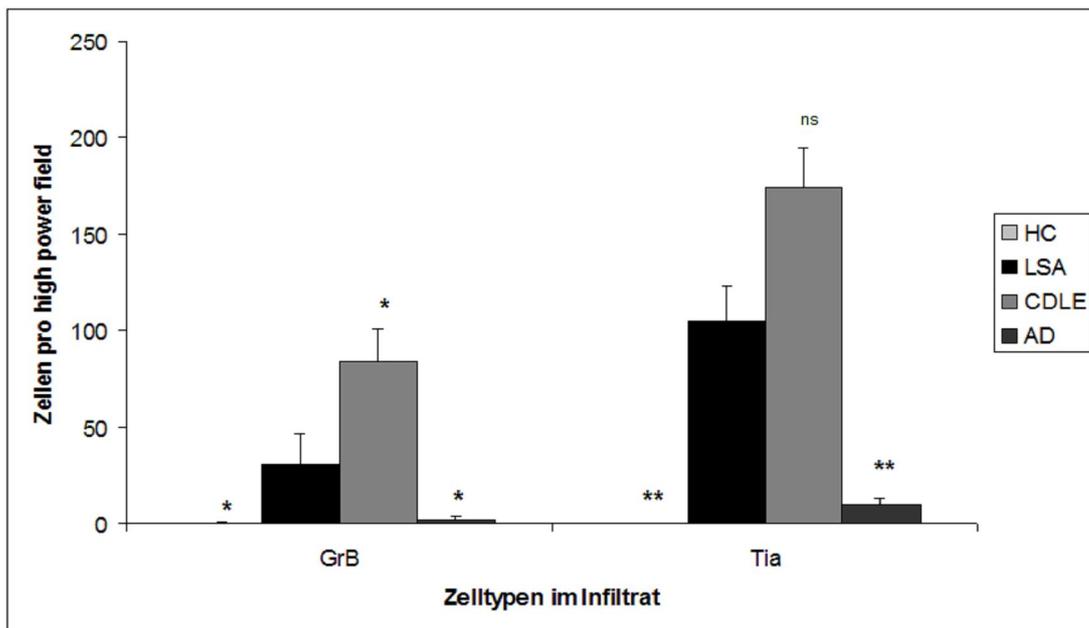


Abb. 6: Expression der Marker GrB und Tia-1 in der gesunden Haut (HC), dem Lichen sclerosus et atrophicus (LSA), dem chronisch-diskoiden Lupus erythematodes (CDLE) und der atopischen Dermatitis (AD).

Die untersuchten Biopsien wurden mit denen des Lichen sclerosus et atrophicus verglichen und die Signifikanzen bestimmt (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Abbildung 7 zeigt den typischen Befund der Tia-1-Expression in den frühen Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus.

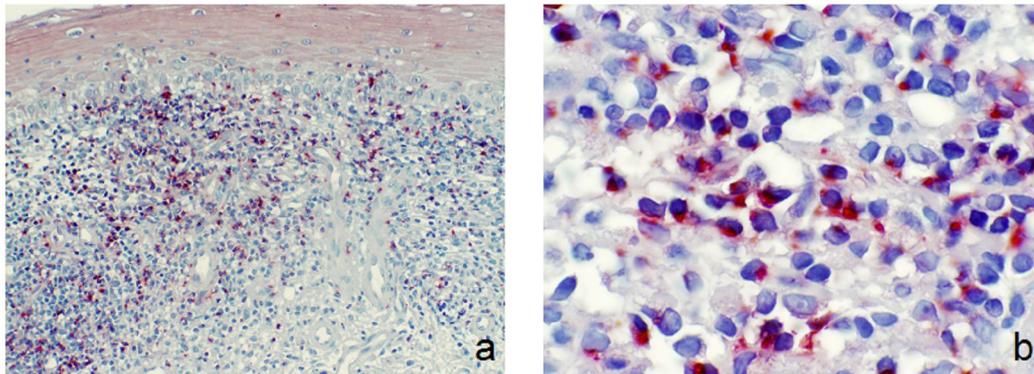


Abb. 7: Expression des zytotoxischen Markers Tia-1 in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus in 200-facher (a) und 1000-facher (b) Vergrößerung.

3.3 Expression von MxA als Nachweis einer Typ-1-Interferon Produktion beim Lichen sclerosus et atrophicus

Um die Beteiligung von Typ I Interferonen bei der Rekrutierung der Zellen in die Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus nachzuweisen, wurden monoklonale Antikörper gegen MxA verwendet. MxA ist ein antivirales Protein, welches spezifisch durch Typ I Interferone induziert wird. Andere Zytokine, wie das Interferon γ , sind nur schwache Induktoren. Daher ist es ein idealer Marker, um die Anwesenheit von Typ I Interferonen in Geweben nachzuweisen (Haller und Kochs, 2002).

In den Läsionen des LSA wurde eine MxA-Expression in allen untersuchten Proben aufgedeckt. Die Expression von MxA war deutlich höher als in den Proben der gesunden Haut, sowie den Biopsien der atopischen Dermatitis. Jedoch war sie nicht so ausgeprägt wie in den Proben des CDLE.

Die Abbildung 8 zeigt vergleichend die Anwesenheit von MxA in den untersuchten Hautbiopsien.

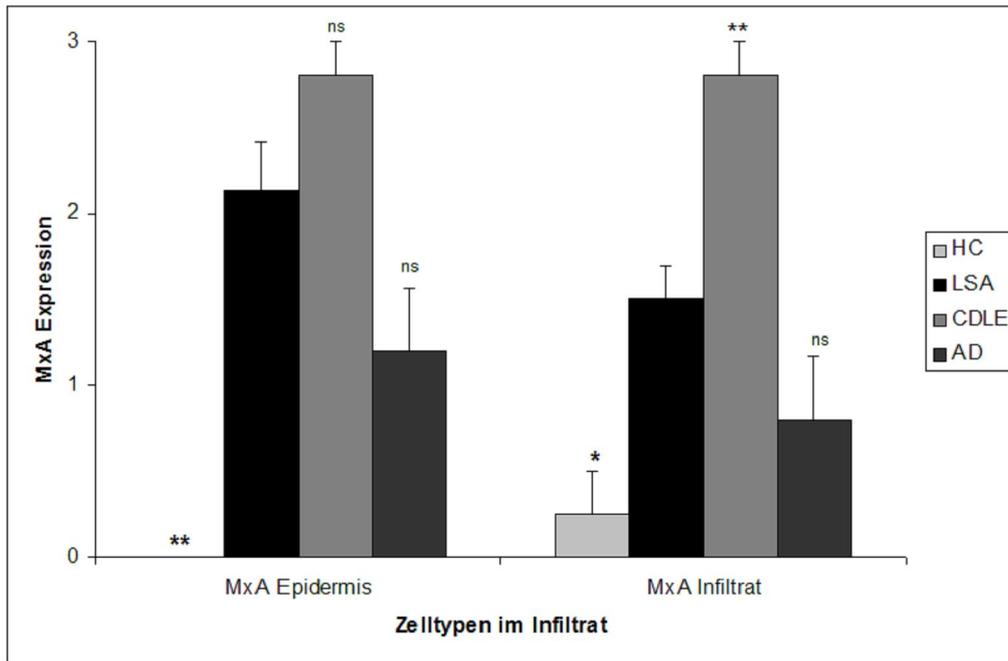


Abb. 8: Expression des Markers MxA in der Epidermis und im Infiltrat in der gesunden Haut (HC), dem Lichen sclerosus et atrophicus (LSA), dem chronisch-diskoiden Lupus erythematoses (CDLE) und der atopischen Dermatitis (AD).

Die MxA-Expression ist angegeben in 0 = keine, 1 = schwache, 2 = mittlere, 3 = starke. Die untersuchten Biopsien wurden mit denen des Lichen sclerosus et atrophicus verglichen und die Signifikanzen bestimmt (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Abbildung 9 zeigt die Anwesenheit von MxA in den untersuchten Hautbiopsien anhand charakteristischer Ausschnitte im Vergleich. Auch hier spiegelt sich die deutliche Anwesenheit von Typ I Interferonen im Gewebe des Lichen sclerosus et atrophicus wieder.

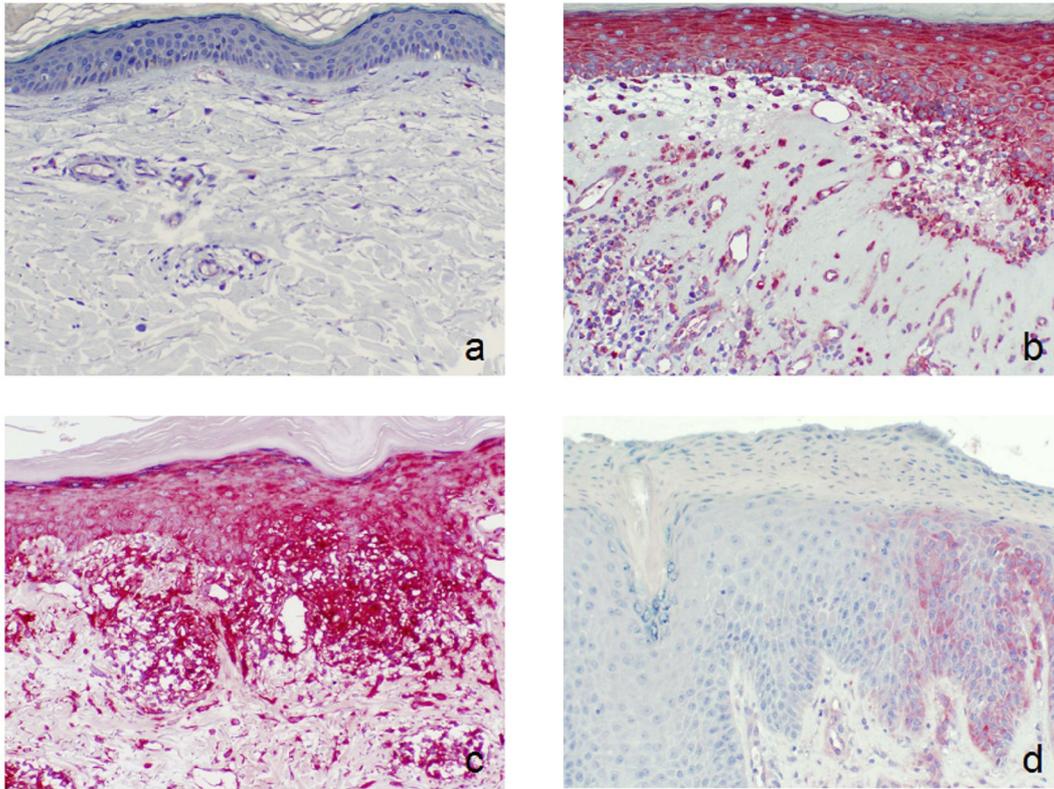


Abb. 9: Expression des Markers MxA in den Biopsien der gesunden Haut (a), des Lichen sclerosus et atrophicus (b), des chronisch-diskoiden Lupus erythematosus (c) und der atopischen Dermatitis (d) in 200-facher Vergrößerung.

Interessanterweise korrelierte die Höhe der MxA-Expression mit der Anzahl der CD3-positiven T-Lymphozyten, wie Abbildung 10 zeigt. Die Korrelation ist auf dem Niveau $p < 0,01$ hoch signifikant.

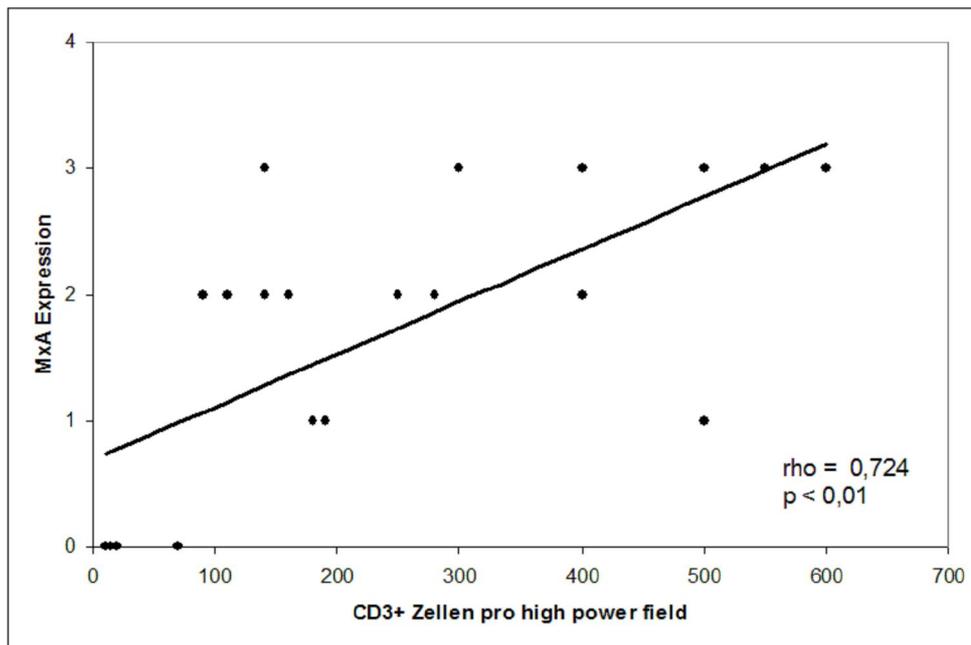


Abb. 10: Korrelation der MxA-Expression und der CD3-positiven T-Zellen in den Biopsien des Lichen sclerosus et atrophicus.
MxA-Expression angegeben in 0 = keine, 1 = schwache, 2 = mittlere, 3 = starke.

Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) sind als die Hauptquelle der Typ I Interferone bei entzündlichen Läsionen der Haut bekannt. Daher wurden im Anschluss an die MxA-Färbung die histologischen Schnitte zusätzlich auf die Anwesenheit von pDCs untersucht. Wie zu erwarten war es möglich, zahlreiche CD123+ Zellen mit einer plasmazytoiden Morphologie in den betroffenen Hautarealen des LSA zu identifizieren. Die plasmazytoiden dendritischen Zellen befanden sich zum einen in der junktionalen Zone, zum anderen in der Dermis und Epidermis.

Abbildung 11 zeigt einen typischen Befund von CD123-positiven Zellen in den Läsionen des LSA.

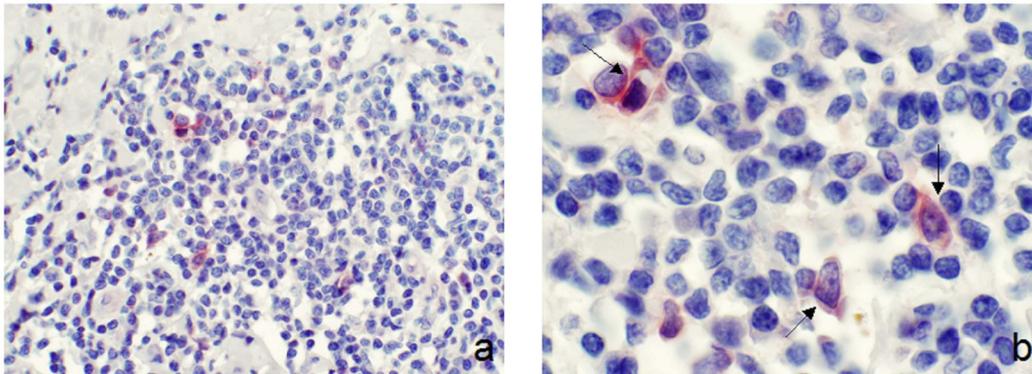


Abb. 11: Nachweis von 123-positiven plasmazytoiden dendritischen Zellen in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus in 400-facher und 1000-facher Vergrößerung. Die Pfeile zeigen die positiv markierten Zellen mit plasmazytoider Morphologie.

3.4 Nachweis der infiltrierenden Lymphozyten, welche beim Lichen sclerosus et atrophicus den Chemokinrezeptor CXCR3 exponieren

Frühere Studien haben gezeigt, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 eine entscheidende Funktion bei der Rekrutierung der Lymphozyten bei entzündlichen Hauterkrankungen einnimmt. Dies ist besonders der Fall bei Typ I Interferon gesteuerten inflammatorischen Ereignissen (Flier et al., 2001). Gezeigt wurde dieses zuletzt beim chronisch-diskoiden Lupus erythematodes (Meller et al., 2005; Wenzel et al., 2005a). Daher wurde vermutet, dass dieser Mechanismus zur Migration der Lymphozyten in die entzündlichen Areale der Haut auch beim Lichen sclerosus et atrophicus eine zentrale Stellung einnimmt. Die Hautbiopsien wurden aus diesem Grund auf die Anwesenheit des Chemokinrezeptors CXCR3 untersucht.

Es wurde eine beträchtliche Anzahl an CXCR3-positiven Lymphozyten in allen untersuchten LSA-Proben beobachtet. Diese Expression war vergleichbar mit der des CDLE. In den vergleichenden Hautbiopsien der atopischen Dermatitis war die Anwesenheit des Rezeptors signifikant niedriger. In den Proben der gesunden, nicht entzündeten Haut wurde der Chemokinrezeptor, wie zu erwarten, kaum exprimiert.

Abbildung 12 zeigt die Anwesenheit des Chemokinrezeptors CXCR3 in den Biopsien der untersuchten Erkrankungen und der gesunden Haut im Vergleich.

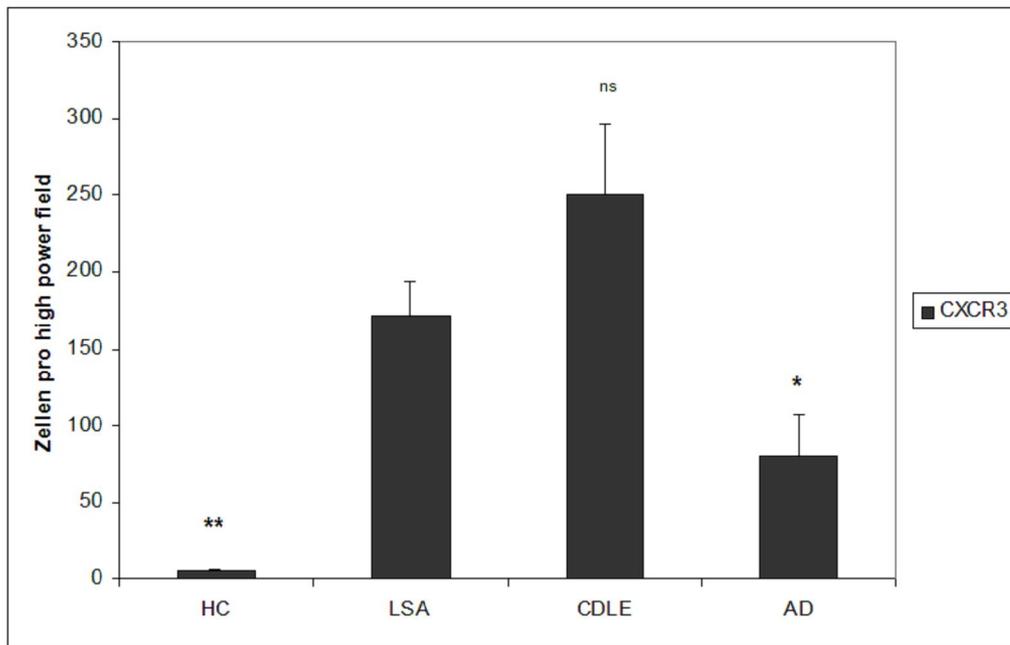


Abb. 12: Expression des Markers CXCR3 in der gesunden Haut (HC), dem Lichen sclerosus et atrophicus (LSA), dem chronisch-diskoiden Lupus erythematosus (CDLE) und der atopischen Dermatitis (AD). Die untersuchten Biopsien wurden mit denen des Lichen sclerosus et atrophicus verglichen und die Signifikanzen bestimmt (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

Der Rezeptor CXCR3 wurde auf ca. 80 % aller infiltrierenden Zellen im Lichen sclerosus et atrophicus exprimiert.

Es wurde vermutet, dass diese CXCR3-positiven Lymphozyten die potentiellen Effektorzellen der entzündlichen Läsionen des LSA sind. Daher wurden Doppelfärbungen mit CXCR3 und dem zytotoxischen Marker Tia-1 angefertigt. Es zeigte sich deutlich eine Expression beider Marker bei einer Mehrzahl der infiltrierenden Zellen. Der Rezeptor CXCR3 stellte sich durch die Färbung nach dem EnVision System und DAB braun dar. Man konnte die Anwesenheit des Rezeptors auf der Zelloberfläche sehen. Deutlich war die Ko-Expression mit dem zytotoxischen Marker Tia-1. Die Tia-1-Expression stellte sich durch das LSAB System mit alkalischer Phosphatase rot dar, es färbte sich spezifisch die intrazelluläre Granula.

Abbildung 13 zeigt einen typischen Befund der Expression beider Marker aus einer Biopsie eines LSA-Patienten.

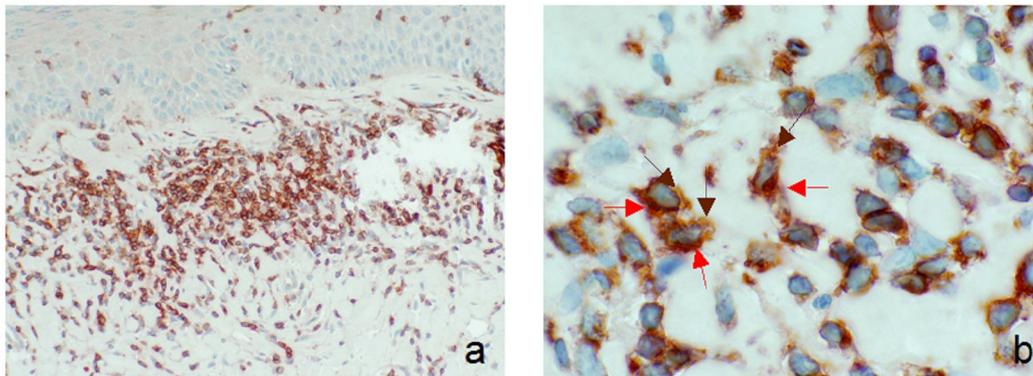


Abb. 13: Nachweis der Ko-Expression von CXCR3 und Tia-1 in Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus durch Doppelfärbungen in 400-facher (a) und 1000-facher (b) Vergrößerung. CXCR3 stellt sich braun an der Oberfläche (braune Pfeile in b), Tia-1 rot in der Granula (rote Pfeile in b) der Zellen dar.

3.5 Expression von IP10 / CXCL10 beim Lichen sclerosus et atrophicus

Typ I Interferone induzieren die Expression verschiedener Mediatoren bei entzündlichen Läsionen der Haut. Hierzu gehört auch das Interferon-induzierbare Chemokin IP10 / CXCL10. Da dieses Protein ein Ligand für den Chemokinrezeptor CXCR3 ist, wird eine Bedeutung von IP10 / CXCL10 bei der Rekrutierung von Lymphozyten in die Haut vermutet. Aus diesem Grund wurde die Expression des Chemokins bei den vorliegenden Hautbiopsien untersucht.

Die immunhistochemischen Analysen deckten eine signifikante Expression von IP10 / CXCL10 in den Proben des Lichen sclerosus et atrophicus auf. Die Anwesenheit von IP10 /CXCL10 war besonders in der basalen Schicht der Epidermis zu sehen, in manchen Proben auch in Regionen mit ausgeprägter junktionaler Infiltration. Teilweise fand sich die IP10 / CXCL10 Expression jedoch gleichwertig in der gesamten Epidermis. Interessanterweise enthielten einige infiltrierenden Lymphozyten IP10 / CXCL10 in ihrer Granula.

Abbildung 14 zeigt den typischen Befund der Expression des Chemokins IP10 / CXCL10 in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus. Außerdem sind Lymphozyten mit IP10 / CXCL10 in ihrer Granula gesondert dargestellt.

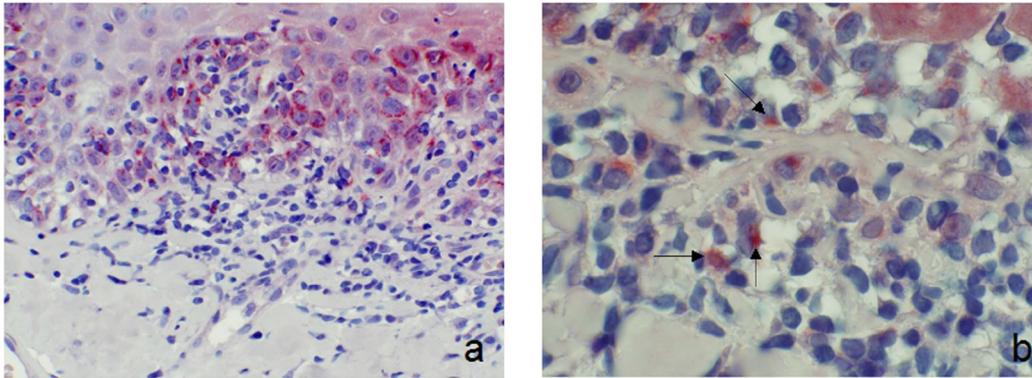


Abb. 14: Charakteristischer Befund der starken Expression von IP10 / CXCL10 in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus in 400-facher (a) und 1000-facher (b) Vergrößerung. Die Pfeile in b zeigen Lymphozyten, welche IP10 / CXCL10 in ihrer Granula enthalten.

Die Expression von IP10 / CXCL10 im LSA war in etwa vergleichbar mit der beim chronisch-diskoiden Lupus erythematoses. Im Vergleich zur atopischen Dermatitis und den Proben der gesunden Haut war die Expression beim LSA signifikant höher.

Abbildung 15 zeigt im Vergleich die Expression des Chemokins IP10 / CXCL10 bei den untersuchten Biopsien.

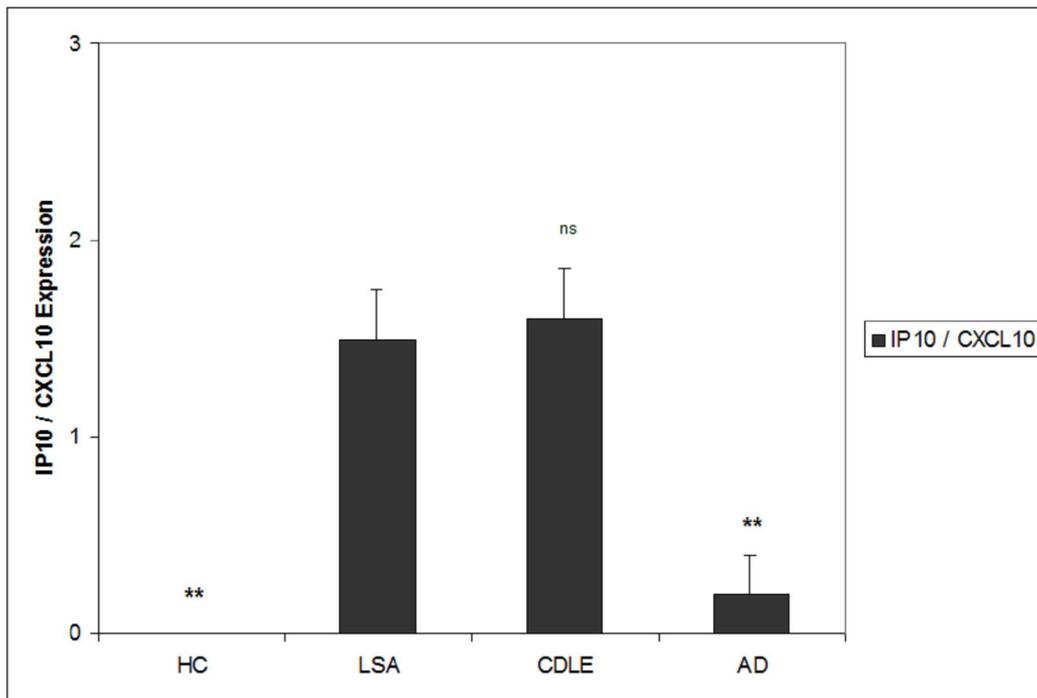


Abb. 15: Expression des Markers IP10 / CXCL10 in der gesunden Haut (HC), dem Lichen sclerosus et atrophicus (LSA), dem chronisch-diskoiden Lupus erythematoses (CDLE) und der atopischen Dermatitis (AD).

Die Expression von IP10 / CXCL10 ist angegeben in 0 = keine, 1 = schwache, 2 = mittlere, 3 = starke. Die untersuchten Biopsien wurden mit denen des Lichen sclerosus et atrophicus verglichen und die Signifikanzen bestimmt (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$).

3.6 Korrelation der Interferon-assoziierten Marker mit der Anzahl der T-Zellen im entzündlichen Infiltrat

Um einen möglichen Zusammenhang der ausgeprägten Präsenz von T-Zellen im entzündlichen Infiltrat des Lichen sclerosus et atrophicus mit der Expression von Typ I Interferonen, dem Chemokin IP10 / CXCL10 und dem Chemokinrezeptor CXCR3 nachzuweisen, wurde eine statistische Analyse durchgeführt. Die Analyse wurde durch die Korrelationen mittels Spearmans rho bestimmt. Tabelle 4 zeigt die Korrelationen der zuvor untersuchten Marker CD3, MxA, CXCR3 und IP10 / CXCL10.

	CD3	MxA Epidermis	MxA Infiltrat	CXCR3	IP10 / CXCL10
CD3	1	0,724**	0,631**	0,791**	0,450
MxA Epidermis	0,724**	1	0,849**	0,774**	0,756**
MxA Infiltrat	0,631**	0,849**	1	0,713**	0,767**
CXCR3	0,791**	0,774**	0,713**	1	0,711**
IP10 / CXCL10	0,450	0,756**	0,767**	0,711**	1

Tab. 4: Analyse der Korrelation der Marker CD3, MxA, CXCR3 und IP10 / CXCL10 mittels Spearmans rho.

* zeigt eine Korrelation auf dem Niveau $p < 0,05$ als signifikant, ** eine Korrelation auf dem Niveau $p < 0,01$ als hoch signifikant.

Aus den Ergebnissen der statistischen Analyse zeigte sich, dass die Anwesenheit der CD3-positiven T-Zellen mit der Anwesenheit von MxA sowohl in der Epidermis, als auch im entzündlichen Infiltrat, assoziiert ist. Da MxA der spezifische Marker für die Anwesenheit von Typ I Interferonen ist, besteht eine signifikante Korrelation zwischen diesen und den T-Zellen. Eine signifikante positive Korrelation besteht auch zwischen den markierten CD3+ Zellen und dem Chemokinrezeptor CXCR3. Zudem kann man einen Zusammenhang zwischen den T-Zellen und dem Chemokin IP10 / CXCL10 erkennen. Es findet sich eine signifikante Korrelation zwischen der Typ I Interferon Produktion, dem durch Typ I Interferone induzierbaren Chemokin IP10 / CXCL10 und dem Chemokinrezeptor CXCR3.

4. Diskussion

Beim Lichen sclerosus et atrophicus handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Dermatose mit vermutlich autoimmuner Ätiologie. Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob beim Lichen sclerosus et atrophicus Typ I Interferon-assoziierte proinflammatorische Mechanismen eine pathogenetische Rolle zur Rekrutierung von Effektorzellen in die Läsionen spielen. Dazu wurden LSA-Hautbiopsien sowie geeignete Kontrollbiopsien (CDLE, atopische Dermatitis, gesunde Haut) immunhistologisch charakterisiert und verglichen.

4.1 Starke Dominanz der T-Lymphozyten im inflammatorischen Infiltrat des Lichen sclerosus et atrophicus

Aus den in dieser Studie durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen ging hervor, dass bei dem entzündlichen Infiltrat des Lichen sclerosus et atrophicus die CD3+ T-Zellen deutlich dominierten. Die T-Zellen konnten weiter differenziert werden in CD4+ T-Lymphozyten, welche auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet werden, und CD8+ T-Lymphozyten, die das Kollektiv der zytotoxischen T-Lymphozyten darstellen. Es befanden sich annähernd gleich viele T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen in den Läsionen. Diese T-Zellen wurden begleitet durch zahlreiche Makrophagen. In den untersuchten Proben befanden sich kaum B-Zellen im entzündlichen Infiltrat, was erneut auf eine T-Zell-gesteuerte Entzündung hinwies.

Die Dominanz der T-Zellen im LSA war vergleichbar mit den Ergebnissen der Interferon-assoziierten Referenz-Kontrolle des chronisch-diskoiden Lupus erythematodes, jedoch war die Anzahl der Zellen, welche die untersuchten Antigene exprimierten, weitaus geringer. Auch bei den Biopsien der atopischen Dermatitis fand sich eine Infiltration von Lymphozyten, denn auch bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine entzündliche Dermatose. Die Proben der Kontrollgruppe der gesunden Haut enthielten kaum entzündliches Infiltrat.

Diese Daten passen gut zu zurückliegenden Studien, welche Hinweise dafür gaben, dass es sich beim Lichen sclerosus et atrophicus um eine Autoimmunerkrankung handelt, die besonders durch T-Zellen vermittelt wird. Es wurde gezeigt, dass sowohl

CD4+ als auch CD8+ T-Zellen in den entzündlichen Läsionen zu finden sind. Diese Lymphozyten verursachen die Inflammation und halten sie aufrecht (Farrell et al., 1999). Bei den T-Zellen handelt es sich zum einen um zytotoxische T-Zellen, welche für die Inflammation verantwortlich sind, zum anderen um T-Helfer-Zellen, wobei besonders der Subtyp Th1 von Bedeutung ist. Die anhaltende Entzündung in den Läsionen wird durch T-Lymphozyten und Makrophagen aufrecht erhalten (Carlson et al., 2000).

4.2 Eine hohe Anzahl an zytotoxischen Lymphozyten beim Lichen sclerosus et atrophicus

In dieser Arbeit wurden die Biopsien aus den Läsionen des LSA auf die Anwesenheit der zytotoxischen Marker Tia-1 und GrB untersucht, um die zytotoxische Aktivität der Lymphozyten zu charakterisieren. Es befand sich eine hohe Anzahl von Tia-1+ und GrB+ Zellen sowohl in der oberen Dermis, als auch in der junktionalen Zone. Eine sehr hohe Anzahl zytotoxischer Lymphozyten zeigte sich besonders in den frühen Läsionen, welche durch den Verlust an elastischen Fasern charakterisiert sind.

Wie zu erwarten war die Expression der untersuchten zytotoxischen Marker bei der Referenz mit bekannter Interface-Dermatis, dem chronisch-diskoiden Lupus erythematoses, vergleichbar mit der des LSA. Die Anwesenheit zytotoxischer Lymphozyten im CDLE wurde bereits in früheren Studien belegt (Wenzel et al., 2005a und 2005b). In den Kontrollgruppen der gesunden Haut und der atopischen Dermatitis waren die zytotoxischen Marker Tia-1 und GrB nicht beziehungsweise gering exprimiert.

Neuere Studien zeigten, dass es sich beim Lichen sclerosus et atrophicus um ein Autoimmungeschehen handelt, bei dem autoreaktive zytotoxische Lymphozyten eine Rolle spielen. Es wurde eine hohe Anzahl von Tia-1+ CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten in den Proben der Läsionen der LSA-Patienten nachgewiesen (Gross et al., 2001). Aktivierte Makrophagen und Lymphozyten sind hinweisend auf eine persistierende Antigen-gesteuerte Inflammation (Carlson et al., 2000). Des Weiteren wurde eine beträchtliche Anzahl von GrB+ aktivierten zytotoxischen Lymphozyten in den Läsionen identifiziert. Diese waren assoziiert mit einer Degeneration der basalen Zellschicht und befanden sich im dermalen Infiltrat und in der dermo-epithelialen Grenzschicht (Gross et al., 2001). Die Autoren folgerten aus ihren Ergebnissen, dass

eine zytotoxische T-Zell-Antwort, gerichtet gegen Keratinozyten-assoziierte Antigene, eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des Lichen sclerosus et atrophicus spielen.

In einer Studie basierend auf 100 Biopsien aus LSA-Läsionen wurden Doppelfärbungen immunhistochemisch angefertigt. Die Autoren identifizierten bei der Studie eine hohe Anzahl von CD8+ CD57+ Lymphozyten beim LSA (Carlson et al., 2000). Diese Zellen werden verdächtigt als die entgültig differenzierten, zytotoxischen Effektor-T-Lymphozyten (Mollet et al., 1998).

Die Expansion von CD8+ CD57+ Lymphozyten ist vermutlich das Ergebnis einer chronischen exzessiven Antigen-Exposition. Sie wird bei dermalen Sklerosen beobachtet und ist ebenfalls mit viralen Infektionen, Autoimmunerkrankungen (Morphea), malignen Erkrankungen und sklerotischen Graft-versus-Host-Reaktionen assoziiert (Carlson et al., 2000). Zusätzlich wurde beschrieben, dass nahezu alle untersuchten CD8-positiven Zellen bei Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus zytotoxische Granula enthalten. Diese Granula wurde identifiziert durch den Marker Tia-1. Diese Zellen sind vermutlich die Ursache für die Zerstörung der Basalzellen (Lukowsky et al., 2000).

In der vorliegenden Untersuchung war die Anzahl der Tia-1-positiven Zellen in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus etwa doppelt so hoch wie die der GrB-positiven Zellen. Eine mögliche Erklärung für die deutlich niedrigere Expression von GrB im Vergleich zu Tia-1 ist, dass die Mehrzahl der CD8+ T-Zellen ihre zytotoxische Granula bereits ausgeschüttet haben. Dies wurde bereits für Beispiele von Hautbiopsien des von der Pathogenese dem LSA ähnlichen Lichen planus beschrieben (Shimizu et al., 1997).

Allgemein kann durch die verwendeten zytotoxischen Marker zwischen der aktiven und der inaktiven Form der zytotoxischen Lymphozyten unterschieden werden. Die Expression von GrB weist auf aktive zytotoxische Lymphozyten hin, während die Expression von Tia-1 Lymphozyten darstellt, welche in aktiver und ruhender Form mit zytolytischem Potential vorliegen (Griffiths und Mueller, 1991).

Interessanterweise wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass bei Hautbiopsien aus den Läsionen von Lichen planus, Lupus erythematoses und Graft-versus-Host-

Reaktionen die meisten CD8-positiven T-Zellen Tia-1 exprimierten, während GrB nur von einer Minderheit der Zellen gebildet wurde. Eine Zerstörung der Epidermis und eine Reihe von apoptotischen Keratinozyten wurde in allen untersuchten Proben identifiziert. Diese Befunde zeigten die Anwesenheit von funktionell aktiven zytotoxischen Lymphozyten. Die Autoren folgerten aus ihren Ergebnissen, dass die relativ niedrige Expression von GrB im Vergleich zu Tia-1 durch die CD8+ T-Zellen nicht bedeutet, dass es sich um funktionell inaktive zytotoxische Lymphozyten handelt. Die große Anzahl der Tia-1+ Lymphozyten in Verbindung mit der Zerstörung der Epidermis weist demnach trotz der niedrigen Expression von GrB auf aktivierte zytotoxische T-Zellen hin (Vermeer et al., 2001).

Diese Schlussfolgerung gilt auch für die hier untersuchten Proben des LSA. Trotz geringerer Expression von GrB im Vergleich zu Tia-1 handelt es sich bei den infiltrierenden Zellen um aktive zytotoxische Lymphozyten, wie der histologische Befund zeigt. Im weiteren Verlauf sollte gezeigt werden, wie diese zytotoxischen Lymphozyten in die Haut rekrutiert und aktiviert werden.

4.3 Die starke Expression von MxA weist auf eine Typ I Interferon Produktion im Lichen sclerosus et atrophicus hin

Die Anwesenheit von Typ I Interferonen spielt eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Lymphozyten in entzündete Areale der Haut. Die Bedeutung der Typ I Interferone für die Regulation der zytotoxischen Immunantwort bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen der Haut, wie dem chronisch-diskoiden Lupus erythematoses, wurde bereits in zurückliegenden Studien belegt (Wenzel et al., 2005a und 2005b). Um die Rolle der Typ I Interferone bei der Pathogenese des Lichen sclerosus et atrophicus zu untersuchen, wurden die Biopsien entsprechend gefärbt.

Der Nachweis der Typ I Interferon Produktion gelingt indirekt durch den immunhistochemischen Nachweis des antiviralen Proteins MxA (Haller und Kochs, 2002). Diese Mx-Proteine werden nicht konstitutiv exprimiert, eine Induktion der Expression erfolgt durch α - und β -Interferone, welche die Typ I Interferone repräsentieren, nicht jedoch durch γ - Interferone, den Typ II Interferonen (Arnheiter et

al., 1996; Simon et al., 1991). Daher sind sie als Marker geeignet, um die Anwesenheit von Typ I Interferonen nachzuweisen.

In dieser Arbeit lag in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus eine signifikante Expression von MxA-Proteinen vor. Diese Expression fand sich in allen untersuchten Hautproben im entzündlichen Infiltrat der Dermis und der Epidermis. Die Expression weist auf die Anwesenheit einer großen Menge von Typ I Interferonen hin. Erneut ist ein Vergleich zu den Proben des chronisch-diskoiden Lupus erythematoses möglich. In den Kontrollgruppen der gesunden Haut und der atopischen Dermatitis wurde MxA nicht beziehungsweise signifikant niedriger exprimiert. Interessanterweise korrelierten die Anwesenheiten von CD3+ Zellen und MxA zudem auf einem hoch signifikanten Niveau.

Typ I Interferone können prinzipiell von allen Zellen des Körpers gebildet werden, jedoch nur in sehr geringen Mengen. Eine Zellpopulation jedoch besitzt die Potenz, große Mengen von Typ I Interferonen auszuschütten, die sogenannten plasmazytoiden dendritischen Zellen (Cella et al., 1999; Fitzgerald-Bocarsly, 1993; Ronnblom et al., 2003). Diese Zellen werden sowohl durch virale, als auch durch allogene Reize stimuliert. Da durch die Typ I Interferone die Expression weiterer Proteine mit immunmodulierender Funktion hervorgerufen wird (Goodbourn et al., 2000), wurden die Biopsien in dieser Studie zusätzlich auf die Anwesenheit von plasmazytoiden dendritischen Zellen untersucht. Dieser Nachweis gelingt durch einen Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD123 (Siegal et al., 1999).

In den vorliegenden Biopsien des LSA wurde eine Vielzahl von CD123-positiven Zellen gefunden, welche eine plasmazytoide Morphologie aufwiesen. Sie befanden sich besonders in den entzündlichen Arealen der Läsionen, hauptsächlich in der junktionalen Zone. Sie wurden auch in geringeren Mengen in der Dermis und der Epidermis gefunden. Diese Zellen repräsentieren die entscheidende Quelle der Typ I Interferone, welche für die Rekrutierung der Lymphozyten in die Haut von Bedeutung sind.

4.4 Die Mehrzahl der infiltrierenden Lymphozyten beim Lichen sclerosus et atrophicus exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR3

Typ I Interferone induzieren eine Immunantwort, welche besonders durch Th1-Zellen gesteuert wird (Hansson et al., 2004). Dadurch kommt es zur Rekrutierung zytotoxischer Lymphozyten in die Haut. Zurückliegende Arbeiten haben gezeigt, dass eine lymphozytäre Rekrutierung über den Chemokinrezeptor CXCR3 entscheidend für die Antigen-spezifische zelluläre Immunreaktion der Haut ist (Iijima et al., 2003; Wenzel et al., 2005a). CXCR3 ist ein charakteristisches Oberflächenantigen von Th1-positiven Lymphozyten bei den TH1-gesteuerten Immunantworten (Sallusto et al., 1998b).

An den Chemokinrezeptor CXCR3 bindet unter anderem das Chemokin IP10 / CXCL10 als Agonist. Die Rekrutierung von zytotoxischen Lymphozyten über Typ I Interferone und die darauf folgenden Interaktion von IP10 / CXCL10 und dem Rezeptor CXCR3 wurde bereits für verschiedene Hauterkrankungen bewiesen, wie dem Lupus erythematoses und dem Lichen planus. Dies wurde in verschiedenen zurückliegenden Studien gezeigt (Flier et al., 2001; Iijima et al., 2003; Meller et al., 2005; Wenzel et al., 2005a und 2005b).

Da Lymphozyten, die den Chemokinrezeptor CXCR3 exprimieren, vermutlich auch eine Rolle bei der Pathogenese des Lichen sclerosus et atrophicus einnehmen, wurden die Biopsien auf die Anwesenheit des Rezeptors untersucht. In allen untersuchten Hautproben des LSA wurde eine hohe Anzahl an CXCR3-positiven Lymphozyten gefunden, etwa 80 % der infiltrierenden Lymphozyten in den Läsionen trugen das Oberflächenantigen. Die Expression des Markers ist vergleichbar mit dem Befund in der Referenzgruppe des CDLE.

In der Kontrolle der gesunden Haut wurde der Chemokinrezeptor kaum exprimiert. In der Vergleichsgruppe der atopischen Dermatitis war die Expression des Rezeptors im entzündlichen Infiltrat signifikant geringer. Da es sich bei der atopischen Dermatitis im Gegensatz zum LSA um eine Th2-getriggerte Entzündung handelt und sich CXCR3-positiv Lymphozyten besonders bei entzündlichen Erkrankungen assoziiert mit Th1-Zellen finden, war dieser Befund zu erwarten (Schuerwegh et al., 1999).

Da eine Mehrzahl der Lymphozyten im entzündlichen Infiltrat CXCR3-positiv war wurde vermutet, dass es sich bei diesen Zellen um die Effektorzellen der entzündlichen Läsionen im Lichen sclerosus et atrophicus handelt. Aus diesem Grund wurden Doppelfärbungen mit den Markern CXCR3 und Tia-1 angefertigt. Es zeigte sich, dass sich bei einer Vielzahl der Zellen eine Ko-Expression beider Marker vorlag. Dieser Befund beweist, dass es sich bei den CXCR3-positiven Zellen um die zytotoxischen Effektorzellen beim LSA handelt.

4.5 Die starke Expression von IP10 / CXCL10 ist verbunden mit der Typ I Interferon Produktion und der Rekrutierung von CXCR3+ Lymphozyten

Bei dem Chemokin IP10 / CXCL10 handelt es sich um einen der natürlichen Liganden des in den LSA-Läsionen zuvor nachgewiesenen Rezeptors CXCR3 (Clark-Lewis et al., 2003). Die Expression von IP10 / CXCL10 wird durch Typ I Interleukine induziert. Da eine entscheidende Rolle des Chemokins bei der Pathogenese des Lichen sclerosus et atrophicus vermutet wird, wurden die Hautproben im Anschluss auf die Anwesenheit von IP10 / CXCL10 untersucht.

In den untersuchten Biopsien war eine signifikante Expression des Chemokins IP10 / CXCL10 zu beobachten. Das Chemokin befand sich besonders in der basalen Schicht der Epidermis und in den Regionen mit ausgeprägt starker junctionaler Infiltration, teilweise jedoch auch in der gesamten Epidermis. Der Befund war vergleichbar mit der Referenz-Kontrolle des chronisch-diskoiden Lupus erythematoses. Die Expression von IP10 / CXCL10 war wie zu erwarten beim LSA signifikant höher als bei der Negativ-Kontrolle der gesunden Haut und der Vergleichsgruppe der atopischen Dermatitis.

Interessanterweise befanden sich im entzündlichen Infiltrat zahlreiche Lymphozyten, welche das Chemokin IP10 / CXCL10 in ihrer Granula trugen. Diese Zellen könnten die Potenz besitzen, die CXCL10-induzierte Rekrutierung weiterer CXCR3-positiven Lymphozyten zu unterstützen. Dieser Befund würde für ein System in der Pathogenese des Lichen sclerosus et atrophicus sprechen, welches sich selbst aufrecht erhält. Dies könnte eine Erklärung für die chronische Inflammation des LSA sein. Vergleichbare Beobachtungen wurden in einer Studie beim oralen Lichen planus gemacht (Iijima et al.,

2003). Der Lichen planus ähnelt sowohl in der Pathogenese, als auch im histologischen Befund dem Lichen sclerosus et atrophicus.

Allerdings könnten zusätzlich auch weitere agonistische CXCR3-Liganden, die durch Typ I Interferone stimuliert werden, an der Rekrutierung beteiligt sein. Hierbei könnte es sich um die Chemokine MIG / CXCL9 und I-TAC / CXCL11 handeln, denn bei diesen handelt es sich auch um natürliche Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3 (Clark-Lewis et al., 2003).

4.6 Die Expression der Interferon-assoziierten Marker korreliert mit der Anwesenheit der T-Zellen

Um die Hypothese, dass es sich bei der entzündlichen Läsion im Lichen sclerosus et atrophicus um eine Inflammation handelt, die durch Typ I Interferone gesteuert wird, erneut zu unterstützen, wurden statistische Analysen angefertigt. Die hohe Anzahl von CD3-positiven T-Zellen wurde in Korrelation zu den Markern MxA, CXCR3 und IP10 / CXCL10 gesetzt. Wie zuvor beschrieben stellt MxA einen spezifischen Marker für die Anwesenheit von Typ I Interferonen dar. Sowohl die MxA-Expression in der Epidermis, als auch im Infiltrat korrelierte signifikant mit der Anwesenheit der CD3+ Zellen. Dies wurde bereits in 4.2 herausgearbeitet. Eine signifikante positive Korrelation bestand auch zwischen den T-Zellen und der Expression des Chemokinrezeptors CXCR3. Demnach exprimierte die Mehrzahl der CD3+ T-Zellen im entzündlichen Infiltrat des LSA den Chemokinrezeptor CXCR3. Zudem korrelierte die Anwesenheit des Interferon-anzeigenden Markers MxA mit der Expression des Chemokins IP10 / CXCL10 und des zugehörigen Rezeptors CXCR3.

Durch diese Analyse wird die Vermutung, dass es bei der Pathogenese des Lichen sclerosus et atrophicus zu einer Rekrutierung von T-Zellen über Typ I Interferone und die durch sie verursachte Aktivierung der T-Zellen über den Rezeptor CXCR3 und seinen Liganden IP10 / CXCL10 kommt, erneut bestätigt.

4.7 Modell der Pathogenese der chronischen Inflammation im Lichen sclerosus et atrophicus

In dieser Studie zeigt sich, dass es sich beim Lichen sclerosus et atrophicus um eine vermutlich autoimmun vermittelte Erkrankung handelt, bei der T-Lymphozyten im entzündlichen Infiltrat dominieren. Es wurde durch die immunhistochemische Analyse durch die Marker GrB und Tia beobachtet, dass es sich bei der Mehrzahl der T-Lymphozyten um zytotoxische Lymphozyten handelt. Diese zytotoxischen Lymphozyten trugen den Chemokinrezeptor CXCR3 auf ihrer Oberfläche. Dieser Beweis wird zum ersten Mal in dieser vorliegenden Arbeit geliefert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Entzündung durch die Anwesenheit von Typ I Interleukinen und den daraufhin exprimierten Chemokinen IP10 / CXCL10 über den Rezeptor CXCR3 aufrechterhalten wird.

Beim Lichen sclerosus et atrophicus handelt es sich um eine Erkrankung mit einer chronischen Inflammation. Die Ursache für die Ausschüttung der Typ I Interferone ist bis jetzt noch nicht geklärt. Unbekannte Antigene könnten für die Entstehung von Autoantikörpern von Bedeutung sein. Die Mehrzahl der Typ I Interferone stammen aus plasmazytoiden dendritischen Zellen. Die Typ I Interferone sind in der Lage, die zytotoxische Kapazität von zirkulierenden Lymphozyten zu steigern. Außerdem induzieren sie sowohl die Produktion antiviraler Proteine wie MxA (Weber et al., 2004), als auch die der Chemokine MIG / CXCL9, IP10 / CXCL10 und I-TAC / CXCL 11, welche Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3 sind (Clark-Lewis et al., 2003). Diese Chemokine wiederum sind verantwortlich für die Rekrutierung von CXCR3-positiven zytotoxischen Lymphozyten und plasmazytoiden dendritischen Zellen in die Haut.

So ergeben sich in der Theorie drei verschiedene selbst-rekrutierende Mechanismen, wie die chronische Entzündung beim Lichen sclerosus et atrophicus aufrecht erhalten wird.

Erstens wurde gezeigt, dass CXCR3-positive Lymphozyten selbst das Chemokin IP10 / CXCL10 in ihrer Granula beinhalten. So können die Chemokine direkt im entzündeten Gewebe von den zytotoxischen Lymphozyten abgegeben werden. Dadurch verstärken sie sich selbst und es kommt zu einer Selbst-Rekrutierung der Lymphozyten in den entzündlichen Läsionen. Dies wurde bereits für die Pathogenese des Lichen planus diskutiert (Iijima et al., 2003).

Zweitens besitzen plasmazytoide dendritische Zellen die Möglichkeit, eine große Menge an Typ I Interferonen zu produzieren, welche in der Lage sind zytotoxische Zellen zu aktivieren (Cella et al., 1999; Fitzgerald-Bocarsly, 1993; Ronnblom et al., 2003). In den Läsionen des LSA wurde eine erhebliche Anzahl von plasmazytoiden dendritischen Zellen nachgewiesen. So ist erneut ein rekrutierender Prozess innerhalb der Läsion möglich.

Drittens führt die Inflammation in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus durch zytotoxische Lymphozyten zur Zerstörung von Zellen oder zu einer gestörten Apoptose der Zielzellen. Durch diesen Prozess könnte die Expression proinflammatorischer Mediatoren in den entzündlichen Arealen hervorgerufen werden und es könnte erneut zur Rekrutierung von Entzündungszellen kommen.

5. Zusammenfassung

Der Lichen sclerosus et atrophicus (LSA) ist eine chronisch-entzündliche Dermatose mit nicht vollständig geklärter Ätiologie, wahrscheinlich handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung. Histologisch ist die Erkrankung durch das Bild einer so genannten „Interface-Dermatitis“ charakterisiert, bei der Lymphozyten in die obere Dermis migrieren und die basale Epidermis infiltrieren sowie möglicherweise (bisher unidentifizierte) LSA-assoziierte Antigene destruieren. Langfristig führt dies zur Hyalinisierung der oberen Dermis mit Verlust funktioneller Eigenschaften der Haut.

Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es zu untersuchen, ob beim Lichen sclerosus et atrophicus Typ I Interferon-assoziierte proinflammatorische Mechanismen eine pathogenetische Rolle zur Rekrutierung von Effektorzellen in die Läsionen spielen. Dieses konnte in zurückliegenden Studien für zahlreiche verwandte Krankheitsbilder, wie den kutanen Lupus erythematoses und den Lichen ruber, gezeigt werden.

Wir haben LSA-Hautbiopsien auf das Vorliegen entsprechender Entzündungsmuster untersucht, dazu wurden Hautproben von insgesamt 11 LSA Patienten sowie geeigneter Kontrollen (jeweils 5 Proben: Lupus erythematoses, atopische Dermatitis, gesunde Haut) immunhistologisch charakterisiert.

In den LSA-Hautproben konnte eine überwiegend T-zelluläre Immunreaktion gezeigt werden, bei der die Rekrutierung CXCR3+ zytotoxischer Effektor-Zellen über die Induktion IFN-induzierbarer Chemokine (CXCL10) beteiligt war. CXCL10 wurde von Keratinozyten in genau den basalen Epidermisbereichen exprimiert, in welche die zytotoxischen Zellen infiltrierten. Interessanterweise konnte zudem erstmals gezeigt werden, dass zahlreiche infiltrierende Lymphozyten selbst das Chemokin CXCL10 in ihrer Granula tragen. Diese könnten einen wichtigen Mechanismus zur „Selbstrekrutierung“ dieser Zellen darstellen und somit zum typischen chronischen Verlauf der Erkrankung beitragen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Extragenitale Manifestationen des Lichen sclerosus et atrophicus	9
Abb. 2: Genitale Manifestationen des Lichen sclerosus et atrophicus	10
Abb. 3: Expression der Marker CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 in der gesunden Haut (HC), dem Lichen sclerosus et atrophicus (LSA), dem chronisch-diskoiden Lupus erythematoses (CDLE) und der atopischen Dermatitis (AD).	34
Abb. 4: Repräsentativer Befund CD3-positiver Zellen in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus in 200-facher (a) und 400-facher (b) Vergrößerung.	34
Abb. 5: Anwesenheit der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen in Biopsien der gesunden Haut (a), des Lichen sclerosus et atrophicus (b), des chronisch-diskoiden Lupus erythematoses (c) und der atopischen Dermatitis (d) in 200-facher Vergrößerung.	35
Abb. 6: Expression der Marker GrB und Tia-1 in der gesunden Haut (HC), dem Lichen sclerosus et atrophicus (LSA), dem chronisch-diskoiden Lupus erythematoses (CDLE) und der atopischen Dermatitis (AD).	36
Abb. 7: Expression des zytotoxischen Markers Tia-1 in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus in 200-facher (a) und 1000-facher (b) Vergrößerung.	37
Abb. 8: Expression des Markers MxA in der Epidermis und im Infiltrat in der gesunden Haut (HC), dem Lichen sclerosus et atrophicus (LSA), dem chronisch-diskoiden Lupus erythematoses (CDLE) und der atopischen Dermatitis (AD).	38
Abb. 9: Expression des Markers MxA in den Biopsien der gesunden Haut (a), des Lichen sclerosus et atrophicus (b), des chronisch-diskoiden Lupus erythematoses (c) und der atopischen Dermatitis (d) in 200-facher Vergrößerung.	39
Abb. 10: Korrelation der MxA-Expression und der CD3-positiven T-Zellen in den Biopsien des Lichen sclerosus et atrophicus.	40
Abb. 11: Nachweis von 123-positiven plasmazytoiden dendritischen Zellen in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus in 400-facher und 1000-facher Vergrößerung.	41
Abb. 12: Expression des Markers CXCR3 in der gesunden Haut (HC), dem Lichen sclerosus et atrophicus (LSA), dem chronisch-diskoiden Lupus erythematoses (CDLE) und der atopischen Dermatitis (AD).	42
Abb. 13: Nachweis der Ko-Expression von CXCR3 und Tia-1 in Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus durch Doppelfärbungen in 400-facher (a) und 1000-facher (b) Vergrößerung.	43
Abb. 14: Charakteristischer Befund der starken Expression von IP10 / CXCL10 in den Läsionen des Lichen sclerosus et atrophicus in 400-facher (a) und 1000-facher (b) Vergrößerung.	44
Abb. 15: Expression des Markers IP10 / CXCL10 in der gesunden Haut (HC), dem Lichen sclerosus et atrophicus (LSA), dem chronisch-diskoiden Lupus erythematoses (CDLE) und der atopischen Dermatitis (AD).	45

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geschlecht und Alter der Patienten sowie Lokalisation der Gewebeläsionen der verwendeten Biopsien.	24
Tab. 2: Verwendete Antikörper mit zugehörigem Klon, Hersteller und etablierter Verdünnung.	25
Tab. 3: Vorbehandlungen der verwendeten Antikörper.	28
Tab. 4: Analyse der Korrelation der Marker CD3, MxA, CXCR3 und IP10 / CXCL10 mittels Spearmans rho.	46

8. Literaturverzeichnis

01. Altmeyer P, Bacharach-Buhles M. Springer Enzyklopädie Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin. Heidelberg; Springer Verlag 2009
02. Arnheiter H, Frese M, Kambadur R, Meier E, Haller O. Mx transgenic mice - animal models of health. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 206: 119-147
03. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines—CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; 55: 97-179
04. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 675-705
05. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-568
06. Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 2001; 250: 91-104
07. Basler CF, Garcia-Sastre A. Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion. *Int Rev Immunol* 2002; 21: 305-337
08. Bottazzi B, Walter S, Govoni D, Colotta F, Mantovani A. Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of murine melanoma. *J Immunol* 1992; 148: 1280-1285
09. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgorf W, Landthaler M. *Dermatologie, Venerologie* 5. Auflage. Heidelberg; Springer Verlag 2005: 686 – 689
10. Carli P, Cattaneo A, Pimpinelli N, Cozza A, Bracco G, Gianotti B. Immunohistochemical evidence of skin immune system involvement in vulvar lichen sclerosus et atrophicus. *Dermatologica* 1991; 182: 18-22
11. Carlson JA, Lamb P, Malfetano J, Ambros RA, Mihm MC Jr. Clinicopathologic comparison of vulvar and extragenital lichen sclerosus: histologic variants, evolving lesions, and etiology of 141 cases. *Mod Pathol* 1998; 11: 844-854
12. Carlson JA, Grabowski R, Chichester P, Paunovich E, Malfetano J. Comparative immunophenotypic study of lichen sclerosus; epidermotropic CD57+ lymphocytes are numerous – implications for pathogenesis;. *Am J Dermatopathol* 2000; 22: 7-16

13. 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
14. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-621
15. Clark-Lewis I, Mattioli I, Loetscher P. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* 2003; 278: 289-295
16. Crowson AN, Magro C. The cutaneous pathology of lupus erythematosus: a review. *J Cutan Pathol* 2001; 28: 1-23
17. De Vito JR, Merogi AJ, Vo T, Boh EE, Fung HK, Freeman SM, Cockerell C, Stewart K, Marrogi AJ. Role of *Borrelia burgdorferi* in the pathogenesis of morphea/scleroderma and lichen sclerosus et atrophicus: a PCR study of thirty five cases. *J Cutan Pathol* 1996; 23: 350-358
18. Farrell AM, Marren P, Dean D, Wojnarowska F. Lichen sclerosus: Evidence that immunological changes occur at all levels of skin. *Br J Dermatol* 1999; 140: 1087-1092
19. Fischer G, Spurrett B, Fischer A. The chronically symptomatic vulva: aetiology and management; *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102: 773-779
20. Fitzgerald-Bocarsly P. Human natural interferon alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 1993; 60: 39-62
21. 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
22. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI. Fitzpatrick's dermatology in general medicine sixth edition. McGraw-Hill Companies 2003: 1110-1113
23. Friedrich EG Jr., Kalra PS. Serum levels of sex hormones in vulvar lichen sclerosus, and the effect of topical testosterone. *N Engl J Med* 1984; 310: 488-491
24. Fritsch P. *Dermatologie, Venerologie* 2. Auflage. Berlin; Springer Verlag 2004: 513-515

25. Fujiwara H, Fujiwara K, Hashimoto K, Mehregan AH, Schaumburg-Lever G, Lange R, Schempp C, Gollnick H. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA (*B. garini* or *B. afzelii*) in morphea and lichen sclerosus et atrophicus tissues of German and Japanese but not of US patients. *Arch Dermatol* 1997; 133: 41-44
26. Gao XH, Barnardo MC, Winsey S, Ahmad T, Cook J, Agudelo JD, Zhai N, Powell JJ, Fuggle SV, Wojnarowska F. The association between HLA DR, DQ antigens, and vulval lichen sclerosus in the UK: HLA DRB112 and its associated DRB112/DQB10301/04/09/010 haplotype confers susceptibility to vulval lichen sclerosus, and HLA DRB10301/04 and its associated DRB10301/04/DQB10201/02/03 haplotype protects from vulval lichen sclerosus. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 895-899
27. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000; 81: 2341-2364
28. Griffiths GM, Mueller C. Expression of perforin and granzymes in vivo: Potential diagnostic markers for activated cytotoxic cells. *Immunol Today* 1991; 12: 415-419
29. Gross T, Wagner A, Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U. Identification of TIA-1+ and granzyme B+ cytotoxic T cells in lichen sclerosus et atrophicus. *Dermatology* 2001; 202: 198-202
30. Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 2002; 3: 710-770
31. Hallopeau H. Lichen planus sclereux. *Ann Dermatol Syph* 1889; 10: 447-449
32. Hansson M, Romero A, Thoren F, Hermodsson S, Hellstrand K. Activation of cytotoxic lymphocytes by interferon-alpha: role of oxygen radical-producing mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 1207-1213
33. Harrington CI, Dunsmore IR. An investigation into the the incidence of autoimmune disorders in patients with lichen sclerosus et atrophicus. *Br J Dermatol* 1981; 104: 563-566

34. Iijima W, Ohtani H, Nakayama T, Sugawara Y, Sato E, Nagura H, Yoshie O, Sasano T. Infiltrating CD8+ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP10/CXCL10 in their cytotoxic granules: a potential self-recruiting mechanism. *Am J Pathol* 2003; 163: 261-268
35. Jasaitiene D, Valiukeviciene S, Vaitkiene D, Jievaltas M, Barauskas V, Gudinaeviciene I, Franke I, Gollnick H. Lichen sclerosus et atrophicus in pediatric and adult male patients with congenital and acquired phimosis. *Medicina (Kaunas)* 2008; 44: 460-466
36. Jinquan T, Quan S, Feili G, Larsen CG, Thestrup-Pedersen K. Eotaxin activates T cells to chemotaxis and adhesion only if induced to express CCR3 by IL-2 together with IL-4. *J Immunol* 1999; 162: 4285-4292
37. Kamarashev JA, Vassileva SG. Dermatologic diseases of the vulva. *Clin Dermatol* 1997; 15: 53-65
38. Kerl H, Garbe C, Cerroni L, Wolff HH. *Histopathologie der Haut*. Berlin; Springer Verlag 2003
39. Kizer WS, Prarie T, Morey AF. Balanitis xerotica obliterans: epidemiologic distribution in an equal access health care system. *South Med J* 2003; 96: 9-11
40. Klier CM, Nelson PJ. Chemokine-induced extravasation of MonoMac 6 cells: chemotaxis and MMP activity. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 878: 575-577
41. Koenig A, Krenn V, Toksoy A, Gerhard N, Gillitzer R. Mig, GRO alpha and RANTES messenger RNA expression in lining layer, infiltrates and different leucocyte populations of synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Virchows Arch* 2000; 436: 449-458
42. Lamkhioued B, Garcia-Zepeda EA, Abi-Younes S, Nakamura H, Jedrzakiewicz S, Wagner L, Renzi PM, Allakhverdi Z, Lilly C, Hamid Q, Luster AD. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 expression in the airways of patients with asthma. Induction in epithelial cells and mononuclear cells by proinflammatory cytokines. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 723-732

43. Lamkhioed B, Abdelilah S, Hamid Q, Mansour N, Delespesse G, Renzi PM. The CCR3 receptor is involved in eosinophil differentiation and is up-regulated by Th2 cytokines in CD34+ progenitor cells. *J Immunol* 2003; 170: 537-547
44. Leung DY, Bieber T. Atopic dermatitis. *Lancet* 2003; 361: 151-160
45. Liu L, Callahan MK, Huang D, Ransohoff RM. Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. *Curr Top Dev Biol* 2005; 68: 149-181
46. 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
47. Lukowsky A, Muche JM, Sterry W, Audring H. Detection of expanded T cell clones in skin biopsy samples of patients with lichen sclerosus et atrophicus by T cell receptor-gamma polymerase chain reaction assays. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 254-259
48. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 1985; 315: 672-676
49. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445
50. Marren P, Yell J, Charnock FM, Bunce M, Welsh K, Wojnarowska F. The association between lichen sclerosus and antigens of the HLA system. *Br J Dermatol* 1995; 132: 197-203
51. Meller S, Winterberg F, Gilliet M, Mueller A, Lauceviciute I, Rieker J, Neumann NJ, Kubitza R, Gombert M, Bünemann 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 leucocyte recruitment: An amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1504-1516
52. Meyrick Thomas RH, Ridley CM, McGibbon DH, Black MM. Lichen sclerosus et atrophicus and autoimmunity - a study of 350 women. *Br J Dermatol* 1988; 188: 41-46
53. Modi WS, Chen ZQ. Localization of the human CXC chemokine subfamily on the long arm of chromosome 4 using radiation hybrids. *Genomics* 1998; 47: 136-139

54. Mollet L, Sadat-Sowti B, Duntze J, Leblond V, Bergeron F, Calvez V, Katlama C, Debre P, Autran B. CD8hi+ CD57+ T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity. *Int Immunol* 1998; 10: 311-323
55. Naruse K, Ueno M, Satoh T, Nomiya H, Tei H, Takeda M, Ledbetter DH, Coillie EV, Opdenakker G, Gunge N, Sakaki Y, Iio M, Miura R. A YAC contig of the human CC chemokine genes clustered on chromosome 17q11.2.. *Genomics* 1996; 34: 236-240
56. Neill SM, Ellis JP, Pembroke AC, Staughton RCD. The cytokeratin profile of normal vulval epithelium and vulval lichen sclerosus. *Br J Dermatol* 1990; 123: 62
57. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: 7-28
58. Oyama N, Chan I, Neill SM, Hamada T, South AP, Wessagowit V, Wojnarowska F, D´Cruz D, Hughes GJ, Black MM, McGrath JA. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. *Lancet* 2003; 362: 118-123
59. Oyama N, Chan I, Neill SM, South AP, Wojnarowska F, Kawakami Y, D´Cruz D, Mepani K, Hughes GJ, Bhogal BS, Kaneko F, Black MM, McGrath JA. Development of antigen-specific ELISA for circulating autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. *J Clin Invest* 2004; 113: 1550-1559
60. Padovan E, Spagnoli GC, Ferrantini M, Heberer M. IFN- α 2a induces IP10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhanced their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 669-676
61. 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
62. Regauer S, Reich O, Beham-Schmid C. Monoclonal gamma-T-cell receptor rearrangement in vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 2002; 160: 1035-1045

63. Ronnblom L, Eloranta ML, Alm GV. Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity. *Autoimmunity* 2003; 36: 463-472
64. Rovin BH. Chemokine blockade as a therapy for renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9: 225-232
65. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998a; 19: 568-574
66. 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* 1998b; 187: 875-883
67. Schuerwegh AJ, De Clerck LS, De Schutter L, Bridts CH, Verbruggen A, Stevens WJ. Flow cytometric detection of type I (IL-2, IFN-gamma) and type II (IL-4, IL-5) cytokines in T-helper and T-suppressor/cytotoxic cells in rheumatoid arthritis, allergic asthma and atopic dermatitis. *Cytokine* 1999; 11: 783-788
68. Shimizu M, Higaki Y, Higaki M, Kawashima M. The role of granzyme B – expressing CD8-positive T cells in apoptosis of keratinocytes in lichen planus. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 527-532
69. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Antonenko S, Liu YJ. The nature of principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835-1837
70. Simon A, Faeh J, Haller O, Staeheli P. Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines. *J Virol* 1991; 65: 968-971
71. Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroffe MN. Expression of the beta chemokine-receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol* 2000; 108: 192-200
72. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314
73. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001; 2: 129-134
74. Vaddi K, Newton RC. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines; *J Immunol* 1994; 153: 4721-4732

75. Vermeer MH, van Doorn R, Dukers D, Bekkenk MW, Meijer CJ, Willemze R. CD8+ T cells in cutaneous T-cell lymphoma; expression of cytotoxic proteins, Fas Ligand, and killing inhibitory receptors and their relationship with clinical behavior. *J Clin Oncol* 2001; 19: 4322-4329
76. Vessey MP, Lawless M. The Oxford-Family Association contraceptive study. *Clin Obstet Gynaecol.* 1984; 11: 743-757
77. Wakelin SH, Marren P. Lichen sclerosis in women. *Clin Dermatol* 1997; 15: 155-169
78. Wallace HJ. Lichen sclerosis et atrophicus. *Trans St Johns Hosp Dermatol Soc* 1971; 57: 9-30
79. Weber F, Kochs G, Haller O. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol* 2004; 17: 498-515
80. Wenzel J, Woerenkaemper E, Freutel S, Henze S, Haller O, Bieber T, Tueting T. Enhanced type 1 interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol* 2005a; 205: 435-442
81. Wenzel J, Uerlich M, Woerenkaemper E, Freutel S, Bieber T, Tueting T. Scarring skin lesions of discoid lupus erythematosus are characterized by high numbers of skin-homing cytotoxic lymphocytes associated with strong expression of the type 1 interferon-induced protein MxA. *Br J Dermatol* 2005b; 153: 1011-1015
82. Wenzel J, Henze S, Woerenkaemper E, Basner-Tschakarjan E, Sokolowska-Wojdylo M, Steitz J, Bieber T, Tüting T. Role of chemokine receptor CCR4 and its ligands thymus- and activation-regulated chemokine/CCL17 for lymphocyte recruitment in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* 2005c; 124: 1241-1248
83. Wenzel J, Scheler M, Proelss J, Bieber T, Tueting T. Type 1 interferon-associated cytotoxic inflammation in lichen planus. *J Cut Pathol* 2006; 33: 672-678
84. Zernecke A, Weber C. Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease. *Basic Res Cardiol* 2005; 100: 93-101

9. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn P.D. Dr. med. Jörg Wenzel für das Überlassen des Promotionsthemas, für die immer konstruktive Kritik, die Motivation und Betreuung über die gesamte Dauer der Arbeit.

Ebenso gilt mein Dank Sandra Mikus, Dr. med Andreas Wiechert und dem ganzen Team des histologischen Forschungslabors, die mir die Arbeit im Labor und am Mikroskop näher gebracht haben.

Vielen Dank auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer motiviert und unterstützt haben.