

**CXCR3 Liganden  
vermittelte Hautentzündung bei kutaner  
lichenoider Graft-versus-Host Disease**

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

**Svenja Eleonore Lucas**

**aus Bonn**

**2015**

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Wenzel

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Peter Fischer

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.03.2015

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

Direktor: Prof. Dr. Dr. T. Bieber

Für meine Eltern Elfrun und Manuel Lucas



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	7
1. Einleitung.....	9
1.1 Graft-versus-host Disease .....	10
1.1.1 Klinik und Histologie der GvHD .....	10
1.1.2 Pathophysiologie der GvHD .....	16
1.1.2.1 Die Pathophysiologie der akuten GvHD .....	16
1.1.2.2 Die Pathophysiologie der chronischen GvHD.....	18
1.2 Immunpathologie „interface dermatitis“ .....	20
1.2.1 Der Lichen Ruber Planus .....	20
1.2.2 Der Kutane Lupus Erythematodes .....	21
1.3 Bedeutung und Funktion der Chemokine .....	23
1.4 CXCR3 und seine Liganden .....	25
1.5 Bedeutung und Funktion der Interferone .....	27
1.6 Rekrutierung von Lymphozyten in die Haut - Skin Homing .....	28
2. Arbeitshypothese.....	32
3. Patienten und Methoden .....	34
3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE Färbung) .....	34
3.2 Perjodsäure-Schiffsche-Reagenz-Färbung (PAS-Färbung) .....	35
3.3 Histologie und Immunhistologie.....	35
3.4 Statistik.....	39

4.	Ergebnisse .....	40
4.1	T-zelluläre Entzündungen bei der lichenoiden Graft-versus-Host Disease .....	40
4.2	Läsionale Expression von Typ I IFN assoziierten Chemokinen bei der lichenoiden Graft-versus-Host Disease .....	47
5.	Diskussion .....	54
5.1	Effektorzellen der lichenoiden Graft-versus-Host Disease .....	54
5.2	CXCR3 – Liganden gestützte Rekrutierung von T-Lymphozyten im Rahmen der lichenoiden Graft-versus-Host Disease .....	56
5.3	Die Rolle der Typ I Interferone bei der lichenoiden Graft-versus-Host Disease .....	58
5.4	Synthese .....	60
6.	Zusammenfassung .....	61
7.	Abbildungsverzeichnis .....	62
8.	Literaturverzeichnis .....	63
9.	Danksagung .....	73
10.	Lebenslauf .....	74

## Abkürzungsverzeichnis

aGvHD	akute GvHD
APC	Antigen-Präsentierende Zellen
Aqua dest.	Aqua destilliert
BMT	Knochenmarktransplantation
cGvHD	chronische GvHD
CLE	kutaner Lupus erythematodes
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CXCR3	Chemokinrezeptor 3 der Cx Chemokine
DC	Dendritische Zellen
Fas/L	Fas Ligand
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen - Kolonie-stimulierender Faktor
GrB	Granzym B
GvHD	Graft-versus-Host disease
GVL	Graft versus Leukämie
HEV	Hochendothel Venen
HLA	Humanleukozytenantigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP 10	CXCL10, IFN induziertes Protein 10
KOF	Körperoberfläche
liGvHD	lichenoide GvHD
LE	Lupus erythematodes
LP	Lichen ruber planus
LPS	Lipopolysaccharide

LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin Methode
MHC	Major histokompatibilitäts antigen
Mig	CXCL9, Monokin induziert durch IFN, Chemokin
MiH	Minor-Histoantigen
MxA	Antivirales Mx Protein A, spezifischer Typ I IFN Marker
NK	Natürliche Killerzellen
pDC	plasmazytoide Dendritische Zellen
scGVHD	sklerodermiforme GVHD
SCLE	subakut kutaner Lupus erythematodes
SCT	Stammzelltransplantation
SLE	systemischer Lupus erythematodes
Str.	Stratum
TGF $\beta$	Tumor growth factor
Th	T- Helferzelle
Tia1	zytotoxisches Molekül
TNF	Tumor Nekrose Faktor



## 1. Einleitung

Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist, die immunologischen Prozesse der Graft-versus-Host Disease (GvHD) aufzuklären, da diese bisher nicht bekannt waren. Die pathophysiologischen Mechanismen welche ursächlich für Hautschäden bei der GvHD sind, wurden bislang nicht identifiziert. Unser Ziel war zu untersuchen, inwieweit ähnliche Mechanismen wie bei anderen immunologisch vermittelten Hauterkrankungen (Lichen Planus, Lupus erythematoses) vorliegen. Hierbei ist eine Interaktion des Chemokinrezeptors CXCR3 und seiner Liganden von zentraler Bedeutung (vgl. Lacotte et al., 2009; Wenzel et al., 2006 ; 2005c ; 2005e, 2009).

Die Graft-versus-Host Disease (GvHD) ist eine immunologisch vermittelte Reaktion nach einer Stammzell- oder Knochenmarkstransplantation. Die GvHD ist eine Multiorganerkrankung welche durch Spender T-Zellen initiiert wird. Die Patienten erhalten Transplantate von major histokompatiblen (MHC) Spendern. Die Spender-T-Zellen erkennen jedoch Empfänger-Peptide welche von Minor Histokompatiblen Antigenen (MiH) stammen.

Im Allgemeinen wird zwischen zwei Typen der GvHD unterschieden. Die akute GvHD tritt innerhalb der ersten 100 Tage nach der Transplantation auf (i.d.R. zwischen dem 7. und 21. Tag). Bei einem Auftreten nach dem 100. Tag, spricht man von einer chronischen GvHD (Fimiani et al., 2003). Die akute GvHD befällt 60-90 % der Patienten, die chronische GvHD tritt bei 30-50 % der Transplantatempfänger auf (Fimiani et al., 2003). Unter der aGvHD kommt es zu Fieber, Hautausschlag, erhöhten Leberwerten sowie gastrointestinalen Symptomen. Die kutane Beteiligung bei der cGvHD umfasst lichenoiden und/ oder sklerodermiforme Veränderungen. Die lichenoiden GvHD (liGvHD) ähnelt den Hautläsionen des Lichen Planus (LP) sowohl klinisch als auch histologisch.

Die Pathophysiologie der cGvHD ist ein sehr komplexes Zusammenspiel aus vielen verschiedenen Faktoren. Es ist unklar, welche Zelltypen Haupteffektoren einer chronischen GvHD sind. Im Tierversuch verursachen T-Zellen Schäden im Rahmen einer cGvHD entweder durch direkte zytolytische Wirkung (CD8<sup>+</sup>/T<sub>h</sub>1-basiert), Sekretion inflammatorischer Zytokine (Lee et al., 2003) oder durch B-Zell Aktivierung und der Produktion von Autoantikörpern (CD4<sup>+</sup>/ T<sub>h</sub>2-basiert)(vgl. Lee, 2005). Die genauen immunologischen Prozesse im Rahmen einer GvHD sind noch weitgehend ungeklärt.

Obwohl es sich um eine allogene Reaktion handelt, ähnelt die GvHD sowohl klinisch als auch histologisch verschiedenen Autoimmunerkrankungen mit kutaner Beteiligung wie dem Lichen Planus und dem kutanen Lupus Erythematoses. Jüngere Studien zeigen, dass autoreaktive zytotoxische T-Zellen für die Läsionen im Rahmen dieser Erkrankungen verantwortlich sind (Blazar et al., 2012; Iijima et al., 2003 ; Sugeran et al., 2000).

Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine Typ I Interferon (IFN) assoziierte Rekrutierung von zytotoxischen Lymphozyten via Interaktion des Chemokinrezeptors CXCR3 und seiner Liganden Mig/CXCL9, IP10/CXCL10 und I-TAC/CXCL11 an der Pathogenese verschiedener kutaner T-zellulärer Autoimmunerkrankungen wie dem LP und dem CLE, welche durch eine Interface-Dermatitis charakterisiert sind, beteiligt ist (vgl. Wenzel et al., 2006 ; 2005c ; 2005e).

Ausgehend von den histopathologischen Ähnlichkeiten der lichenoiden GvHD zu anderen kutanen Erkrankungen wie dem LP und dem CLE, für die eine Rolle der CXCR3 – Liganden Interaktion im pathophysiologischen Prozess beschrieben wurde, gingen wir der Frage nach, ob ähnliche Wirkmechanismen an der Entstehung von Hautschäden im Rahmen einer lichenoiden GvHD beteiligt sind.

## **1.1 Graft-versus-Host Disease**

Die Graft-versus-Host Disease (GvHD) ist eine immunologisch vermittelte Reaktion nach einer Stammzell-(SCT) oder Knochenmarkstransplantation. Sie wird allerdings auch nach Transfusionen von unbestrahlten leukozytenhaltigen Blutprodukten, sowie nach Organtransplantationen im Allgemeinen beobachtet (Karrer et al., 2001; Karrer, 2003).

### **1.1.1 Klinik und Histologie der GvHD**

Bei der akuten GvHD treten als erstes vor allem Hautveränderungen auf, die den anderen Erscheinungen vorausgehen. Diese Hautveränderungen manifestieren sich durch Juckreiz, Druckschmerzhaftigkeit, sowie vor allem Exantheme an den Handflächen, Fußsohlen und an der Retroaurikulärregion (Fritsch, 2003; Gilliam, 2004). Die orale Schleimhaut ist ebenfalls betroffen und zeigt weiße Papeln oder blasse netzartige Streifen (Ziener und Montemurro, 2004). Die Hautveränderungen bei der GvHD können sehr

unterschiedlich ausfallen. Das Exanthem kann sich als makulopapulös, purpuriform, folliculitisartig, morbilliform oder skarlatiniform darstellen (Karrer et al., 2001). Das perifollikuläre papulöse Exanthem wird von manchen Autoren als charakteristisch für die GvHD bezeichnet (Karrer et al., 2001). Die Exantheme können zusammenfließen in ein konfluierendes Erythem und im Extremfall können sich Blasen bilden, welche aufplatzen und die Klinik des Lyell-Syndroms zeigen (Gilliam, 2004; Ziemer und Montemurro, 2004). Die Exantheme bei der akuten GvHD können oft von einem Virusexanthem, einer Bestrahlungsdermatitis oder einem Arzneimittelexanthem nicht unterschieden werden, so dass es keine sicheren Zeichen für eine akute GvHD gibt.

Neben der Haut sind vor allem die Leber und der Gastrointestinaltrakt Zielorgane der GvHD (Gilliam, 2004). Eine Lebermitbeteiligung zeigt sich durch erhöhte Leberwerte (Bilirubin, alkalische Phosphatase, etc.) sowie durch eine mögliche Hepatomegalie. Die Beteiligung des Darmtraktes manifestiert sich klinisch in Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe. Bei einem schweren Verlauf der GvHD kann es zu einem akuten Abdomen, Schmerzen und einem Ileus kommen (Karrer et al., 2001). Obwohl die Haut bei der akuten GvHD meist als erstes geschädigt wird, können auch die Darm- oder Lebererscheinungen zuerst auftreten oder kommen manchmal sogar isoliert vor (Karrer et al., 2001).

Die Läsionen der akuten GvHD sind histologisch durch eine Interface-Dermatitis mit zytotoxischem „junctional band-like“ Infiltrat und Verflüssigung der basalen Schicht charakterisiert. Außerdem zeigt die Epidermis eine vakuolisierende Degeneration der basalen Keratinozyten. Die nekrotischen Keratinozyten sind von zahlreichen Lymphozyten umgeben, die sogenannten „Satellitenzellnekrosen“. Die Dermis zeigt ein relativ spärliches perivaskulär betontes entzündliches Infiltrat (Karrer et al., 2001). Bei einem schweren Verlauf kommt es zu einer zytolytischen Spaltbildung der Basalschicht mit einer ausgeprägten Nekrose der Epidermis (Fritsch, 2003).

Um die akute GvHD prognostisch einschätzen zu können, wird klinisch zunächst das Ausmaß der Haut-, Leber- und Darmbeteiligung jeweils in vier Stadien eingeteilt (s. Tab. 1). Anhand der Stadieneinteilung wird die akute GvHD gemäß dem Ausmaß der Organbeteiligung in vier Schweregrade unterteilt (s. Tab.2).

Die Gradeinteilung korreliert mit den Überlebenschancen der betroffenen Patienten. Bei

Grad I überleben > 90 %, bei Grad II und III ca. 60 % und bei Grad IV versterben fast alle Patienten (Firoz et al., 2006). Langfristig überleben nur etwas mehr als 50 % der Patienten mit Grad II-IV. Um das Überleben der Patienten zu verlängern spielt die Früherkennung der akuten GvHD und eine gezielte Therapie eine extrem wichtige Rolle (Karrer et al., 2001).

Die chronische GvHD ist eine bedeutende Komplikation einer SCT und tritt bei 30-50 % aller Patienten auf (Fimiani et al., 2003). Die chronische GvHD kann unmittelbar aus der akuten GvHD hervorgehen. Dies ist die sog. Progressive Form (ca. 32 % der Fälle), welche die schlechteste Prognose aufweist. Sie kann nach einem krankheitsfreien Intervall nach der akuten GvHD auftreten, was man als intermediäre Form (ca. 36 % der Fälle) bezeichnet. Zuletzt kann eine cGvHD de novo (ca. 30 % der Fälle) auftreten, ohne vorausgegangene akute GvHD. Unter den drei Formen weist letztere die beste Prognose auf (Karrer et al., 2001).

Stadium	Haut Exanthem	Leber Bilirubin	Darm Diarrhöen
1	< 25 % der KOF	2-3 mg/dl	> 500 ml/d
2	25-50 % der KOF	3-6 mg/dl	> 1000 ml/d
3	> 50 % der KOF	6-15 mg/dl	> 1500 ml/d
4	Generalisiertes Exanthem mit Blasenbildung	> 15 mg/dl	Starke abdominelle Schmerzen mit oder ohne Ileus

Tab. 1: Stadieneinteilung der GvHD (vgl. Przepiorka et al., 1995; Firoz et al., 2006). Die Hauptzielorgane der GvHD sind Haut, Leber und Darm. Die Schäden an diesen Organen werden jeweils in vier verschiedene Stadien unterteilt. Die Beurteilung der Haut erfolgt anhand des von Exanthenen betroffenen Anteils der Kopfoberfläche (KOF). Das Ausmaß der Leberschäden wird durch den Bilirubin-Wert beschrieben (Der Referenzbereich für Gesamtbilirubin im Serum ist 0-1 mg/dl (Dormann et al., 2008)). Die Einteilung der Darmbeteiligung erfolgt anhand der Stärke der auftretenden Diarrhöen (maßgeblich ist hier das abgeführte Volumen in ml/Tag).

Grad	Schweregrad	Haut (Stadium gemäß Tab. 1)	Leber (Stadium gemäß Tab. 1)	Darm (Stadium gemäß Tab. 1)
I	gering	1-2	0	0
II	mittelgradig	3	1	1
III	Schwer	-	2-3	2-4
IV	lebensbedrohlich	4	4	-

Tab. 2: Gradeinteilung der GvHD (vgl. Przepiorka et al., 1995). Anhand der Stadieneinteilung der Haut-, Leber- und Darmschäden (Tab. 1) wird die GvHD in vier Schweregrade unterteilt. Ein bestimmter Schweregrad liegt vor, wenn die Schäden an mindestens einem der drei Zielorgane Haut, Leber und Darm das entsprechende Stadium erreicht haben. Ein geringer Schweregrad der GvHD liegt nur vor, wenn keine nennenswerten Leber- und Darmsymptome auftreten.

Eine chronische GvHD kann sich klinisch als limitierte oder extensive Form darstellen (Karrer et al., 2001). Zudem kann man zwischen einer lokalisierten Form, welche etwa 20% ausmacht und einer generalisierten Form, ca. 80 %, unterscheiden (Karrer et al., 2001). Bei der lokalisierten Form können die Hautveränderungen unilateral in den Dermatomen verlaufen oder sie folgen den Blaschko-Linien (Fimiani et al., 2003).

Die prädisponierenden Faktoren um eine chronische GvHD zu erleiden beinhalten eine akute GvHD in der Vorgeschichte, die angewandte Prophylaxe bei der akuten GvHD, der Humanleukozytenantigen- (HLA-) Unterschied zwischen Spender und Empfänger, ein Alter des Empfängers über 20 Jahre, Verwendung von Knochenmark mit vielen T-Zellen, eine zweite Knochenmarksinfusion, Transfusion von nicht bestrahlten Spender Leukozyten, ein weiblicher Spender für einen männlichen Empfänger, ein weiblicher Spender der schon schwanger war für einen männlichen Empfänger und zuletzt eine frühere Herpes- oder Cytomegalievirus Infektion (Fimiani et al., 2003).

Die Haut ist auch bei der chronischen GvHD in fast allen Fällen beteiligt und eignet sich daher am besten als diagnostisches Merkmal. Die am häufigsten betroffenen Organe sind

neben der Haut die Mundschleimhaut, die Leber, der Gastrointestinaltrakt, der Ösophagus, die Augen, der neuromuskuläre Apparat sowie der obere Respirationstrakt (Karrer et al., 2001).

Die kutane Beteiligung umfasst lichenoiden und/ oder sklerodermiforme Veränderungen. Die lichenoiden GvHD (liGvHD) ähnelt den Hautläsionen des Lichen Planus (LP) sowohl klinisch als auch histologisch. Die lokalisierte Form der chronischen GvHD verläuft meist unter dem Bild des Lichen Planus (Karrer et al., 2001). Die lichenoiden Läsionen treten meist in der frühen Phase der chronischen GvHD auf (Fimiani et al., 2003). Klinisch stellt sie sich mit leicht juckenden erythematösen oder lividen Papeln dar, welche sich gewöhnlich auf den Handflächen und Fußsohlen finden, sie können aber auch die Leisten- und Genitalgegend, den Stamm, die Ohren und die periorbitale Region betreffen (Fimiani et al., 2003). Wie beim Lichen Planus selbst, kommt es auch bei der liGvHD zu entsprechenden Mundschleimhautveränderungen (Ziemer und Montemurro, 2004). Es zeigen sich weißliche retikuläre Streifungen (Wickham-Streifung), Erosionen, Ulzerationen und eine Leukoplakie (Ziemer und Montemurro, 2004). Eine generalisierte Erythrodermie ist eine seltene aber heimtückische Komplikation (Fimiani et al., 2003). Kommt es zu einer starken Beteiligung der Mundschleimhaut kann es zu einem Sicca-Syndrom kommen (Karrer et al., 2001).

Die Prognose von Patienten mit liGvHD ist bei den Patienten am schlechtesten, welche alle die typischen histologischen Merkmale des Lichen Planus zeigen (Fimiani et al., 2003). Der Verlauf der liGvHD ist allerdings variabel. Sie kann sich stabilisieren, spontan zurückbilden oder in einigen Fällen in eine sklerodermiforme GvHD übergehen (Fimiani et al., 2003).

Die chronisch-sklerodermiforme GvHD ist die schwerste Form der chronischen GvHD (Karrer et al., 2001). Die sklerodermiformen Läsionen entwickeln sich meistens progressiv, lange nach einer akuten GvHD. Die Hautveränderungen entwickeln sich entweder auf gesunder Haut oder auf früher betroffenen lichenoiden Hautarealen. Auch hier kann man zwischen einer lokalisierten und einer generalisierten Form differenzieren (Fimiani et al., 2003). Meist sind bei der lokalisierten Form die Hautfalten, die Oberschenkel und der Stamm betroffen (Fimiani et al., 2003).

Die Hautläsionen manifestieren sich als erythematöse hyper-/hypopigmentierte verhärtete

te Plaques oder ähneln Morphea-artigen Hautveränderungen (Fimiani et al., 2003). Es können sich Kontrakturen bilden, die zur Einschränkung der Thoraxexkursionen führen (Karrer et al., 2001). Bei bis zu 40 % der Patienten finden sich auch Nagelveränderungen, wie Längsspaltung der Nägel, Atrophie, weiße Flecken oder der bleibende Nagelverlust (Karrer et al., 2001). Auch die Haare und Schweißdrüsen können betroffen sein. Bei Befall der Haare kann es zu einem vorzeitigem Ergrauen, einem Pigmentverlust oder zu einer vernarbenden Alopezie kommen (Karrer et al., 2001).

Vor allem sollten hier noch mal die Pigmentationsstörungen erwähnt werden, welche manchmal die einzigen klinischen Manifestationen einer chronischen GvHD sind (Karrer et al., 2001). Die Hyperpigmentierungen finden sich meist auf der Beugenseite. Hypopigmentierte Areale umfassen diffuse oder lokalisierte Vitiligo-ähnliche Läsionen (Fimiani et al., 2003). Die lokalisierte Form der sklerodermiformen chronischen GvHD kann selbstlimitierend sein oder in eine generalisierte Form übergehen (Fimiani et al., 2003).

Die Histologie der chronischen GvHD gleicht dem jeweiligen Krankheitsbild. Die lichenoiden GvHD ähnelt histologisch dem Lichen Planus, während die sklerodermiforme GvHD der Histologie der Sklerodermie gleicht. Bei der liGvHD zeigt sich histologisch eine vakuolisierende Degeneration der basalen Keratinozyten und eine Lymphozytenaggregation („Satellitenzellnekrosen“) in der Epidermis. In der Dermis zeigt sich ein bandförmiges lymphozytäres Infiltrat (Fritsch, 2003).

Für das Auftreten einer GvHD müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Die GvHD wurde erstmals 1955 von Barnes und Loutit als „secondary Disease“ beschrieben (Karrer et al., 2001). Im Jahr 1966 beschrieb Billingham die GvHD erstmals genauer und setzte folgende drei Kriterien für die Entwicklung einer GvHD fest: die GvHD tritt auf, wenn (a) das Transplantat immunkompetente Zellen enthält; (b) der Empfänger Gewebe Antigene exprimiert, welche nicht auf dem Transplantatgewebe vorhanden sind und (c) der Empfänger nicht im Stande ist eine effektive Immunantwort aufzubauen, um die transplantierten Spenderzellen effektiv zu eliminieren (Gilliam, 2004).

Natürlich spielen auch sehr viele andere Faktoren eine Rolle bei der Entstehung der GvHD. Es wurden verschiedene Risikofaktoren für die Entwicklung einer GvHD beobachtet. Der größte Risikofaktor ist die Histoinkompatibilität zwischen Spender und

Empfänger (Karrer et al., 2001). Daneben spielen der Spender-Empfänger Geschlechtsunterschied eine Rolle, ein höheres Alter des Empfängers, eine hohe Anzahl von transfundierten T-Zellen des Spenders, frühere Bluttransfusionen beim Empfänger, eine niedrige Konzentration der immunsupprimierenden Medikamente beim Empfänger und die Konditionierung (Gilliam, 2004).

## **1.1.2 Pathophysiologie der GvHD**

### **1.1.2.1 Die Pathophysiologie der akuten GvHD**

Die aGvHD ist ein alloreaktiver Prozess, der im Allgemeinen in einem Drei-Phasen-Modell beschrieben wird (Ferrara, 2000; Jaksch und Mattsson, 2005). Die erste Phase tritt auf, bevor der Wirt mit Spenderzellen in Kontakt getreten ist. In der ersten Phase treten durch die vor der Transplantation durchgeführte Konditionierung, in Form von Bestrahlung und Chemotherapie, Gewebeschäden beim Wirt auf. Durch diese Schäden kommt es zu einer Aktivierung des Gewebes des Empfängers und damit zu einer entzündlichen Reaktion. Das geschädigte Gewebe reagiert mit einer Ausschüttung von Entzündungsfaktoren wie Zytokinen, Chemokinen, Adhensionsmolekülen und Wachstumsfaktoren, wie Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF). Bei den typischen GvHD Zielorganen Haut, Leber und Darm handelt es sich um „Barrieren“ Organe die auf eine Gewebsverletzung besonders leicht mit einer entzündlichen Reaktion antworten (Ferrara, 2000).

Die wichtigsten Zytokine die in der initialen Phase der GvHD freigesetzt werden sind Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1). TNF- $\alpha$  und IL-1 initiieren die Freisetzung von Adhensionsmolekülen, kostimulierenden Molekülen und MHC Antigenen. Dies fördert die Aktivierung von wirtseigenen Dendritischen Zellen und die Erkennung von MHC und MiH Antigenen durch ausgereifte Spender T-Zellen.

TNF- $\alpha$  hat darüber hinaus direkte schädigende Wirkung auf die Darmschleimhaut, wodurch es zu einer vermehrten Freisetzung von Lipopolysacchariden (LPS) kommen kann. Diese können wiederum die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 durch Lymphozyten und Makrophagen verstärken (ebd.).

Die zweite Phase entspricht der Aktivierung und Proliferation der Spender-T-Zellen. Nach



der Transplantation spalten Antigenpräsentierende Zellen (APC) große wirtseigene Proteine in kleine Peptide, um diese in Verbindung mit MHC Molekülen auf der Oberfläche zu präsentieren. Durch die Präsentation durch APCs erkennen Spender-T-Zellen nun fremde Wirt-Antigene und proliferieren daraufhin. Die T-Zell Aktivierung bedingt eine Sekretion von Zytokinen und Chemokinen. Die Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  werden von aktivierten T-Zellen sezerniert. IL-2 ist ein wichtiger T-Zell Wachstumsfaktor der die klonale Vermehrung der T-Zellen und ihre Differenzierung zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) fördert (ebd.).

IFN- $\gamma$  ist ebenfalls am T-Zell Wachstum beteiligt. Es induziert die zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und Natürliche Killer (NK) Zell Antwort und fördert die Produktion der Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$ . Es führt zu verstärkter Ausprägung von Adhensionsmolekülen, Chemokinen und HLA-Molekülen und erleichtert so die Zellrekrutierung und Antigenpräsentation. Darüber hinaus hat IFN- $\gamma$  eine direkte gewebsschädigende Wirkung. Gleichzeitig ist IFN- $\gamma$  an der Regulierung der Immunantwort und der Fas-vermittelten Apoptose aktivierter T-Zellen beteiligt, indem es die Expression von Fas- Rezeptoren auf den T-Zellen induziert. Daneben senkt IFN- $\gamma$  die zur Produktion entzündlicher Zytokine durch Makrophagen nötige Anzahl an LPS und trägt zur Reifung der DCs bei (ebd.).

Ein zentrales Element bei der Entstehung der GvHD sind die Chemokine, welche im entzündlichen Gewebe unter anderem durch Monozyten oder Makrophagen gebildet werden und auf die Rekrutierung von Leukozyten an den Entzündungsort spezialisiert sind. Eine Beteiligung an der GvHD wurde insbesondere für die Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP-2 $\alpha$ , Mig (CXCL9), MCP-1, MCP-3 sowie für den Chemokinrezeptor CCR5 gezeigt (Jaksch und Mattsson, 2005).

Neben alloreaktiven T-Zellen sind auch Spender NK-Zellen an den Gewebsschäden beteiligt. Eine Aktivierung von Spender NK-Zellen erfolgt umso eher je größer der HLA Unterschied zwischen Spender und Empfänger ist. NK-Zellen schütten IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und NO aus und verstärken damit die Gewebsschäden bei der GvHD.

Die dritte Phase der akuten GvHD beschreibt die T-Zell vermittelte Zytotoxizität. Die aktivierten Spender T-Zellen verursachen auf verschiedenen Wegen einen Gewebeschaden. Die wichtigsten zytologischen Wege laufen über den Fas/Fas Ligand (FasL), den Perforin/Granzym B und direkte Zytokin vermittelte Schäden (Ferrara, 2000).

Der Fas Rezeptor genauso wie der Fas Ligand gehören zur Familie der TNF. Der Fas-Rezeptor wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Der Fas-Ligand kommt vorwiegend auf aktivierten T-Zellen vor. Bei Aufeinandertreffen von Fas-Rezeptor und Fas-Liganden kommt es zu einer Fas vermittelten Apoptose. Eine erhöhte Ausprägung von Fas/FasL bei der GvHD wurde mehrfach nachgewiesen (ebd). Das Perforin Molekül, welches durch Zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird, wird zusammen mit Granzymen und anderen Proteinen in zytotoxischen Granula gespeichert. Perforin besitzt die Fähigkeit in den Ziel-Zell-Membranen Kanäle zu bilden, was den Granzymen erlaubt in die Ziel-Zelle einzudringen. Hier aktivieren sie eine Caspase Kaskade, welche zur Apoptose und damit letztendlich zum Zelltod führt.

In einer Studie von Graubert et al. (1996) zeigten diese, dass für MHC-Klasse-I vermittelte GvHD primär der Perforin/Granzym B Mechanismus von Bedeutung ist, während bei der MHC-Klasse-II Unterschieden vor allem die Fas/FasL vermittelte Apoptose eine Rolle spielt. Jedoch sind weder CD4<sup>+</sup> noch CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf einen dieser zytolytischen Wege beschränkt.

Neben der direkten T-Zell vermittelten Zytotoxizität kommt es auch in der dritten Phase zu weiteren Gewebsschäden durch entzündliche Zytokine. Hier ist vor allem TNF- $\alpha$  zu nennen, welches hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten gebildet wird, jedoch auch von CTL sezerniert werden kann. TNF- $\alpha$  unterstützt nicht nur die Aktivierung von DCs und die Alloantigenpräsentation sowie die Rekrutierung von Effektorzellen, sondern entfaltet darüber hinaus eine unmittelbare zytotoxische Wirkung. TNF- $\alpha$  verursacht Zellnekrosen und -apoptose in den Zielgeweben der GvHD (Ferrara, 2000).

#### **1.1.2.2 Die Pathophysiologie der chronischen GvHD**

Die chronische GvHD weist eine komplexere Pathophysiologie als die akute Form auf, die zudem wenig erforscht ist (Fimiani et al., 2003). Im Gegensatz zur akuten GvHD, die in der Regel ein bis zwei Monate nach der Transplantation einsetzt, beginnt eine chronische GvHD normalerweise nach drei oder mehr Monaten nach Transplantation (Parkman 1998). Da eine vorhergehende akute GvHD zu den Hauptrisikofaktoren für eine Entwicklung einer chronischen GvHD gehört, ist ein ähnlicher pathophysiologischer

Prozess wie bei der akuten GvHD zu vermuten. So hatten bis zu 90 % der Patienten, die eine chronische GvHD entwickeln, eine vorhergehende akute GvHD (Parkman 1998). In progressiven Phasen der cGvHD ähneln die histopathologischen Veränderungen in Haut und Leber denen der akuten Form (Kansu, 2004).

Gegen vergleichbare pathophysiologische Vorgänge wie bei der aGvHD spricht jedoch, dass die Entwicklung neuer Therapien, mit Ausnahme der T-Zell Depletion und der Verwendung von Nabelschnurblut, zwar die Häufigkeit und Schwere der akuten GvHD deutlich senken konnte, das Auftreten einer chronischen GvHD jedoch nicht wesentlich beeinflusst hat. Zudem gibt es kleinere Unterschiede in den betroffenen Organen und den pathologischen Veränderungen. So zeichnet sich die chronische GvHD eher durch Entzündungen und Fibrose aus, während es unter der akuten Form vermehrt zu Apoptose und Nekrosen kommt (Lee, 2005).

Wie bei der akuten GvHD spielen alloreaktive Spender T-Zellen, welche Minorhistoantigene erkennen, eine wichtige Rolle (Cutler und Antin, 2006). So ist die Entstehung einer cGvHD nach autologen oder syngenen Transplantationen beim Menschen höchst selten (Lee, 2005). Es scheint jedoch unklar, welcher T-Zelltyp der Haupteffektor einer chronischen GvHD ist. Im Tierversuch verursachen T-Zellen Schäden im Rahmen einer cGvHD entweder durch direkte zytolytische Wirkung (CD8<sup>+</sup>/T<sub>h</sub>1-basiert), Sekretion inflammatorischer Zytokine (Lee et al., 2003) oder durch B-Zell Aktivierung und der Produktion von Autoantikörpern (CD4<sup>+</sup>/ T<sub>h</sub>2 basiert) (vgl. Lee, 2005). Welcher dieser Effektormechanismen im Vordergrund steht, ist stark vom verwendeten Mausmodell abhängig (Cutler und Antin, 2006).

Daneben scheinen jedoch auch autoreaktive Prozesse an der Entstehung der chronischen GvHD beteiligt zu sein (vgl. Arractingi und Chosidow, 1998). Die chronische GvHD weist Eigenschaften einer Autoimmunkrankheit auf. So lassen sich Antikörper nachweisen, welche vom Spender abstammende Zelllinien angreifen oder aber gegen Antigene gerichtet sind, welche sowohl beim Empfänger als auch dem Spender vorkommen (Fimiani et al., 2003). Möglicherweise ist dieser autoreaktive Prozess durch eine fehlerhafte T-Zell Selektion im Thymus bedingt. Dies könnte die Folge von Gewebeschäden im Thymus sein, welche beispielsweise im Rahmen einer vorhergehenden akuten GvHD oder der Konditionierung im Vorfeld der Transplantation entstanden sein

können (Arractingi und Chosidow, 1998; Karrer et al., 2001).

Die chronische GvHD umfasst damit sowohl alloreaktive als auch autoreaktive Mechanismen. Im entzündlichen Hautinfiltrat dominieren vor allem CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Wie bei der akuten GvHD kommt es zu einer erhöhten Produktion von TNF $\alpha$  und IL-1 $\alpha$ , welche in dem betroffenen Hautgewebe von Keratinozyten gebildet werden. Arractingi und Chosidow (1998) vermuten zudem, dass die sklerodermiforme Form der cGvHD eine Spätform der liGvHD ist und somit beiden Formen der gleiche Pathomechanismus zugrunde liegt.

## **1.2 Immunpathologie „interface dermatitis“**

Als Kontrollkollektiv verwendeten wir für diese Arbeit Material von Patienten mit einer lichenoiden Dermatose, den Lichen ruber planus. Zusätzlich beschreiben wir hier kurz das Krankheitsbild des kutanen Lupus erythematodes (CLE), da dieser ebenfalls histologische und pathophysiologische Ähnlichkeiten zur GvHD und zum LP aufweist und wir oft auf den CLE Bezug nehmen werden.

### **1.2.1 Der Lichen Ruber Planus**

Der Lichen Planus (LP) ist eine chronisch rezidivierende entzündliche Erkrankung der Haut und Schleimhaut, die zu den Dermatosen zählt. In den meisten Fällen kommt es zu einer spontanen Abheilung nach 1-2 Jahren. Nur 10-20 % sind chronisch rezidivierend. Die Dermatose bleibt auf die Haut beschränkt, es kommen keine Systemzeichen vor. Frauen sind häufiger betroffen als Männer. Das Manifestationsalter liegt zwischen 30-60 Jahre. Der LP manifestiert sich vor allem an den Beugeseiten der Handgelenke und Unterarme, Vorderseite der Unterschenkel, Knöchel und im Sakralbereich. Die Schleimhaut ist vor allem an der Wangen-, Zungen-, Lippen- und Genitalschleimhaut betroffen (Fritsch, 2003).

Typischerweise ist der LP durch charakteristische hell-livide polygonale abgeflachte Papeln und Plaques gekennzeichnet. Die Hauteffloreszenzen jucken stark, doch das Kratzen schmerzt die Patienten, so dass es in der Regel zu keinen Kratzspuren kommt, da die Patienten reiben statt kratzen. Die Papeln haben einen matten Glanz und haben zumeist keine Schuppen. Bei Beleuchtung der Schuppen kommt es zu einer Lichtreflexion, was

ein diagnostisches Zeichen ist (ebd.). Konfluieren die Papeln zu Plaques kommt es zur sogenannten Wickham-Streifung, welche sich durch eine weißliche, netzförmige Streifung auszeichnet.

Beim Verlauf des LP unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Typen, den exanthemischen und den chronisch-lokaliserten Typ. Der exanthemische Verlauf beginnt mit einem auf die Prädilektionsstellen beschränktem Exanthem, welches sich verdichtet und generalisiert. Bei der chronisch-lokaliserten Form sind die Hauteffloreszenzen auf eine bestimmte Region beschränkt.

Die Ätiologie und Pathogenese des LP sind nicht ausreichend geklärt. Beim LP zeigt sich eine zelluläre Autoimmunreaktion gegen basale Keratinozyten. Die Zerstörung der Keratinozyten löst die Reaktion der LP Papeln aus (ebd.). Der Untergang der Keratinozyten erfolgt mittels Apoptose. Als Folge kommt es zu einer Hyperkeratose.

Histologisch zeigt sich in der Epidermis das Bild einer ballonierenden Degeneration der Basalzellen. Das Stratum granulosum ist verbreitert und zeigt eine streifige Hypergranulose (Furter und Jasch, 2007). Die Hornschicht ist hyperkeratotisch. Das Stratum basale ist vakuolisiert und fehlt teilweise. An diesen Stellen sitzt das Stratum spinosum direkt der Basalmembran auf. Die obere Dermis ist von einem subepitheliale bandförmigen lymphozytären Infiltrat erfüllt (Wenzel et al., 2006).

Wenzel et al. (2006) konnten zeigen, dass eine CXCR-Liganden gestützte Rekrutierung von pDC und zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Entzündungsreaktionen im Rahmen des LP verstärkt.

### **1.2.2 Der Kutane Lupus Erythematodes**

Der Lupus erythematodes (LE) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunkrankheit, mit einem breiten klinischem Spektrum. Die Krankheit kann auf die Haut beschränkt bleiben oder systemisch auftreten. Frauen sind häufiger betroffen als Männer. Das Manifestationsalter liegt zwischen dem 20.-40. Lebensjahr, kann sich aber in jedem Lebensalter manifestieren (Parodi et al., 2000). Die am häufigsten befallenen Organe sind die Nieren, Herz, Gelenke, ZNS und die Haut (Fritsch, 2003). Beschränken sich die Symptome auf die Haut, spricht man vom kutanen Lupus Erythematodes (CLE), der sich vom sys-

temischen Lupus erythematos (SLE) abgrenzt.

Der kutane LE lässt sich aufgrund seiner vielfältigen Morphologie in verschiedene Formen unterteilen. Die Klassifikation des CLE wurde im Jahr 2004 abgeändert, so dass man heute folgende Formen unterscheidet: akuter CLE (ACLE), subakuter CLE (SCLE), chronischer CLE (CCLE) mit den Subtypen des diskoiden LE (DLE), des LE profundus (LEP) und des Chiblain LE (CHLE) sowie den intermittierenden CLE (ICLE) (Tebbe, 2004). Die Sicherung der Diagnose des einzelnen Subtyps folgt über die Genetik, die Klinik und die histopathologische und immunserologische Untersuchung (Wenzel et al., 2003).

Häufige Subtypen des LE sind der vernarbende CDLE sowie der nicht-vernarbende SCLE. Ersterer zeichnet sich durch vernarbende diskoide Plaques aus, welche lokal begrenzt oder disseminiert sein können. Patienten die vom SCLE betroffen sind weisen münz- oder wirbelförmige erythematosquamöse Hautläsionen auf, die sich vor allem auf sonnenexponierter Haut, ohne Narbenbildung, manifestieren.

Die Ätiologie und Pathogenese des CLE sind noch weitgehend unbekannt. Beim LE kommt es zu einer Bildung von Auto-Antikörpern aufgrund einer gestörten B- und T-Zell Funktion (Furter und Jasch, 2007). Die Antikörper sind vor allem gegen Bestandteile des Zellkerns (antinukleäre Antikörper ANA) gerichtet. Die Autoantikörper lagern sich zu Immunkomplexen zusammen, welche sich an der Basalmembran der Haut ablagern und dort durch eine Komplementaktivierung zu einer Gewebsschädigung führen können. Allerdings können CLE Hautläsionen durch bestimmte Faktoren ausgelöst werden. Als auslösende Ursache spielen UV-Strahlen eine wichtige Rolle (Fritsch, 2003). Einige Medikamente, wie z.B. Hydrochlorothiazid, ACE-Hemmer und Terbinafin können auch einen CLE induzieren. Mögliche andere Ursachen können Gestagene oder mechanische Noxen sein. Kommt es dabei zu einer Auslösung tritt meist der SCLE auf (Bonsmann et al., 2001). Wenzel et al. (2007c) konnten eine Beteiligung des CXCR3-Liganden Mechanismus für verschiedene Untertypen des LE zeigen.

Histologisch zeigt sich in der Epidermis eine Hyperkeratose mit hyperkeratotischen Pfröpfen der Haarfollikel. Zudem findet sich eine Atrophie des Stratum spinosum sowie eine Degeneration der Basalzellen. Die Basalmembran ist verdickt. Außerdem findet sich ein entzündliches Infiltrat der Dermis. In der direkten Immunfloreszenz erkennt man bei

über 75 % älterer (> 6 Wochen) CDLE Herde das typische „Lupusband“, welches aus bandförmigen Ablagerungen von Immunglobulinen (IgM und IgG) und Komplementkomponenten (C<sub>3</sub>) besteht. Die nicht-läsionale Haut ist unauffällig (Fritsch, 2003).

### 1.3 Bedeutung und Funktion der Chemokine

Chemokine sind chemotaxisch aktive Zytokine, welche Leukozyten, Monozyten und andere Effektorzellen aus dem Blut zu einem Infektionsherd locken (Janeway et al., 2002). Die Chemokine gehören zu den ersten Zellen die bei einer Infektion freigesetzt werden. Es handelt sich um kleine Proteine, die sich aus 70 bis 130 Aminosäuren zusammensetzen. Die Chemokinrezeptoren gehören zur Gruppe der an G-Proteinen gekoppelten Rezeptoren und sind integrale Membranproteine mit sieben membrandurchschlängelnden Proteinketten.

Anhand der Anordnung der Cysteinreste lassen sich die Chemokine in vier Gruppen einteilen. Man unterscheidet anhand der Cystein-Reste, die entweder einzeln (C), nebeneinander (CC), von einer Aminosäure getrennt liegen (CXC) oder von drei Aminosäuren getrennt sind (CX<sub>3</sub>C) (Murphy et al., 2000). Entsprechend der Nomenklatur der Chemokine werden die Chemokin-Rezeptoren abhängig von ihren Liganden benannt.

Die CC-Chemokine binden an die CC-Rezeptoren und die CXC-Chemokine an CXC-Rezeptoren. Die Chemokin-Rezeptoren haben nicht einen speziellen Liganden, sondern können viele verschiedene Chemokinliganden binden. Andererseits können diese Chemokinliganden auch an verschiedene Chemokin-Rezeptoren binden (Wilbanks et al., 2001). Chemokin-Rezeptoren finden sich auf verschiedenen Zellen des Körpers. Dabei kann eine Zelle mehr als nur einen Rezeptortyp exprimieren. Die T-Lymphozyten beispielsweise tragen mehr als zehn verschiedene Chemokin-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche.

Die Chemokine lassen sich nach einer neueren Klassifizierung auch funktionell einteilen. Hierbei unterscheidet man zwischen inflammatorischen und homöostatischen Chemokinen (Nakayama et al., 2003). Während die inflammatorischen Chemokine induzierbar sind, werden die homöostatischen Chemokine konstitutiv exprimiert. Entsprechend wird analog zwischen induzierbaren und konstitutiven Chemokinen unterschieden. Inflammatorische Chemokine übernehmen die Aufgabe der Rekrutierung von Leukozyten und

anderen Immunzellen an den Ort der Entzündung, während die homöostatischen Chemokine die Wanderung von Leukozyten durch gesundes peripheres Gewebe kontrollieren, das sogenannte „homing“ (Ben-Baruch, 2006). Zu den inflammatorischen Chemokinen zählen u.a. die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11.

Chemokine spielen eine wichtige Rolle für die gerichtete Rekrutierung von Immunzellen in periphere Organe. Die inflammatorischen Chemokine, welche von Leukozyten und von anderen Geweben produziert werden, dienen als Entzündungsmediatoren bei der Abwehrreaktion des Körpers im Rahmen von Infektionen und Entzündungen. Dagegen werden die homöostatischen Chemokine konstant vom lymphoiden Gewebe gebildet und dienen der Reifung, Differenzierung und Aktivierung von Lymphozyten (Baggiolini, 2001).

Wie oben schon erwähnt, werden Chemokine von verschiedenen Zelltypen während einer bakteriellen Infektion, eines Virusinfektes oder aber als Reaktion auf Agenzien, die physische Schäden verursachen, gebildet. Alle diese Auslöser führen zu einem Aufbau von Chemokingradienten. Anhand dieses Chemokingradienten, dessen Konzentration in Richtung auf einen Infektionsherd zunimmt, gelangen die Leukozyten durch Chemotaxis und im Zusammenspiel mit den entsprechenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche an den Ort, wo sie gebraucht werden. Auch hier spielen die Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle, denn es werden nur diejenigen Immunzellen rekrutiert, die den korrespondierenden Chemokinrezeptor tragen.

Weiterhin erfüllen die Chemokine noch eine andere Funktion beim Anlocken der Leukozyten. Die Leukozyten rollen ständig an Endothelzellen entlang. Treffen die Leukozyten auf eine Entzündungszone, helfen die Chemokine dabei die Rollbewegung in eine stabile Bindung umzuwandeln. Durch diese Immobilisierung kann der Leukozyt die Gefäßwand durchdringen und am Ort der Entzündung seine Funktion ausüben (Janeway et al., 2002). Mit beiden Funktionen, der Anlockung von Immunzellen zum Herd der Infektion und der Hilfestellung für die Leukozyten beim durchqueren des Gefäßendothels, dienen die Chemokine dem Körper als Immunabwehr bei Infektionen.

Allerdings kann es auch bei der Immunabwehr zu unpassenden Immunantworten kommen. Dies ist z.B. der Fall bei der Graft-versus-Host Disease (GvHD) oder dem Lupus Erythematodes (LE). Hierbei spielen T-Lymphozyten, welche Träger von Chemokinrezeptoren sind, eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen in der Haut. Ein



wesentlicher Faktor für eine passende Immunantwort ist die Stimulation unterschiedlicher T-Zell-Subpopulationen.

Die Immunantwort wird durch die Interaktion von dem Krankheitserreger mit unterschiedlichen Mediatorzellen bestimmt. Durch das Überwiegen von verschiedenen Mediatorzellen, die Art der Antigenpräsentation, die Menge des Antigens, den Ort der Antigenaufnahme und die Anwesenheit von verschiedenen Zytokinen wird entschieden, ob die Immunantwort eher zellulär oder humoral ausfällt (Janeway et al., 2002). Dies entscheidet darüber ob sich vor allem  $T_H1$ -Zellen oder  $T_H2$ -Zellen entwickeln.  $T_H1$ -Zellen und  $T_H2$ -Zellen, welche man auch T-Helferzellen nennt, gehören zu Untergruppen von  $CD4^+$  T-Zellen. Die bedeutendsten Untergruppen der T-Zell-Population werden durch die Oberflächenmarker CD4 und CD8 definiert. Die beiden Typen von T-Helferzellen haben ganz unterschiedliche Funktionen.

Die  $T_H1$ -Zellen aktivieren vor allem Makrophagen, produzieren Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) und sind für die Abwehr intrazellulärer Pathogene zuständig. Zudem werden von  $T_H1$ -Zellen vor allem der Chemokinrezeptor CXCR3 exprimiert.  $T_H2$ -Zellen sind wichtig für die Abwehr extrazellulärer Pathogene und aktivieren effektiv B-Zellen. Sie sezernieren vor allem IL-4,-5 und -10 und tragen somit zur B-Zell Aktivierung bei (Romagnani et al., 1998). Die Unterscheidung zwischen  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Zellen ist wichtig, um verschiedene Immunantworten besser zu verstehen und dafür, ob das Pathogen im Körper überlebt oder eliminiert wird. Die Chemokine spielen eine entscheidende Rolle für die Entscheidung, ob es zu einer humoralen ( $T_H2$ ) oder zellulären ( $T_H1$ ) Immunantwort kommt (Janeway et al., 2002).

#### **1.4 CXCR3 und seine Liganden**

CXCR3 gehört zur Familie der CXC Chemokinrezeptoren und ist Liganden-spezifisch. CXCR3 bindet an die Liganden CXCL9 (Mig, Monokine induced by  $\gamma$ -Interferon), CXCL10 (IP10, Interferon-inducible protein 10) und CXCL11 (I-TAC, Interferon-inducible T Cell- $\alpha$  chemoattractant) (Clark-Lewis et al., 2003). CXCL11 hat von den drei genannten Liganden die höchste Affinität zu CXCR3. CXCR3 wird auf aktivierten T-Zellen, natürlichen Killerzellen, plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC) und auf einigen B-Zellen exprimiert (Loetscher et al., 1996). Die Liganden von CXCR3 werden zu den

inflammatorischen Chemokinen gerechnet und sind an der entzündungsabhängigen Rekrutierung von T-Zellen beteiligt und können durch Interferone während einer Entzündung induziert werden. Die Liganden sind effektive T-Zell-Chemoattraktoren. Hauptsächlich werden durch die Liganden  $T_h1$ -Lymphozyten angezogen, welche in hohem Maße CXCR3 exprimieren. Diese These wird dadurch unterstützt, dass die Produktion aller drei Liganden durch das für eine  $T_h1$  Antwort charakteristische IFN- $\gamma$  induziert werden (Clark-Lewis et al., 2003).

CXCR3 ist an der Pathogenese chronisch entzündlicher Veränderungen, Autoimmunerkrankungen und an der Entwicklung von Abstoßungsreaktionen beteiligt. Man hat festgestellt, dass eine hohe Anzahl der T-Zell-Lymphozyten in entzündlichen Hautläsionen CXCR3 positiv sind und nur wenige CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen im zirkulierenden Blut und in Lymphknoten zu finden sind (ebd.). Dies spricht dafür, dass CXCR3 ein entzündliches Milieu kennzeichnet. Es wird vermutet, dass CXCL9, CXCL10 und CXCL11 bei der Rekrutierung von T-Lymphozyten eine große Rolle spielen und die T-Zell Wanderung in entzündliches Gewebe regulieren (ebd.).

CXCR3 wird von Fibroblasten, Endothel-Zellen, Monozyten, T-Zellen und Keratinozyten produziert. Keratinozyten welche durch TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  stimuliert werden, exprimieren vermehrt CXCL9 und CXCL10. Werden Haut-Endothelzellen stimuliert kommt es ebenfalls zu einer vermehrten CXCL10 Expression (Rottman et al., 2001). Die CXCL9 und CXCL10 Signalisierung scheint somit ein wichtiger Mechanismus für das selektive „Skin-Homing“ von aktivierten Effektorzellen zu sein. Diese Chemokine akkumulieren bevorzugt an Orten mit entzündlichem Geschehen und in Tumoren (Liao et al., 1995).

Eine CXCR3-Liganden Beteiligung konnte für eine Vielzahl  $T_h1$  basierter Entzündungsreaktionen wie der Multiplen Sklerose, Rheumatoiden Arthritis, Sarkoidose und Psoriasis gefunden werden. Unter diesen Erkrankungen ist eine starke Korrelation zwischen der Ausprägung, insbesondere von CXCL10, und der Infiltration entzündlichen Gewebes durch T-Lymphozyten festzustellen (Clark-Lewis et al., 2003). Rottman et al. (2001) nehmen an, dass CXCR3 an der transendothelialen Wanderung von T-Lymphozyten in die Haut bei Psoriasis Patienten beteiligt ist. Sie vermuten, dass CXCR3 der Rezeptor ist, welcher die T-Zell Wanderung in die Epidermis leitet. CXCR3 und CXCL10 scheinen auch in akuten Abstoßungsreaktionen nach allogenen Organtransplantationen eine Rolle zu

spielen (Clark-Lewis et al., 2003). Segerer et al. (2004) stellten fest, dass CXCR3 auf den meisten inflammatorischen Haut-T-Lymphozyten exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit interessierte uns, ob CXCR3 und seine Liganden an der Pathogenese der T-Zell vermittelten Entzündungen im Rahmen einer Graft-versus-Host Disease beteiligt sind.

## 1.5 Bedeutung und Funktion der Interferone

Interferone (IFN) sind Zytokine, welche als Reaktion auf eine Virusinfektion produziert werden. Sie induzieren die Expression zahlreicher Gene, die auf verschiedene Weise die Virusreplikation behindern und die Immunabwehr unterstützen (Goodbourn et al., 2000). Die Interferone hindern Viren daran, auf nicht-infizierte Zellen überzugreifen (Janeway et al., 2002).

Heutzutage werden Interferone aufgrund ihrer Struktur, Funktion und zellulären Wirkungsweise in zwei Gruppen unterteilt: die große Gruppe der Typ I Interferone ( $\alpha, \beta, \delta, \kappa, \tau, \omega$ ) und das Typ II Interferon ( $\gamma$ ) (Akbar et al., 2000; Biron, 2001). Alle Subtypen der Typ I Interferone wirken über den gleichen IFN- $\alpha/\beta$ -Rezeptor (Mogensen et al., 1999) welcher ubiquitär exprimiert wird, so dass alle Zellen auf Typ I IFN reagieren können (Tough, 2004). Prinzipiell sind alle kernhaltigen Zellen des Menschen in der Lage Typ I IFN zu produzieren. Allerdings gibt es eine Zellpopulation, die in der Lage ist, nach einer viralen Stimulation große Mengen an Typ I Interferone zu produzieren (Fitzgerald-Bocarsly, 1993). Diese sogenannten plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC) sind eine Zellpopulation die erst vor kurzem charakterisiert werden konnte und scheinen die Hauptproduzenten von Typ I Interferon zu sein (Cella et al. 1999). Die pDCs sind auf die Erkennung von Viren spezialisiert.

Die Interferone tragen auf verschiedenen Wegen dazu bei Virusinfektionen abzuwehren. Sie verstärken die zelluläre Immunantwort über eine Hochregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen (Bikoff et al., 1991). Die Hochregulation der MHC-Klasse-I-Moleküle schützt eine nicht infizierte Zelle vor der Zerstörung durch Natürliche Killerzellen und fördert andererseits die Immunantwort gegen Viren, da virale Peptidfragmente über die MHC-Klasse-I-Moleküle effektiv den T-Zellen präsentiert werden und damit die Zerstörung dieser Zellen gewährleistet ist. Interferone aktivieren außerdem Natürliche Killerzellen um

virusinfizierte Zellen zu töten und setzen Zytokine frei. Natürliche Killerzellen können anhand der MHC-Klasse-I-Moleküle zwischen nicht infizierten und infizierten Zellen unterscheiden. Kommen Typ I Interferone mit NK-Zellen in Kontakt, wird die Tötungsaktivität der NK-Zellen um das 20 bis 100-fache verstärkt (Janeway et al., 2002). NK-Zellen sollen die Virusinfektion eindämmen, während die adaptive Immunantwort antigenspezifische zytotoxische T-Zellen produziert, welche die Infektion bekämpfen können (Janeway et al., 2002).

Zudem spielen Interferone eine wichtige Rolle bei der Unterstützung der  $T_{h1}$  assoziierten zellulären zytotoxischen Immunantwort durch Stimulation proinflammatorischer Zytokine und Unterstützung der zytotoxischen Kapazität infiltrierender zytotoxischer T-Lymphozyten. Die Typ I Interferone sind in der Lage, dendritische Zellen (DCs) des Immunsystems zu aktivieren und die Stimulation, Expansion und Differenzierung von antigenspezifischen T-Zellen zu unterstützen (Tough, 2004). Typ I Interferone wirken auf zwei Ebenen auf DCs. Zum einen führen Typ I Interferone in einer frühen Phase zur Entwicklung von DCs aus Vorläuferzellen. Zum anderen stimulieren Typ I Interferone die Ausreifung von DCs in einer späteren Phase der Immunantwort (Tough, 2004). Typ I Interferone unterstützen die Antigenprozessierung und -präsentation durch dendritische Zellen (Le Bon et al., 2003).

Typ I IFN induzieren die Expression von mehr als 300 Proteinen mit antiviraler, anti-proliferativer und immunmodulatorischer Funktion (de Veer et al., 2001). Die am besten untersuchten sind dabei die antiviralen Mx-Proteine (Weber et al., 2004). Das MxA-Protein ist eine zytoplasmatische GTPase mit Aktivität gegen RNA Viren, die hochspezifisch durch Typ I IFN induziert wird (Haller und Kochs, 2002).

## **1.6 Rekrutierung von Lymphozyten in die Haut - Skin Homing**

T-Zellen müssen in der Lage sein, das Blut zu verlassen und jedes andere Gewebe im Körper zu erreichen. Die naiven T-Zellen, wandern ständig zwischen dem Blutkreislauf und dem lymphatischen System, wo sie auf viele Antigenpräsentierende Zellen treffen. Die naiven T-Zellen können jedoch normalerweise nicht die Wände der speziellen Venolen des lymphatischen Systems, die sogenannten postkapillären Venolen mit hohem Endothel (HEVs), durchqueren. Um den Gefäßraum verlassen zu können, benötigen

Lymphozyten die Interaktion zwischen membranständigen und vaskulären Adhäsionsmolekülen. Diese Interaktionen erfolgen über eine genau regulierte Kaskade, auf welche wir später näher eingehen werden.

Sind die naiven T-Lymphozyten in den Lymphknoten gelangt, binden sie vorübergehend an jede antigenpräsentierende Zelle, der sie begegnen. Diese vorübergehende Bindung der naiven T-Zellen an die antigenpräsentierenden Zellen ist wichtig, damit die T-Zellen die MHC-Moleküle auf den APCs absuchen können. Die wirksamsten Antigenpräsentierenden Zellen zur Aktivierung naiver T-Zellen sind die reifen, aktivierten dendritischen Zellen. Dendritische Zellen wandern, nachdem sie von der Aufnahme von Krankheitserregern aktiviert wurden, in das Lymphgewebe, um den naiven T-Zellen Antigene zu präsentieren.

Erkennt eine naive T-Zelle ihr spezifisches Antigen auf der Oberfläche einer dendritischen Zelle, beenden die T-Zellen ihre Wanderung zwischen dem lymphatischen System und dem Blutkreislauf. Die T-Zellen werden nun dazu angeregt zu proliferieren (=klonale Expansion) und beginnen mit den Prozessen, die nötig sind um aus einer naiven T-Zelle T-Effektorzellen entstehen zu lassen. Außerdem kommt es zur Aktivierung von naiven B-Zellen, welche nach der Aktivierung Antikörper produzieren. Diese Prozesse dauern mehrere Tage. Am Ende dieser Periode verlassen die T-Effektorzellen das lymphatische System um in den Blutkreislauf zurückzukehren. Jedoch verlassen nicht alle T-Effektorzellen das Lymphgewebe. Einige Zellen bleiben im Lymphknoten und wandeln sich zu Gedächtniszellen um, die den Körper bei einer erneuten Infektion, durch Ausschüttung spezifischer Antikörper schützen können.

Die bewaffneten CD8<sup>+</sup>-T-Effektorzellen müssen das lymphatische Gewebe, in welchen sie aktiviert wurden, verlassen, um infizierte Zellen angreifen und zerstören zu können (Janeway et al., 2002). Durch die Aktivierung der naiven T-Zellen im Lymphknoten kommt es zur Exprimierung von verschiedenen Adhäsions-, Aktivierungs- und Effektor-molekülen. Zu diesen Molekülen zählen die sogenannten Homing-Rezeptoren, die an gewebespezifische Moleküle binden, welche die T-Zellen zu ihrem Bestimmungsort leiten. Die T-Zellen die zur Haut wandern, exprimieren beispielsweise das kutane Lymphozytenantigen (cutaneous lymphocyte antigen; CLA), welches ihnen erlaubt in entzündliches Gewebe der Haut zu gelangen. Die aktivierten T-Zellen setzen zudem

Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und IFN- $\gamma$  frei, welche gemeinsam die Form der Endothelzellen verändern, was zu einer besseren Durchblutung, einer erhöhten Durchlässigkeit der Gefäße und damit zu einem stärkeren Eindringen von Leukozyten und Flüssigkeiten ins Gewebe führt.

Die T-Zell-Migration in die Haut beginnt mit einem vielschrittigen Adhäsionsprozess, der sogenannten Extravasation der Leukozyten, bei dem die T-Zellen aus dem zirkulierenden Blut an die Endothelschicht der Gefäßwand andocken. Diese Kontaktaufnahme zwischen Lymphozyten und Endothel ist für zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse essentiell. Die Mechanismen dieser Adhäsion sind sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden.

In Entzündungsherden sind die Gefäße erweitert, was die Fließgeschwindigkeit vermindert. Dies ermöglicht es den Lymphozyten die zentrale Strombahn des Gefäßes zu verlassen und in die Nähe des Endothels zu gelangen, um mit diesem in Wechselwirkung zu treten. Die Leukozyten treten in Kontakt mit der Endothelwand, wobei die Leukozyten an dem Endothel entlang „rollen“. Dieser lockere Kontakt ist der erste Schritt bei der Leukozytenwanderung. Bei diesem ersten Schritt spielen die Selektine, eine Untergruppe von Zelladhäsionsmolekülen, eine wichtige Rolle. Man unterscheidet P-Selektin (platelets, auf ihnen wurde es als erstes entdeckt), L-Selektin (Leukozyten) und E-Selektin (Endothel). Selektine sind Glykoproteine mit besonders langen extrazellulären Domänen, was ein Einfangen der Leukozyten aus dem Blutstrom begünstigt (Tedder, Steeber 1995). Die Interaktion von CLA auf den aktivierten T-Lymphozyten mit E-Selektin spielt eine entscheidende Rolle für die Adhäsion zwischen den Leukozyten und dem Endothel (Ley, 2003).

Im nächsten Schritt kommt die Rollbewegung zum Stillstand und die Leukozyten heften sich fest an das Endothel. Hierbei spielen auf der Oberfläche von Endothelzellen gebundene Chemokine eine Rolle, welche eine Konformationsänderung von sogenannten Leukozyten-Integrinen auslösen. Die Integrinfamilie umfasst eine große Anzahl von Zelloberflächenrezeptoren und erfüllen eine Vielfalt unterschiedlichster Aufgaben. Unter anderem ermöglichen die Integrine, nach dem sie durch Chemokine verändert wurden eine feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel.

Die Leukozyten steuern nun auf die interendothelialen Junctionen zu, brechen mithilfe

proteolytischer Enzyme die Basalmembran auf und zwängen sich durch die entstandenen Lücken (Transmigration). Auch hier bei der Transmigration spielen die Integrine wieder eine Rolle.

Nachdem die T-Lymphozyten die Gefäßwand passiert haben, können sie in das Zielgewebe Haut wandern. Diese Wanderung der Leukozyten nennt man Migration. Die gerichtete Migration erfolgt entlang eines Chemokingradienten, der zum Entzündungsort führt. In der Fachliteratur wird dieser Vorgang „Skin Homing“ genannt. Er beschreibt die Migration von Zellen entlang eines Chemokingradienten bis in das Zielgewebe Haut.

## 2. Arbeitshypothese

In jüngeren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Typ I Interferon (IFN) assoziierte Rekrutierung von zytotoxischen Lymphozyten via Interaktion des Chemokinrezeptors CXCR3 und seiner Liganden Mig/CXCL9, IP10/CXCL10 und I-TAC/CXCL11 an der Pathogenese verschiedener kutaner T-zellulärer Autoimmunerkrankungen, welche durch eine Interface-Dermatitis charakterisiert sind, beteiligt ist (Wenzel und Tüting, 2008).

Studien zur Pathogenese des Lichen Planus weisen darauf hin, dass die im Rahmen dieser Erkrankung entstehenden Hautläsionen durch autoreaktive zytotoxische T-Zellen verursacht werden, welche eine Degeneration von Keratinozyten verursachen (Iijima et al., 2003; Sugerman et al., 2000). In diesem Zusammenhang zeigten Wenzel et al. (2006) eine mögliche Beteiligung des Chemokin Rezeptors CXCR3 und seines Typ I Interferon induzierbaren Liganden IP10/CXCL10 an der Rekrutierung von zytotoxischen T-Zellen in die Haut bei Patienten mit LP. So ist das für Typ I IFN hochspezifische Protein MxA in der Epidermis und im entzündlichen Infiltrat bei LP deutlich erhöht. Quelle dieser erhöhten Typ I IFN Ausprägung sind vermutlich infiltrierende pDC. Diese sind jüngeren Studien zufolge Hauptproduzenten von Typ I Interferonen bei Hautentzündungen (Farkas et al., 2001). Wenzel et al. (2006) fanden eine signifikant erhöhte Ausprägung des Chemokins IP10/CXCL10 in Hautbiopsien von LP Patienten. Diese war eng mit einer starken Infiltration durch CXCR3<sup>+</sup> zytotoxischer T-Lymphozyten verbunden. Darüber hinaus bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl infiltrierender CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen und der Ausprägung von MxA. Eine erhöhte Produktion von Typ I IFNs durch pDCs führt so vermutlich zu einer Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen via CXCR3 <-> CXCL10 Interaktion in die entzündliche Haut beim LP.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch beim Lichen Sclerosus et atrophicus (LSA). Eine Studie zeigt eine deutliche Infiltration mit CD3<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen beim LSA. Diese korrelierte mit einer signifikant erhöhten Ausprägung von MxA. Dabei prägten 80-95 % der infiltrierenden Zellen den Chemokinrezeptor CXCR3 aus. Wie zuvor beim LP konnte eine signifikant erhöhte Ausprägung von CXCL10 nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass einige der infiltrierenden Lymphozyten CXCL10 in ihren Granula tragen lässt zudem einen selbstrekrutierenden Prozess vermuten (vgl. Wenzel et al., 2007a).

Ein erhöhtes Aufkommen von Typ I Interferonen scheint auch für die Pathogenese des



Lupus Erythematodes eine wichtige Rolle zu spielen. So konnten in kutanen Läsionen beim LE in großer Zahl infiltrierende pDCs nachgewiesen werden, welche, wie oben erwähnt, Hauptproduzenten von Typ I IFNs sind (Blomberg et al., 2001; Farkas et al., 2001). Studien zum systemischen LE weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Interaktion des IFN-I induzierbaren Chemokins IP10/CXCL10 mit CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen und Gewebsschäden bei dieser Erkrankung hin (Amoura et al., 2003; Segerer et al., 2004). Wenzel et al. vermuteten, dass ein vergleichbarer Zusammenhang mit Hautläsionen beim kutanen LE (CLE) besteht. Tatsächlich fanden sich ein deutlich erhöhtes MxA Aufkommen sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis von CLE Patienten. Dies korrelierte mit einer erhöhten Anzahl von infiltrierenden CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen. Zudem konnte CXCL10 in den entsprechenden Hautläsionen nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise war die Zahl peripherer CXCR3<sup>+</sup> T-Zellen deutlich verringert, was auf eine Rekrutierung selbiger in die Haut schließen lässt. Ähnlich den Ergebnissen beim LP und LSA scheint es sich bei der Pathogenese des CLE um eine T<sub>h</sub>1 gestützte Immunreaktion zu handeln, bei der zytotoxische T-Lymphozyten über die Interaktion des CXCR3 Rezeptors mit seinen durch Typ I IFNs induzierbaren Chemokinen in die Entzündungsorte rekrutiert werden (vgl. Wenzel et al., 2005b, 2007b, 2007c).

Da die Krankheitsbilder des Lichen Planus und des kutanen Lupus Erythematodes einige histologische Gemeinsamkeiten mit der lichenoiden GvHD teilen, vermuteten wir, dass ähnliche Mechanismen an der Rekrutierung zytotoxischer Lymphozyten bei der lichenoiden GvHD beteiligt sein könnten. Mausmodelle der GvHD weisen, wie oben erwähnt, zudem auf eine Beteiligung der CXCR3 – Liganden gesteuerten T-Zell Rekrutierung an der Pathogenese hin.

Ausgehend von diesen Beobachtungen im Rahmen der akuten GvHD und der histopathologischen Ähnlichkeiten der lichenoiden GvHD zu anderen kutanen Erkrankungen wie dem LP und dem CLE, für die eine Rolle der CXCR3 – Liganden Interaktion im pathophysiologischen Prozess beschrieben wurde, gingen wir der Frage nach, ob ähnliche Wirkmechanismen an der Entstehung von Hautschäden im Rahmen einer lichenoiden GvHD beteiligt sind.

### **3. Patienten und Methoden**

Aus dem Archiv des Autors wurden insgesamt 10 Hautbiopsien aus läsionalen Hautpartien von 8 Patienten mit verschiedenen Arten der kutanen GvHD (lichenoide GvHD: 5 Patienten, sklerodermiforme GvHD: 3 Patienten) entnommen.

Um ein homogenes Kollektiv zu erhalten wurden ausschließlich Hautbiopsien solcher Patienten eingeschlossen, welche einen klar definierten Krankheitsverlauf der chronischen GvHD (> 100 Tage) aufweisen konnten.

Diese Hautbiopsien wurden gemäß einer semi-quantitativen Bewertung des Grads der lichenoiden Entzündung und der läsionalen Sklerose klassifiziert (0= keine; += schwach; ++= mittelmäßig; +++= stark).

Zusätzlich wurden Proben von 8 Patienten mit Lichen Planus untersucht. Alle Exemplare wurden zu diagnostischen Zwecken entnommen. Als Negativkontrolle dienten „Normalhaut“ Biopsien (healthy control /HC), die der nicht erkrankten Haut von 5 Patienten entnommen wurden, die sich einer Behandlung von Hauttumoren unterzogen.

Alle Patienten wurden aufgeklärt und haben eine schriftliche Einwilligung abgegeben. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den örtlichen ethischen Richtlinien sowie der Helsinki Vereinbarung durchgeführt.

#### **3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)**

Zu Diagnosezwecken wurde eine Standard-HE-Färbung von allen Präparaten angefertigt. Die histologischen Schnitte werden bei der HE- und der PAS-Färbung auf nicht beschichtete Objektträger der Marke Engelbrecht aufgezogen. Anschließend werden die Schnitte genau wie bei den Immunhistologischen Präparaten entparaffinisiert und in einer folgenden absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Daran schließt sich ein Waschvorgang mit Aqua dest. an. Anschließend werden die Schnitte für 2,5 min in Mayer's Hämalaun inkubiert. Durch das Hämalaun färben sich die Zellkerne dunkelblau. Nach diesem Schritt werden die Objektträger für 5 min in warmem Leitungswasser gebläut, um die Säurereste des Hämalauns herauszuwaschen. Mit der anschließenden Färbung in 1 % Eosinlösung für 5 min. werden das Zellplasma, die Muskulatur und das Bindegewebe rot gefärbt. Auch hiernach werden die Schnitte wieder kurz in Aqua dest. gespült. Zur

Entwässerung werden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, und 100 % Ethanol) eingelegt. Anschließend legt man die Objektträger in einen Löschpapierblock und trocknet sie damit. Zuletzt werden sie dann mit Corbitt-Balsam eingedeckelt.

### **3.2 Perjodsäure-Schiffsche-Reagenz-Färbung (PAS-Färbung)**

Auch diese Färbung wurde zu Diagnosezwecken von allen histologischen Präparaten angefertigt. Im ersten Schritt werden die Präparate entparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Daran anschließend werden die Schnitte mit Aqua dest. gespült. Hiernach werden die Schnitte für 10 Minuten in wässriger 0,5 %-iger Perjodsäurelösung inkubiert. Danach kommen die Schnitte für 10 Minuten in ein Behälter mit warmen Leitungswasser. Schließlich werden die histologischen Schnitte für 20 Minuten in Schiffsche Reagenz gelegt. Die Schnitte kommen danach wieder für 10 min. in warmes Leitungswasser und danach werden sie für 30 sec. in Mayer's Hämalaun gegengefärbt. Zum bläuen bleiben die Objektträger für 5 min. in warmen Leitungswasser. Anschließend werden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zum Schluss werden sie mit Corbitt-Balsam eingedeckelt.

### **3.3 Histologie und Immunhistologie**

Als ersten Schritt fertigten wir Paraffinblöcke von Formalin-fixierten Hautbiopsien unserer Patienten an. Die Gewebeproben wurden in Paraffinblöcke an einer Ausbettstation eingebettet. Diese setzt sich aus einem heißen Paraffinbad, einer Kühlplatte und verschiedenen großen Metallförmchen zusammen. Nach Anlegen und Festwerden der Paraffinblöcke auf der Kühlplatte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden diese am Handschlittenmikrotom der Firma Leica mit einer Dicke von  $5\ \mu\text{m}$  geschnitten. Die erhaltenen Schnitte wurden mit einer Pinzette aufgefangen und in ein Warmwasserbad gelegt, womit ein Wellenmuster oder Treppenstufen im Schnitt verhindert werden. Nun konnten die Schnitte auf speziell beschichtete Objektträger (Marienfeld) aufgezogen werden. Anschließend wurden die histologischen Schnitte über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet.

Um die Präparate immunhistochemisch färben zu können müssen diese entparaffiniert

und rehydriert werden. Für die Entparaffinisierung und Rehydratisierung benutzten wir unseren Färbeautomat der Firma medite, der die geforderten Schritte automatisch durchführt. Die Präparate wurden für 14 Minuten (min.) in Xylol gebadet, um das Paraffin vollständig herauszulösen. Anschließend wurden die histologischen Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 % und dann 70 %igem Ethanol) jeweils für eine Minute rehydriert, um anschließend für eine Minute in Aqua dest. gespült zu werden.

Im Anschluss an die Entparaffinisierung erfolgte für zwei Antikörper noch eine Vorbehandlung. Für die Antikörper CXCL11 und CXCR3 musste bevor der Primärantikörper aufgetragen werden konnte eine proteolytische Vorbehandlung mit Proteinkinase K stattfinden. Die Proteinkinase K Vorbehandlung ist vor dem Einsatz einiger Antikörper notwendig, da durch die Fixierung der Gewebe in Formalin Aldehydvernetzungen entstehen, welche die Struktur eines Antigen verändern können. Durch eine Vorbehandlung mit der Proteinkinase K werden die überschüssigen Aldehydvernetzungen aufgespalten und die Antigen-Freisetzung (antigen retrieval) bewirkt. Nach der Vorbehandlung kann der Antikörper das spezifische Antigen im Gewebe identifizieren. Die Gewebeschnitte wurden nun mit der Proteinkinase K fertigen Gebrauchslösung bedeckt. Die Lösung blieb für 10 Minuten auf den Objektträgern. Um die Andauung zu stoppen, spült man die Schnitte mit Aqua dest. Jetzt kann man mit diesen Gewebeschnitten weiterverfahren wie mit den anderen.

Bei allen von uns verwendeten Antikörpern benutzten wir zur hitzeinduzierten Antigen-demaskierung als Vorbehandlung einen Dampfgerät der Marke Braun, in welchem unsere Pufferlösungen Platz fanden. Die Vorbehandlung mit den Pufferlösungen ist wichtig, denn mit ihnen wird zwischen den verschiedenen Arbeitsschritten „gewaschen“. Man wäscht nicht gebundene oder unspezifisch gebundene Antikörper von den Präparaten aus, so dass eine spätere spezifische Antikörperbindung möglich ist. Je sauberer ein Puffer wäscht, desto besser wird das Endergebnis werden, da weniger unspezifische Bindungen das Endergebnis der Färbung beeinträchtigen können.

Auch der hier zur Vorbehandlung eingesetzte Dampfgerät dient der Antigendemaskierung. Durch die Hitze wird auch hier, die durch die Formalinfixierung verursachte Proteinvernetzung wieder aufgehoben.

Als nächster Schritt mussten zunächst die Pufferlösungen hergestellt werden. Wir be-

nutzten die Pufferstärken pH 6 und pH 9. Die Puffer in denen die jeweiligen Schnitte inkubiert wurden, werden als 10-fach Konzentrat geliefert und müssen 1:10 mit Aqua dest. verdünnt werden, um die gewünschte Gebrauchslösung zu erhalten. Die Pufferlösungen wurden in Plastikkuvetten mit Deckeln gefüllt und anschließend in den Dampfgarer gestellt. Der Dampfgarer wurde vorher bis zur maximal Markierung mit Aqua dest. aufgefüllt.

Die Pufferlösungen verblieben nun für 20 min. im Dampfgarer um vorgewärmt zu werden. Nach Ablauf der 20 min. wurden die Schnitte in ihrem jeweiligen Puffer für 10 min. in den Dampfgarer gestellt. Anschließend holt man die Plastikkuvetten aus dem Dampfgarer, belässt aber die Schnitte in den Pufferlösungen bis sie abgekühlt sind. Die Objektträger kamen nach dem Abkühlen in eine Küvette mit Aqua dest. und danach in eine Küvette mit Tris-Puffer. Nun konnte die eigentliche Antikörperbehandlung beginnen.

Die immunhistologische Färbung wurde mit Hilfe des automatischen Färbeautomaten Autostainer der Firma DAKO durchgeführt. Als Primärantikörper verwendeten wir in unserer Studie CD3 (F7238), CD4 (1F6, Novocastra™, Newcastle, UK, Verdünnung 1:20), CD8 (C8/144B, Verdünnung 1:10), CD20 (L26, Verdünnung 1:100), CD56 (1B6, Novocastra™, Verdünnung 1:50), CD68 (PGM1; alle von DAKO™, Hamburg, Germany, Verdünnung 1:100), CXCR3 (1C6, PharMingen™, San Diego, USA, Verdünnung 1:100), CXCL9/Mig (MAB392, R&D™, Verdünnung 1:20), CXCL10/IP10 (Clone 33036, R&D Systems, Minneapolis, USA, Verdünnung 1:25), Tia (Clone 26gA10F5, Immunotech™, Marseille, France, Verdünnung 1:50), GranzymB (GrB7, DAKO™, Verdünnung 1:25) und MxA (M143, Prof. Haller, University of Freiburg, einzige Antikörper ohne Puffer Vorbehandlung, Verdünnung 1:250).

Die jeweilige Verdünnung der Primärantikörper erfolgte durch Dako ChemMate™ Antibody Diluent. Die Primärantikörper CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, CD68 und CXCR3 dienten dazu das entzündliche Infiltrat zu kennzeichnen. Zusätzlich benutzten wir das Protein MxA zum indirekten Nachweis für eine Typ I IFN Aktivität. CXCL9/Mig und CXCL10/IP10 benutzten wir als Nachweis für das Vorhandensein von Chemokinen. Das zytotoxische Potential der infiltrierenden Lymphozyten wurde bestimmt, indem wir monoklonale Antikörper einsetzten, welche spezifisch für Tia und Granzyme B sind.

Für jeden Antikörper wurde in Vorversuchen die optimale Vorbehandlung als auch die korrekte Antikörper-Verdünnung ermittelt, die zur optimalen Darstellung notwendig ist.

Unsere immunhistochemische Färbung erfolgte nach der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB). Diese Methode funktioniert nach folgendem Prinzip. Diese Färbemethode ist eine indirekte Methode, bei der zunächst ein spezifischer, monoklonaler Primärantikörper an das entsprechende Antigen bindet. Anschließend verwendet man einen Sekundärantikörper, welcher eine Brücke zwischen dem Primärantikörper und dem später aufgetragenen Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex bildet. Der Brückenantikörper ist stets mit dem Vitamin Biotin gekoppelt (biotinyliert) und wird im Überschuss zugegeben, damit nur ein Fab-Fragment des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper bindet und das andere Fab-Fragment für den Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex frei bleibt. Im dritten Schritt wird ein Streptavidin-Enzymkonjugat-Komplex aufgetragen. Das Streptavidin war bei unseren Versuchen direkt mit der Alkalischen Phosphatase (AP) als Enzym gekoppelt („labeled“).

Streptavidin ist ein synthetisches Produkt, welches aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert wird. Streptavidin ist ein Pendant zu Avidin, bei welchem es zu unspezifischen Reaktionen gekommen war und deswegen Streptavidin auf gentechnischen Weg produziert worden ist, und besitzt wie dieses vier Bindungsstellen für Biotin, welche alle für das am Brückenantikörper vorhandene Biotin genutzt werden können. Die sehr starke Affinität des Vitamins Biotin zu Streptavidin wird bei dieser Methode genutzt, um eine spezifische und sehr sensitive Immunreaktion zu erreichen. Um eine Farbreaktion zu erhalten, verwendet man eine Substrat-Chromogen-Lösung, welche zu einem farbigen Präzipitat an der Antigenstelle führt.

Zu Beginn verdünnten wir alle Primärantikörper wie vorgegeben mittels Dako ChemMate™ Antibody Diluent und stellten sie vorschriftsmäßig in den Dako Färbautomaten. Die Primärantikörper verblieben für eine halbe Stunde auf den ordnungsgemäß eingelegten Objektträgern im Färbautomaten. Bevor die Sekundärantikörper aufgetragen werden, werden die Schnitte automatisiert mit Tris-Puffer gewaschen. Die Schnitte werden nun mit dem Brückenantikörper (gelbe Flasche A des ChemMate Detection Kit) für 15 min. inkubiert. Als Sekundärantikörper verwendeten wir das LSAB 2 System AP von Dako Cytomation. Der Sekundärantikörper muss so gewählt sein, dass er gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet ist. Wir verwendeten einen „multi-link“ mit Anti-Kaninchen-, Anti-Maus- und Anti-Ziegen-Immunglobulinen. Am Ende

dieses Vorganges wurden die Schnitte wieder mit Tris-Puffer gespült. Im nächsten Schritt wird die Streptavidin-Alkalische-Phosphatase (rote Flasche) aufgetragen und für 15 Minuten auf den Objektträgern belassen. Hierbei findet eine Kopplung des enzymmarkierten Streptavidins an den biotinylierten Sekundärantikörper statt, wobei sich der sogenannte LSAB-Komplex ausbildet, bei welchem das Biotin direkt an das Streptavidin gebunden ist und somit direkt markiert ist. Nach einem weiteren Waschvorgang, wird im letzten Schritt eine Chromogenlösung zur Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes zugegeben. Wir verwendeten dafür den Farbstoff Fuchsin. Dieser wird kurz zuvor angesetzt und kommt für 2 x 8 Minuten, nur durch einen Waschgang mit Tris-Puffer unterbrochen, auf die Objektträger. Durch die Chromogenlösung kommt es zu einer enzymatischen Reaktion mit der Alkalischen Phosphatase, wobei es zu einer leuchtend roten Farbreaktion am Ort der Bindung des Primärantikörpers kommt. Diese Farbreaktion wird dann im Lichtmikroskop sichtbar. Anschließend wurden die Präparate für 45 Sekunden in Mayer's Hämalaun gegen-gefärbt und danach mit Leitungswasser gespült. Zuletzt wird vorgewärmte Kaisers-Gelatine der Marke Merck auf die Schnitte aufgetragen und anschließend ein passendes Deckglas aufgelegt.

Bei allen Untersuchungen wurden geeignete und passende Kontrollen eingeschlossen. Die Ergebnisse wurden unabhängig von zwei erfahrenen Dermatopathologen (JW und TT) im Rahmen einer Blinduntersuchung ausgewertet. Die Leukozyten Populationen wurden innerhalb dreier high power fields (HPF/ x200) gezählt und deren Durchschnitt berechnet. Die Expression von MxA, IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  wurden jeweils semi-quantitativ ausgewertet (0= keine Ausprägung; + = schwache Ausprägung; ++ =mittelmäßige Ausprägung; +++ =starke Ausprägung).

### **3.4 Statistik**

Um die Leukozytenpopulationen und die Ausprägung von IFN assoziierten Proteinen in den untersuchten Subtypen zu vergleichen verwendeten wir den nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test. Alle statistischen Analysen wurden computerbasiert mit dem Programm SPSS™ (Version 14) durchgeführt. Wahrscheinlichkeiten <0,05 wurden als signifikant erachtet (\*), p-Werte <0,01 als hochsignifikant (\*\*).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 T-zelluläre Entzündungen bei der lichenoiden Graft-versus-Host Disease

Zunächst wurden alle GvHD Hautbiopsien nach dem Grad der Sklerose und der lässionalen Entzündung bewertet. 6 Hautbiopsien zeigten eine typische lichenoid chronische GvHD (liGvHD) mit mittleren bis starken (++)/+++ lichenoiden Entzündungen bei nur schwacher (0/+) Sklerose. Die histologische Untersuchung der übrigen vier Proben zeigten mittlere bis starke (++)/+++ Sklerose, jedoch nur eine schwache Entzündung (+), und entsprachen so einer sklerodermiformen GvHD (sclGvHD). Das inflammatorische Infiltrat wurde immunhistochemisch anhand der monoklonalen Antikörper gegen die Leukozytenoberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD20 CD56 und CD68, die zytotoxischen Proteine Granzym B & Tia und den Chemokinrezeptor CXCR3, charakterisiert.

Alle GvHD Hautläsionen zeichneten sich durch ein Vorherrschen von CD3+ Lymphozyten im entzündlichen Infiltrat aus (Abb. 1). Die Entzündung drückte sich hierbei durch ein gürtelartiges, subepidermales Entzündungsmuster, einschließlich Verflüssigung der basalen Epidermis, aus. Bei der lichenoiden GvHD wurde das Infiltrat durch T-Lymphozyten dominiert. CD4+ Zellen fanden sich hauptsächlich in den perivaskulären Gebieten, während die Lymphozyten, welche in die basale Epidermis eindrangen, hauptsächlich CD8+ Zellen waren (Abb. 2). Unter genauerer Betrachtung ergab sich, dass nahezu alle Zellen, die im Rahmen einer liGvHD in die basale Schicht der Epidermis eindrangen CD8 positiv waren. Es war ein leichter Überschuss von CD8+ gegenüber CD4+ T-Zellen festzustellen. Zudem fanden sich einige CD68+ Makrophagen sowie wenige CD20+ B-Zellen. Wie zu erwarten, war die Zahl der infiltrierenden CD3+ T-Zellen bei der liGvHD signifikant höher als bei der sclGvHD (Abb. 3). Etwa 60-90 % aller infiltrierenden lymphoiden Zellen exprimierten den Chemokin Rezeptor CXCR3 (Abb. 4). Es fanden sich zytotoxische Marker in der interstitiellen Dermis. Die Mehrzahl der Lymphozyten präsentierte die zytotoxischen Moleküle Tia1 und Granzym B (Abb. 5), während nur eine geringe Anzahl von CD56+ Natürlichen-Killerzellen zu finden war. Das entzündliche Muster bei der liGvHD zeigt starke Ähnlichkeit zu dem beobachteten Muster beim LP. Das entzündliche Infiltrat war jedoch im Allgemeinen schwächer als beim LP. Bei der sclGvHD wurde eine kleine Anzahl von Lymphozyten gefunden, welche CXCR3 ausprägten.



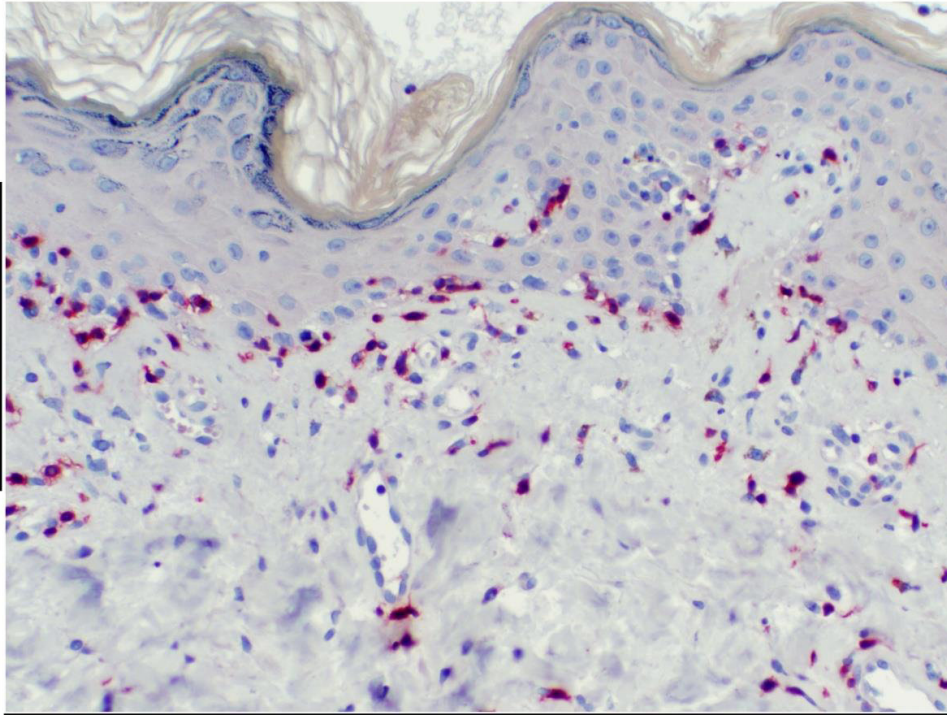
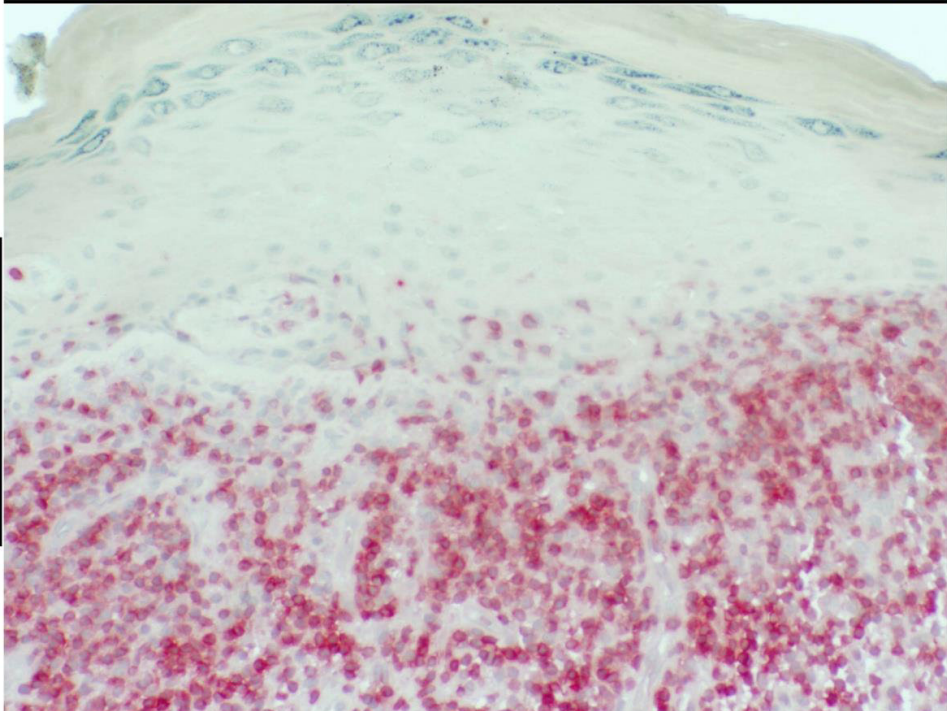
**CD3****GvHD****LP**

Abb. 1: CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im inflammatorischen Infiltrat bei GvHD und Lichen Planus. Die Abbildung zeigt charakteristische Mikroskopaufnahmen der lichenoiden GvHD und des Lichen Planus. Wie beim Lichen Planus dominieren auch bei der liGvHD CD3<sup>+</sup> Zellen das entzündliche Infiltrat. Ein gürtelartiges (band-like) Entzündungsmuster ist deutlich zu erkennen

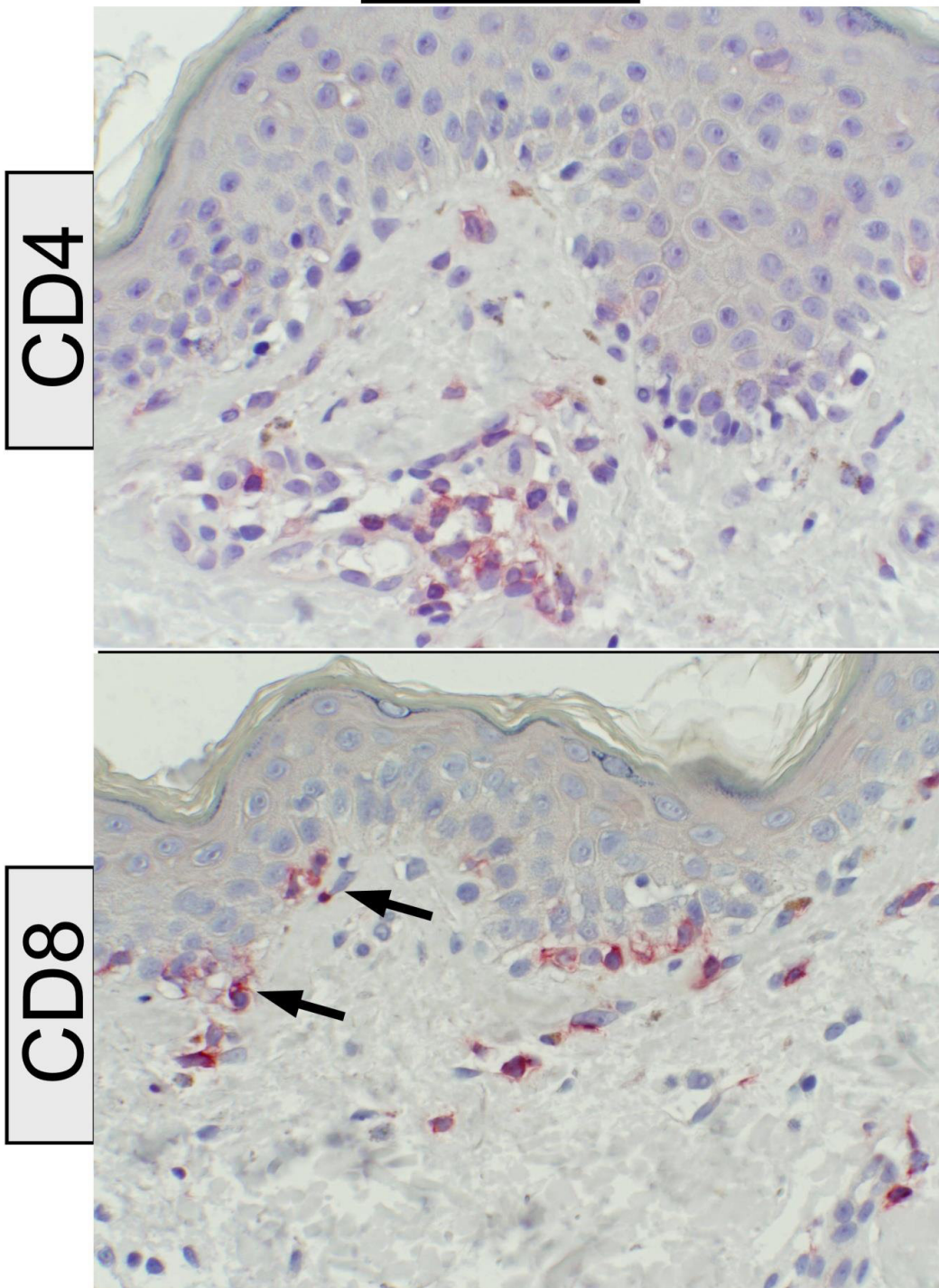
**liGvHD**

Abb. 2: Infiltration von liGvHD Hautläsionen mit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Die Abbildung zeigt charakteristische Mikroskopaufnahmen der lichenoiden GvHD. Perivaskulär dominieren CD4<sup>+</sup> Zellen (Bild oben). In der basalen Schicht der Epidermis hingegen finden sich fast ausschließlich CD8<sup>+</sup> Zellen (unten, siehe Pfeile)

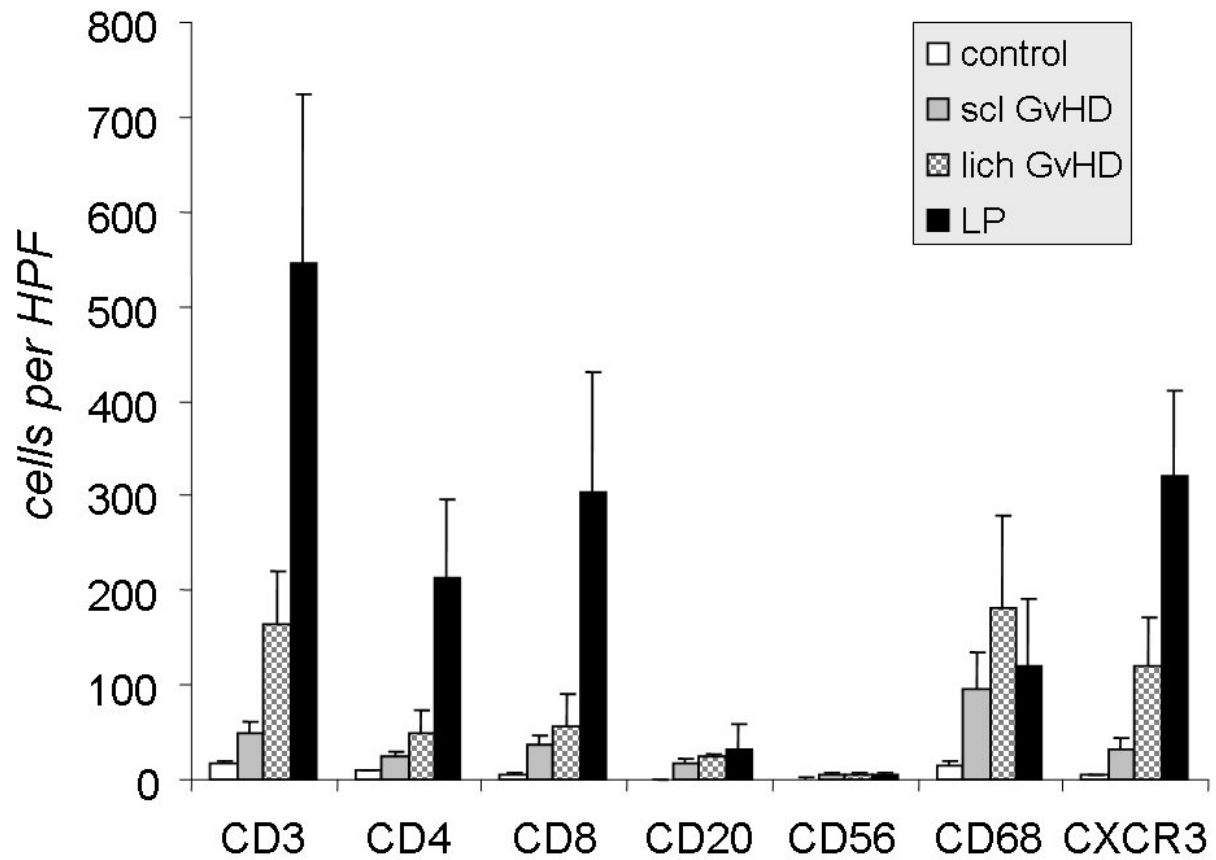


Abb. 3: Charakterisierung des inflammatorischen Infiltrats bei GvHD und Lichen Planus. Zellen wurden per High Power Feld (x200, HPF) gezählt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Das Zellmuster des inflammatorischen Infiltrats bei der GvHD ähnelt jenem des Lichen Planus.

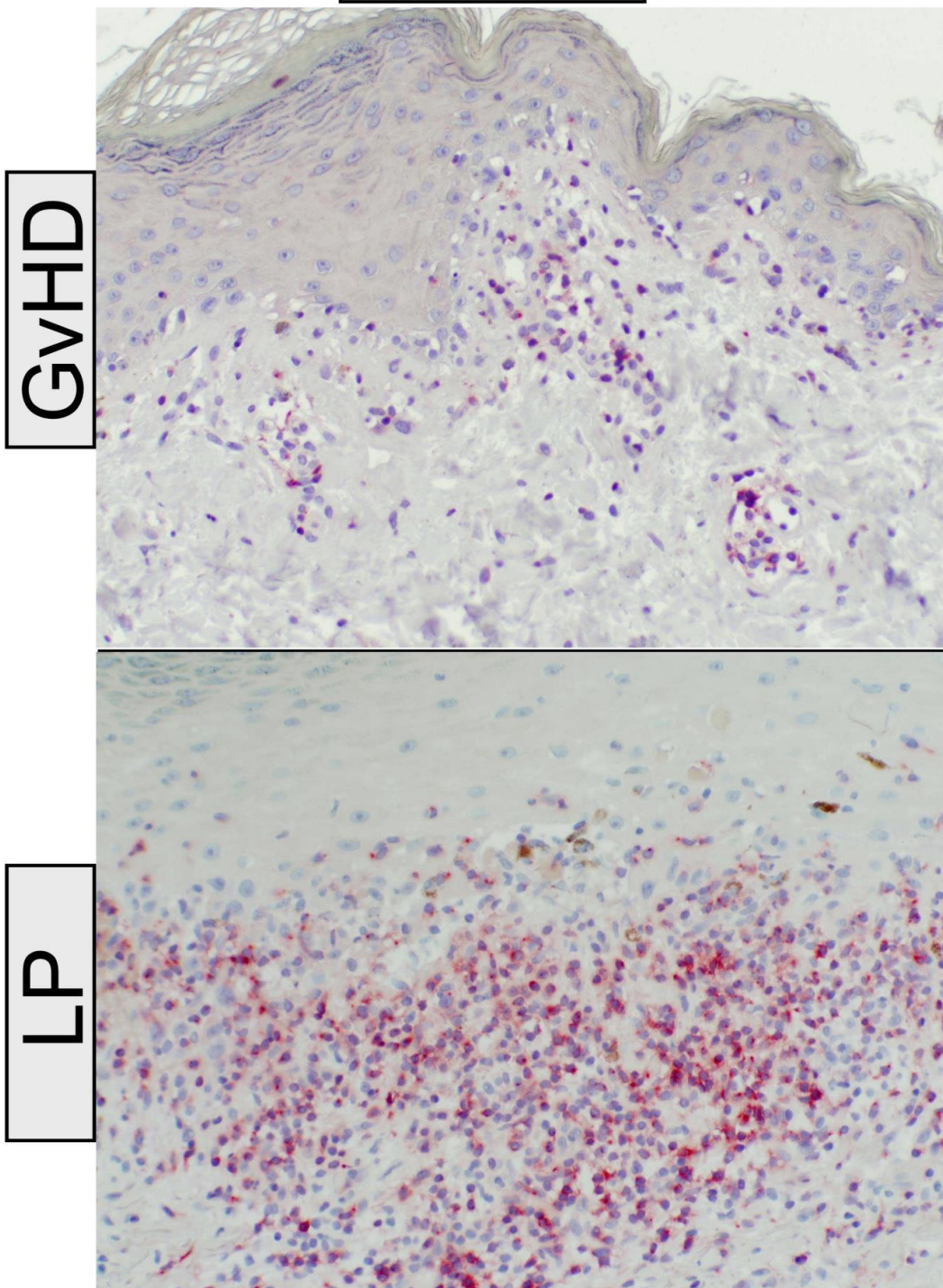
**CXCR3**

Abb. 4: CXCR3<sup>+</sup> Lymphozyten im inflammatorischen Infiltrat bei GvHD und Lichen Placus. Zellen wurden per High Power Feld (x200, HPF) gezählt. Etwa 60-90 % aller unter einer GvHD infiltrierenden lymphoiden Zellen exprimierten den Chemokin Rezeptor CXCR3

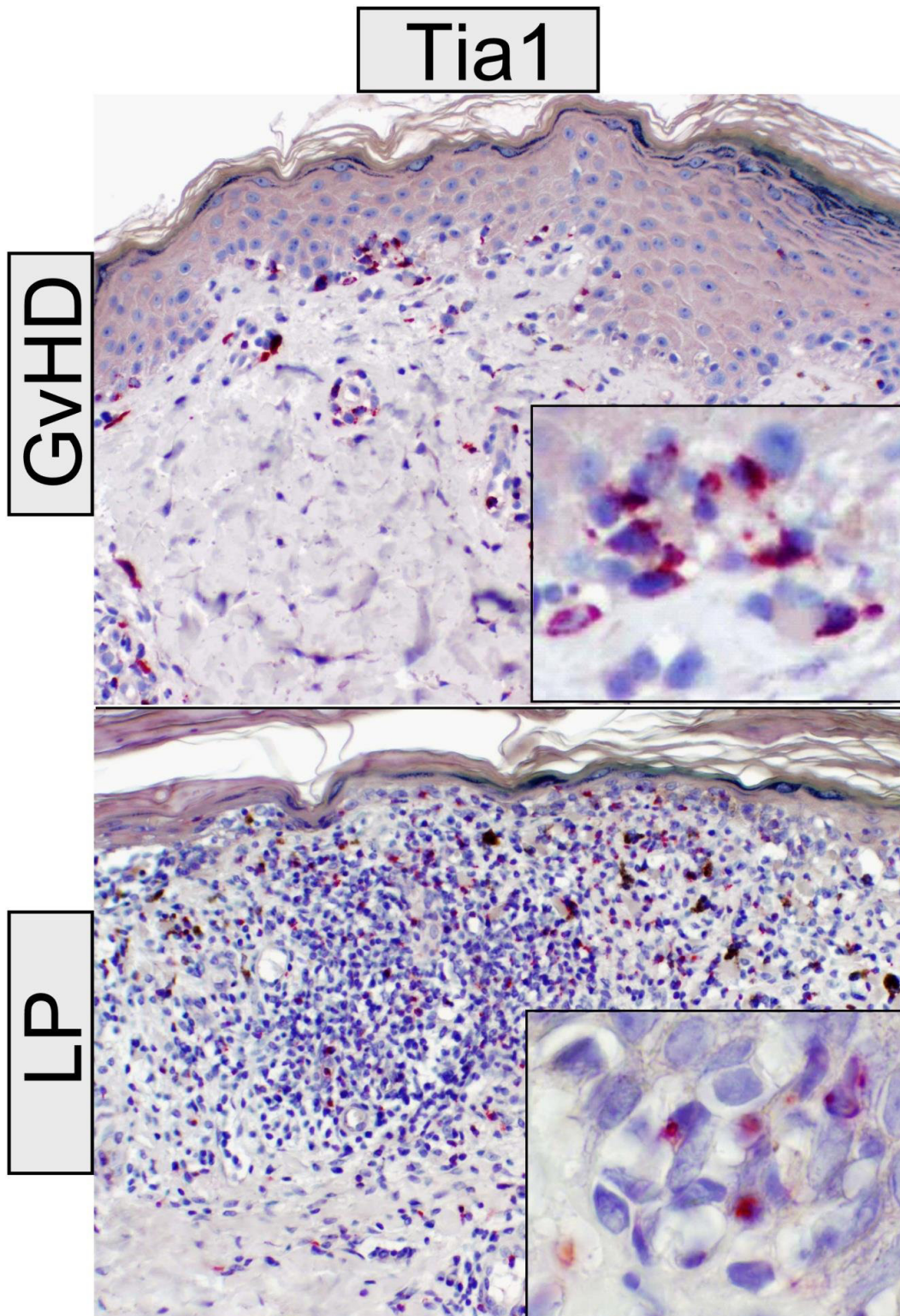


Abb. 5: Tia1 exprimierende Lymphozyten im inflammatorischen Infiltrat bei GvHD und Lichen Planus. Die Abbildung zeigt charakteristische Mikroskopaufnahmen der Tia1 Verteilung bei der lichenoiden GvHD und dem Lichen Planus (LP). Das entzündliche Infiltrat enthält eine Vielzahl von zytotoxischen Lymphozyten

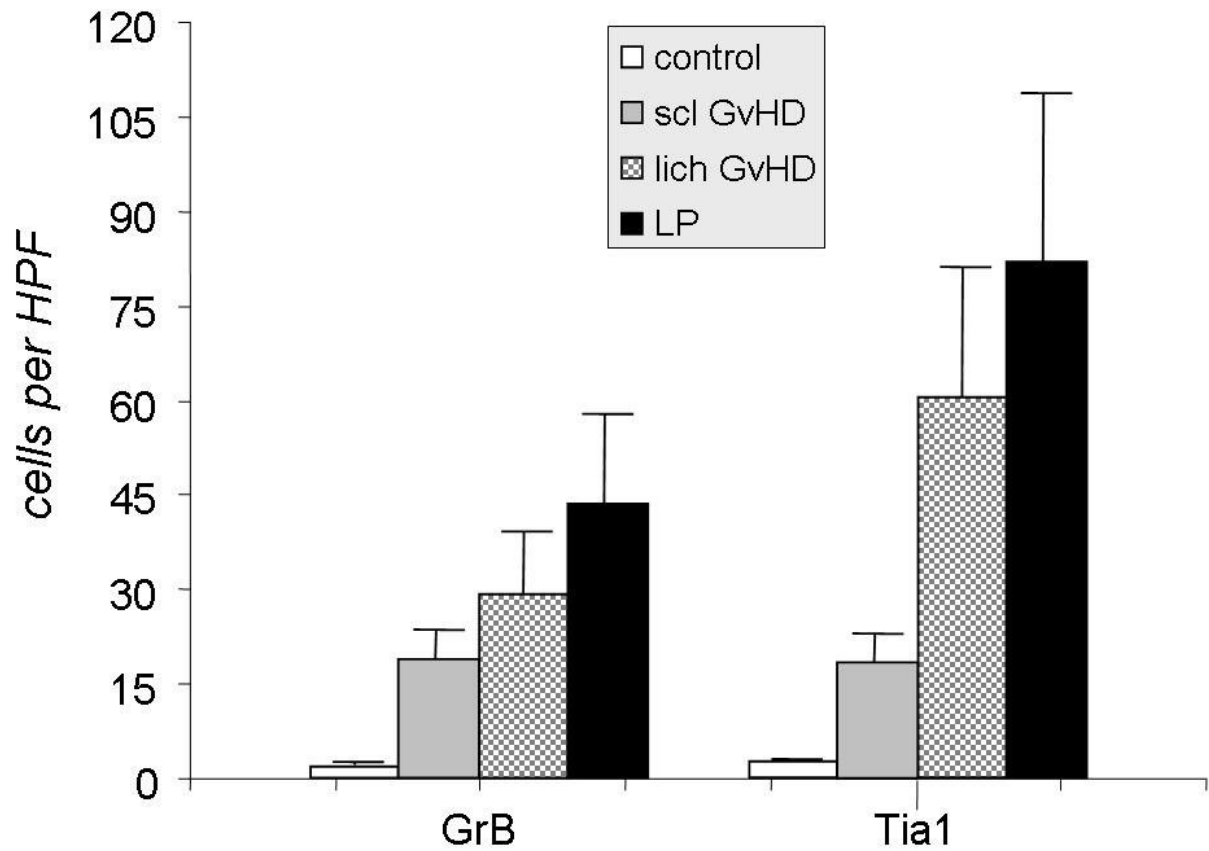


Abb. 6: Zytotoxische Eigenschaften des inflammatorischen Infiltrats bei GvHD und Lichen Planus. Zellen wurden per High Power Feld (x200, HPF) gezählt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die zytotoxischen Moleküle Granzym B und Tia 1 sind gegenüber der Kontrollgruppe stark erhöht

## 4.2 Läsionale Expression von Typ I IFN assoziierten Chemokinen bei der lichenoiden Graft-versus-Host Disease

Frühere Studien zeigten die Rolle von Typ I IFN gesteuerten Entzündungen bei Haut Störungen, welche sich histologisch durch eine zytotoxische Interface Dermatitis auszeichnen, wie etwa der Lichen Planus sowie der kutane Lupus Erythematodes.

Um zu untersuchen, ob ein vergleichbarer Mechanismus an der Pathogenese der liGvHD beteiligt ist, wurden alle GvHD Haut-Biopsien anhand immunohistochemischer Verfahren auf Anzeichen für eine läsionale IFN Ausprägung hin analysiert. Zuerst wurden die Proben mit einem, für das antivirale Protein MxA spezifischen, monoklonalen Antikörper gefärbt. MxA wird durch Typ I IFN stark induziert, während andere Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , nur eine schwach induzierende Wirkung haben. Nach vollständiger Induktion kann es zwischen 0,5 bis 1 % der zytosolischen Proteine (vgl. Horisberger 1992; Kotenko et al., 2003; Haller und Kochs, 2002) ausmachen. Es ist daher ein idealer Surrogat-Marker für Typ I Interferon (Signal-) Aktivität im Gewebe.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, zeigten unsere Analysen eine mittlere bis starke Expression von MxA in den Hautläsionen der liGvHD. Diese Expression war fast so stark wie beim LP. Eine MxA Expression konnte dabei ausschließlich in entzündeten Hautpartien gesehen werden, wobei sich die stärksten Signale in Bereichen mit einer extremen junctionalen Entzündung zeigten.

Anschließend wollten wir die läsionale Expression der CXCR3 Liganden CXCL9 und CXCL10 untersuchen, da bei der liGvHD eine große Anzahl von CXCR3<sup>+</sup> Lymphozyten beobachtet wurde. Diese Chemokine werden bekanntermaßen durch Typ I IFN induziert und scheinen eine bedeutende Rolle für die Rekrutierung von Lymphozyten bei LP und CLE zu spielen (Wenzel et al., 2006 ; Wenzel et al., 2005c ; Meller et al., 2005).

Es zeigte sich, dass CXCL9 in der Epidermis von liGvHD Läsionen stark exprimiert war, wie auch, in schwächerer Form, in der oberen Dermis, wobei sich ein vergleichbares Muster wie für MxA fand (Abb. 7). In allen untersuchten liGvHD Proben fand sich ebenfalls eine CXCL10 Expression, jedoch nur in epidermalen Bereichen mit extensiver basaler hydropischer Degeneration der basalen Schicht (Abb. 8). Die Muster der CXCL9 und CXCL10 Expression spiegelten ebenfalls die typischen Merkmale des LP wieder (Abb. 7+8).

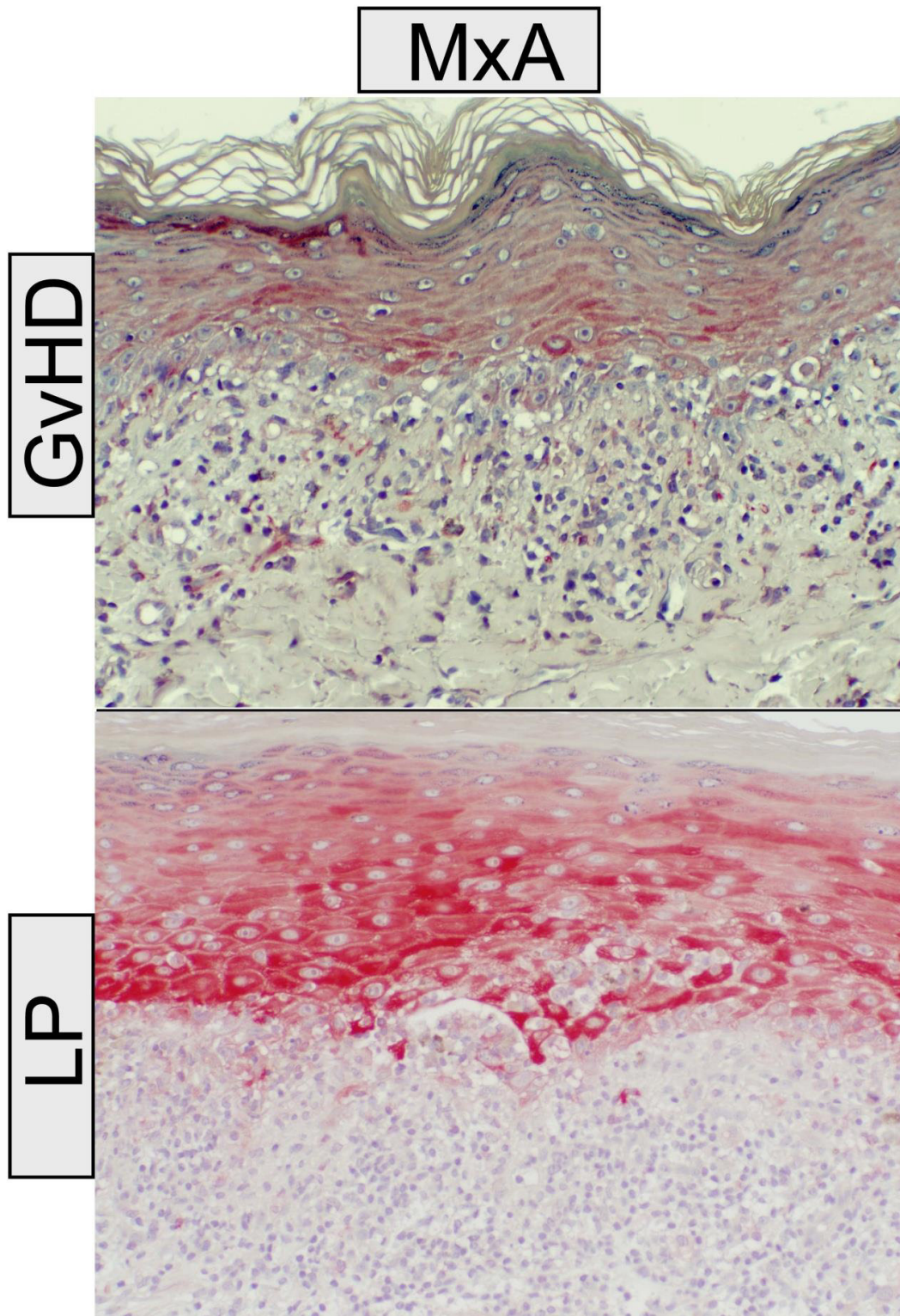


Abb 7: Nachweis des für Typ I IFN spezifischen Proteins MxA in Hautläsionen der GvHD und des Lichen Planus. Die Abbildung zeigt charakteristische Mikroskopaufnahmen der Expression des antiviralen Proteins MxA, welches ein spezifischer Typ I IFN Surrogat Marker ist



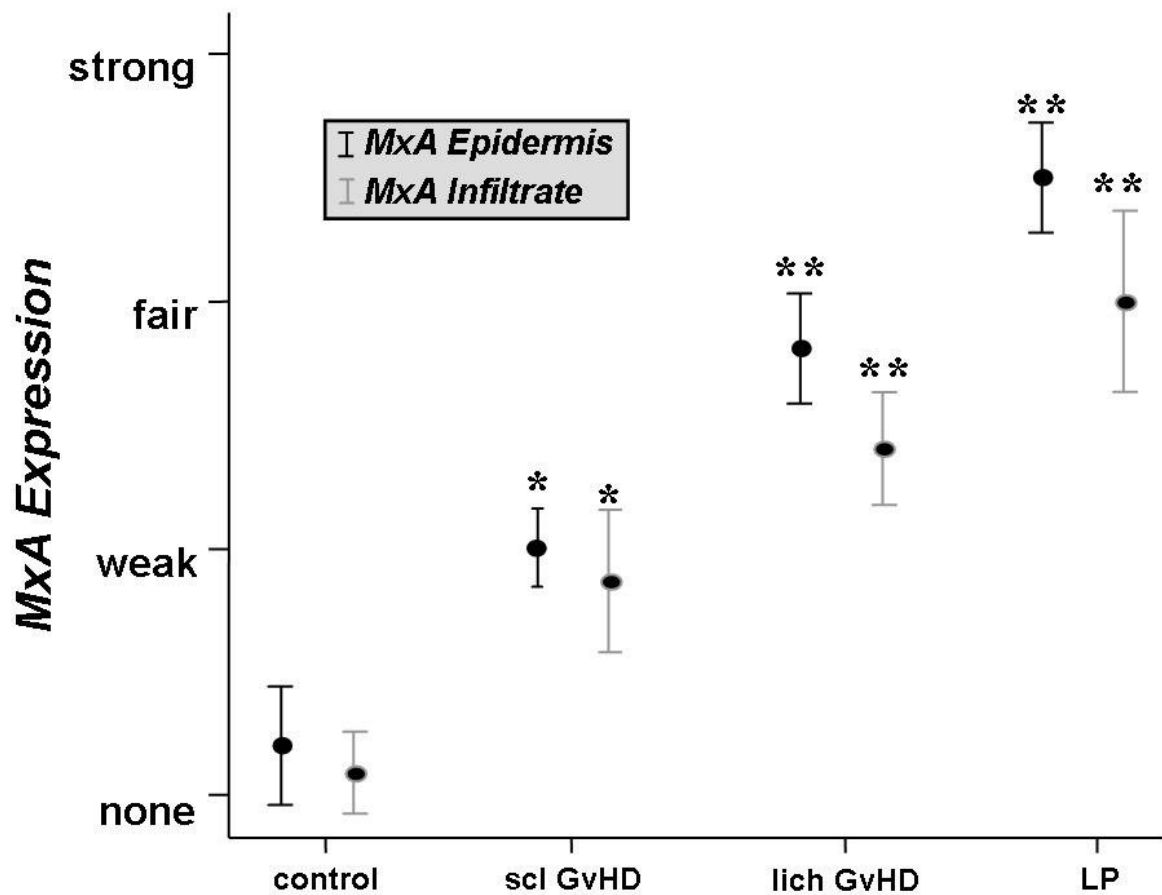


Abb 8: Expression des Typ I IFN spezifischen Proteins MxA. MxA ist für alle drei Krankheitsbilder gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dies deutet auf eine erhöhte Aktivität von Typ I Interferon in der Pathogenese dieser Erkrankungen hin. Die MxA Expression wurde semi-quantitativ bewertet. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 14 durchgeführt, wobei der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test verwendet wurde. Wahrscheinlichkeiten  $<0,05$  wurden als signifikant (\*), p-Werte  $<0,01$  als hochsignifikant (\*\*) gewertet

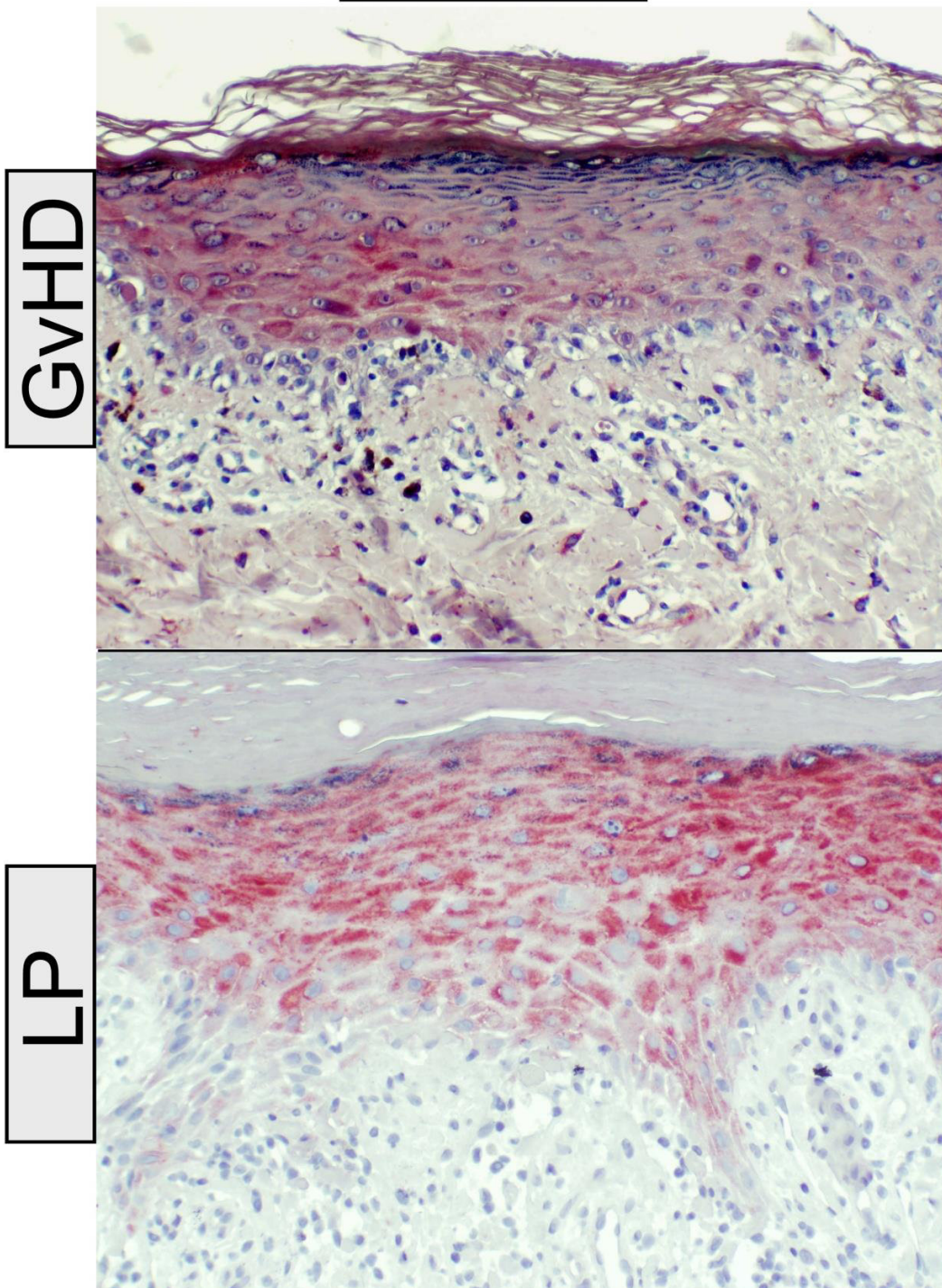
**CXCL9**

Abb 9: Läsionale Expression des Chemokins CXCL9 (Mig). Die Abbildung zeigt charakteristische Mikroskopaufnahmen der Expression des Chemokins CXCL9 in Hautläsionen bei der GvHD (oben) und dem Lichen Planus (unten). CXCL9 ist ein Ligand des CXCR3 Rezeptors

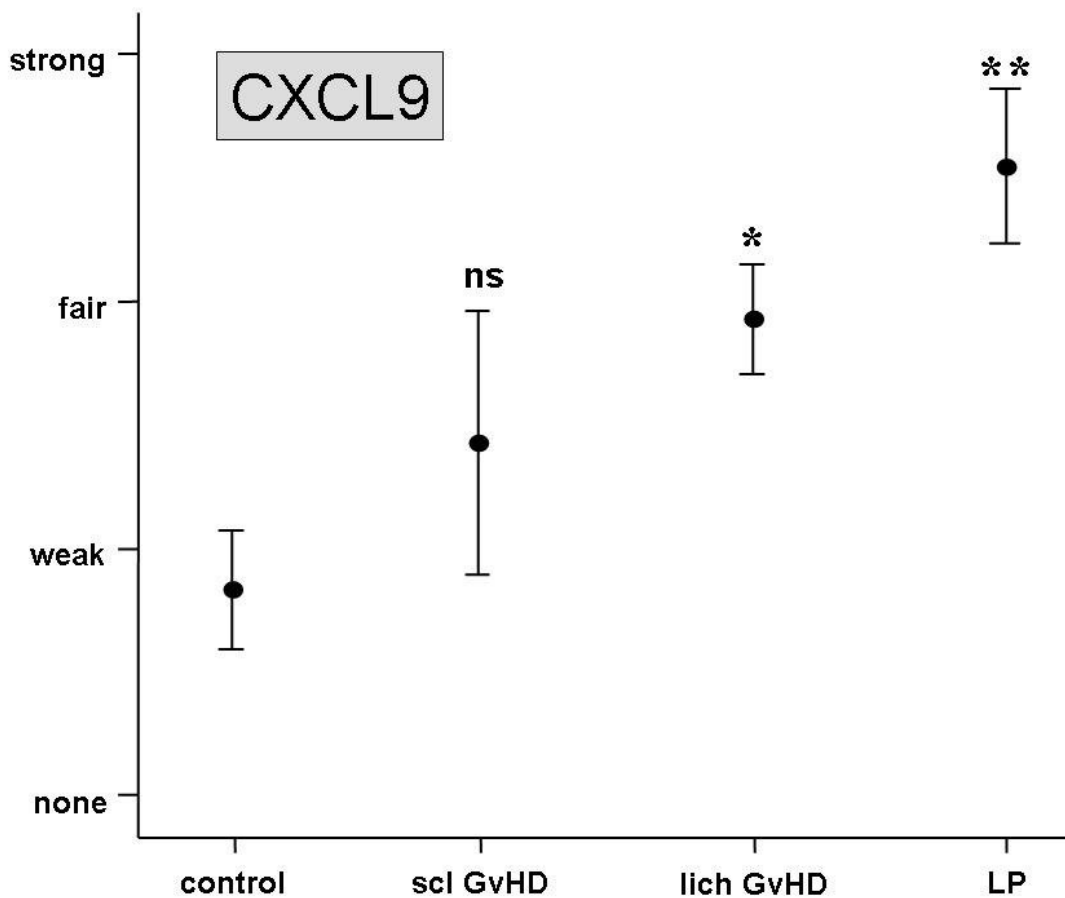


Abb 10: Erhöhte Aktivität des Chemokins CXCL9 (Mig). In den Proben von Patienten mit liGvHD war das CXCL9 Aufkommen signifikant erhöht. Bei der sclGvHD fand sich ebenfalls vermehrt CXCL9, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die CXCL9 Expression wurde semi-quantitativ bewertet. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 14 durchgeführt, wobei der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test verwendet wurde. Wahrscheinlichkeiten  $<0,05$  wurden als signifikant (\*), p-Werte  $<0,01$  als hochsignifikant (\*\*) gewertet

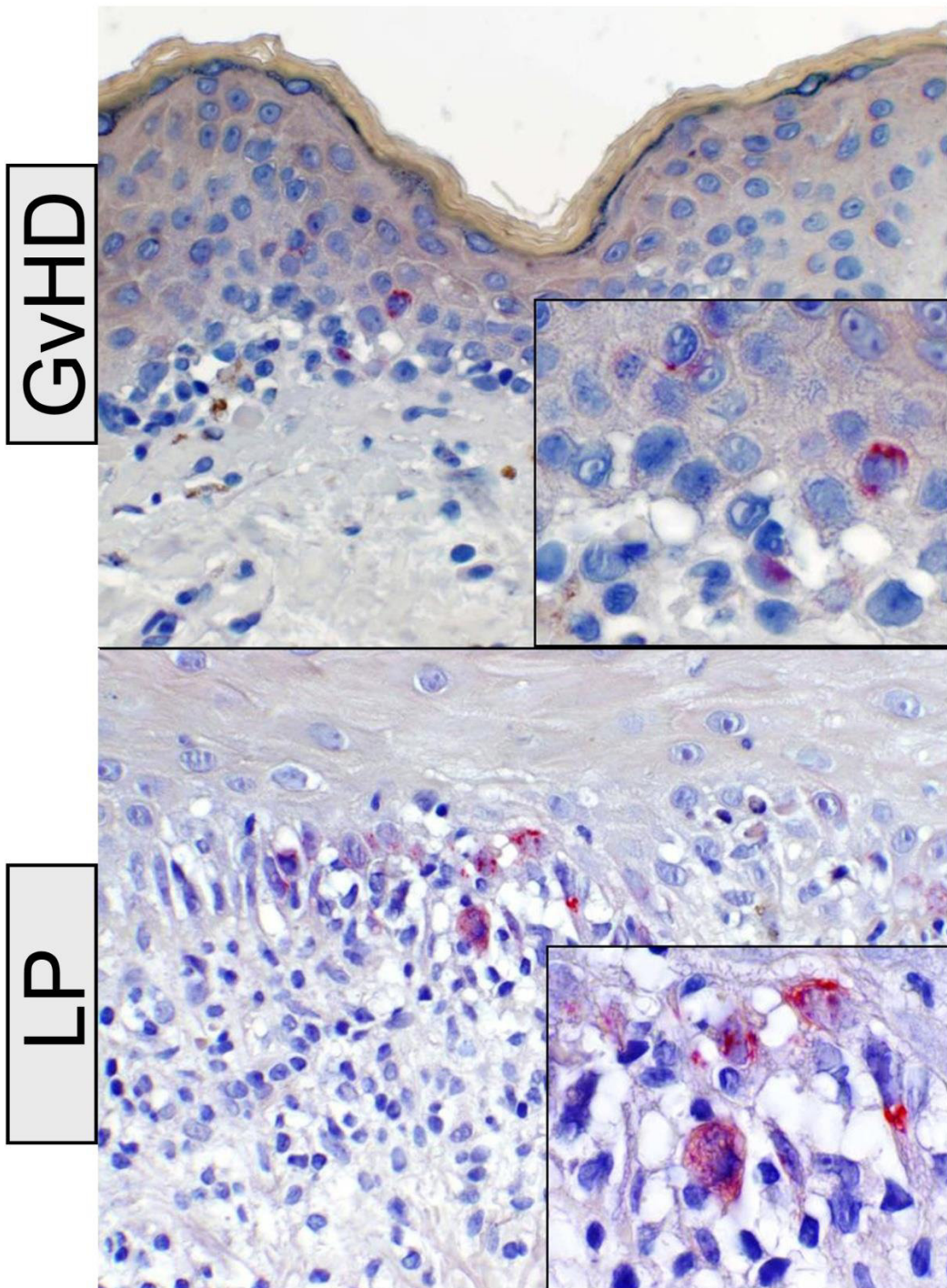
**CXCL10**

Abb 11: Läsionale Expression des Chemokins CXCL10 (IP-10). Die Abbildung zeigt charakteristische Mikroskopaufnahmen der Expression des Chemokins CXCL10 in Hautläsionen bei der GvHD (oben) und dem Lichen Planus (unten). CXCL10 ist ein Ligand des CXCR3 Rezeptors

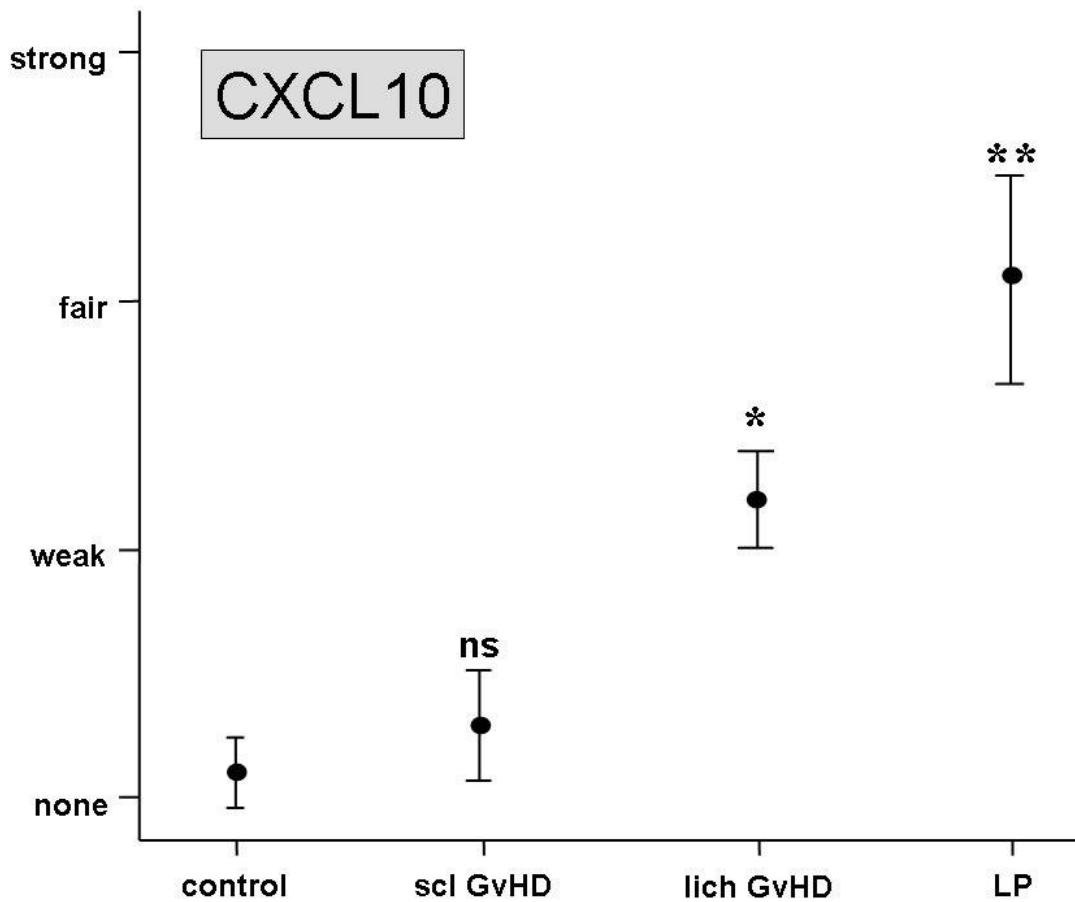


Abb 12: Erhöhte Aktivität des Chemokins CXCL10 (IP-10). In den Proben von Patienten mit liGvHD war das CXCL10 Aufkommen signifikant erhöht. Bei der sclGvHD fand sich ebenfalls vermehrt CXCL10, jedoch ohne statistische Signifikanz. Die CXCL10 Expression wurde semi-quantitativ bewertet. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 14 durchgeführt, wobei der nicht-parametrische Mann-Whitney-U Test verwendet wurde. Wahrscheinlichkeiten  $<0,05$  wurden als signifikant (\*), p-Werte  $<0,01$  als hochsignifikant (\*\*) gewertet

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Beteiligung einer CXCR3-Liganden gestützten T-Zell Rekrutierung an der Pathogenese der lichenoiden Graft-versus-Host Disease. Hierzu untersuchten wir Hautbiopsien von Patienten mit GvHD (8 Patienten), einer Kontrollgruppe von Patienten mit Lichen Planus (8 Patienten) sowie gesunder Hautareale (5 Patienten).

Zunächst wurden die Proben histologisch auf die Zusammensetzung des histologischen Infiltrats (CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, CD68) untersucht. Die Expression von CXCR3 auf den infiltrierenden Lymphozyten wurde analysiert. Zudem untersuchten wir die Proben auf die Präsenz und Verteilung der CXCR3 Liganden CXCL9 (Mig) und CXCL10 (IP-10). Die Ausprägung von Typ I Interferonen in den betroffenen Hautarealen wurden mittels des Markerproteins MxA aufgezeigt.

### 5.1 Effektorzellen der lichenoiden Graft-versus-Host Disease

Zunächst identifizierten wir die beteiligten Effektorzellen in den untersuchten Hautzellen. Die kutane GvHD ist eine sehr komplexe Erkrankung. Während vermutet wird, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Hauptrolle bei der akuten GvHD spielen, ist noch unklar, welcher T-Zelltyp der Haupteffektor einer chronischen GvHD ist.

Im Tierversuch verursachen T-Zellen Schäden im Rahmen einer cGvHD entweder durch direkte zytolytische Wirkung (CD8<sup>+</sup>/T<sub>h</sub>1-basiert), Sekretion inflammatorischer Zytokine (Lee et al., 2003) oder durch B-Zell Aktivierung und der Produktion von Autoantikörpern (CD4<sup>+</sup>/ T<sub>h</sub>2 basiert) (vgl. Lee, 2005). Welcher dieser Effektormechanismen im Vordergrund steht ist stark vom verwendeten Mausmodell abhängig (Cutler und Antin, 2006). Im *Parent-to-F1 Hybrid* Maus Modell scheinen vor allem eine humorale, von auto-reaktiven T<sub>h</sub>2 Zellen initiierte Immunantwort mit B-Zell Aktivierung und Antikörperfreisetzung für die Gewebsschäden verantwortlich zu sein (vgl. Parkman, 1998; Kansu, 2004; Lee, 2005). Aufgrund verschiedener Symptome wie Splenomegalie und Glomerulonephritis, die beim Menschen nicht typisch für eine cGvHD sind, ist die Relevanz dieses Modells allerdings fraglich (vgl. Lee, 2005; Sale, 2005). Zudem entsteht eine chronische GvHD in diesem Modell hauptsächlich dann, wenn die Anzahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen

gering ist, andernfalls entwickeln die Mäuse eine akute GvHD. In anderen Modellen kommt es zu einer autologen/ syngenen GvHD. Tiere mit ex-ante intaktem Thymus erhalten eine Bestrahlung sowie Gabe von Cyclosporin. Cyclosporin hemmt die klonale Deletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus (Lee et al., 2003). Infolgedessen kommt es zur Reaktion autologer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gegen Klasse II Antigene (vgl. Parkman 1998; Sale, 2005). In einem weiteren Mausmodell mindert eine frühzeitige Produktion von TGF- $\beta$  durch Spender T-Zellen eine aGvHD und ist notwendig für einen optimalen Graft-versus-Leukämie (GVL) Effekt. Eine TGF- $\beta$  Produktion mit deutlichem zeitlichem Abstand zur Transplantation stammt primär von mononuklearen Zellen und vermittelt eine cGvHD (Baird und Pavletic, 2006). Im ‚Parent-to-F1‘ Mausmodell scheinen T<sub>H</sub>2 Zellen, welche IL-4, IL-6 und IL-10 sezernieren, für die klinischen Symptome verantwortlich (Lee et al., 2003). Andere Studien weisen hingegen darauf hin, dass IL-10 Niveaus bei Patienten mit cGvHD vermindert sind, während IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ <sub>1</sub> erhöht sind (vgl. Barak et al., 1995; Liem et al., 1999; Lee, 2005).

Frühere Studien belegen, dass zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen für das histologische „Interface“ Muster bei T-Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen der Haut verantwortlich sind. So zeigten Bovenschen et al. (2005), dass aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der junktionalen Zone ein Kennzeichen für Lichen Planus Hautläsionen, verglichen mit atopischer Dermatitis und Psoriasis, darstellen. Sugerman et al. (2000) etablierten CD8<sup>+</sup> autozytotoxische T-Zell Linien aus LP Hautbiopsien, welche autologe Keratinozyten-Antigene erkennen.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir, welche Zelltypen vornehmlich die erkrankten Hautareale der Patienten mit GvHD infiltrieren, und ob die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats dem beim LP ähnelt. Infiltrierende T-Lymphozyten untersuchten wir zudem auf ihr zytotoxisches Potential.

In unseren Präparaten zur lichenoiden GvHD dominierten CD3<sup>+</sup> Lymphozyten in den analysierten Hautläsionen. Außerdem fanden sich einige CD68<sup>+</sup> Makrophagen, jedoch nur eine geringe Anzahl an B-Zellen. Dieses Muster spricht für eine Th1 basierte Entzündungsreaktion. Wir stellten fest, dass hauptsächlich CD8<sup>+</sup> Lymphozyten in die basale Schicht eindrangen, während CD4<sup>+</sup> Zellen vermehrt im dermalen Infiltrat zu sehen waren. Die infiltrierenden Lymphozyten exprimierten mehrheitlich die zytotoxischen Moleküle

Granzym B und Tia.

Frühere Studien zeigen ebenfalls, dass beim Menschen eher CD8<sup>+</sup> T-Zellen im entzündlichen Infiltrat dominieren. Die Präsenz von Interferon- $\gamma$  weist zudem darauf hin, dass die nachgewiesenen CD4<sup>+</sup> Zellen vom T<sub>h</sub>1 Typ sind (vgl. Aractingi und Chosidow, 1998; Fimiani et al., 2003). Es wird vermutet, dass T<sub>h</sub>1 – T<sub>h</sub>2 Ungleichgewichte generell die Entwicklung einer cGvHD begünstigen (Fimiani et al., 2003).

Eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion wurde in Hautbiopsien von Patienten mit cGvHD nachgewiesen (Parkman 1998, Fimiani et al., 2003). Dies lässt einen T<sub>h</sub>1 basierten Mechanismus der Pathogenese vermuten. So hemmt IFN- $\gamma$  die Proliferation von T<sub>h</sub>2 Zellen und die Aktivierung von IL-4 induzierten B-Zellen, während IL-4 die Zytokinproduktion durch T<sub>h</sub>1 Zellen und die IL-2 induzierte Proliferation von T- und B-Zellen hemmt (Fimiani et al., 2003). Eine erhöhte TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  Transkription wiesen unabhängig voneinander auf das Einsetzen einer extensiven cGvHD hin (Baird und Pavletic, 2006; Ritchie et al., 2005). TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  werden durch Keratinozyten in der läsionalen Haut von Patienten mit cGvHD konstant produziert. Diese beiden Zytokine sind daher wahrscheinlich am entzündlichen Prozess bei der cGvHD beteiligt. Im Gegensatz hierzu war die Ausprägung von IL-8 vergleichbar zu den Kontrollgruppen, so dass dieses Zytokin nicht an den GvHD Läsionen beteiligt scheint (Aractingi, Chosidow 1998).

Bei der Produktion dieser verschiedenen Zytokine scheint Antigen-präsentierenden Zellen eine wichtige Rolle zuzukommen. Chan et al. (2003) zeigten, dass der Verbleib von Dendritischen Zellen des Empfängers an Tag 100+ signifikant mit der Entwicklung einer schweren akuten und chronischen GvHD korrelierten (vgl. auch Kansu, 2004).

Unsere Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Hautschäden im Rahmen der lichenoiden GvHD durch zytotoxische T-Zellen verursacht werden. Wir stellten uns die Frage, welche Mechanismen entscheidend zur Rekrutierung dieser Effektorzellen in die erkrankten Hautareale beitragen.

## **5.2 CXCR3 – Liganden gestützte Rekrutierung von T-Lymphozyten im Rahmen der lichenoiden Graft-versus-Host Disease**

Wir vermuteten, dass ein Zusammenspiel des Chemokinrezeptors CXCR3 und seiner



Liganden CXCL9 und CXCL10 entscheidend an der Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen in die entzündeten Hautareale einer lichenoiden GvHD beteiligt ist. Wir konnten zeigen, dass die Mehrheit der infiltrierenden mononuklearen Zellen den Chemokin Rezeptor CXCR3 exprimierte. Der CXCR3 Ligand CXCL9 fand sich bei beiden Erkrankungen in der gesamten Epidermis, während CXCL10 jeweils genau in den Gebieten mit erheblicher basaler hydropischer Degeneration gefunden wurde.

Frühere experimentelle Studien an Mäusen durch Duffner et al. (2003) unterstreichen eine Bedeutung von CXCR3 und seiner Liganden für die Entwicklung der GvHD. Im Tierversuch mit MiHC inkompatiblen Spender-Empfänger Paaren erhielten mit einer letalen Dosis bestrahlte C3H.SW Empfänger-Mäuse Transplantate entweder von Wild-Typ B6 oder von CXCR3 (-/-) B6 Spendern. Hier zeigten sich nach Zellimplantaten von CXCR3<sup>-/-</sup> Mäusen eine höhere Anzahl von, insbesondere aktivierten, CD8<sup>+</sup> T Lymphozyten in der Milz, während deren Anzahl im Dünndarm im Vergleich zu Wild-Typ Spendern signifikant geringer ist. Dies deutet darauf hin, dass die CXCR3 – Liganden Interaktion zwar für die Rekrutierung von aktivierten zytotoxischen T-Zellen in die Zielorgane der GvHD, nicht aber deren vorherige Migration in die sekundären Lymphorgane von Bedeutung ist, was vor allem hinsichtlich der Erhaltung des wünschenswerten Graft-versus-Leukämie Effekts bei einer potentiellen therapeutischen Intervention bei der GvHD interessant ist.

Für die Serumspiegel von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  waren im Vergleich zwischen CXCR3<sup>-/-</sup> und Wild-Typ Spender keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Das Fehlen des CXCR3 Rezeptors scheint somit weder die T-Zell Antwort auf Wirtsantigene noch die systemische Entzündungsreaktion zu beeinflussen. Bei CXCR3<sup>-/-</sup> Spender-zellen zeigten sich in dem Modell deutlich geringere histopathologische Veränderungen von Dünndarm und Leber im Vergleich zu Wild-Typ Spendern. Die Mortalität sowie die Schwere der Erkrankung waren ebenfalls niedriger bei CXCR3<sup>-/-</sup> Spendern.

Diese Resultate werden durch neueste Ergebnisse im Rahmen eines Scl GvHD Maus Modell unterstützt, in dem BALB/c (H-2d) Mäusen B10.DS (H-2d) Knochenmark und Milzzellen transplantiert wurde. Diese Mäuse entwickelten Hautverdickungen mit starker kutaner Ausprägung von mRNAs für CXCL9 und CXCL10 (vgl. Zhou et al., 2007). Die Tierstudien von Anderson et al. (2005) und Mapara et al. (2006), die sich auf die Rolle

von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei der GvHD konzentrieren, zeigten ebenfalls eine starke Ausprägung von CXCR3 Liganden. Obwohl hier CXCR3 (-/-) Spender Lymphozyten verwendet wurden, entwickelten die Mäuse eine GvHD, was eher auf eine unterstützende Rolle dieser Chemokine für die CD4<sup>+</sup> vermittelten Erkrankungen im Rahmen dieses Mausmodells spricht.

In einer separaten Studie der Gruppe um Duffner (Teshima et al., 1999) in einem Modell mit MHC Inkompatibilität, hatte die Eliminierung von CXCR3 ebenfalls keine signifikanten Effekte. Bei MHC Unterschieden ist die erfolgende Immunreaktion tendenziell CD4<sup>+</sup> basiert, während bei MiHC Differenzen CD8<sup>+</sup> T-Zellen überwiegen. Möglicherweise ist die Rekrutierung von zytotoxischen T-Zellen via CXCR3 daher hauptsächlich bei Schäden durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen relevant.

Jaksch et al. (2005) kommen in einer klinischen Studie zu dem Schluss, dass eine Korrelation zwischen dem Grad der Ausprägung verschiedener Chemokinrezeptoren, insbesondere CXCR3 und dem Auftreten einer akuten GvHD besteht. Piper et al. (2007) stellten erhöhte Serumlevel von CXCL10 bei Patienten mit einer akuten GvHD fest. In Hautbiopsien dieser Patienten fand sich eine beträchtliche Anzahl infiltrierender CXCR3<sup>+</sup> Zellen.

Unsere Ergebnisse unterstützen eine bedeutende Beteiligung des Chemokinrezeptors CXCR3 und seiner Liganden an den durch zytotoxische T-Zellen verursachten entzündlichen Prozessen der Haut im Rahmen einer chronischen GvHD (Bouazzoui et al., 2008; Croudace et al., 2012; He et al., 2008; Villarroel et al., 2014; Wenzel et al., 2008b).

### **5.3 Die Rolle der Typ I Interferone bei der lichenoiden Graft-versus-Host Disease**

Klinische Beobachtungen weisen auf eine wichtige Rolle von Interferonen im Rahmen der Graft-versus-Host Disease hin. Patienten die unter einer GvHD leiden zeigen typische Zeichen einer kräftigen Typ I IFN Produktion wie Fieber, Abgeschlagenheit, Arthralgie und Myalgie.

Wir vermuteten eine zentrale Rolle von Typ I Interferonen bei der Induktion der T-Zell Rekrutierung über den CXCR3-Liganden Mechanismus. Typ I Interferone induzieren die proinflammatorischen Chemokine CXCL9 (Mig) und CXCL10 (IP10), welche CXCR3<sup>+</sup>

Lymphozyten und CXCR3<sup>+</sup> pDCs rekrutieren (Moser et al., 2001). Damit unterstützen die Interferone die Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten zu den Entzündungsorten (Wenzel et al., 2005a).

Über den Nachweis des für Typ I Interferone spezifischen MxA Proteins konnten wir eine hohe Typ I IFN Aktivität in Hautläsionen der liGvHD zeigen. Diese zeigte sich ausschließlich in entzündlichen Hautgebieten und folgte einem ähnlichen Muster wie die Ausprägung von CXCL9. Diese Ergebnisse sprechen für eine wichtige Beteiligung der Typ-I Interferone und inflammatorischer Chemokine an der Pathogenese der GvHD. IFN- $\alpha$  hat eine starke proinflammatorische Wirkung. Es unterstützt die Ausprägung von Klasse I und II MHC Antigenen und kann zudem die Aktivierung von Adhensionsmolekülen induzieren, welche an der initialen Amplifikation der allogenen Antwort beteiligt sind (vgl. Dorr, 1993; Lo Iacono et al., 1998).

Typ I IFN steigern die Aktivität Natürlicher Killerzellen, von denen gezeigt wurde, dass sie als Mediatoren von Gewebsschäden im Rahmen der GvHD fungieren und die zytotoxische Kapazität zirkulierender Lymphozyten erhöhen (vgl. Ghayur et al., 1997; Guillot et al., 2005).

Während in der Literatur zur GvHD vielfach auf erhöhte Vorkommen von IFN- $\gamma$  hingewiesen wird, deuten unsere Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von Typ I Interferonen bei der Entstehung einer GvHD hin. Typ I Interferone induzieren die Ausschüttung der Chemokine CXCL9 und CXCL10 durch dendritische Zellen (Padovan et al., 2002; vgl. auch Ogasawara et al. 2002) und stimulieren die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  durch STAT4 Aktivierung (Baccala et al., 2005 ; Theophilopoulos et al., 2005). Sie induzieren die Produktion von CXCL9 und CXCL10 durch Keratinozyten und unterstützen so die Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup> Effektor Zellen in die Haut (Wenzel et al., 2005c ; Meller et al., 2005).

Klinische Untersuchungen deuten ebenfalls auf eine pathogene Rolle von Typ I IFN bei der Entwicklung einer GvHD hin: mehrere Fallstudien berichten über eine Verschlimmerung der GvHD nach der Behandlung mit rekombinanten IFN- $\alpha$  (vgl. Klingemann et al., 1991, Serrano et al., 2001). Eine Gruppe um Klimpel (Cleveland et al., 1987; Reyes und Klimpel, 1987) fanden deutliche Anzeichen für erhöhte IFN Aktivität im Serum sowohl bei der akuten als auch der chronischen Form der GvHD im Mausmodell. Die aktiven

Interferone wurden dabei als Typ I IFN charakterisiert. Die Milz wurde als Herkunftsort dieser Interferone identifiziert. Die IFN Produktion im Rahmen der aGvHD war dabei von der Präsenz von Spender T-Zellen abhängig. Es zeigte sich eine starke Korrelation der Typ I IFN Aktivität und dem Auftreten sowohl der akuten als auch der chronischen GvHD. Unsere Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von Typ I Interferonen an der Pathogenese der liGvHD hin.

#### **5.4 Synthese**

Unsere Analysen zeigten Gemeinsamkeiten zwischen den zytotoxischen Entzündungsmustern bei der lichenoiden GvHD und dem Lichen Planus. Beide Krankheiten gehen mit einer erheblichen lymphozytischen Interface-Dermatitis sowie einer starken epidermalen Ausprägung des MxA Proteins – einem hochspezifischen Surrogat Marker für läSIONALE Typ I IFN Signalaktivität – einher. Unsere histologischen Beobachtungen der GvHD entsprechen einer Typ I IFN assoziierten zytotoxischen Entzündung, wie sie typischerweise in diversen T-Zell vermittelten Autoimmunkrankheiten der Haut, die mit einer junctionalen Entzündung einhergehen, wie Lichen Planus, kutaner Lupus erythematoses, Dermatomyositis und Lichen Sclerosus, beobachtet wird (vgl. Wenzel et al., 2005c, 2005d, 2006, 2008).

Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 und seine durch Typ I Interferone induzierbaren Liganden CXCL9 und CXCL10 an der Rekrutierung von Lymphozyten bei der kutanen lichenoiden GvHD beteiligt sind.

Insbesondere die Tatsache, dass CXCL10 genau in den Gebieten gesehen wurde in denen eine deutliche Verflüssigung der basalen Epidermis erfolgte, unterstützt eine Beteiligung dieses Chemokins an der Entwicklung des typischen histologischen „Interface“ Musters, welches durch CD8+ Effektorzellen vermittelt wird.

Unsere Beobachtung der Typ I IFN assoziierten Entzündung und die Tatsache, dass Keratinozyten, zumindest bei einigen Patienten, selbst IFN- $\alpha$  Produzenten in GvHD HautläSIONen sind, könnte die Tür für alternative therapeutische Behandlungsansätze öffnen, die auf diese Mechanismen einwirken.

## 6. Zusammenfassung

Einleitung: Die Graft-versus-Host Disease (GvHD) ist eine immunologisch vermittelte Reaktion nach einer Stammzell- oder Knochenmarktransplantation. Im Transplantat enthaltene Immunzellen des Spenders greifen den Host an. Die kutanen Manifestationen der lichenoiden GvHD ähneln histologisch dem Krankheitsbild des Lichen Planus. Für den LP konnte eine Typ I Interferon induzierte T-Zell Rekrutierung in die Epidermis nachgewiesen werden. Aufgrund der histologischen Ähnlichkeiten vermuteten wir einen vergleichbaren Mechanismus in der Pathogenese der liGvHD.

Methode: Wir analysierten Proben von Patienten mit lichenoider und sclerodermatöser GvHD Als Kontrollkollektiv verwendeten wir Proben aus gesunder Haut sowie Proben von Patienten mit LP Läsionen. Wir identifizierten die an der Entzündung beteiligten Effektorzellen und untersuchten die Ausprägung des Chemokinrezeptors CXCR3 und seiner Liganden CXCL9 und CXCL10 sowie das Aufkommen des für Typ I IFN hochspezifischen Markerproteins MxA am Entzündungsort mittels immunhistochemischer Färbung.

Ergebnis: Alle GvHD Hautläsionen zeichneten sich durch ein Vorherrschen von CD3<sup>+</sup> Lymphozyten im entzündlichen Infiltrat aus. Nahezu alle Zellen die im Rahmen einer liGvHD in die Epidermis eindringen, waren CD8 positiv. 60-90 % aller unter liGvHD infiltrierenden lymphoiden Zellen exprimierten den Chemokin Rezeptor CXCR3. Eine mittlere bis starke MxA Expression zeigte sich in den entzündeten Hautpartien bei liGvHD. CXCL9 war in der Epidermis von liGvHD Läsionen stark exprimiert, wobei das Muster der MxA Expression entsprach. CXCL10 zeigte sich in epidermalen Bereichen mit extensiver hydropischer Degeneration der basalen Schicht.

Diskussion: Die vorliegende Arbeit unterstützt das Konzept einer Th1 basierten, T-Zell vermittelten Pathogenese der chronischen liGvHD. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass der Chemokinrezeptor CXCR3 und seine durch Typ I Interferone induzierbaren Liganden CXCL9 und CXCL10 an der Rekrutierung von Lymphozyten bei der kutanen liGvHD beteiligt sind.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb.1: CD3 <sup>+</sup> Lymphozyten im inflammatorischen Infiltrat bei GvHD und Lichen Planus	41
Abb. 2: Infiltration von liGvHD Hautläsionen mit CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	42
Abb. 3: Charakterisierung des inflammatorischen Infiltrats bei GvHD und Lichen Planus	43
Abb. 4: CXCR3 <sup>+</sup> Lymphozyten im inflammatorischen Infiltrat bei GvHD und Lichen Planus	44
Abb. 5: Tia1 exprimierende Lymphozyten im inflammatorischen Infiltrat bei GvHD und Lichen Planus	45
Abb. 6: Zytotoxische Eigenschaften des inflammatorischen Infiltrats bei GvHD und Lichen Planus	46
Abb. 7: Nachweis des für Typ I IFN spezifischen Proteins MxA in Hautläsionen der GvHD und des Lichen Planus	48
Abb. 8: Expression des Typ I IFN spezifischen Proteins MxA	49
Abb. 9: Läsionale Expression des Chemokins CXCL9 (Mig)	50
Abb.10: Erhöhte Aktivität des Chemokins CXCL9 (Mig)	51
Abb.11: Läsionale Expression des Chemokins CXCL10 (IP-10)	52
Abb.12: Erhöhte Aktivität des Chemokins CXCL10 (IP-10)	53

## 8. Literaturverzeichnis

Akbar AN, Lord JM, Salmon M. IFN-alpha and IFN-beta: a link between immune memory and chronic inflammation. *Immunol Today* 2000; 21: 337-342

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

Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic Graft-versus-Host disease: requirements depend on target organ. *Blood* 2005; 105: 2227-2234

Aractingi S, Chosidow O. Cutaneous Graft-versus-Host Disease. *Arch Dermatol* 1998; 134: 602-612

Arpinati M, Chirumbolo G, Urbini B, Perrone G, Rondelli D, Anasetti C. Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 2003;11: 345-356

Baccala R, Kono DH, Theofilopoulos AN. Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity. *Immunol Rev* 2005; 204: 9-26

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

Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 426-435

Barak V, Levi-Schaffer F, Nisman B, Nagler A. Cytokine dysregulation in chronic graft versus host disease. *Leuk Lymphoma* 1995; 17: 169-173

Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25: 357-371

Bikoff EK, Jaffe L, Ribaldo RK, Otton GR, Germain RN, Robertson EJ. MHC class I surface expression in embryo-derived cell lines inducible with peptide or interferon. *Nature* 1991; 354: 235-238

Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators-a new look. *Immunity* 2001; 14: 661-664

- Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 443-458
- Blomberg S, Eloranta ML, Cederblad B, Nordlin K, Alm GV, Rönnblom L. Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001; 10: 484-490
- Bonsmann G, Schiller M, Luger TA, Ständer S. Terbinafine-induced subacute cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44: 925-931
- Bouazzaoui A, Spacenko E, Mueller G, Miklos S, Huber E, Holler E, Andreesen R, Hildebrandt GC. Chemokine and chemokine receptor expression analysis in target organs of acute graft-versus-host disease. *Genes Immun* 2009; 10: 687-701
- Bovenschen HJ, Seyger MM, Van de Kerkhof PC. Plaque psoriasis vs. atopic dermatitis and lichen planus: a comparison for lesional T-cell subsets, epidermal proliferation and differentiation. *Br J Dermatol* 2005; 153: 72-78
- 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
- Chan GW, Gorgun G, Miller KB, Foss FM. Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003; 9: 170-176
- Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, Loetscher P. Structure-Function Relationship between the Human Chemokine Receptor CXCR3 and Its Ligands. *J Biol Chem* 2003; 278: 289-295
- Cleveland MG, Lane RG, Klimpel GR. Enhanced Interferon- $\alpha/\beta$  (IFN- $\alpha/\beta$ ) and Defective IFN- $\gamma$  Production in Chronic Graft versus Host Disease: A Potential Mechanism for Immunosuppression. *Cell Immunol* 1987; 110: 120-130
- Cutler C, Antin JH. Chronic graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol* 2006; 18: 126-131
- Croudace JE, Inman CF, Abbotts BE, Nagra S, Nunnick J, Mahendra P, Craddock C, Malladi R, Moss PA. Chemokine-mediated tissue recruitment of CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells plays a major role in the pathogenesis of chronic GVHD. *Blood* 2012; 120: 4246-4255



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

Dormann A, Luley C, Wege T (Hrsg.). *Laborwerte* (4., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage). München: Elsevier, 2005

Dorr RT. Interferon-alpha in malignant and viral diseases - A review. *Drugs* 1993; 45: 177-211

Duffner U, Lu B, Hildebrandt GC, Teshima T, Williams DL, Reddy P, Ordemann R, Clouthier SG, Lowler K, Liu C, Gerard C, Cooke KR, Ferrara JLM. Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol* 2003; 31: 897-902

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

Ferrara J. Pathogenesis of Acute Graft-versus-Host Disease: Cytokines and Cellular Effectors. *J Hematother Stem Cell Res* 2000; 9: 299-306

Fimiani M, De Aloe G, Cuccia A. Chronic graft versus host disease and skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003; 17: 512-517

Firoz BF, Lee SJ, Nghiem P, Qureshi AA. Role of Skin Biopsy to Confirm Suspected Acute Graft-vs-Host-Disease. *Arch Dermatol* 2006; 142: 175-182

Fitzgerald-Bocarsly P. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 1993; 60: 39-62

Fritsch P. *Dermatologie und Venerologie Grundlagen Klinik Atlas* (2., vollst. überarb. Ausg.) Berlin: Springer Verlag, 2003

Furter S, Jasch KC. *Crashkurs Dermatologie* (1. Auflage). München: Elsevier, 2007

Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, Quintal L, Sekut L, Talanian R, Paskind M, Wong W, Kamen R, Tracey D, Alien H. Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 1997; 386: 619-623

Gilliam A. Update on Graft versus Host Disease. *J invest dermatol* 2004; 123: 251-257

- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000; 81: 2341-2364
- Graubert TA, Russell JH, Ley T. The role of granzyme B in murine models of acute graft-versus-host disease and graft rejection. *Blood* 1996; 87: 1232-1237
- Guillot B, Portales P, Du Thanh A, Merlet S, Dereure S, Clot J, Corbeau P. The expression of cytotoxic mediators is altered in mononuclear cells of patients with melanoma and increased by interferon-alpha treatment. *Br J Dermatol* 2005; 152: 690-696
- Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 2002 3: 710–717
- He S, Cao Q, Qiu Y, Mi J, Zhang JZ, Jin M, Ge H, Emerson SG, Zhang Y, Zhang Y. A new approach to the blocking of alloreactive T cell-mediated graft-versus-host disease by in vivo administration of anti-CXCR3 neutralizing antibody. *J Immunol* 2008; 181: 7581-7592
- Horisberger MA. Interferon-induced human protein MxA is a GTPase which binds transiently to cellular proteins. *J Virol* 1992; 66: 4705-4709
- 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 IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism. *Am J Pathol* 2003; 163: 261–268
- Jaksch M, Remberger M, Mattsson J. Increased Gene Expression of Chemokine Receptors Is Correlated with Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 280-287
- Jaksch M, Mattsson J. The Pathophysiology of Acute Graft-Versus-Host Disease. *Scand J Immunol* 2005; 61: 398-409
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie* (5. Auflage). Heidelberg, Berlin: Spektrum Akad Verl, 2002
- Kansu E. The Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Int J Hematol* 2004; 79: 209-215
- Karrer S. Graft-versus-Host-Disease der Haut. *Hautarzt* 2003; 5: 465-480

- Karrer S, Holler E, Szeimies RM. Kutane Manifestationen der Graft-versus-Host-Reaktion. *Med Klin* 2001; 96: 457-466
- Klingemann HG, Grigg AP, Wilkie-Boyd K, Barnett MJ, Eaves AC, Reece DE, Shepherd JD, Phillips GL. Treatment with recombinant interferon (alpha-2b) early after bone marrow transplantation in patients at high risk for relapse. *Blood* 1991; 78: 3306-3311
- Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antan A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003; 4: 69-77
- Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. CXCR3, Inflammation, and Autoimmune Diseases. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1173: 310-317
- Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, Borrow P, Tough DF. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* 2003; 4: 1009-1015
- Lee S. New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 105: 4200-4206
- Lee S, Vogelsang G, Flowers M. Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9: 215-233
- Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 2003; 9: 263-268
- Liem LM, Fibbe WE, van Houwelingen HC, Goulmy E. Serum transforming growth factor-beta1 levels in bone marrow transplant recipients correlate with blood cell counts and chronic graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1999; 67: 59-65
- Loetscher P, Seitz M, Bagglioni M, Moser B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 569-577
- Lo Iacono O, Garcia-Monzon C, Almasio P, Garcia-Buey L, Craxi A, Moreno-Otero R. Soluble adhesion molecules correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C treated with interferon-alpha. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 1091-1099

Mapara MY, Leng C, Kim YM, Bronson R, Lokshin A, Luster A, Sykes M. Expression of chemokines in GVHD target organs is influenced by conditioning and genetic factors and amplified by GVHR. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 623-634

Meller S, Winterberg F, Gilliet M, Müller A, Lauceviciute I, Rieker J, Neumann NJ, Kubitza R, Gombert M, Günemann E, Wiesner U, Franken-Kunkel P, Kanzler H, Dieu-Nosjean MC, Amara A, Ruzicka T, Lehmann P, Zlotnik A, Homey B. Ultraviolet radiation-induced injury, chemokines, and leukocyte recruitment: An amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1504-1516

Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uzé G. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 1069–1098

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

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, and Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 145–176

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

Ogasawara K, Hida S, Weng Y, Saiura A, Sato K, Takayanagi H, Sakaguchi S, Yokochi T, Kodama T, Naitoh M, De Martino JA, Taniguchi T. Requirement of the IFN- $\alpha/\beta$ -induced CXCR3 chemokine signaling for CD8<sup>+</sup> T cell activation. *Genes Cells* 2002; 7: 309-320

Padovan E, Spagnoli GC, Ferrantini M, Heberer M. IFN- $\alpha$ 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8<sup>+</sup> effector T cells. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 669-676

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

Piper KP, Horlock C, Curnow JS, Arrazi J, Nicholis S, Mahendra P, Craddock C, Moss PAH. CXCL10-CXCR3 interactions play an important role in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease in the skin following allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* 2007; 110: 3827-3832

Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED. Consensus Conference on acute GvHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 825-828

Reyes VE, Klimpel GR. Interferon  $\alpha/\beta$  synthesis during acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 1987; 43: 412-416

Ritchie D, Seconi J, Wood C, Walton J, Watt V. Prospective monitoring of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma to predict the onset of acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 706–712

Romagnani S, Kapsenberg M, Radbruch A, Adorini L. Th1 and Th2 cells. *Res Immunol* 1998; 149: 871-873

Rottman JB, Smith TL, Ganley KG, Kikuchi T, Krueger JG. Potential role of the chemokine receptors CXCR3, CCR4, and the integrin  $\alpha\text{E}\beta\text{7}$  in the pathogenesis of psoriasis vulgaris. *Lab Invest* 2001; 81: 335-347

Sale GE. Pathogenesis of Graft-versus-Host-Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 21-23

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

Serrano J, Prieto E, Mazarbeitia F, Roman A, Llamas P, Tomas JF. Atypical chronic graft-versus-host disease following interferon therapy for chronic myeloid leukaemia relapsing after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 85-87

Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 2000; 142: 449-456

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

Teshima T, Mach N, Hill GR, Pan L, Brinson YS, van den Brink MRM, Cooke KR, Ferrara JLM. IL-11 separates graft-vs-leukemia effects from graft-vs-host disease after bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1999; 104: 317-355

Theophilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I Interferons ( $\alpha/\beta$ ) in Immunity and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 307-336

Tough DF. Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation. *Leuk Lymphoma* 2004; 45: 257-264

Villarroel VA, Okiyama N, Tsuji G, Linton JT, Katz SI. CXCR3-mediated skin homing of autoreactive CD8 T cells is a key determinant in murine graft-versus-host disease. *J Invest Dermatol*. 2014; 134: 1552-1560

Weber F, Kochs G, Haller O. Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol* 2004; 17: 498-515

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

Wenzel J, Lucas S, Zahn S, Mikus S, Metze D, Ständer S, von Stebut E, Hillen U, Bieber T, Tuting T. CXCR3  $\leftrightarrow$  ligand-mediated skin inflammation in cutaneous lichenoid graft-versus-host disease. *J Am Acad Dermatol* 2008b; 58: 437-442

Wenzel J, Peters B, Zahn S, Birth M, Hofmann K, Küsters D, Tomiuk S, Baron JM, Merk HF, Mauch C, Krieg T, Bieber T, Tuting T, Bosio A. Gene Expression Profiling of Lichen Planus Reflects CXCL9+-Mediated Inflammation and Distinguishes this Disease from Atopic Dermatitis and Psoriasis. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 67-78

Wenzel J, Proelss J, Wiechert A, Zahn S, Bieber T, Tuting T. CXCR3-mediated recruitment of cytotoxic lymphocytes in lupus erythematosus profundus. *J Am Acad Dermatol* 2007b; 56: 648-650

Wenzel J, Scheler M, Proelss J, Bieber T, Tuting T. Type I interferon-associated cytotoxic inflammation in lichen planus. *J Cutan Pathol* 2006; 33: 672-678

Wenzel J, Scheler M, Tuting T, Bieber T. Evidence for a role of type I interferons in dermatomyositis. *Br J Dermatol* 2005d; 153: 462-463

Wenzel J, Tuting T, Bieber T. Cutaneous lesions in lupus erythematosus. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128: 1655-1658

Wenzel J, Tüting T. An IFN-Associated Cytotoxic Cellular Immune Response against Viral, Self-, or Tumor Antigens Is a Common Pathogenetic Feature in "Interface Dermatitis". *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2392–2402

Wenzel J, Uerlich M, Haller O, Bieber T, Tuting T. Enhanced type I interferon signaling and recruitment of chemokine receptor CXCR3-expressing lymphocytes into the skin following treatment with the TRL7-agonist imiquimod. *J Cutan Pathol* 2005b; 32: 257-262

Wenzel J, Uerlich M, Worrenkamper E, Freutel S, Bieber T, Tuting 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* 2005; 153: 1011-1015

Wenzel J, Uerlich M, Worenkamper E, Freutel S, Bieber T, Tuting 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 I Interferon-Induced Protein MxA. *Br J Dermatol* 2005e; 153: 1011-1015

Wenzel J, Wiechert A, Merkel C, Bieber T, Tuting T. IP10/CXCL10 – CXCR3 Interaction: a Potential Self-recruiting Mechanism for Cytotoxic Lymphocytes in Lichen Sclerosus et Atrophicus. *Acta Derm Venereol* 2007a; 87: 112-117

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

Wenzel J, Zahn S, Mikus S, Wiechert A, Bieber T, Tuting T. The expression pattern of interferon-inducible proteins reflects the characteristic histological distribution of infiltrating immune cells in different cutaneous lupus erythematosus subsets. *Br J Dermatol* 2007c; 157: 752-757

Wenzel J, Zahn S, Bieber T, Tüting T. Type I interferon-associated cytotoxic inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* 2009; 301: 83-86

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

Zhou L, Askew D, Wu C, Gilliam AC. Cutaneous gene expression by DNA microarray in murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 281-292

Ziemer A, Montemurro M. Hautmanifestationen nach Stammzelltransplantationen. *Hautnah Derm* 2004; 04-2004: 192-195



## 9. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Wenzel für die lange und gute Zusammenarbeit. Ich möchte mich herzlich bei meinem ehemaligem Chef Prof. Dr. Walther Kuhn für seinen engagierten Einsatz im Hinblick auf meine Dissertation bedanken. Meiner Kollegin Dr. Lin-Kristin Ehler danke ich für ihre Mühe und ihr Engagement. Ich bin sehr froh, Azin Jafari kennengelernt zu haben, die in jeder Lebenslage für mich da ist, sich alle Sorgen anhört und ein sehr selbstloser und liebenswerter Mensch ist. Es ist schön, zwei Brüder zu haben, Jean-Philippe und Laurent, die einen immer bewundern und einen für klüger als sich selbst halten. Es ist schön, dass es sie gibt. Meinen beiden Eltern, Elfrun und Manuel Lucas, danke ich für das Zuhause, welches sie uns gegeben haben und dafür, dass sie in jeder Lebenslage an mich geglaubt und mich bei meinen Zielen immer unterstützt haben. Meine Kinder Manon Sophie und Jérémy Aurélien liebe ich über alles. Mein größter Dank geht an meinen Mann und meinen besten Freund, Jan Lucas, für seine Geduld, seine Unterstützung und dafür, dass er immer für mich da ist.