

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der  
Universität Würzburg

Direktorin: Professor Dr. med. Eva-Bettina Bröcker

Die Expression von Chemokinen bei entzündlichen Reaktionen der Haut

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Atiye Toksoy  
aus Würzburg

Würzburg, Juli 2008

Referent: Professor Dr. med. Reinhard Gillitzer

Korreferent: Professor Dr. rer. nat., Dr. sc. nat. Edgar Serfling

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2009

Die Promovendin ist Ärztin

# DIE EXPRESSION VON CHEMOKINEN BEI ENTZÜNDLICHEN REAKTIONEN DER HAUT

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Entzündungsbedingte Veränderungen an Blutgefäßen	1
1.2	Chemotaxis und Leukozytenmigration im Rahmen von Entzündungsreaktionen	1
1.3	Chemokine	3
1.3.1	CXC-Chemokine	4
1.3.2	CC-Chemokine	6
1.3.3	C- und CX <sub>3</sub> C-Chemokine	8
1.4	Histopathologie von entzündlichen Hauterkrankungen	9
1.4.1	Histopathologie der Wundheilung	9
1.4.2	Histopathologie der Psoriasis	10
1.4.3	Histopathologie der Alopecia areata	11
1.5	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	12
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
2.1	Hautbiopsien	13
2.2	Bearbeitung des Gewebes, Kryostatschnitte	14
2.3	Immunhistologische Färbungen	14
2.4	Molekularbiologische Methoden	16
2.4.1	Transformation von DNA in kompetente Zellen	16
2.4.2	Plasmidisolierung	17
2.4.3	Restriktionsenzymreaktion	17
2.4.4	Subklonierung	19
2.4.5	Herstellung von <sup>35</sup> S-markierten RNA-Sonden/In-vitro-Transkription	19
2.4.6	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	21
2.5	Zellkultur	22
2.6	ELISA	23
2.7	Durchflußzytometrie	23

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>24</b>
3.1	Chemokinexpression in den entzündlichen Hauterkrankungen	24
3.1.1	Chemokinexpression in der Wundheilung	24
3.1.2	Chemokinexpression in psoriatischen Läsionen	38
3.1.3	Chemokinexpression nach Epidermis-spezifischer Deletion von IKK2	44
3.1.4	Chemokinexpression in der Psoriasis nach Infliximabtherapie	46
3.1.5	Chemokinexpression in der Alopecia areata	49
<b>4.0</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>53</b>
4.1	Chemokine in entzündlichen Hauterkrankungen	53
4.1.1	CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 in humaner kutaner Wundheilung und Psoriasis	54
4.1.2	CXCL12/SDF-1 in humaner kutaner Wundheilung und Psoriasis	57
4.2	Die leukozytenchemotaktischen Chemokine in der Psoriasis und Wundheilung	61
4.2.1	CCL18/PARC	62
4.2.2	CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 in IKK2-defizienten Mäusen	62
4.2.3	Chemokinexpression in der Psoriasis pustulosa vor und nach Infliximabtherapie	64
4.2.4	Leukozytenchemotaktische Chemokine in der Alopecia areata	66
<b>5.0</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>69</b>
<b>6.0</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>

## **Folgende publizierte Arbeiten sind Bestandteil der vorliegenden Dissertation**

Benoit, S., A. Toksoy, et al. (2004). "Treatment of recalcitrant pustular psoriasis with infliximab: effective reduction of chemokine expression." Br J Dermatol **150**(5): 1009-12.

Benoit, S., A. Toksoy, et al. (2003). "Selective expression of chemokine monokine induced by interferon-gamma in alopecia areata." J Invest Dermatol **121**(4): 933-5.

Pasparakis, M., G. Courtois, et al. (2002). "TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2." Nature **417**(6891): 861-6.

Toksoy, A., V. Müller, et al. (2007). "Biphasic expression of stromal cell-derived factor-1 during human wound healing." Br J Dermatol **157**(6): 1148-54.

## Liste der Abkürzungen

AEC	2,3 Amino-9-Ethylcarbazol
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	registrierte Impulse pro Minute
CCL2/MCP-1	Macrophage chemoattractant protein-1
CCL3/MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$
CCL4/MIP-1 $\beta$	Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$
CCL5/Rantes	<u>R</u> egulated on <u>a</u> ctivation, <u>n</u> ormal <u>T</u> -cell <u>e</u> xpressed and <u>s</u> ecreted
CCL14/HCC-1	Hemofiltrate CC Chemokine-1
CCL17/TARC	Thymus and activation-Regulated chemokine
CC18/PARC	Pulmonary and activation-regulated chemokine
CCL20/LARC	Liver and activation-regulated chemokine
CXCL5/ENA 78	Epithelial derived neutrophil attractant-78
Cxcl5/LIX	Lipopolysaccharide-induced CXC-chemokine
CXCL1/GRO $\alpha$	Growth-related oncogene $\alpha$
CXCL8/IL-8	Interleukin-8
CXCL9/MIG	Monokine induced by interferon- $\gamma$
CXCL10/IP-10	Interferon- $\gamma$ -inducible protein-10
CXCL11/I-TAC	Interferon-inducible T cell alpha chemokine
CXCL12/SDF-1	Stromal cell derived factor-1
DTT	Dithiothreitol
EBM	Endothelzellmedium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F135-60-86	Fibroblastenzelllinie
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
hEGF	Humaner endothelialer Wachstumsfaktor
5-HETE	5-Hydroxyeicosatetraenoic acid
HEV	High endothelial venule (hohes Endothel)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1

IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1, 3, 5, 6, 8	Interleukin-1, 3, 5, 6, 8
LFA-1	Leukocyte function antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
SSC	Natrumchlorid-Zitronensäure-Puffer
streptABC	Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
TCR $\alpha$	T-Zell-Antigen-Rezeptor $\alpha$
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$

## **1. Einleitung**

Eine Entzündung ist eine vitale Reaktion auf einen - zumindest in der Anfangsphase - lokalen Gewebeschaden und ggf. auf die zugrunde liegende Noxe (Böcker, Denk, Heitz, 2004). Klinische Kardinalsymptome der Entzündung, Rubor (Rötung), Calor (Wärme), Tumor (Schwellung), Dolor (Schmerz), können durch exogene (mechanisch, physikalisch, chemisch) oder endogene Reize (Autoimmunerkrankungen, Infektionen, Stoffwechselstörungen etc.) provoziert werden, die von biochemischen Veränderungen begleitet werden.

### **1.1 Entzündungsbedingte Veränderungen an Blutgefäßen**

Die klinischen Kardinalsymptome der Entzündung weisen auf drei Veränderungen in den lokalen Blutgefäßen hin. Zunächst deuten Hitze und Rötung auf eine Vasodilatation der Arteriolen und Venolen hin, wodurch der lokale Blutfluss verstärkt, und gleichzeitig die Fließgeschwindigkeit des Blutes verringert wird. Folgend kommt es zu Veränderungen an den die Blutgefäße auskleidenden Endothelzellen. Diese ermöglichen Leukozyten über die Expression von Adhäsionsmolekülen die Anheftung an das Endothel und die Extravasation ins Gewebe, worauf im Punkt 1.2 näher eingegangen werden soll. Weiterhin kommt es zur entzündungsbedingten ödematösen Schwellung des Gewebes und dadurch verursachte Schmerzen, die durch eine erhöhte Durchlässigkeit der Gefäßwand herbeigeführt werden.

### **1.2 Chemotaxis und Leukozytenmigration im Rahmen von Entzündungsreaktionen**

Der Exsudatphase in den kleinen Gefäßen mit Vasodilatation und Zunahme der Gefäßpermeabilität folgt die Infiltrationsphase von Leukozyten in das Entzündungsgewebe. Im Rahmen dieser Leukozytendiapedese akkumulieren zunächst neutrophile Granulozyten und darauffolgend Monozyten innerhalb der kleinen Venulen und adhären an das Endothel, welches die Gefäßwände



auskleidet (Margination). Anschließend wandern die Leukozyten im Bereich der Venulen, wo der Blutfluss langsam ist, entlang des Endothels (Rolling). Das Rolling wird über die Wechselwirkung mit Selektinen vermittelt. Hierbei kommen die Leukozyten mit chemotaktischen Faktoren, die durch Endothelzellen sezerniert werden, den Chemokinen, in Kontakt. Chemokine führen zur Aktivierung der korrespondierenden Chemokin-Rezeptoren auf den Leukozyten, die jetzt ihrerseits Adhäsionsmoleküle auf der Leukozytenoberfläche, die sogenannten Integrine, aktivieren. Die aktivierten Integrine vermitteln die feste und länger anhaltende Bindung der Leukozyten auf dem Endothel, indem sich die aktivierten Integrine an ICAM-Moleküle (intercellular adhesion molecule) der Endothelzellen binden und anheften. Anschließend wandert der so positionierte Leukozyt aktiv zwischen zwei Endothelzellen unter partieller Auflösung der Basalmembran in das extravaskuläre Kompartiment des interstitiellen Bindegewebes (Diapedese/Transmigration) und gelangt schließlich zum Ort des Entzündungsgeschehens. Die Migration der Infiltratzellen erfolgt gezielt an den Ort der sich ausbildenden Entzündung. Diese zielgerichtete Migration, die auch als Chemotaxis bezeichnet wird, ist abhängig von löslichen Faktoren, die einen Konzentrationsgradienten bilden, d.h. die Zellen bewegen sich aktiv entlang eines chemischen Konzentrationsgradienten in Richtung der höheren Konzentration.

Chemotaxine sind hierbei die Substanzen, die einen derartigen Konzentrationsgradienten aufbauen können, wobei hier zwischen unspezifisch und spezifisch wirkenden Chemotaxinen unterschieden werden muss. Zu den erstgenannten gehören bakterielle Spaltprodukte (Formylmethionylpeptide), Komplementfaktoren (C5a) oder Phospholipidmetaboliten (Leukotriene). Diese sind in der Lage, alle Leukozytensubpopulationen anzulocken. Dagegen zählen Zytokine und Chemokine zu den selektiv wirksamen Chemotaxinen, die spezifisch auf definierte Leukozytensubpopulationen wirken.

Seit der Erstentdeckung von Chemokinen (CXCL8/IL-8) durch Schröder und Christophers im Jahre 1986 ist die Familie der Chemokine stetig angewachsen; mittlerweile sind über 40 Mitglieder dieser Gruppe bekannt.

### 1.3 Chemokine

Bei diesen chemotaktischen Mediatoren handelt es sich um heparinbindende, basische Proteine mit einem kleinen Molekulargewicht zwischen ca. 8-10 kDa.

Die Chemokinfamilie wird aufgrund der strukturellen Eigenschaften der beiden ersten Cysteine in die zwei Hauptgruppen der CC- und CXC-Chemokine und in die zwei Nebengruppen der C- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine unterteilt. Im Falle der CXC-Chemokine werden die beiden Cysteine durch eine intervenierende Aminosäure getrennt, wohingegen die Cysteine der CC-Familie in direkter Nachbarschaft liegen.

Bei den beiden Nebengruppen der Chemokinfamilie handelt es sich um die C- und die CX<sub>3</sub>C-Chemokine, von denen bislang nur wenige Vertreter bekannt sind. Im Falle der C-Chemokine befindet sich nur ein Cystein am N-Terminus, wogegen die beiden ersten Cysteine der CX<sub>3</sub>C-Gruppe durch drei variable Aminosäuren getrennt sind.

Neben den strukturellen Unterschieden lassen sich auch unterschiedliche Wirkungen, die über spezifische Rezeptoren erfolgen, beobachten.

Die Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembran- $\alpha$ -Helices, welche zur Rhodopsin-Superfamilie gehören. Die Chemokine zeigen bezüglich ihres Bindevhaltens an ihren Rezeptor ein teilweise promiskuitives Verhalten, d.h. mehrere Chemokine einer Subfamilie können an den gleichen Rezeptortyp binden.

Weiterhin unterscheiden sich die Chemokingruppen durch die Chromosomenlokalisationen ihrer Gene. Auf Chromosom 4 befinden sich die Gensequenzen der CXC-Chemokine, mit Ausnahme des CXCL12/SDF-1-Gens, das sich auf Chromosom 1 befindet. Die Gene der CC-Chemokine sind auf Chromosom 17, die der CX<sub>3</sub>C-Chemokine auf dem Chromosom 16 und die der C-Chemokine auf Chromosom 1 lokalisiert.

### 1.3.1 CXC-Chemokine

Die Gruppe der CXC-Chemokine kann weiterhin aufgrund des Vorhandenseins eines ELR-Motivs (Glu-Leu-Arg-Sequenz vor dem ersten Cystein) in die ELR-Motiv-positiven und ELR-Motiv-negativen CXC-Chemokine unterteilt werden. Das ELR-Motiv ist entscheidend für die Interaktionen am Rezeptor und die chemotaktische Wirkung auf die Leukozytensubpopulationen. So wirken CXC-Chemokine mit vorhandenem ELR-Motiv via CXCR2-Rezeptor in erster Linie chemotaktisch auf Neutrophile, wohingegen die Gruppe ohne ELR-Motiv über die CXCR3- und CXCR5-Rezeptoren vorzugsweise auf Lymphozyten reagiert. Das erste Chemokin überhaupt, welches charakterisiert wurde, war das CXC-Chemokin CXCL8/Interleukin 8, das chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt. Aufgrund der Präsenz von Neutrophilenabszessen in der Epidermis psoriatischer Läsionen konnte es aus Schuppen von Psoriasisplaques isoliert werden (Schroder and Christophers 1986; Schroder, Mrowietz et al. 1987). In **Tabelle 1** sind einige bekannte Vertreter dieser Subfamilie zusammengefasst.

Chemokin	Produzenten	Zielzellen	Wirkung
CXCL8/IL-8 (8,0 kDa)	Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinocyten, T-Zellen, Neutrophile, Hepatozyten, Chondrozyten	Neutrophile  T-Zellen Basophile  Endothelzellen Keratinocyten Melanomzellen	Chemotaxis, respiratory burst↑, Degranulation↑, Freisetzung lysosomaler Enzyme↑, Ca <sup>2+</sup> -Efflux, Anheftung an Endothelzellen, Fibrinogen und subendotheliale Matrixproteine↑, Bindung von C3bi und LPS↑, Oberflächenexpression von β <sub>2</sub> -Integrinen↑, Freisetzung von LTB <sub>4</sub> und 5-HETE Chemotaxis Chemotaxis, Histaminfreisetzung↑↓↑ Leukotrienfreisetzung↑ Proliferation↑, Angiogenese, Chemotaxis Proliferation↑ Adhäsion und Chemotaxis↑
CXCL1/GROα (7,9 kDa)	Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Synovialzellen	Neutrophile  Melanomzellen  Fibroblasten Endothelzellen	Chemotaxis↑, Degranulation, Freisetzung lysosomaler Enzyme↑, Freisetzung autokriner Wachstumsfaktoren↑ Proliferation↑, kostimuliert Myelopoese↑ Chemotaxis
CXCL5/ENA78 (8,0 kDa)	Pulmonale epitheliale Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten, Neutrophile	Neutrophile	Chemotaxis
CXCL8/IL-8 (8,0 kDa)	Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinocyten, T-Zellen, Neutrophile, Hepatozyten, Chondrozyten	Neutrophile  T-Zellen Basophile  Endothelzellen Keratinocyten Melanomzellen	Chemotaxis, respiratory burst↑, Degranulation↑, Freisetzung lysosomaler Enzyme↑, Ca <sup>2+</sup> -Efflux, Anheftung an Endothelzellen, Fibrinogen und subendotheliale Matrixproteine↑, Bindung von C3bi und LPS↑, Oberflächenexpression von β <sub>2</sub> -Integrinen↑, Freisetzung von LTB <sub>4</sub> und 5-HETE Chemotaxis Chemotaxis, Histaminfreisetzung↑↓↑ Leukotrienfreisetzung↑ Proliferation↑, Angiogenese, Chemotaxis Proliferation↑ Adhäsion und Chemotaxis↑
CXCL9/MIG (11,7 kDa)	Makrophagen Primäre Gliazellen (ZNS)	T-Lymphozyten	Chemotaxis
CXCL11/I-TAC (8,3 kDa)	Astrozyten, Monozyten Mikrogliazellen Keratinocyten	aktivierte T- Zellen	Chemotaxis
CXCL10/IP-10 (8,7 kDa)	Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinocyten	T-Lymphozyten Makrophagen Endothelzellen	Chemotaxis Chemotaxis Adhäsion von T-Zellen↑
CXCL12/ SDF-1α/β (8 kDa)	Endothelzellen, Perizyten Dendritische Zellen Fibroblasten, Axone Vorläufer-B-Zellen	T-Lymphozyten  CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen  Monozyten CD34 <sup>+</sup> -Zellen Brustkrebs- Zellen Cerebelläre Körnerzellen Fibrozyten B-Zellen	Chemotaxis, induziert intrazelluläre Aktinpolymeri- sation Verhindert Eintritt von T-tropem HIV-1 in aktivierte T-Zellen Chemotaxis Migration und Homing Migration  Chemotaxis  Migration Chemotaxis (in Anwesenheit von BCL2)

**Tab. 1:** Auswahl bedeutender Mitglieder der CXC-Chemokine und deren wichtige Eigenschaften

### 1.3.2 CC-Chemokine

Die CC-Chemokine unterscheiden sich von den CXC-Chemokinen im Hinblick auf ihre chemotaktische Wirkung auf die Zielzellen; so locken die CC-Chemokine in erster Line Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen an, nicht jedoch Neutrophile.

Das erste CC-Chemokin, das entdeckt wurde, ist das CCL2/MCP-1 (Yoshimura, Yuhki et al. 1989), (Furutani, Nomura et al. 1989). CCL2/MCP-1 zeigt eine chemotaktische Aktivität auf Monozyten, nicht jedoch auf Neutrophile.

Die zur Gruppe der CC-Chemokine gehörenden wichtigsten Vertreter sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

Chemokinin	Produzenten	Zielzellen	Effekte
CCL2/MCP-1 (8,7 kDa)	Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinocyten, glatte Muskulatur, einige Tumor-Zelllinien, Astrozyten	Monozyten/ Makrophagen  Basophile T-Lymphocyten NK-Zellen	Chemotaxis, respiratory burst, Degranulation↑, Freisetzung lysosomaler Enzyme↑, zytostatische Aktivität↑, Histaminfreisetzung↑ Chemotaxis Chemotaxis
CCL3/MIP-1α (7,5 kDa)	Monozyten, Makrophagen, T-Zellen	Makrophagen  CD8 <sup>+</sup> T-Zellen B-Zellen Stammzellen Basophile Eosinophile NK-Zellen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	Chemotaxis, respiratory burst↑, Degranulation↑, Freisetzung lysosomaler Enzyme↑, verstärkende myelo-poetische Wirkung Chemotaxis Adhärenz an aktivierte Endothelzellen↑ Chemotaxis wachstumshemmend Histaminfreisetzung↑ Chemotaxis Chemotaxis HIV-Suppression
CCL4/MIP-1β (7,8 kDa)	Monozyten, Makrophagen, T-Zellen	Makrophagen  CD4 <sup>+</sup> T-Zellen  Basophile Dendritische Zellen NK-Zellen	Chemotaxis, respiratory burst↑, Degranulation↑, Freisetzung lysosomaler Enzyme↑, verstärkende myelo-poetische Wirkung↑ Adhärenz an aktivierte Endothelzellen↑ HIV-Suppression Histaminfreisetzung↑ Chemotaxis Chemotaxis
CCL5/Rantes (7,8 kDa)	T-Zellen, Thrombozyten, fetale Astrozyten	Monozyten/ Makrophagen Basophile aktivierte T-Zellen, CD4 <sup>+</sup> T-Zellen  Eosinophile	Chemotaxis  Histaminfreisetzung↑ Chemotaxis Chemotaxis, Adhärenz an aktivierte Endothelzellen↑, Suppression von HIV Chemotaxis und Aktivierung
CCL14/HCC-1 (8,6 kDa)	Hämo-filtrat und Plasma gesunder Personen und Patienten mit chronischer renaler Insuffizienz Milz, Leber, Skelett- und Herzmuskel, Darm, Knochenmark	Monozyten CD34 <sup>+</sup> Stammzellen	Intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Anstieg Proliferation, Chemotaxis
CCL17/TARC (8 kDa)	Stimulierte PBMC, Thymus (konstitutiv)	T-Zellen	Chemotaxis
CCL18/PARC (9,8 kDa)	Monozyten/ (alveoläre) Makro- Phagen, Dendritische Zellen	Naïve T-Zellen Aktivierte T-Zellen	Chemotaxis Chemotaxis
CCL20/LARC (8 kDa)	Lymphocyten, Makrophagen, Keratinocyten (Psoriasis)	PBMC T-Zellen B-Zellen	Chemotaxis Chemotaxis Chemotaxis
CCL21/Exodus-2 (12 kDa)	Endothelzellen, Podozyten Konstitutiv in lymph- atischen Organen und hohes Endothel (HEV)	T-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen aktivierte NK-Zellen Thymocyten Mastzellen	Chemotaxis Chemotaxis Chemotaxis Chemotaxis antiapoptotisch

**Tab. 2:** Wichtige Vertreter der CC-Chemokine und deren Eigenschaften

### 1.3.3 C- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine

Die C- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine bilden neben den Hauptfamilien der CC- und CXC-Chemokine zwei kleine Subfamilien.

Der Hauptvertreter der C-Chemokine, XCL1/Lymphotactin, wird von aktivierten T-Zellen, wie aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen, und nicht in aktivierten CD4<sup>+</sup>-Zellen produziert. XCL1/Lymphotactin, welches spezifisch an den XCR1/GPR5-Rezeptor bindet (Kennedy, Kelner et al. 1995), (Zlotnik, Morales et al. 1999), wirkt chemotaktisch auf CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Kelner and Zlotnik 1995) und natürliche Killer-Zellen.

Als einziger Vertreter der CX<sub>3</sub>C-Gruppe ist bisher CX<sub>3</sub>CL1/Fractalkine bekannt. Auch dieses wirkt chemotaktisch auf Leukozyten. Interessanterweise ist dieses Chemokin im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern membranassoziiert und nicht gelöst. Es wird von Endothelzellen, jedoch nicht von Leukozyten exprimiert (Bazan, Bacon et al. 1997), (Pan, Lloyd et al. 1997). Weiterhin unterstützt es die Adhäsion von T-Zellen und Monozyten (Bazan, Bacon et al. 1997).

In **Tabelle 3** sind Vertreter dieser Chemokinsubfamilien und deren wichtigste Funktionen zusammengefasst.

C-Chemokin	Produzenten	Zielzellen	Wirkung
XCL1/Lymphotactin (11 kDa)	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen, konstitutiv in Milz, Thymus, Dünndarm, periphere Blutleukozyten, Lunge, Prostata, Ovarien	CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> T-Zellen NK-Zellen periphere Blutleukozyten	Chemotaxis Chemotaxis Intrazelluläres Calcium↑
CX <sub>3</sub> C-Chemokin	Produzenten	Zielzellen	Wirkung
CX <sub>3</sub> CL1/Fractalkine/ Neurotactin (8,5 kDa)	Endothelzellen Mikroglia, mono- nukleäre Zellen in arteriosklero- tischen Plaques	Leukozyten Neutrophile T-Zellen Monozyten	Chemotaxis, Adhäsion Chemotaxis Chemotaxis Chemotaxis

**Tab. 3:** Vertreter der C- und CX<sub>3</sub>C-Chemokinsubfamilie

## **1.4 Histopathologie von entzündlichen Hauterkrankungen**

Zahlreiche Erkrankungen der Haut werden durch eine Entzündungsreaktion verursacht oder begleitet. Für das Verständnis der Pathogenese entzündlicher Hauterkrankungen ist die Zusammensetzung des zellulären Entzündungsinfiltrates und die Verteilung der Entzündungszellen von wesentlicher Bedeutung. In Anbetracht der chemotaktischen Funktion der Chemokine liegt die Annahme nahe, dass das zelluläre Infiltrationsmuster in entzündlichen Hauterkrankungen das Expressionsmuster von Chemokinen und umgekehrt widerspiegelt.

Die Infiltrationsroute der Leukozyten in die Haut erfolgt immer vom Lumen dermalen Gefäße in das dermale Milieu und ggf. weiter in das epidermale Kompartiment (sog. Epidermotropismus). Die Migration inflammatorischer Zellen über die Grenzen unterschiedlicher Hautkompartimente hinweg ist einzigartig und präsentiert ein ideales Modell, um die chemotaktischen Cytokin- bzw. Chemokinfunktionen zu evaluieren.

Anhand verschiedener ausgewählter Hautdermatosen (Wundheilung, Psoriasis, Alopecia areata) wurden in der vorliegenden Arbeit die unterschiedlichen Expressionsmuster einer Auswahl von Chemokinen untersucht.

### **1.4.1 Histopathologie der Wundheilung**

Wundheilung ist ein dynamischer Prozess, der in drei sich überlappende Stadien - Entzündungsphase, Reparaturphase mit Gefäß- und Gewebeneubildung und Umbauphase mit Wundkontraktion, Gewebe- oder auch Narbenbildung - eingeteilt werden kann (Singer and Clark 1999).

Im Rahmen der begleitenden Entzündungsreaktion bei kutaner Wundheilung kommt es zu einer phasisch ablaufenden Migration von Leukozyten-subpopulationen. So dominieren an Tag 1 nach Wundsetzung neutrophile Granulozyten das histologische Bild („Neutrophilenphase“), gefolgt von Makrophagen an Tag 2 („Makrophagenphase“) und Lymphozyten nach 4-7 Tagen („Lymphozytenphase“). Korrelierend mit der Invasion bzw. Rekrutierung



von Leukozytensubpopulationen in das Wundterrain wurden während der sogenannten „Neutrophilenphase“ eine starke Expression von CXCL1/GRO $\alpha$  und CXCL8/IL-8, während der „Makrophagenphase“ eine Dominanz des CC-Chemokins CCL2/MCP-1, welches auch während der „Lymphozytenphase“ persistierte, und zusätzlich die beiden CXC-Chemokine CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 detektiert (Engelhardt, Toksoy et al. 1998).

#### **1.4.2 Histopathologie der Psoriasis**

Bei der Psoriasis handelt es sich um eine chronische Entzündungsreaktion der Haut, bei der sowohl das epidermale (Hyperkeratose, Akanthose, Parakeratose, Verlust des Stratum granulosum, neutrophilen Mikroabzesse) als auch das dermale Kompartiment (Ödem, Rundzellinfiltrate um weitgestellte Gefäße der papillären Dermis, Neovaskularisation) involviert sind.

Keratinocyten nehmen im psoriatischen Geschehen eine zentrale Rolle ein. Diese sind insgesamt stark hyperproliferativ und weisen eine um das Zehnfache erhöhte Zellteilungsrate auf.

Das Entzündungsinfiltrat der Psoriasis weist eine charakteristische Verteilung von Leukozytensubtypen auf. Neutrophile Granulozyten wandern aus dem Gefäß in die obersten Epidermisschichten und formieren sich dort zu Munro'schen Mikroabszessen, während Makrophagen in der papillären Dermis akkumulieren und sich teilweise unterhalb der Reteleisten aufreihen.

Lymphozyten sind hauptsächlich mit Makrophagen kolokalisiert, aber auch zusätzlich fokal in der Epidermis vorzufinden. In der Epidermis sind hauptsächlich CD8<sup>+</sup> (zytotoxische) T-Zellen anzutreffen. Dagegen sind in der oberen Dermis vorwiegend CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen vorzufinden. Die CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen sezernieren Zytokine wie IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF, sowie eine Reihe von Interleukinen (IL-1, 3, 5, 6, 8).

Die proliferative Aktivität von basalen Keratinocyten kann direkt, über IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , und indirekt, über die Stimulation der autokrinen Zytokinsekretion (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-8) in Keratinocyten, erfolgen.

### **1.4.3 Histopathologie der Alopecia areata**

Bei der Alopecia areata handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der es zum kreisrunden, nicht vernarbenden Haarausfall kommt. Der Pathogenese liegt eine Entzündungsreaktion zugrunde, die sich gegen Zellen des Follikelapparates richtet. Histopathologische Untersuchungen zeigen eine perifollikuläre und intrafollikuläre Entzündung der anagenen Haarbulbi durch sich bienenschwarmartig anordnende, mononukleäre Infiltratzellen, insbesondere T-Lymphozyten. In der telogenen Phase befindliche Haarfollikel bleiben unbeeinflusst.

Lokal infiltrierende CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten werden als Effektorzellen für den reversiblen Umbau des Haarfollikels verantwortlich gemacht, der dann zu einem Haarverlust führt (McDonagh and Messenger 2001), (McElwee and Hoffmann 2002). Infiltrierende Leukozyten sind hauptsächlich um die Haarbulbi verteilt.

## 1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Unterschiedliche entzündliche Hauterkrankungen sind meist durch ein charakteristisches Zellinfiltrat gekennzeichnet.

Wie schon aus früheren Untersuchungen bekannt, korreliert die Expression spezifischer Chemokine mit den ins entzündliche Gewebe eingewanderten Leukozytensubpopulationen. Daneben sind primär auch residente Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten an der Chemokinproduktion beteiligt.

Für ein besseres Verständnis der Funktion von Chemokinen in entzündlichen Prozessen der Haut untersuchten wir die Expression von Chemokinen in der Psoriasis und der Alopecia areata, zwei entzündliche Dermatosen mit charakteristischem Infiltrat. Um zusätzlich die Dynamik der Veränderungen der Chemokinexpression zu erforschen bedienten wir uns eines Wundheilungsmodells, in dem die Entzündungsreaktion von einem sich im Verlauf verändernden Leukozytenprofil charakterisiert ist. Im Einzelnen sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Korreliert die Expression distinkter CC- und CXC-Chemokinen mit der Verteilung von Leukozytensubpopulationen?
2. Welche Rolle spielen residente Zellen der Haut (Keratinozyten, Endothelzellen, Fibroblasten) bei der Chemokinexpression? Von großem Interesse sind hier insbesondere jene Chemokine, die von Endothelzellen exprimiert werden, da deren Expression eine wesentliche Voraussetzung für die Leukozytendiapedese darstellt.
3. Kann ein spezifisches Chemokinprofil für Entzündungsreaktionen in der Wundheilung, Psoriasis und Alopecia areata nachgewiesen werden?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Hautbiopsien**

Alle Biopsien der Haut wurden nach Einverständnis der Patienten bzw. Probanden in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Würzburg entnommen. Das Procedere der artifiziellen Wundsetzung und Biopsieentnahme wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt.

#### *Studien der kutanen Wundheilung beim Menschen*

Zum Studium der Wundheilung wurden artifizielle Hautwunden erzeugt und untersucht. Zu diesem Zweck wurden 11 gesunden, erwachsenen Probanden vor Gewinnung von Wundbiopsien jeweils 5-7 artifizielle Wunden von je 5 mm Tiefe und 5 mm Länge am ulnaren Unterarm gesetzt. Anschließend wurden jedem Probanden 5 mm Stanzbiopsien nach definierten Zeitintervallen von 0, 1, 2, 4, 7, 10, 14 und 21 Tagen unter Lokalanästhesie mit Mepivacain oder Articain entnommen, das Biopsiematerial in entsprechendes Einbettmedium (Tissue-Tek, Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingelegt und unter Stickstoffatmosphäre Schock-gefroren und bei -80°C kryokonserviert.

#### *Biopsien bei Patienten mit Psoriasis und Alopecia areata*

Biopsien wurden von 11 Patienten mit einer langjährigen Psoriasis und von 13 Patienten mit einer Alopecia areata nach Einverständnis im Rahmen der routinehistologischen Diagnostik gewonnen und kryo- oder paraffinpräserviert und für weitere wissenschaftliche Zwecke verwendet. Biopsien wurden nur von solchen Patienten gewonnen, die unbehandelt bzw. nicht unmittelbar zuvor eine Behandlung erhielten. Als Vergleichskontrolle in den verschiedenen Studien wurde jeweils normale, gesunde Haut verwendet.

## 2.2 Bearbeitung des Gewebes, Kryostatschnitte

Von den kryopräservierten, in OCT-Blöcken eingelegten Geweben wurden mit dem Kryostat bei -20°C 4 µm-Schnitte gefertigt und auf Glasobjektträger (Superfrost®/Plus, Fa. Roth, Karlsruhe) für die *In-situ*-Hybridisierung bzw. für die Immunhistochemie aufgebracht. Anschließend wurden die Schnittpräparate auf einer Wärmebank (40-50°C) getrocknet und für die *In-situ*-Hybridisierung mit 4 % Paraformaldehyd (in 1 x PBS) bei Raumtemperatur 20 min bzw. für die Immunhistochemie in Aceton (4°C) für 10 min fixiert. Paraformaldehydfixierte Schnitte wurden nach absteigender PBS-Reihe (jeweils 5 min in 3 x PBS, 1 x PBS und 1 x PBS) und einem Zwischenbad in Aqua dest. in einer ansteigenden Ethanolreihe (30%, 60%, 80%, 95%, 100%) dehydriert, getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert. Während sämtlicher Arbeitsprozesse, die für die anschließende *In-situ*-Hybridisierung notwendig sind, wurde unter strikt RNase-freien Bedingungen (Handschuhe, RNase-freie Lösungen und Gefäße) gearbeitet. Aceton-fixierte Schnitte wurden kurz luftgetrocknet und luftdicht bei -20°C gelagert.

## 2.3 Immunhistologische Färbungen

Der immunhistochemische Nachweis von Gewebe- und Zellantigenen wurde mit der Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (streptABC-HRP, Dako, Kopenhagen, Dänemark) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht aufgrund der Reaktionskaskade, bei der primärer Antikörper, sekundärer biotinylierter Antikörper und Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex miteinander reagieren, eine hohe Sensitivität und Spezifität. Dazu wurden die zuvor angefertigten Gewebeschnitte wie folgt weiterverarbeitet: Die Objektträger wurden zunächst einige Minuten in Blotto-Magermilchpulverlösung eingetaucht, um das beim Schneidevorgang ebenfalls auf den Objektträger aufgebrauchte OCT-Medium zu entfernen. Die Objektträger wurden dann in einer Feuchtkammer und zur Blockierung von unspezifischen Bindungen für 20 min in 20 % Schafserum oder 20 % Mausserum in Blotto-Magermilchpulverlösung bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit monoklonalen bzw. polyklonalen Primärantikörpern in entsprechender Verdünnung (**Tabelle 4**) für 12-16 Stunden bzw. über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörper wurden danach mit Blotto-Magermilchpulverlösung 3 x für je 5 min gewaschen und der sekundäre Antikörper aufgebracht (1h, RT). Nach weiteren Waschschritten (3 x Blotto-Magermilchpulverlösung) wurde der vorinkubierte strept-ABC-Komplex (1 h, RT) mit dem Gewebe inkubiert. Es erfolgten weitere Waschvorgänge (2 x Blotto, 1 x 1 x PBS + 0,1 % Tween 20). In der folgenden Substratreaktion wurde als Peroxidase-spezifisches Substrat 3-Amino-9-Ethyl-carbazol (AEC) (Sigma, Taufkirchen) (0,02 % (w/v) in 50 mM Acetatpuffer, pH 5, 5 % Dimethylformamid (Merck, Darmstadt) und Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt) (Endkonzentration: 0,005% v/v) verwendet, welches zu einem roten Farbniederschlag im Bereich des gebundenen Antikörpers führt. Die Enzymsubstratlösung wurde vor dem Auftropfen auf die Gewebe unter Verwendung einer Einmalspritze und eines Einmalfilters (0,45 µm) filtriert, um größere Partikel zu entfernen. Zur besseren Beurteilung wurde mit Hämatoxylinlösung gegengefärbt. Die so behandelten Gewebe wurden mit Aquatex (Merck, Darmstadt) und Deckgläschen abgedeckt und mikroskopisch ausgewertet.

Antikörper	Verdünnung	Reaktivität	Bezugsquelle
moAK Maus anti humanes CD45	1:100	Common Leukocyte Antigen CD45	Becton Dickinson, Heidelberg
moAK Maus anti humanes CD1	1:10000	Langerhanszellen, Dendritische Zellen	Coulter, Krefeld
moAK Maus anti humanes CD68	1:1000	Monozyten, Makrophagen	Dako, Hamburg
moAK Maus anti humanes CD3	1:500	Lymphozyten	Becton-Dickinson, Heidelberg
moAK Maus anti humanes CD4	1:200	Makrophagen	Dako, Hamburg
moAK Maus anti humanes CD8	1:100	T-Suppressor Zellen	Dako, Hamburg
moAK Maus anti humane NE	1:200	Neutrophile	Dako, Hamburg
moAK Maus anti humanes MIB 1	1:100	Proliferierende Zellen	Dianova, Hamburg
moAK Maus anti humanes EN4	1:500	Endothelzellen	Harlan, Sera Lab, Crawley Down, UK
Polyklonales Kaninchen anti humanes FVIII	1:2000	Endothelzellen, Megakaryozyten	Dako, Hamburg
moAK Maus anti humanes Vimentin	1:200	Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen	Dako, Hamburg
moAK Maus anti humanes CXCL12/SDF-1	1:50	CXCL12/SDF-1-Protein	R&D Systems, Wiesbaden
moAk Maus anti humanes CXCR4	1:50	CXCR4- Rezeptor	R&D Systems, Wiesbaden
Sekundärantikörper: Biotinylierter Schaf anti-Maus Ig	1:200	Mausimmunglobuline	Amersham, Freiburg
Sekundärantikörper: Biotinylierter Schaf anti Kaninchen Ig	1:200	Kaninchenimmunglobuline	Amersham, Freiburg
Schafserum			Amersham, Freiburg
Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (streptABC-HRP)			Dako, Hamburg

**Tab. 4:** Monoklonale (mo) Primärantikörper (AK), Sekundärantikörper, Konjugate und Seren

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Transformation von DNA in kompetente Zellen

Plasmide, die chemokinspezifische DNA-Sequenzen enthalten, wurden in kompetente DH5 $\alpha$  E. coli (Invitrogen/Gibco, Karlsruhe) transformiert. Die Plasmide wurden freundlicherweise von verschiedenen Forschergruppen (**Tabelle 5**) zur Verfügung gestellt bzw. im eigenen Labor kloniert. Zur Transformation der DNA wurden 1-10 ng der Ursprungs-(Plasmid)-DNA zu 20  $\mu$ l kompetenten Bakterien (auf Eis) gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 45 sec bei 42°C hitzeschockbehandelt und anschließend sofort für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900  $\mu$ l S.O.C. Medium (RT) wurden die Bakterien 1 h lang bei 225 rpm (rounds per minute) bei 37°C geschüttelt und nachfolgend auf ampicillinhaltigen Agarplatten (50  $\mu$ g Ampicillin/ml Agar) ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht im Brut-

schränk bei 37°C inkubiert. Ampicillinresistente und somit transformierte Kolonien wurden in LB-Medium weiter expandiert.

### 2.4.2 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung aus *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits (Qiagen-Maxipräp; Qiagen, Hilden) entsprechend der Anleitung mit der Methode der alkalischen Extraktion durchgeführt. Die so isolierten Plasmide wurden anschließend durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm auf ihre Reinheit und Quantität geprüft. Die Menge an isolierter DNA ergibt sich aus der folgenden Formel:

Menge isolierter DNA in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  =  $\text{OD}_{260}$  der Probe x Verdünnungsfaktor x 50

Die Konzentration wurde anschließend auf 1,0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DNA mit H<sub>2</sub>O bidest. eingestellt.

### 2.4.3 Restriktionsenzymreaktion

Zur Linearisierung des Plasmids bzw. zum enzymatischen Ausschneiden der chemokinspezifischen DNA-Sequenz (Insert) aus dem zirkulären Plasmid wurde die Plasmid-DNA mit einem bzw. mehreren Restriktionsenzymen (1 U Enzym/1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA), die das Plasmid an definierter Stelle schneiden, zusammen mit dem geeigneten Puffer für 1 h bei 37°C synchron oder sequenziell inkubiert. Danach wurde ein Aliquot des Ansatzes nach Zugabe von DNA-Probenpuffer auf einem 1,5 % igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet. Durch Testverdau mit geeigneten Restriktionsenzymen wurde überprüft, ob a) die Linearisierung komplett abgelaufen und b) ob im Falle der Transformation das gewünschte DNA-Fragment (Insert) vorhanden war. Die verwendeten Plasmide mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen sind in **Tabelle 5** aufgeführt:



**Tabelle 5:** Übersicht über die verwendeten sense- und anti-sense DNA-Proben

Chemokin-Insert/ Größe in bp	Vektor	Restriktions- schnittstelle für anti-sense Probe/RNA-Poly- merase	Restriktions- Schnittstelle für sense Probe/RNA-Poly- merase	Bezugsquelle
Hu CXCL1/GRO $\alpha$ / 850 bp	pGEM-3	XbaI, T7	PvuII, sp6	R. Saga, New York, USA
M Cxcl5/LIX/ 1519 bp	pBluescript SK <sup>-</sup>	NotI/T7	XhoI/T3	J. B. Smith, Los Angeles, USA
Hu CXCL8/IL-8/ 1200 bp	pGEM	Hind II, sp6		V. Mielke, Kiel
Hu CXCL9/MIG/ 690 bp	pBluescript KS <sup>+</sup>	SmaI, T3	XhoI, T7	Dr. J. M. Farber, NIH, Bethesda, USA
M Cxcl9/MIG/ 1228bp	pBluescript SK <sup>-</sup>	PstI/T3	HindIII/T7	Dr. J. M. Farber, NIH, Bethesda, USA
Hu CXCL10/IP-10/ 374bp	pBluescript KS <sup>+</sup>	Hind III, T7	BamHI, T3	Im eigenen Labor kloniert
M Cxcl10/IP-10/ 462 bp	pBluescript M13+	PstI/T3	Xba I, T7	T. Hamilton, Cleveland, USA
Hu CXCL11/I-Tac/ 307 bp	pBluescript KS <sup>+</sup>	BamHI/ T3	Xho I/ T7	Im eigenen Labor kloniert
Hu CXCL12/SDF-1/ 397 bp	pBluescript KS <sup>+</sup>	Not I, T3	Xho I, T7	T. Honjo, Yoshida, Japan
Hu CCL2/MCP-1/ 600 bp	pBluescript SK <sup>+</sup>	NotI, T7	HindIII, T7	T. Yoshimura, Frederick, USA
M Ccl2/MCP-1/ 700 bp	pBluescript SK <sup>-</sup>	HindIII, T3	XbaI, T7	T. Yoshimura, Frederick, USA
Hu CCL3/MIP1 $\alpha$ / 775 bp	pBluescript KS <sup>+</sup>	PstI, T7	EcoRI, sp6	Genetics Institute, Camebridge, MA, USA
Hu CCL4/MIP-1 $\beta$ / 536 bp	pBluescript KS <sup>+</sup>	XhoI, T3		T. Schall, San Francisco, USA
Hu CCL5/RANTES/ 419bp	pBluescript KS <sup>+</sup>	BamHI, T7	Hind III, T3	T. Schall, San Francisco, USA
M Ccl6/C10/ 1300 bp	pBluescript SK <sup>-</sup>	XhoI/T3	PstI/T7	A. Orlofsky, New York, USA
Hu CCL17/TARC/ 285 bp	pBluescript KS <sup>+</sup>	BamHI/ T3	EcoRI/T7	Im eigenen Labor kloniert
Hu CCL18/PARC/ 760 bp	pSport 1	Sall/sp6	Not I, T7	G. J. Adema, Nijmegen, Niederlande
Hu CCL20/LARC/ 799 bp	pBluescript KS <sup>+</sup>	BamH I, T3	Kpn I, T7	R. Hromas, Indianapolis, USA
Hu CCL21/Exodus-2/ 828 bp	pt3t7	EcoRI/ T3		R. Hromas, Indiana University, Minneapolis, USA
M MIP-2/353 bp	pBlueskript SK <sup>+</sup>	NotI/T7	BamHI/T3	J. B. Smith, Los Angeles, USA

**Tab. 5:** Humane (hu) und murine (m) cDNA-Proben von CC- und CXC-Chemokinen, Restriktionsschnittstellen für die *In-vitro*-Transkription von sense und anti-sense Proben, RNA-Polymerasetyp (T3, T7, sp6)

#### 2.4.4 Subklonierung

Im Falle von chemokin-codierenden Plasmiden, die keine *In-vitro*-Transkription erlauben, d.h. die keine T3-, T7-, sp6-RNA-Polymerasepromotoren besitzen, wurden Subklonierungen in einen Vektor mit entsprechenden Polymerasepromotoren vorgenommen. Hierbei hat sich der Vektor pBlueskript SK<sup>+</sup>/KS<sup>+</sup> bewährt. Zunächst wurden die entsprechenden Inserts aus dem Ursprungsplasmid wie oben beschrieben durch Restriktionsenzymverdau herausgeschnitten, auf einem 1,5 %igem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende Bande bei UV-Illumination aus dem Gel herausgeschnitten und das DNA-Fragment eluiert. Das Insert wurde anschließend in den linearisierten Blueskript-Vektor, welcher komplementäre Schnittstellen durch einen vorgeschalteten Restriktionsverdau enthielt, einligiert. Die Ligation erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim). Der Insert-tragende Vektor wurde durch Transformation in kompetente Bakterien - wie oben beschrieben - weiter expandiert und isoliert.

#### 2.4.5 Herstellung von <sup>35</sup>S-markierten RNA-Sonden/*In-vitro*-Transkription

Zum Nachweis der Expression von Chemokin-mRNA *in vivo* wurden komplementäre Gensequenzen verwendet. Da RNA-RNA-Hybride am stabilsten sind, und durch RNA-RNA-Hybridisierung in Verbindung mit radioaktiver Markierung die höchste Sensitivität erzielt werden kann, wurden in den Experimenten ausschließlich <sup>35</sup>S-markierte RNA-Sonden verwendet. Voraussetzung war, dass die zu kodierenden Chemokine in einem Plasmid vorliegen, welches mittels RNA-Polymerasereaktion die Synthese der Chemokin-RNA erlaubt (siehe oben). Die Plasmide wurden unter Verwendung von Restriktionsenzymen am Ende der abzuschreibenden Sequenz linearisiert, damit die Reaktion nach Transkription der gewünschten Sequenz abbricht und keine irrelevante RNA synthetisiert wurde. Da sämtliche Plasmide Promotoren an beiden Enden der codierenden Sequenz enthalten, ist die Synthese von komplementären Sonden (anti-sense) wie auch nicht-komplementären Sonden

(sense) möglich. 2 µl linearisiertes Plasmid/Template [1 µg/µl] wurde mit 12 µl Polymerase Stocklösung (100 µl enthalten 20 µl 5 x Polymerasepuffer, 10 µl 100 mM DTT, 10 µl Ribonukleotidmix -je 3,33 µl 10 mM ATP, CTP, GTP- 10 µl 5 mg/ml BSA, 2 µl 50 U/µl RNAsin, 1 µl sp6-, T3- oder T7-Polymerase und 14,6 µl H<sub>2</sub>O) und 3,5 µl <sup>35</sup>S-UTP [800 Ci/mMol] versetzt und 45 min bei 37°C bei T3- und T7- bzw. 42°C bei Verwendung von sp6-RNA-Polymerase inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl einer frischen, Polymerase enthaltenden Lösung (10 µl enthalten 2 µl 5 x Polymerasepuffer, 7 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl sp6-, T3- oder T7-RNA-Polymerase) reaktiviert und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Gemisch zur Entfernung der Template-DNA mit 2 µl DNase-Lösung (DNase Stocklösung von 12 µl enthält 6 µl DNase, 3 µl RNAsin, 3 µl H<sub>2</sub>O) für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Pro Ansatz wurden 30 µl t-RNA [2 mg/ml] (Roche Diagnostics, Mannheim) hinzugegeben und mittels Phenolextraktion und zweimaliger Ethanolpräzipitation die somit radioaktiv markierte und synthetisierte RNA-Sonde gereinigt. Nach Messung der inkorporierten Radioaktivität im Szintillationszähler wurde das Pellet in H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf 2 x 10<sup>6</sup> cpm/µl eingestellt.

#### *Alkalische Hydrolyse (size reduction)*

Bei Sonden, deren Länge 200 bp überschritt, wurde vor der letzten Alkoholpräzipitation eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Dabei wurde die Probe (200 µl Ansatz) mit 200 µl 0,2 M Carbonatpuffer (pH 10,2) bei 60°C für unterschiedliche Zeiten entsprechend der Formel  $t \text{ (Zeit)} = (L_o - L_f) / (0,11 \times L_o \times L_f)$  [ $L_o$  = Ausgangslänge der Probe in kb,  $L_f$  = Länge der Probe nach alkalischer Hydrolyse – angestrebte Länge 100 kb] inkubiert und die Hydrolysereaktion durch Zugabe von 24 µl Natriumacetat-Eisessiggemisch (292 µl 3 M Natriumacetat pH 5,4 und 21 µl Eisessig) gestoppt, um 100 kb-Fragmente zu erhalten.

### 2.4.6 *In-situ*-Hybridisierung

Die auf einen Objektträger aufgebrauchten Gewebe wurden in einer Proteinase-lösung (1 µg/ml Proteinase K in 100 mM TRIS HCl pH 8.0 und 50 mM EDTA) 30 min bei 37°C inkubiert, mit 4 % Paraformaldehyd nachfixiert (siehe Gewebeschnitte) und anschließend in 0,1 M Triethanolamin (pH 8.0) zweimal gespült. Nachfolgend wurden die Objektträger acetyliert. Zu diesem Zweck wurde 500 µl Acetanhydrid (Sigma, Taufkirchen) auf den Boden eines Glasfärbetrogs gegeben, die Objektträger im Färberahmen darübergestellt, und unter ständigem Rühren 200 ml 0,1 M Triethanolaminlösung (pH 8.0) hinzugegeben. Nach 10 min wurde kurz mit H<sub>2</sub>O gespült und die Objektträger nach Alkoholdehydratation in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 2 min in 30%, 60%, 80%, 95% und Alkohol abs.) dehydriert. Anschließend wurde 12 µl Hybridisierungslösung bei 18 x 18 mm großen Deckgläsern bzw. 18 µl bei 22 x 22 mm großen Objektträgern blasenfrei über die Gewebe geschichtet und diese mit einem Deckglas abgedeckt. Die Zusammensetzung der Hybridisierungslösung ist nachfolgend aufgeführt:

<b>Puffer/Substanzen/Volumen/Menge:</b>	<b>Endkonzentration:</b>
Formamid (500 µl)	50% (v/v)
5 M NaCl (60 µl)	300 mM
1 M TRIS pH 7,5 bei 50 mM (20 µl)	20 mM
100 mM EDTA pH 8,0 (50 µl)	5 mM
50 x Denhardt Lösung (20 µl)	1 x
1 M DTT (100 µl)	100 mM
100 µl H <sub>2</sub> O	-
100 µl sense/anti-sense Probe	0,2 x 10 <sup>6</sup> cpm/µl

Die mit der Hybridisierungslösung beschichteten und mit Deckgläsern versehenen Schnitte wurden für 12-16 h (über Nacht) bei 45-46 °C in einer feuchten Kammer mit 50 %igem Formamid und 2 x SSC unter luftdichtem Abschluss inkubiert. Nach Entfernung der Deckgläser wurde in jeweils frischer

Waschlösung (50 % Formamid, 2 x SSC, 1 mM EDTA, 10 mM DTT) bei 54°C unter ständigem Rühren (Magnetrührer) die Hybridisierungslösung aus dem Gewebe gewaschen. Nicht abgewaschene und nicht hybridisierte, überschüssige Probe wurde mit RNasen (20 µg/ml RNase A, 1 U/ml RNase T1, 2 x SSC, 1 mM EDTA) verdaut, und die Spaltprodukte durch zwei weitere Waschvorgänge ohne DTT bei 54°C und bei 56°C (höhere Stringenz) entfernt. Nach kurzem Spülen in 2 x SSC, Alkoholdehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 min in 30 %, 60 %, 80 %, 95 % und Ethanol abs.) und Trocknen der Objektträger wurden die Schnitte in der Dunkelkammer mit einer NTB-2 Photoemulsionslösung (Kodak, 1:1 verdünnt mit 0,8 M Ammoniumacetat) beschichtet, erneut getrocknet und in lichtgeschützten Boxen (mit Kieselgel versehen) für 2-6 Wochen gelagert. Die Photoreaktionsprodukte, bzw. die Silbernitratniederschläge wurden mit D19 Entwickler (Kodak) und Fixierer (Kodak) sichtbar gemacht. Die Entwicklung erfolgte folgendermaßen: Für 3 min in Entwicklerlösung (laut Herstellerangaben lösen), 2 min in 2 %iger Essigsäure, 5 min in Fixierlösung (Lösung laut Herstellerangaben) eintauchen. Zur besseren histologischen Beurteilbarkeit der Präparate wurden diese nach Papanicolaou gegengefärbt und die Hybridisierungssignale unter Hellfeld- und Dunkelfeldbeleuchtung mikroskopisch ausgewertet.

## **2.5 Zellkultur**

### *HDMEC*

HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells) wurden von Clonetics (via Cell Systems, St. Katharinen) bezogen. Die Zellen wurden in Endothelzellmedium EBM (Clonetics) mit Zusatz von 5 % FBS (fetal bovine serum), 10 ng/ml hEGF (humaner endothelialer Wachstumsfaktor), 1 µg/ml Hydrokortison, 50 µg/ml Gentamycin, 50 ng/ml Amphotericin B und 12 µg/ml Rinderhirnextrakt (bovine brain extract, Clonetics) kultiviert. Die Zellen wurden nach der 2. Passage verwendet und durch Nachweis der Expression von Faktor VIII (von Willebrand-Faktor) die Endothelzellidentität bestätigt.

## *Fibroblasten*

Die Fibroblastenzelllinie F135-60-86 wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. A. Trautmann (Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurde diese in RPMI-Medium mit Zusatz von 10 % FCS (foetal calf serum). Zur Stimulation mit  $TNF\alpha$  oder  $IFN\gamma$  wurden die Zellen in T25 oder T125 Zellkulturflaschen kultiviert und mit  $TNF\alpha$  (2 ng/ml),  $IFN\gamma$  (25 ng/ml) oder mit beiden Cytokinen gleichzeitig über jeweils 24 und 48 Stunden stimuliert. Nach Stimulation wurden Zellüberstände gesammelt und diese bis zur Durchführung des ELISA bei  $-20^{\circ}C$  eingefroren.

Für die *In-situ*-Hybridisierung wurden die Zellen nach zweimaligen Waschschritten in kaltem 1 x PBS auf beschichtete Glasobjektträger (Superfrost plus, Roth) aufgetropft, luftgetrocknet und im Anschluss für 20 min in 4 % Paraformaldehyd in 1 x PBS fixiert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen für die Durchflusszytometrie verwendet.

### **2.6 ELISA**

Die zuvor gesammelten und bei  $-20^{\circ}C$  eingefrorenen Zellüberstände der HDMEC und Fibroblasten wurden quantitativ auf CXCL12/SDF-1-Protein mittels eines kommerziell erhältlichen CXCL12/SDF-1-ELISA-Testsystem (R&D) gemäß der Herstellerangaben untersucht.

### **2.7 Durchflußzytometrie**

Die zuvor stimulierten und mit Hilfe von 0,5 % EDTA abgelösten Zellen wurden 30 min in 1 % BSA/PBS inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Im Anschluss wurde mit dem Primärantikörper Maus anti humanes CXCR4 (Klon: 44716.111, R&D Systems, Wiesbaden) für 45 min bei  $4^{\circ}C$  zugesetzt. Danach wurden die Zellen in 1 x PBS/1 % BSA gewaschen und anschließend für weitere 45 min mit einem FITC- konjugierten Kaninchen anti Maus Antikörper

in einer Verdünnung von 1:50 in 1 x PBS (Dako, Hamburg) inkubiert und im Anschluss mittels Durchflusszytometrie (FACScan, BD) unter Verwendung der Cell Quest Software (BD) analysiert.

### **3. Ergebnisse**

Zur Analyse der Rolle von Chemokinen in Entzündungsreaktionen der Haut wurden Gewebeschnitte von drei bedeutsamen entzündlichen Hautreaktionen - Wundheilung, Psoriasis und Alopecia Areata - mit spezifischem Zellinfiltrat, jeweils auf gleiche Weise behandelt.

Stanzbiopsien im Durchmesser von 4-6 mm wurden wie im Methodenteil beschrieben entnommen, eingefroren und serielle Schnitte angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden entweder immunhistochemisch gefärbt oder radioaktiv mittels <sup>35</sup>S-UTP markierten, sequenzspezifischen antisense und sense Proben für das jeweilige Chemokin markiert. Als Kontrollgewebe wurde normale Haut gesunder Probanden verwendet.

#### **3.1 Chemokinexpression in den entzündlichen Hauterkrankungen**

##### **3.1.1 Chemokinexpression in der Wundheilung**

Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Korrelation zwischen den phasisch ins Wundterrain migrierenden Leukozytensubpopulationen während des begleitenden Entzündungsprozesses humaner kutaner Wundheilung und dem Chemokin-Expressionsmuster. Die Expression der beiden CXC-Chemokine CXCL1/GRO $\alpha$  und CXCL8/IL-8 korreliert mit neutrophilen Granulozyten, die des CC-Chemokins CCL2/MCP-1 mit Makrophagen und die der beiden CXC-Chemokine CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 mit Lymphozyten (Engelhardt, Toksoy et al. 1998). Da während einer Entzündungsreaktion die Expression von Chemokinen durch Endothelzellen notwendige Voraussetzung für eine effiziente Leukozytendiapedese ist, untersuchten wir im weiteren Verlauf Chemokine mit

lymphozyten- und/oder monozytenchemotaktischen Eigenschaften, deren Expression voraussichtlich in aktivierten Endothelzellen hochreguliert wird. Für diesen Zweck stellten wir radioaktiv markierte sense und anti-sense Proben der u.g. Chemokine her und färbten mittels *In-situ*-Hybridisierung Schnitte von Hautbiopsien artifiziell erzeugter Wunden. Die Analyse umfasste die nachfolgend genannten Chemokine:

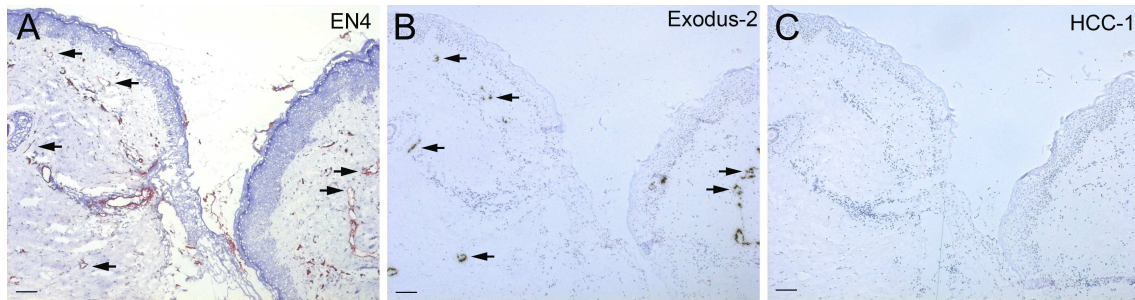
CCL14/HCC-1, CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL20/LARC, CCL21/Exodus-2, CXCL11/I-TAC und CXCL12/SDF-1

*CCL14/HCC-1, CCL21/Exodus-2*

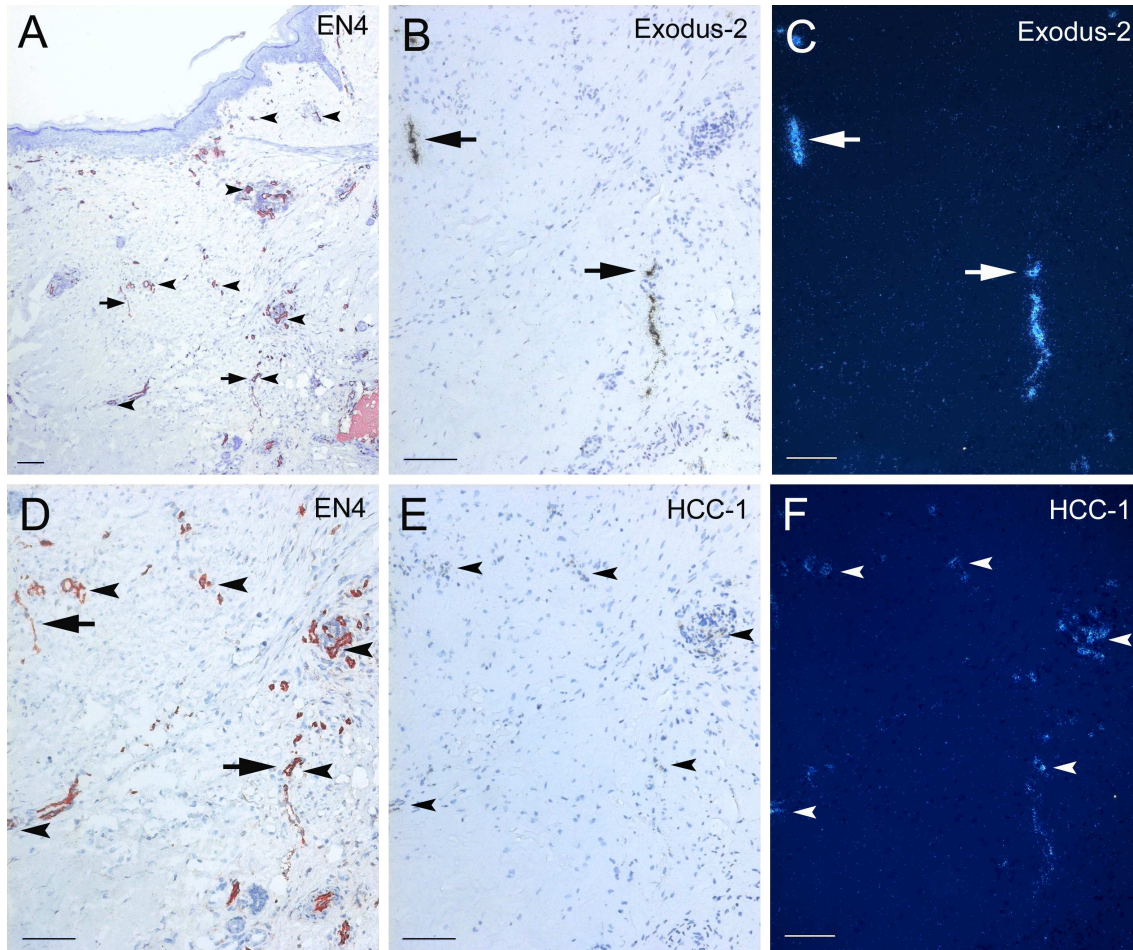
Von den im Wundgewebe untersuchten Chemokinen (CCL14/HCC-1, CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL20/LARC, CCL21/Exodus-2, CXCL11/I-TAC und CXCL12/SDF-1), fanden wir mRNA-Signale für CCL14/HCC-1, CCL21/Exodus-2 und CXCL12/SDF-1, wobei das CXC-Chemokin CXCL12/SDF-1 eindeutig in der Expression dominierte. Die beiden CC-Chemokine CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 zeigten eine vergleichbare Expression, die ausschließlich mit Endothelzellen dermalen Gefäße assoziiert war. Im epidermalen Kompartiment wurden weder CCL21/Exodus-2 noch CCL14/HCC-1 detektiert. CXCL12/SDF-1 zeigte ein auffälliges Verteilungsmuster, was nachfolgend separat diskutiert wird.

Eine schwache CCL21/Exodus-2-Expression wurde bereits zu frühen Zeitpunkten (Tag 1-4) detektiert (**Abb. 1**), wohingegen die Expression von CCL14/HCC-1-mRNA zunächst zu den frühen Zeitpunkten gegenüber normaler Haut erst deutlich später (Tag 7 bis 21) vorgefunden wurde (**Abb. 2**). Die mRNA-Expression dieser beiden CC-Chemokine wurde im Verlauf der Wundheilung auf ein stärkeres Expressionsniveau hochreguliert, wobei die CCL14/HCC-1- und CCL21/Exodus-2-Signale weiterhin ausschließlich mit Endothelzellen dermalen Gefäße assoziiert blieben.



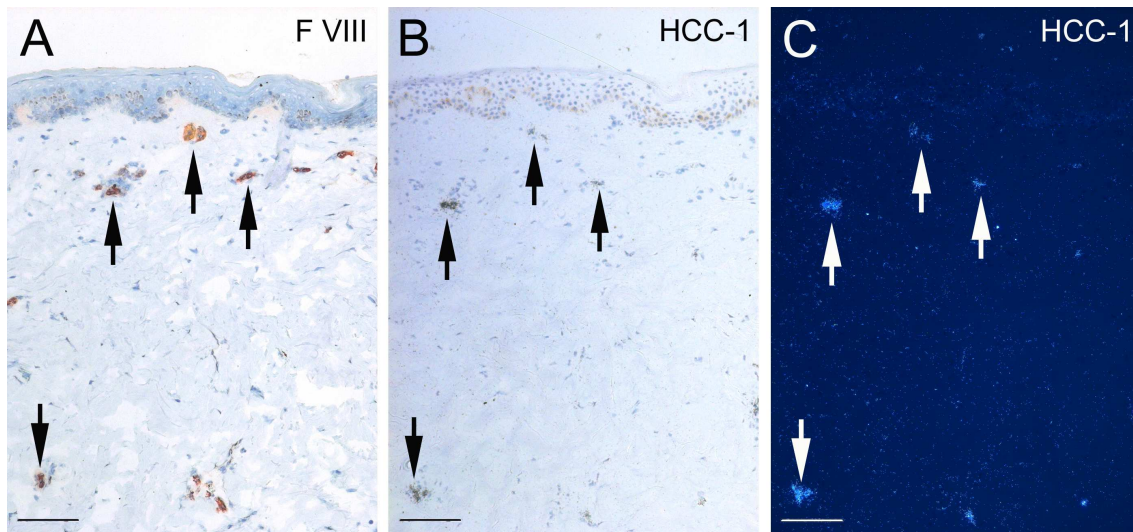


**Abb. 1 Wundgewebe:** CCL21/Exodus-2- und CCL14/HCC-1-mRNA-Expression im Wundgewebe 2 Tage post incisionem. CCL21/Exodus-2-Signale (B) sind in identischer Lokalisation wie EN4<sup>+</sup>-Gefäße (A) vorzufinden. CCL14/HCC-1 (C) wird zu diesem Zeitpunkt noch nicht exprimiert. CCL21/Exodus-2 und CCL14/HCC-1 anti-sense Proben wurden mit <sup>35</sup>S-UTP markiert und Schnitte aus Wundgewebe mittels *In-situ*-Hybridisierung untersucht. Endothelzellen wurden immunhistochemisch mit einem monoklonalen Antikörper (EN4) unter Verwendung der dreistufigen Streptavidin-Peroxidase Methode und AEC als Substrat gefärbt. Hellfeldbeleuchtung (A, B, C). Bar = 100µm



**Abb. 2 Wundgewebe:** Expression von CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 im Wundgewebe 21 Tage post incisionem: *In-situ-Hybridisierung* von CCL14/HCC-1 (E, F, Pfeilköpfe) und CCL21/Exodus-2 (B, C, Pfeile) zeigen eine vergleichbare mRNA-Expression, die mit EN4<sup>+</sup> Endothelzellen (A, D) korreliert. Übersichtsaufnahme (A) und immunhistochemischer Nachweis EN4<sup>+</sup> Endothelzellen (A, D). D zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus A. CCL14/HCC-1-mRNA-Signale (E, F) sind zu den späten Zeitpunkten humaner kutaner Wundheilung vermehrt vorzufinden. Hellfeldbeleuchtung (A, B, D, E), Dunkelfeldbeleuchtung (C, F). Bar = 100µm

Im Kontrollgewebe (normale unbehandelte Haut) wurde CCL14/HCC-1- und CXCL12/SDF-1-mRNA nachgewiesen. CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL20/LARC, CCL21/Exodus-2, CXCL11/I-TAC wurden nicht exprimiert (Daten nicht gezeigt). Auch in normaler Haut gesunder Probanden waren CCL14/HCC-1-Transkripte mit Endothelzellen dermalen Gefäße assoziiert (**Abb. 3**).



**Abb. 3 Normale Haut:** Mittels *In-situ-Hybridisierung* dargestellte CCL14/HCC-1-mRNA-Expression (B, C) in normaler, unbehandelter Haut; diese korreliert mit immunhistochemisch nachgewiesenen Faktor VIII<sup>+</sup> Endothelzellen (A). Hellfeldbeleuchtung (A, B), Dunkelfeldbeleuchtung (C). Bar = 100µm

Im Falle von CXCL12/SDF-1 wurde ebenfalls eine Expression im Bereich dermalen Gefäße und zusätzlich in Fibroblasten detektiert, worauf später näher eingegangen wird.

#### *CXCL12/SDF-1, ein konstitutiv exprimiertes CXC-Chemokin*

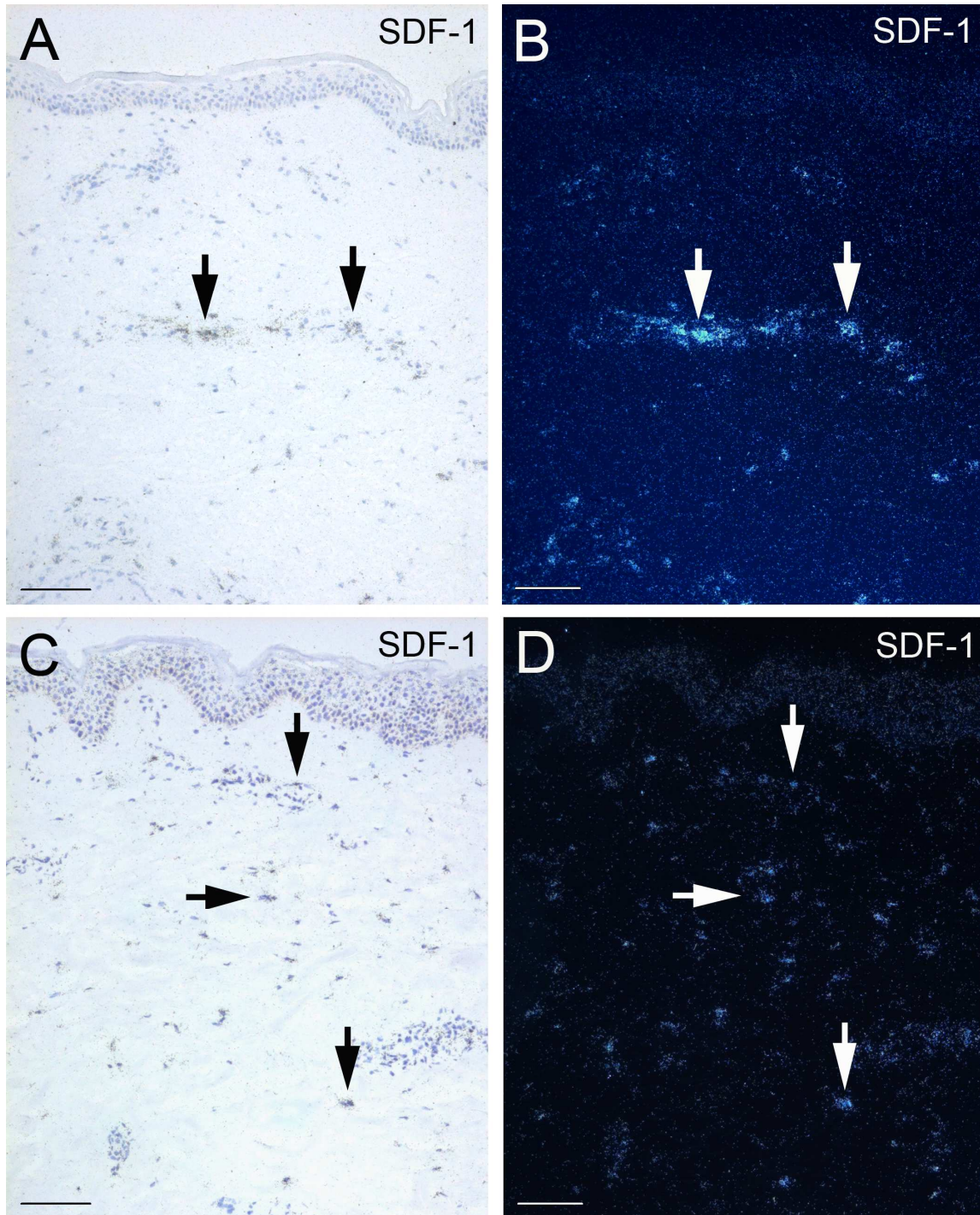
*In vivo* und *in vitro* wird CXCL12/SDF-1-mRNA unter den untersuchten Chemokinen besonders stark exprimiert, was uns veranlaßte, die Regulation von CXCL12/SDF-1 genauer zu untersuchen.

Eine semiquantitative Auswertung der CXCL12/SDF-1-mRNA-Expression während des Wundheilungsverlaufs ergab, dass zu jedem Zeitpunkt Transkripte des Chemokins detektiert werden konnten, die allerdings zwischen Tag 7 und 10 auf ein Maximum hochreguliert wurden und dieses im weiteren Verlauf bestehen blieb. In **Tabelle 6** ist eine semiquantitative Auswertung CXCL12/SDF-1-mRNA exprimierender Zellen in normaler, unbehandelter Haut gesunder Probanden (0 Stunden) und im Wundheilungsverlauf (1 bis 21 Tage post incisionem) dargestellt.

Zeit nach Incision Proband	gesunde Haut	Tag 1	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14	Tag 21
Proband 1	++	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Proband 2	+	+	n. u.	++	++	++	++	++
Proband 3	+++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
Proband 4	+	+	+	++	+++	+++	++	+++
Proband 5	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
Proband 6	++	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Proband 7	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
Mittelwert	1.5	1.0	1.5	2.1	2.7	2.9	2.7	2.9

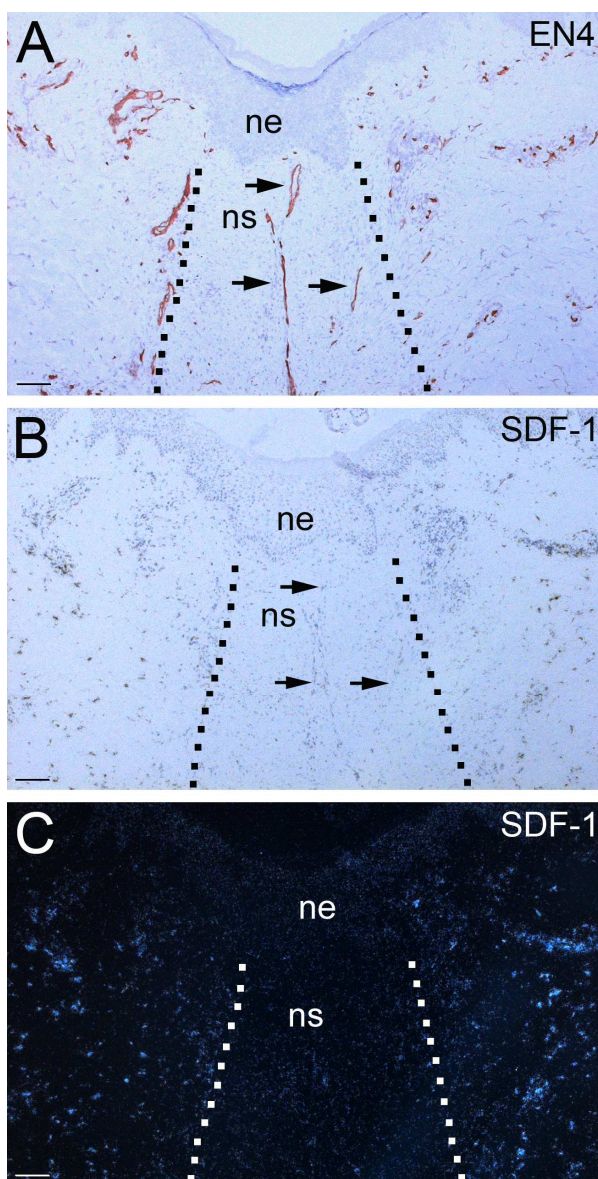
**Tabelle 6 Wundgewebe:** Semiquantitative Auswertung von CXCL12/SDF-1-mRNA exprimierenden Zellen im Randbereich humaner Hautwunden 0, 1, 2, 4, 7, 10, 14 und 21 Tage nach Wundsetzung. Es konnte zeitabhängig eine (+) schwache, (++) moderate, oder (+++) starke Expression während der Wundheilung beobachtet werden. (n.u.) nicht untersucht. In allen untersuchten Geweben konnten keine CXCL12/SDF-1-mRNA exprimierenden Zellen im Neostroma, welches den initialen Wunddefekt ersetzte, detektiert werden. Die *In-situ*-Hybridisierung wurde mit <sup>35</sup>S-UTP markierten CXCL12/SDF-1 anti-sense Proben durchgeführt.

So konnte zu frühen Zeitpunkten der Wundheilung, d.h. von Tag 1-4 an, eine schwache bis mäßige, endothelzellosoziierte CXCL12/SDF-1-Expression in den Wundrändern beobachtet werden, vergleichbar mit der Expression des Chemokins in normaler, unbehandelter Haut gesunder Probanden (Kontrolle) (**Abb. 4**). Während dieser Zeit war der Wunddefekt noch nicht durch fibröses Stroma ersetzt. Jedoch entwickelte sich nach Tag 4 eine akanthotische Neopidermis über der zuvor unbedeckten Wundoberfläche.



**Abb. 4 Normale Haut und Wundgewebe:** mRNA-Expression von CXCL12/SDF-1 in normaler, unbehandelter Haut gesunder Probanden (A, B) und in den Wundrändern 2 Tage nach Wundsetzung (C, D). CXCL12/SDF-1-Transkripte sind in vergleichbarem Ausmaß sowohl in normaler Haut (A, B) wie auch im Wundgewebe (C, D) detektierbar. CXCL12/SDF-1 anti-sense Proben wurden mit  $^{35}\text{S}$ -UTP markiert und Schnitte normaler, gesunder Haut (A, B) und Wundgewebe (C, D) mittels *In-situ*-Hybridisierung untersucht. CXCL12/SDF-1-mRNA-Transkripte sind in vergleichbarem Ausmaß sowohl in normaler Haut (A, B) wie auch im Wundgewebe (C, D) detektierbar. Hellfeldbeleuchtung (A, C), Dunkelfeldbeleuchtung (B, D). Bar = 100 $\mu\text{m}$

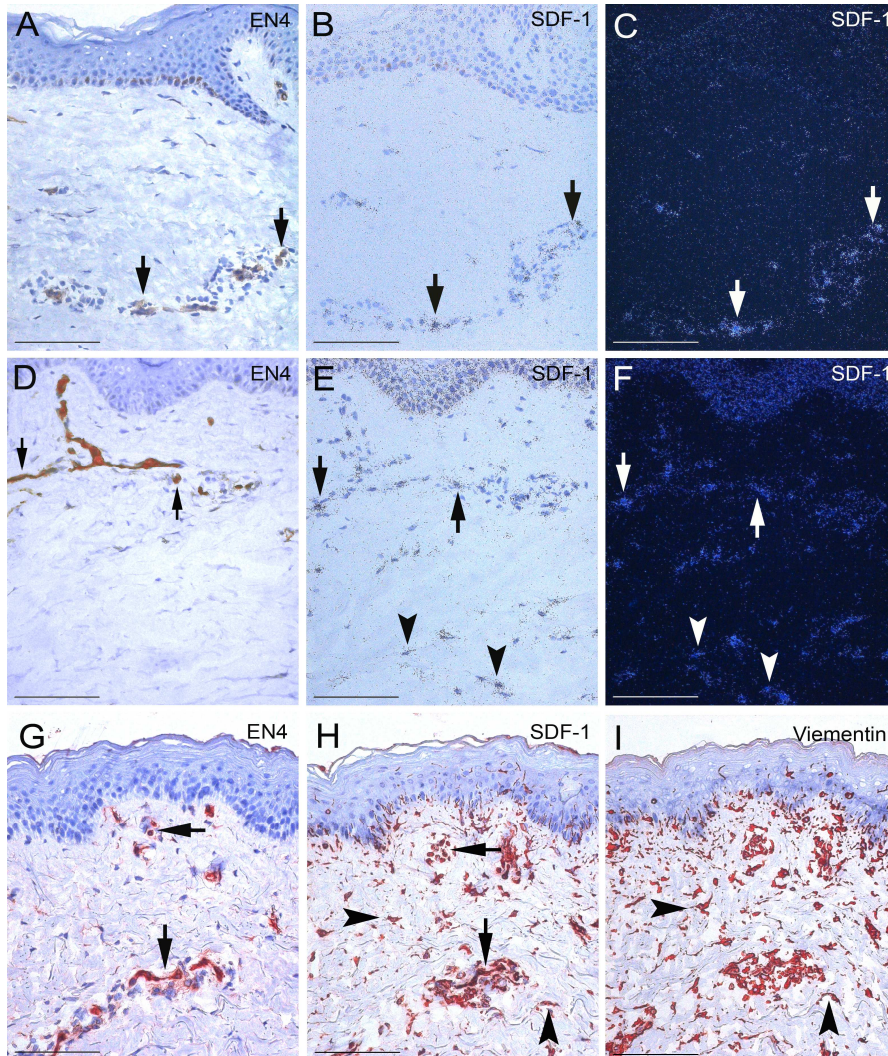
Im weiteren Wundheilungsverlauf von Tag 7-21 post incisionem stieg die Expression von CXCL12/SDF-1-Transkripten stark an (**Tabelle 6**). In diesem Zeitintervall wurde im Rahmen der Wundheilungsvorgänge der initiale Wunddefekt durch fibröses Stroma ersetzt. Interessanterweise konnten CXCL12/SDF-1-Signale ausschließlich an den Wundrändern, aber nicht im Neostroma detektiert werden (**Abb. 5**). Auch 5-7 Wochen nach Wundsetzung war nahezu keine CXCL12/SDF-1-mRNA im Neostroma nachweisbar (Daten nicht gezeigt)



**Abb. 5: Wundgewebe:** CXCL12/SDF-1-Expression 10 Tage nach Wundincision. CXCL12/SDF-1 anti-sense Proben wurden mit <sup>35</sup>S-UTP markiert und das Wundgewebe mittels *In-situ*-Hybridisierung analysiert.

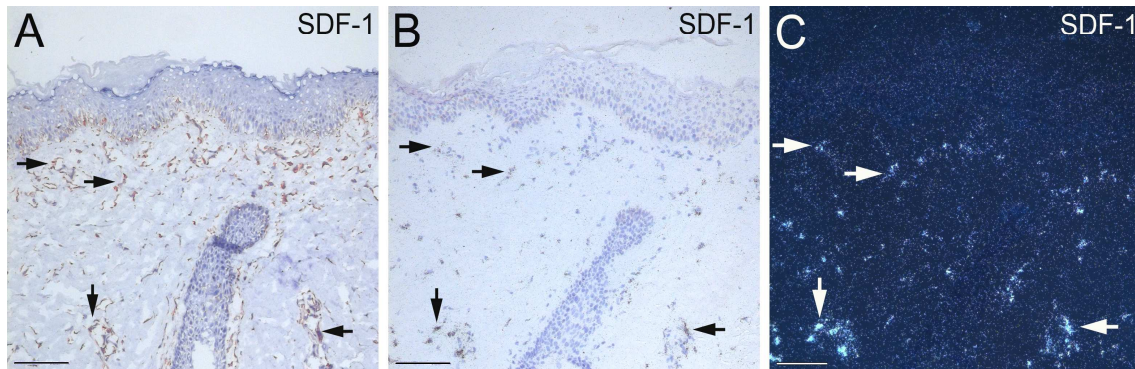
Die Expression von CXCL12/SDF-1-mRNA ist auf die Wundränder beschränkt und nicht im Neostroma (ns) nachweisbar (B, C), obwohl im Neostroma EN4<sup>+</sup> Gefäße vorhanden sind (A, B). Die gestrichelte Linie deutet die Grenze zwischen Wundrändern, Neostroma und Neoepidermis (ne) an. EN4<sup>+</sup> Endothelzellen wurden immunhistochemisch mit Hilfe eines endothel-spezifischen, monoklonalen Antikörpers (EN4) und unter Verwendung der dreistufigen Streptavidin-Peroxidase-Methode und AEC als Substrat gefärbt. Hellfeldbeleuchtung (A, B), Dunkelfeldbeleuchtung (C). Bar = 100µm

Anhand von seriellen Schnitten wurden nun die Zellpopulationen analysiert, die CXCL12/SDF-1 produzieren. Dabei konnte eine Korrelation von CXCL12/SDF-1-mRNA<sup>+</sup> Zellen mit EN4<sup>+</sup> Endothelzellen beobachtet werden. Zudem war die CXCL12/SDF-1-Expression mit Fibroblasten assoziiert (**Abb. 6**).



**Abb. 6 Normale Haut und Wundgewebe:** CXCL12/SDF-1 wird hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert. Serielle Schnitte normaler, unbehandelter Haut (A, B, C) und Proben von Wundrändern 2 Tage (D, E, F) und 7 Tage (G, H, I) nach Wundsetzung wurden immunhistochemisch mit einem endothelspezifischen, monoklonalen Antikörper (EN4) (A, D, G), einem monoklonalen Antikörper gegen CXCL12/SDF-1-Antigen (H) und einem monoklonalen Antikörper gegen Vimentin (I) zur Detektion von Fibroblasten (Pfeilköpfe) gefärbt. Der Nachweis von CXCL12/SDF-1-mRNA (B, C, E, F) erfolgte mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-UTP markierten CXCL12/SDF-1 anti-sense Proben. CXCL12/SDF-1-mRNA und CXCL12/SDF-1-Protein sind kolokalisiert mit EN4<sup>+</sup> Endothelzellen (Pfeile). Weiterhin wird CXCL12/SDF-1 durch Fibroblasten, die mittels Vimentin identifiziert wurden, exprimiert (Pfeilköpfe). Hellfeldbeleuchtung (A, B, D, E, G, H, I), Dunkelfeldbeleuchtung (C, F). Bar = 100μm

Um unsere bisherigen mRNA-Expressionsdaten auch auf dem Proteinniveau zu bestätigen, färbten wir serielle Schnitte mit Hilfe eines CXCL12/SDF-1-spezifischen monoklonalen Antikörpers. Es zeigte sich auf Proteinebene ein dem mRNA-Expressionsmuster vergleichbares Muster (**Abb. 7**) und bestätigt, dass *in vivo* bei der Wundheilung mRNA-Transkripte in Protein translatiert werden.



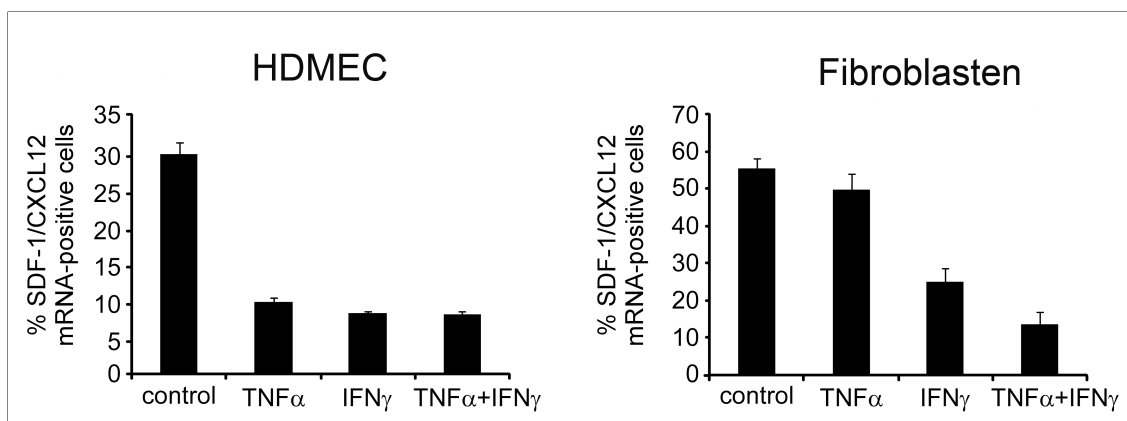
**Abb. 7 Wundgewebe:** Serielle Wundgewebsschnitte 7 Tage post incisionem (A, B). CXCL12/SDF-1-Immunreaktivität und CXCL12/SDF-1-mRNA im Wundgewebe im Vergleich. CXCL12/SDF-1-Protein wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers unter Verwendung der dreistufigen Streptavidin-Peroxidase Methode und AEC als Substrat gefärbt. CXCL12/SDF-1 anti-sense Proben wurden mit <sup>35</sup>S-UTP markiert und das Wundgewebe mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung analysiert. CXCL12/SDF-1-Protein (A) und mRNA (B, C) zeigen das gleiche Expressionsmuster. Hellfeldbeleuchtung (A, B), Dunkelfeldbeleuchtung (C). Bar = 100µm

### *TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ regulieren die Expression von CXCL12/SDF-1 in humanen dermalen Endothelzellen und Fibroblasten in vitro*

Um festzustellen, welche Faktoren einen regulatorischen Effekt auf die CXCL12/SDF-1-Produktion haben, wurden Kulturen dermalen mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMEC) und Fibroblasten (F 135) angelegt und mit den proinflammatorischen Cytokinen TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  stimuliert. Wir konzentrierten uns auf diese beiden Faktoren, da TNF $\alpha$  für die Induktion von Frühphasechemokinen wie CXCL8/IL-8, CXCL1/GRO $\alpha$  und CCL2/MCP-1 verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu stimuliert IFN $\gamma$  CXCL9/Mig und CXCL10/IP-10, welche während späterer Zeitpunkte der kutanen Wundheilung erscheinen. Weiterhin regulieren beide Cytokine die Expression von Genen, die



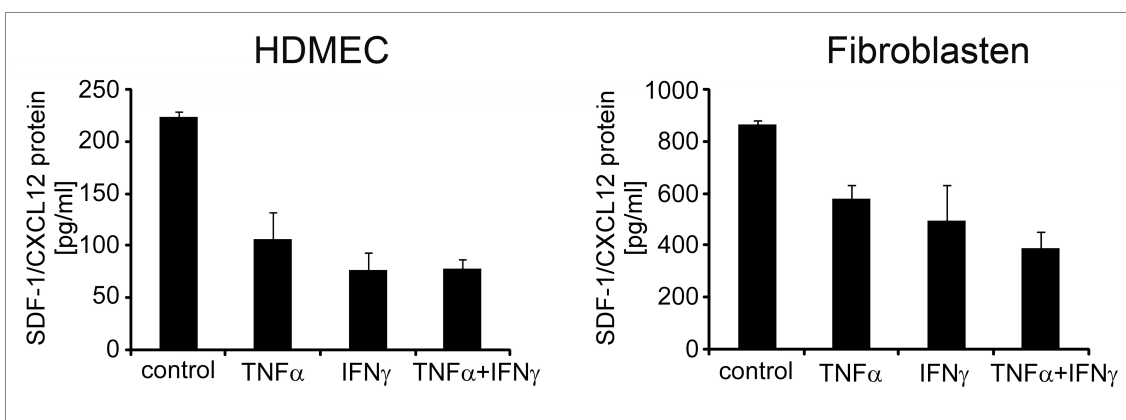
für Angiogenese verantwortlich sind (Salvucci, Basik et al. 2004). Vor und nach Stimulation wurden beide Zelltypen auf Glasobjektträger aufgetropft und mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung auf CXCL12/SDF-1-mRNA-Expression untersucht. Beide Zelllinien zeigten eine konstitutive Expression von CXCL12/SDF-1-mRNA, wobei die Anzahl konstitutiv exprimierender Zellen bei Fibroblasten ( $56 \pm 3$  %) höher lag als bei Endothelzellen ( $30 \pm 2$  %). Nach Behandlung mit den o.g. Cytokinen kam es zu einer deutlichen Herunterregulation von CXCL12/SDF-1, wobei  $50 \pm 4$  % der Fibroblasten und  $10 \pm 0,4$  % der Endothelzellen nach Zugabe von  $\text{TNF}\alpha$  CXCL12/SDF-1-mRNA exprimierten. Im Gegensatz zu  $\text{TNF}\alpha$ , führte  $\text{IFN}\gamma$  zu einer ausgeprägteren Suppression von CXCL12/SDF-1-Transkripten; lediglich  $25 \pm 4$  % der Fibroblasten und  $8 \pm 0,3$  % der HDMEC exprimierten noch CXCL12/SDF-1 (**Abb. 8**).



**Abb. 8:** Expression von CXCL12/SDF-1 in Endothelzellen und Fibroblasten nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$ . Kultivierte Endothelzellen (HDMEC) und Fibroblasten wurden vor und nach Stimulation mit 2 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  oder 25 ng/ml  $\text{IFN}\gamma$  oder in Kombination mit beiden über 24 Stunden stimuliert. Zellen wurden geerntet und einer *In-situ*-Hybridisierung mit  $^{35}\text{S}$ -UTP markierter CXCL12/SDF-1-mRNA unterzogen. Die Abbildung gibt die prozentuale CXCL12/SDF-1-mRNA-Expression vor und nach Stimulation mit den Zytokinen wieder

Im Folgenden untersuchten wir die Zellüberstände der zuvor stimulierten Zellen mit Hilfe eines ELISA-Testsystems auf CXCL12/SDF-1-Protein. Auch hier konnte eine konstitutive Expression des CXCL12/SDF-1-Proteins in den Überständen der unbehandelten Proben detektiert werden. Auch die Suppression der CXCL12/SDF-1-mRNA nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  bestätigte sich auf

Proteinebene. Ausgehend von einem Basalwert von 225 pg/ml CXCL12/SDF-1-Protein in unstimulierten HDMEC konnte eine Reduzierung des Chemokinspiegels im Zellüberstand auf 107 pg/ml nach TNF $\alpha$  und 77 pg/ml nach IFN $\gamma$  Behandlung nachgewiesen werden. Die Fibroblasten zeigten hinsichtlich der CXCL12/SDF-1-Synthese ein den HDMEC vergleichbares Verhalten; beide Cytokine führten auch hier zu einer Suppression von CXCL12/SDF-1-Protein nach TNF $\alpha$ -Stimulation (581 pg/ml) bzw. nach IFN $\gamma$ -Stimulation (493 pg/ml) (**Abb. 9**).



**Abb. 9:** Expression von CXCL12/SDF-1 in Endothelzellen und Fibroblasten nach Stimulation mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ . Kultivierte Endothelzellen (HDMEC) und Fibroblasten (F 135-60-86) wurden vor und nach Stimulation mit 2 ng/ml TNF $\alpha$  oder 25 ng/ml IFN $\gamma$  oder in Kombination mit beiden über 24 Stunden stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden mit Hilfe eines ELISA-Testsystems auf ihre CXCL12/SDF-1-Konzentrationen untersucht.

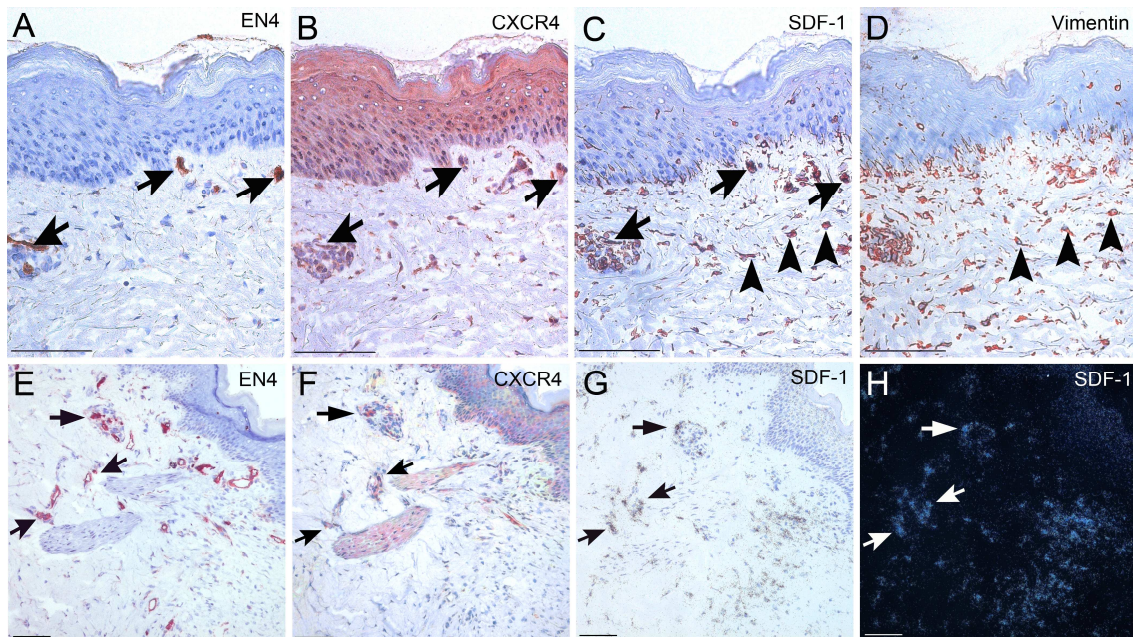
Unsere Ergebnisse zeigen, dass *in vitro* in beiden Zelltypen, HDMEC und Fibroblasten, CXCL12/SDF-1 konstitutiv exprimiert wird. Die Cytokine TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  führen zu einer signifikanten CXCL12/SDF-1-Suppression, wobei IFN $\gamma$  einen stärkeren inhibitorischen Effekt als TNF $\alpha$  zeigt. Diese *in vitro* Daten stehen im Einklang mit unseren *in situ*-Daten:

*In situ* erreicht die CXCL12/SDF-1-Expression an Tag 7 nach Wundsetzung ihr Maximum. Zu diesem Zeitpunkt werden weder die Frühphasechemokine CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO $\alpha$  und CXCL8/IL8, für deren Expression TNF $\alpha$  verantwortlich gemacht wird, noch die IFN $\gamma$ -induzierten Spätphasechemokine CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 exprimiert. Die Expression der Früh- und

Spätphasechemokine spiegelt das Vorhandensein der proinflammatorischen Cytokine,  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$ , wieder. Eine verminderte Expression der Früh- und Spätphasechemokine an Tag 7 nach Wundsetzung läßt vermuten, dass zu diesem Zeitpunkt auch die proinflammatorischen Cytokine,  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$ , vermindert vorhanden sind und folglich CXCL12/SDF-1 vermehrt exprimiert werden kann.

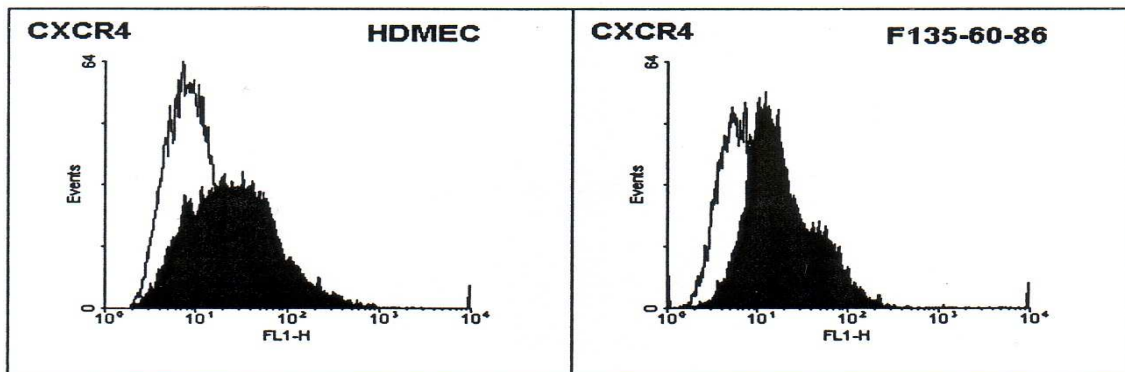
## Das Expressionsmuster von CXCR4-Protein korreliert mit dem Expressionsmuster seines Liganden CXCL12/SDF-1

Wie schon beschrieben, binden CXCR4 und sein Ligand CXCL12/SDF-1 nicht promiskuitiv (Nagasawa, Tachibana et al. 1999), weswegen wir uns fragten, ob CXCR4 in unserem Wundheilungsmodell eine vergleichbare Verteilung aufweist wie sein Ligand. Daraufhin untersuchten wir mittels eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch für CXCR4 ist, das Expressionsmuster dieses Rezeptors. Beide, Ligand und Rezeptor, zeigten sich assoziiert mit Endothelzellen. Zusätzlich wurde CXCR4 noch von Keratinozyten in der epidermalen Schicht exprimiert (**Abb. 10**).



**Abb. 10 Wundgewebe:** Vergleich der Expression von CXCL12/SDF-1-mRNA und CXCR4 in humaner kutaner Wundheilung 10 (A-D) und 14 (E-H) Tage nach Wundsetzung. Sowohl EN4<sup>+</sup> Endothelzellen (A, E) (als Pfeile angezeigt) als auch Fibroblasten (Pfeilköpfe) (D) exprimieren den Liganden CXCL12/SDF-1 (C, G, H) und seinen Rezeptor CXCR4 (B, F). CXCR4 wird zusätzlich von epidermalen Keratinozyten exprimiert (B). CXCL12/SDF-1 anti-sense Proben wurden mit <sup>35</sup>S-UTP markiert und das Wundgewebe mittels *In-situ*-Hybridisierung analysiert (G, H). CXCL12/SDF-1-Protein (C), CXCR4-Protein (B, F), EN4 (A) und Vimentin (D) wurden mittels Immunhistochemie mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern unter Verwendung der dreistufigen Streptavidin-Peroxidase Methode und AEC als Substrat gefärbt. Hellfeldbeleuchtung (A-G), Dunkelfeldbeleuchtung (H). Bar = 100µm

FACS-Analysen für CXCR4 zeigten, dass unstimulierte Fibroblasten den Rezeptor stark exprimieren, während Endothelzellen deutlich geringere Mengen an CXCR4 aufweisen (**Abb. 11**). Sowohl Endothelzellen als auch Fibroblasten exprimieren nicht nur CXCL12/SDF-1, sondern auch CXCR4 auf ihrer Oberfläche.



**Abb. 11:** Expression von CXCR4 in Endothelzellen und Fibroblasten. Durchflusszytometrie von CXCR4 auf Endothelzellen (HDMEC) und Fibroblasten (F135-60-86). Die schwarzen Profile zeigen CXCR4<sup>+</sup> Endothelzellen (HDMEC, links) und CXCR4<sup>+</sup> Fibroblasten (F135-60-86, rechts). Die weißen Profile stellen Isotypkontrollen dar.

Die dargestellten Ergebnisse weisen auf die wichtige Rolle der Chemokine im Rahmen der Wundheilung hin. Unsere Beobachtungen zeigen, dass Chemokine nicht ausschließlich von Leukozytensubpopulationen, sondern auch, wie im Falle von CCL14/HCC-1, CCL21/Exodus-2 und CXCL12/SDF-1, von residenten Zellen (Endothelzellen, Fibroblasten) exprimiert werden.

### 3.1.2 Chemokinexpression in der Psoriasis

Wie schon aus früheren Publikationen unserer Arbeitsgruppe bekannt, korreliert das räumliche und zeitlich differentielle Expressionsmuster bestimmter CC- und CXC-Chemokine mit der Infiltration korrespondierender Entzündungszellen in psoriatischen Läsionen (Gillitzer, Berger et al. 1991), (Gillitzer, Wolff et al. 1993), (Gillitzer, Ritter et al. 1996), (Goebeler, Toksoy et al. 1998).

Die beiden CXC-Chemokine CXCL1/GRO $\alpha$  und CXCL8/IL-8 wurden in Keratinozyten der oberen Epidermis von Psoriasispatienten detektiert. CXCL8/IL-8, das im Gegensatz zu CXCL1/GRO $\alpha$  nur im epidermalen Kompartiment (Stratum malphigii) vorgefunden wurde, wird zusätzlich von neutrophilen Granulozyten, die in die Epidermis migriert sind und Munrosche Mikroabzesse bilden, exprimiert. Eine Expression von CXCL1/GRO $\alpha$  findet sich in Neutrophilen allerdings nicht. Dagegen wurde CXCL1/GRO $\alpha$  in gefäßassoziierten Zellen der papillären Dermis detektiert (Gillitzer, Ritter et al. 1996). Auch ist bekannt, dass das makrophagenchemotaktische CC-Chemokin CCL2/MCP-1 von basalen Keratinozyten der läsionalen, klobig imponierenden Retespitzen exprimiert wird, was die lineare Anordnung von dermalen Makrophagen um die Retespitzen erklärt (Gillitzer, Wolff et al. 1993).

Die CXC-Chemokine CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10, welche in den Papillenspitzen der psoriatisch veränderten Haut detektiert wurden, waren mit der Akkumulation von CD68<sup>+</sup> Makrophagen und CD3<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert (Goebeler, Toksoy et al. 1998).

Vergleichbar mit unseren Wundheilungsstudien interessierten uns im weiteren Verlauf auch hier die Chemokine, die möglicherweise von Endothelzellen produziert werden und chemotaktisch auf Lymphozyten und/oder Monozyten/Makrophagen wirken. Hierzu stellten wir <sup>35</sup>S-UTP markierte anti-sense und sense Proben verschiedener Chemokine her, und untersuchten mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung Biopsien von Psoriasisläsionen.

*Expression von CCL14/HCC-1, CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL20/LARC, CCL21/Exodus-2, CXCL11/I-TAC und CXCL12/SDF-1*

Eine semiquantitative Auswertung der mRNA-Expression der untersuchten Chemokine ist in **Tabelle 7** zusammengefaßt. Es wurden Signale von CCL14/HCC-1, CCL18/PARC, CCL21/Exodus-2 und CXCL12/SDF-1 in den psoriatischen Läsionen vorgefunden. CCL17/TARC, CCL20/LARC und CXCL11/I-TAC waren entweder nur vereinzelt oder gar nicht vorhanden.

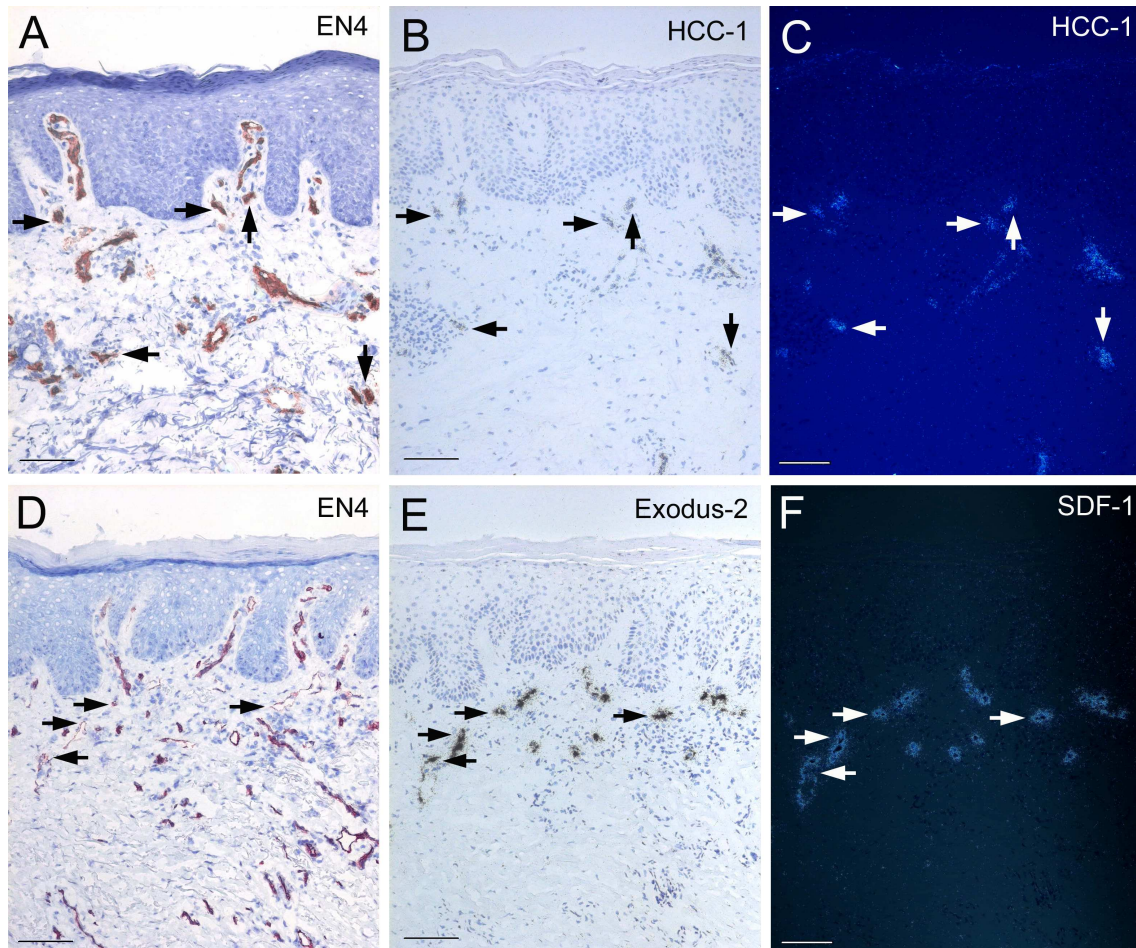
Patienten-ID	CCL14/ HCC-1	CCL17/ TARC	CCL18/ PARC	CCL20/ LARC/	CCL21/ Exodus-2	CXCL11/ I-TAC	CXCL12/ SDF-1
1	+++	-	+	n. u.	++	-	+++
2	+++	+/-	+	n. u.	++	-	+++
3	+++	-	+/-	n. u.	+++	-	+++
4	+++	-	++	n. u.	+/-	-	+++
5	+/-	-	+++	n. u.	++	-	+++
6	+++	-	+++	n. u.	+	-	+++
7	++	-	++	+/-	n. u.	-	-
8	++	+/-	++	n. u.	++	-	+++
9	+	-	+++	+/-	+++	-	+++
10	++	+/-	++	+/-		-	+++
11	n. u.	-	++	-	++	-	++

**Tab. 7 Psoriasis:** Semiquantitative Auswertung der Chemokin-mRNA-Expression in Psoriasisläsionen. Die *In-situ*-Hybridisierung wurde mit <sup>35</sup>S-UTP markierten anti-sense Proben für das jeweilige Chemokin durchgeführt und zeigte unterschiedliche Expressionsstärken: - (negativ), +/- (vereinzelt Zellen), + (schwach), ++ (mittel), +++ (stark), n. u. (nicht untersucht). In normaler Haut gesunder Probanden wurden Transkripte von CCL14/HCC1 und CXCL12/SDF-1 (siehe Punkt 3.1.1), nicht jedoch von CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL20/LARC, CCL21/Exodus-2, CXCL11/I-TAC detektiert (Daten nicht gezeigt).

#### *Expression von CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2*

Die beiden CC-Chemokine CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 konnten in allen untersuchten Psoriasisläsionen nachgewiesen werden. Die Expressionsprofile beider Chemokine waren auffallenderweise sehr ähnlich. Sowohl CCL14/HCC-1 als auch CCL21/Exodus-2 wurden ausschließlich in Endothelzellen dermalen Gefäße exprimiert. Dabei waren CCL21/Exodus-2-Signale in 7 der untersuchten Proben auf papilläre Gefäße beschränkt; in 4 Läsionen war darüber hinaus CCL21/Exodus-2 vereinzelt auch in tieferen dermalen Gefäßen detektierbar. CCL14/HCC-1-Signale waren über die gesamte Läsion verteilt (**Abb. 12**).

Vergleichsweise werden die gefäßassoziierten CCL14/HCC-1-mRNA-Signale in der Psoriasis in einem stärkeren Ausmaß als in normaler, gesunder Haut exprimiert. CCL21/Exodus-2 war dagegen in normaler Haut gesunder Probanden nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

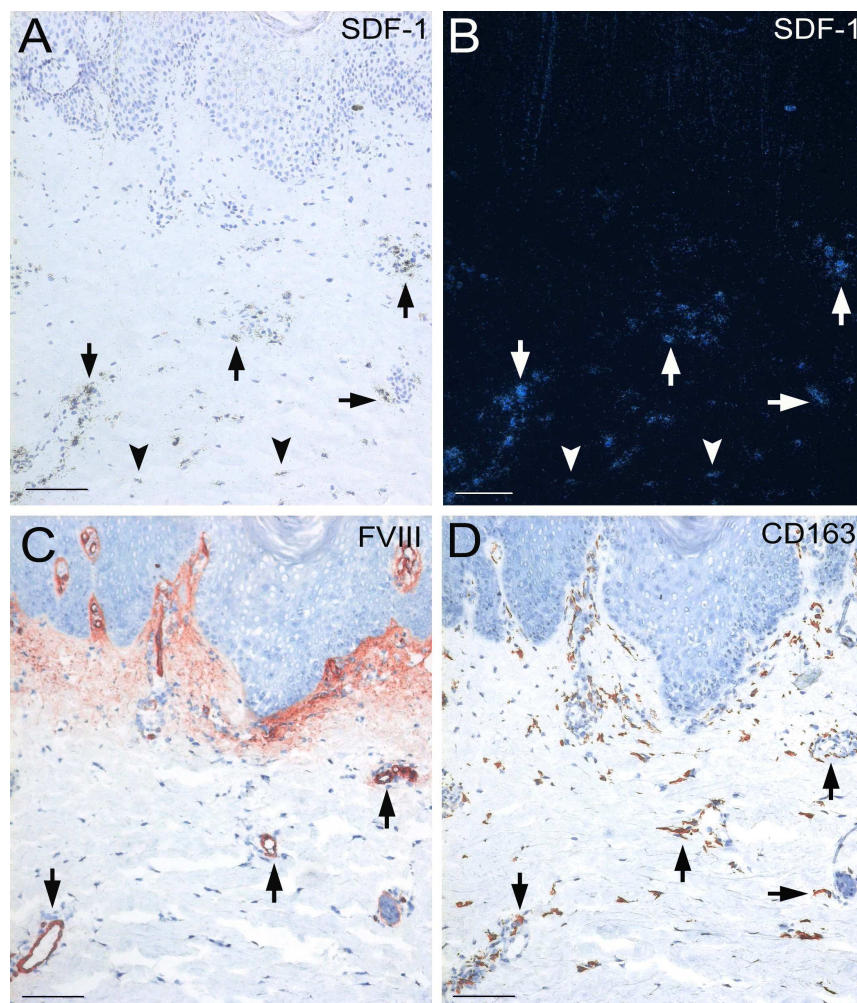


**Abb. 12 Psoriasis:** CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 in psoriatischen Läsionen. A, B, C zeigen eine Korrelation von CCL14/HCC-1-mRNA (B, C) und EN4<sup>+</sup> Gefäßen (A). CCL21/Exodus-2-Expression (E, F) und EN4<sup>+</sup> Gefäße (D) korrelieren miteinander. CCL14/HCC-1 (B, C) und CCL21/Exodus-2 (E, F) anti-sense Proben wurden mit <sup>35</sup>S-UTP markiert und das Psoriasisgewebe mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung analysiert. Endothelzellen (A, D) wurden mittels Immunhistochemie mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern (EN4) unter Verwendung der dreistufigen Streptavidin-Peroxidase Methode und AEC als Substrat gefärbt. Hellfeldbeleuchtung (A, B, D, E), Dunkelfeldbeleuchtung (C, F). Bar = 100µm



## Expression von CXCL12/SDF-1

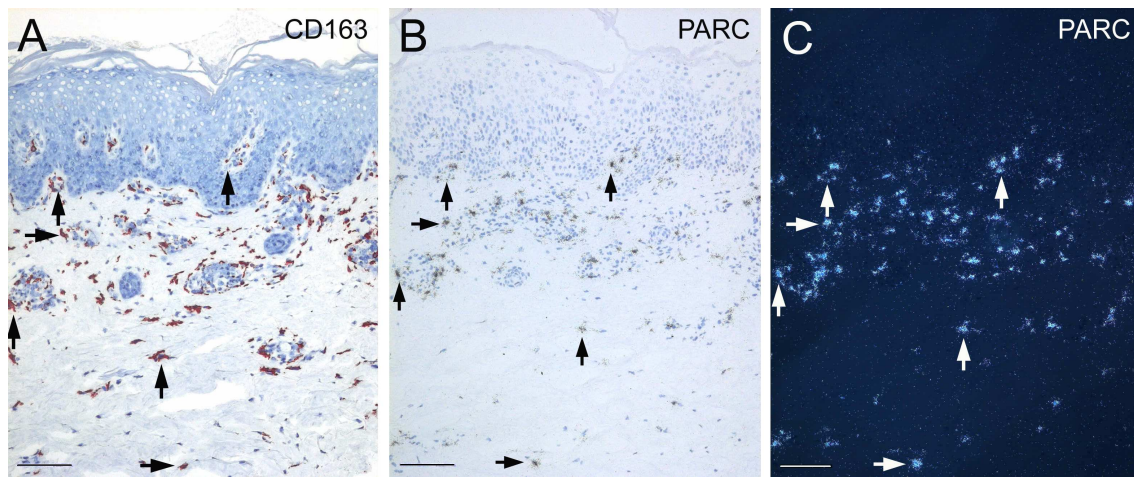
Die *In-situ*-Hybridisierung mit CXCL12/SDF-1 anti-sense Proben zeigte eine hohe Transkriptionsdichte im Bereich dermalen Gefäße und der diese umgebenden perivaskulären Zellen (CD163<sup>+</sup> Makrophagen). Zudem konnten wir CXCL12/SDF-1 auch in spindelförmigen Stromazellen beobachten (**Abb. 13**). Im epidermalen Kompartiment war CXCL12/SDF-1-mRNA nicht nachweisbar.



**Abb. 13 Psoriasis:** CXCL12/SDF-1-mRNA in Psoriasisläsionen. CXCL12/SDF-1-mRNA-Expression (Pfeile A, B) im Bereich perivaskulärer Zellen dermalen Gefäße (Pfeile C, D) und Stromazellen (Pfeilköpfe A, B) CXCL12/SDF-1 (A, B) anti-sense Proben wurden mit <sup>35</sup>S-UTP markiert und das Psoriasisgewebe mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung analysiert (A, B). FVIII (Endothelzellen) (C) und CD163 (makrophagenspezifisches Antigen) wurden mittels Immunhistochemie mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern unter Verwendung der dreistufigen Streptavidin-Peroxidase-Methode und AEC als Substrat gefärbt. Hellfeldbeleuchtung (A, C, D), Dunkelfeldbeleuchtung (B). Bar = 100µm

### Expression von CCL18/PARC

Im Gegensatz zu CCL14/HCC-1, CCL21/Exodus-2 und CXCL12/SDF-1 war die CCL18/PARC-mRNA vorwiegend mit mononukleären Entzündungszellen im Bereich der Papillen assoziiert (**Abb. 14**). Die Lokalisation von CD163<sup>+</sup> Makrophagen und CCL18/PARC-Signalen war identisch.



**Abb. 14 Psoriasis:** Expression von CCL18/PARC (B, C) in mononukleären Entzündungszellen im Bereich psoriatischer Papillen. CCL18/PARC-mRNA (B, C) korreliert mit CD163<sup>+</sup> Makrophagen (A). CCL18/PARC (B, C) anti-sense Proben wurden mit <sup>35</sup>S-UTP markiert und das Psoriasisgewebe mittels *In-situ*-Hybridisierung analysiert (B, C). CD163 (A) wurde mittels Immunhistochemie mit entsprechenden monoklonalen Antikörper unter Verwendung der dreistufigen Streptavidin-Peroxidase Methode und AEC als Substrat gefärbt. Hellfeldbeleuchtung (A, B), Dunkelfeldbeleuchtung (C). Bar = 100µm

In der Psoriasis geht die starke Proliferation der Epidermis und die konsekutive Verlängerung der Reteleisten mit einer ausgeprägten Proliferation und Elongation der Gefäße in den dermalen Papillen einher, was hinweisend auf eine wichtige Rolle des Gefäßsystems in der Pathogenese der Psoriasis sein könnte.

Es wird angenommen, dass die vermehrte Vaskularisierung psoriatischer Haut die Rekrutierung von CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten ins Gewebe erleichtert. Unsere Daten deuten darauf hin, dass eine Beteiligung der von Endothelzellen exprimierten Chemokine, CCL21/Exodus-2, CCL14/HCC-1 und CXCL12/SDF-1, bei der Migration von T-Lymphozyten ins Psoriasisgewebe wichtig ist.

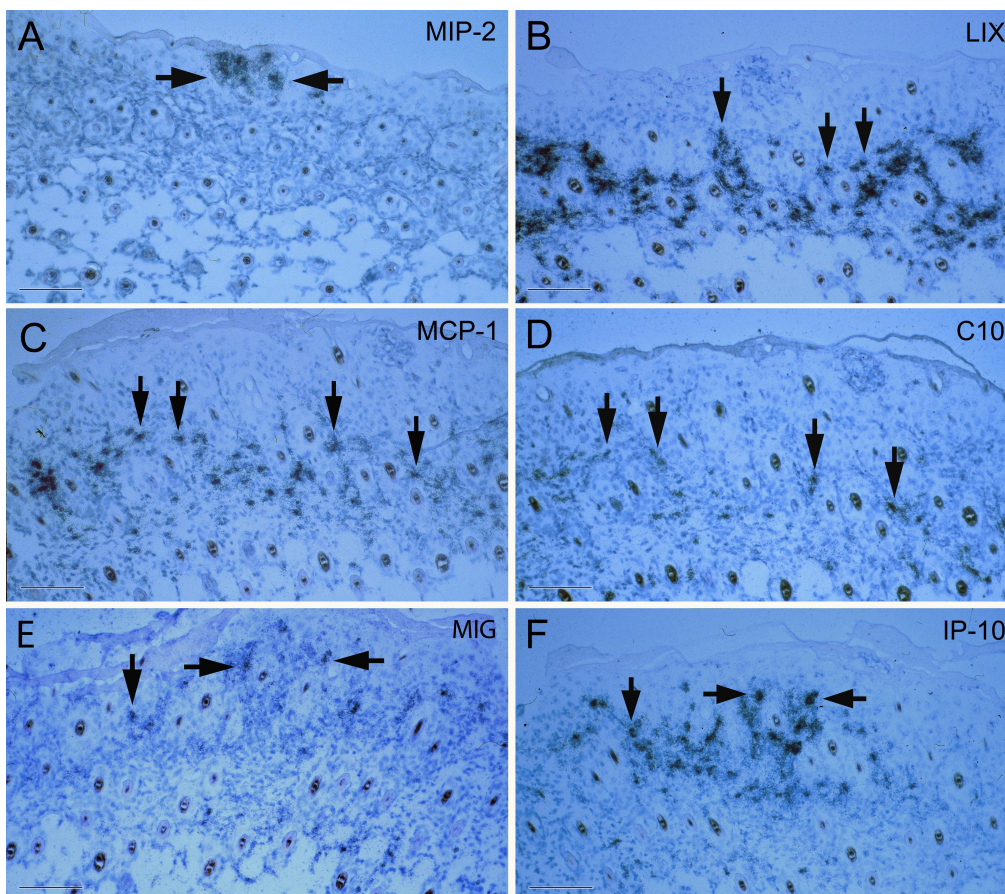
Für das klinische Bild und die Pathogenese der Psoriasis sind Keratinozyten eine weitere wichtige Zellpopulation. Die Proliferationsrate epidermaler Keratinozyten ist bei der Psoriasis um mehr als das achtfache erhöht und die Basalzellen benötigen deshalb nur 4-7 Tage statt 3-4 Wochen, um das Stratum corneum zu erreichen.  $\text{TNF}\alpha$  ist ein wesentlicher Keratinozyten-stimulierender Mediator, der in der Psoriasis stark erhöht ist. Das veranlasste uns, die Chemokinexpression zusätzlich in einem Tiermodell zu untersuchen. Wir zogen hierzu ein Mausmodell heran, in dem es nach keratinozytenspezifischer Deletion von IKK2, einer Komponente des  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signaltransduktionswegs, zur Ausbildung eines psoriasisformen Hautphänotyps kommt (Pasparakis, Courtois et al. 2002).

### **3.1.3 Chemokinexpression nach Epidermis-spezifischer Deletion von IKK2**

Die Ursachen der bei der Psoriasis zu beobachtenden epidermalen Differenzierungsstörung sind bis heute weitgehend ungeklärt. Pasparakis et al. konnten zeigen, dass die epidermisspezifische Deletion von IKK2 in Mäusen zu einer Akanthose mit Verlust des Stratum granulosum, einer Hyperkeratose mit lokaler Parakeratose, einer an Munrosche Mikroabzesse erinnernden subkornealen Pustelbildung sowie zu einem ausgeprägten Entzündungsinfiltrat führt. Die Zahl der Makrophagen, Granulozyten und  $\text{CD4}^+$  T-Zellen ist zudem in der Dermis von IKK2-/- Mäusen deutlich erhöht, wobei Makrophagen und Granulozyten der IKK2-defizienten Tiere eine erhöhte  $\text{TNF}\alpha$ -Expression aufweisen. Auch das durch Keratinozyten synthetisierte  $\text{IL-1}\beta$  ist in den IKK2-/- Mäusen erhöht. Um zu erforschen, ob  $\alpha\beta$ T-Lymphozyten essentiell für die Ausbildung der Hauterkrankung sind, kreuzten Pasparakis et al. IKK2-defiziente Tiere mit T-Zell-Antigen-Rezeptor  $\alpha$  ( $\text{TCR}\alpha$ ) Knockout Mäusen, denen reife  $\alpha\beta$ T-Zellen fehlen. Diese Tiere entwickelten die gleiche Hauterkrankung mit gleicher Kinetik und gleichen histologischen Charakteristika wie IKK-2 defiziente Mäuse, so dass man davon ausgehen kann, daß  $\alpha\beta$ T-Lymphozyten nicht erforderlich für die Entwicklung der Hautläsionen sind. Diese Ergebnisse, zusammen mit dem frühen Erkrankungsbeginn, lassen vermuten, dass die Entzündung der Haut in

IKK2-defizienten Mäusen nicht durch eine antigenspezifische Immunantwort getriggert wird, sondern durch eine Reaktion des angeborenen Immunsystems (Pasparakis, Courtois et al. 2002).

In diesem Kontext untersuchten wir mittels *In-situ*-Hybridisierung, welche chemotaktischen Mediatoren eine Rolle im Entzündungsgeschehen spielen und analysierten die Expression der Maus-Chemokine Ccl2/MCP-1, Ccl6/C10, Cxcl5/LIX, MIP-2, Cxcl9/Mig und Cxcl10/IP-10 im Modell der IKK2-defizienten Tiere. Wir konnten Ccl2/MCP-1-, Ccl6/C10-, Cxcl5/LIX-, Cxcl9/MIG- und Cxcl10/IP-10- mRNA in der Dermis der Mausmutanten an den Tagen 4 und 7 (postnatal) detektieren, jedoch nicht in den Kontrolltieren. MIP-2, das murine Homolog zu humanem CXCL8/IL-8, wurde hauptsächlich in den subcornealen Pusteln in der Epidermis von IKK2<sup>-/-</sup> an Tag 7 gefunden (**Abb. 15**).



**Abb. 15 Haut IKK2<sup>-/-</sup> Tiere:** *In-situ*-Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-Uridintriphosphat markierten Proben von MIP-2- (A), Cxcl5/LIX- (B), Ccl2/MCP-1- (C), Ccl6/C10- (D), Cxcl9/MIG- (E) und Cxcl10/IP-10- (F) mRNA in der Haut von IKK2-defizienten Mäusen. Das Expressionsprofil entspricht dem von Läsionen psoriatischer Haut. Hellfeldbeleuchtung (A, B, C, D, E, F). Bar = 100µm

Die bei den epidermal IKK2-defizienten Mäusen gemachten Beobachtungen lassen vermuten, dass diese Entzündung eine durch TNF $\alpha$  vermittelte, von  $\alpha\beta$ T-Zellen unabhängige Reaktion ist, die sich kurze Zeit nach der Geburt in der Haut entwickelt und keine antigenspezifische Immunantwort darstellt.

### 3.1.4 Die Rolle von TNF $\alpha$ in der Pathogenese der Psoriasis

Da bei der Psoriasis das proinflammatorische Cytokin TNF $\alpha$  vermehrt exprimiert wird, versucht man über eine Blockade dieses Faktors eine Hemmung der psoriatischen Entzündungsreaktion zu erreichen. Die Hemmung von TNF $\alpha$  kann u.a. mit Hilfe des anti-TNF $\alpha$ -Antikörpers Infliximab erreicht werden. Wir studierten die Chemokinexpression bei einem Patienten mit ausgeprägter Psoriasis pustulosa, bei dem eine Besserung des Befundes nur nach Blockade von TNF $\alpha$  mittels Infliximab erreicht werden konnte (Benoit, Toksoy et al. 2004). Hierbei wurde einem 61 Jahre alten Patienten mit einer seit 2 Jahren bestehenden pustulösen Psoriasis vom von-Zumbusch-Typ, die sich bei Behandlung mit konventionellen Maßnahmen als therapieresistent herausstellte, Infliximab appliziert. Hierunter kam es innerhalb weniger Tage zu einer Abheilung der Läsionen (**Abb. 16**). Es wurden jeweils vor und nach Therapie Biopsien entnommen und mit Hilfe der *In-situ*-Hybridisierung auf das Chemokin-expressionsprofil untersucht.

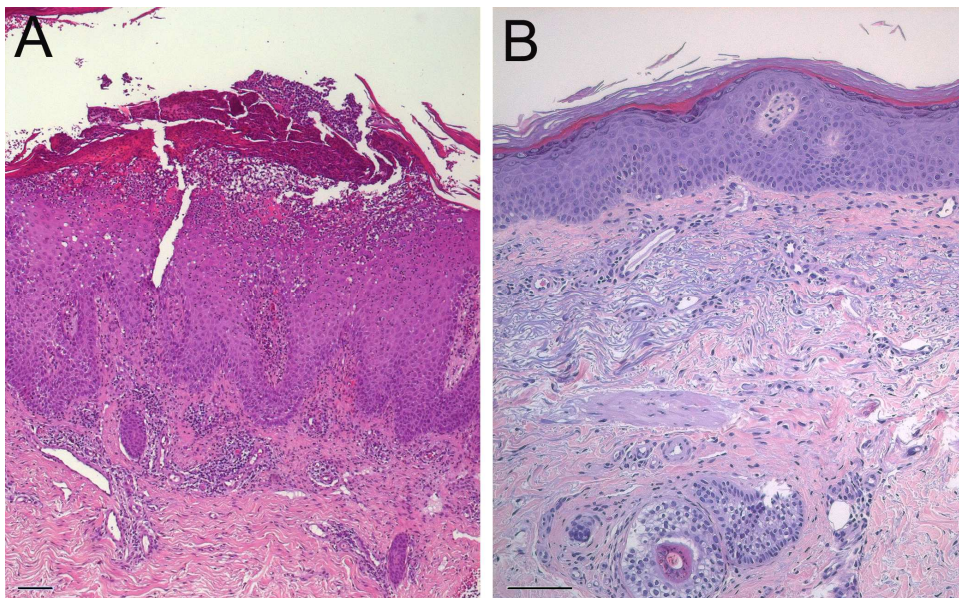
#### *Expression von CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO $\alpha$ und CXCL8/IL-8 bei der Psoriasis pustulosa vor und nach anti-TNF $\alpha$ Therapie mit Infliximab*

Vor Therapie mit Infliximab konnte in Läsionen pustulöser Psoriasis eine massive Expression von CCL2/MCP-1 und CXCL1/GRO $\alpha$  sowie eine starke CXCL8/IL-8-mRNA-Expression detektiert werden (**Abb. 17 C, E, G**). Eine hohe Transkriptionsrate zeigte sich für CCL2/MCP-1 insbesondere in den basalen Keratinozyten der klobig erweiterten und verlängerten Reteleisten. Weiterhin konnte CCL2/MCP-1-mRNA im Bereich der papillären Infiltrate detektiert werden. In der oberen Epidermis zeigte sich eine massive CXCL1/GRO $\alpha$ - und

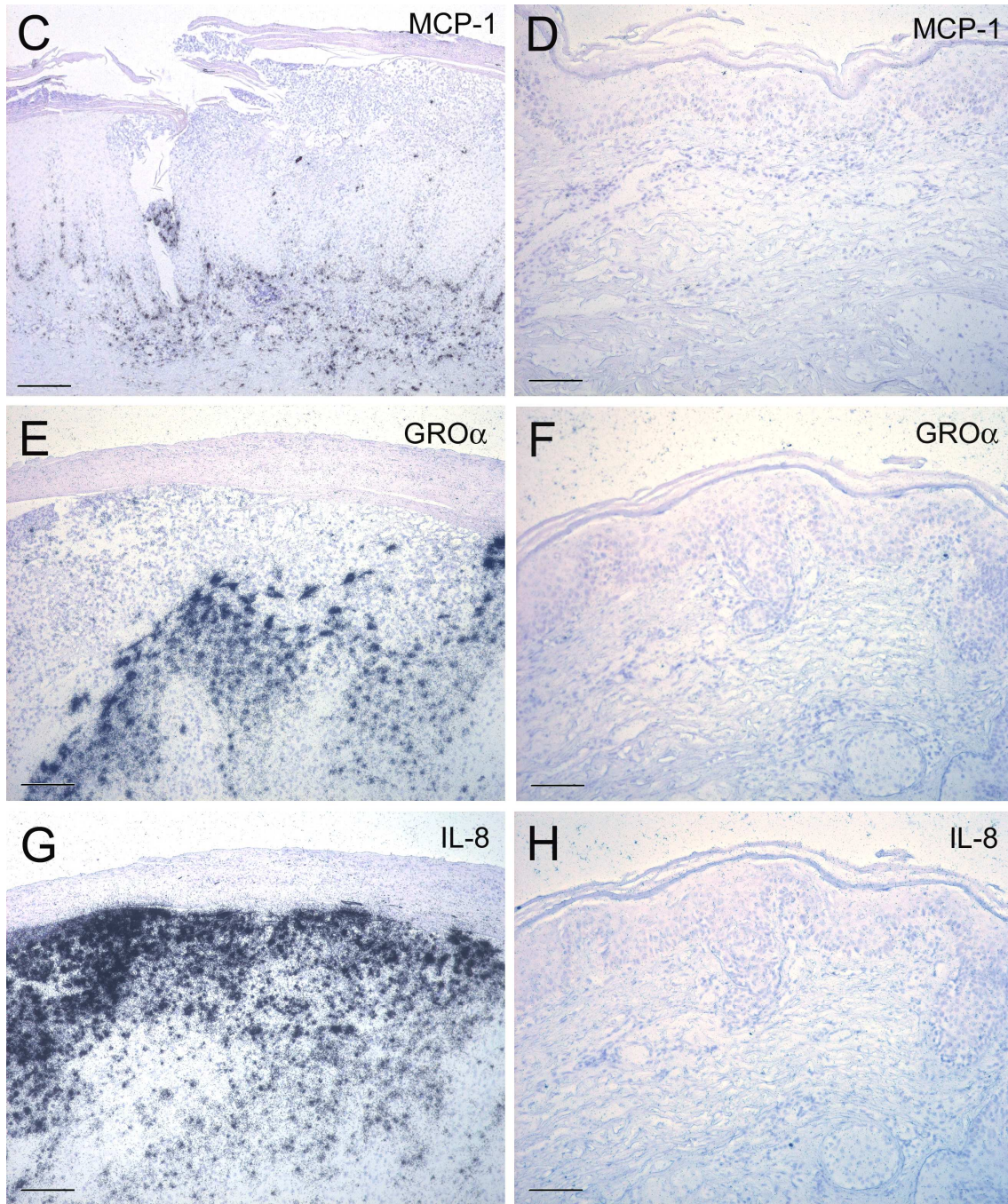
CXCL8/IL-8-mRNA-Expression. Innerhalb von 5 Tagen werden die genannten drei Chemokine vollständig herunterreguliert (**Abb. 17 D, F, H**).

#### *Expression von CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10*

Die lymphozytenchemotaktischen Chemokine CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10, die durch  $\text{IFN}\gamma$  induziert werden (Liao, Rabin et al. 1995), (Piali, Weber et al. 1998) und mit einer TH1 Immunantwort assoziiert sind, konnten weder vor noch nach Therapie der pustulösen Psoriasis detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Herunterregulation von CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO $\alpha$  und CXCL8/IL-8 spiegelt das klinische Ansprechen nach Infliximab-Therapie wider. CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 wurden weder vor noch nach der Behandlung mit Infliximab detektiert. Demnach ist bei der pustulösen Psoriasis das Chemokinexpressionsmuster im wesentlichen durch die neutrophilenchemotaktischen Chemokine CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8 und CCL2/MCP-1 dominiert, während im Gegensatz zur Plaquepsoriasis  $\text{IFN}\gamma$ -induzierte lymphozytenchemotaktische Chemokine wie CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 nicht in relevanten Umfang exprimiert werden.



**Abb. 16 Psoriasis pustulosa:** Histologische Veränderungen vor und nach Infliximab-Infusion. Immunhistochemische Färbung mit HE (A, B) vor (A) und 5 Tage nach der ersten Infliximab-Infusion (B). Hellfeldbeleuchtung (A, B). Bar = 100 $\mu\text{m}$



**Abb. 17 Psoriasis pustulosa:** Chemokinexpression vor und nach Infliximab-Infusion. *In-situ*-Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-Uridintriphosphat-markierten Proben von CCL2/MCP-1 (C, D), CXCL1/GROα (E, F) und CXCL8/IL-8 (G, H) vor (C, E, G) und 5 Tage nach der ersten Infliximab-Infusion (D, F, H). Vor Infliximab-Therapie wurde eine starke Expression der Chemokin-mRNA detektiert. Nach Infliximab-Therapie war die Chemokin-Expression nicht mehr nachweisbar. Hellfeldbeleuchtung (C-H). Bar = 100µm

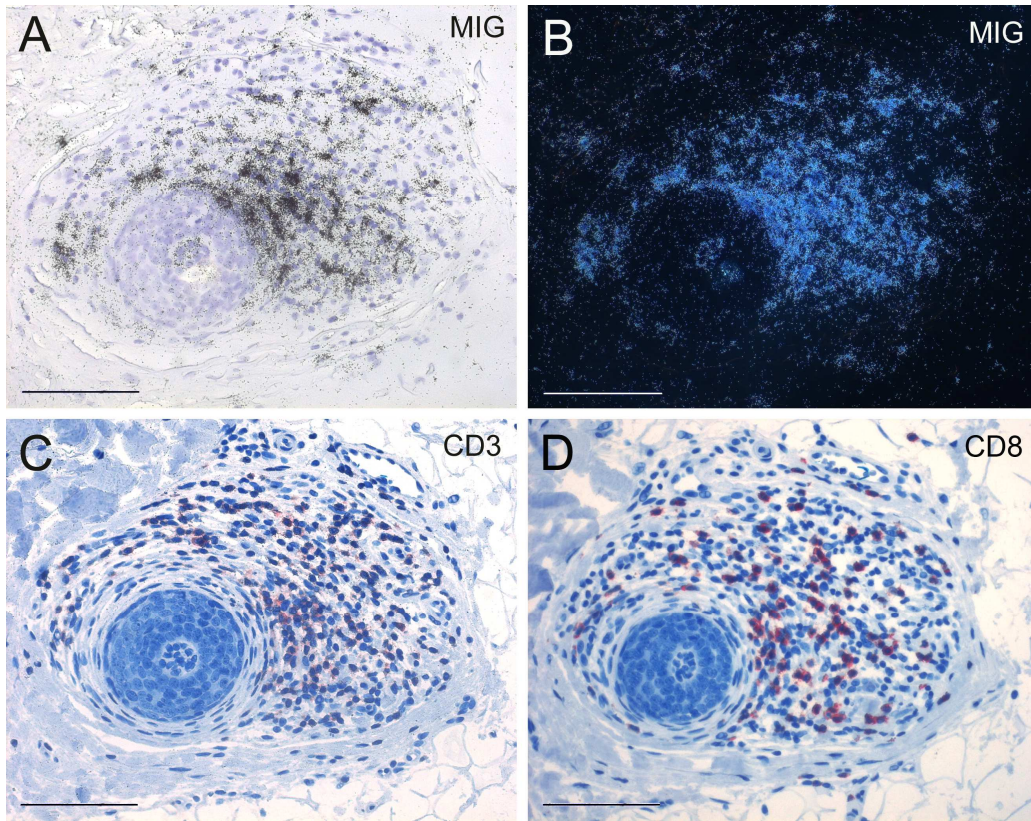
### 3.1.5 Chemokinexpression in der Alopecia areata

Auch bei der Alopecia areata, einer Autoimmunerkrankung, kommt es zur Infiltration von mononukleären Entzündungszellen, die sich bienenschwarmartig um die Bulbi konzentrieren. Wir untersuchten hier die Expression von Chemokinen, die mutmaßlich zu einer Rekrutierung dieser mononukleären Zellen führen. Von den untersuchten Chemokinen CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10, wurden CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 und CXCL10/IP-10 detektiert.

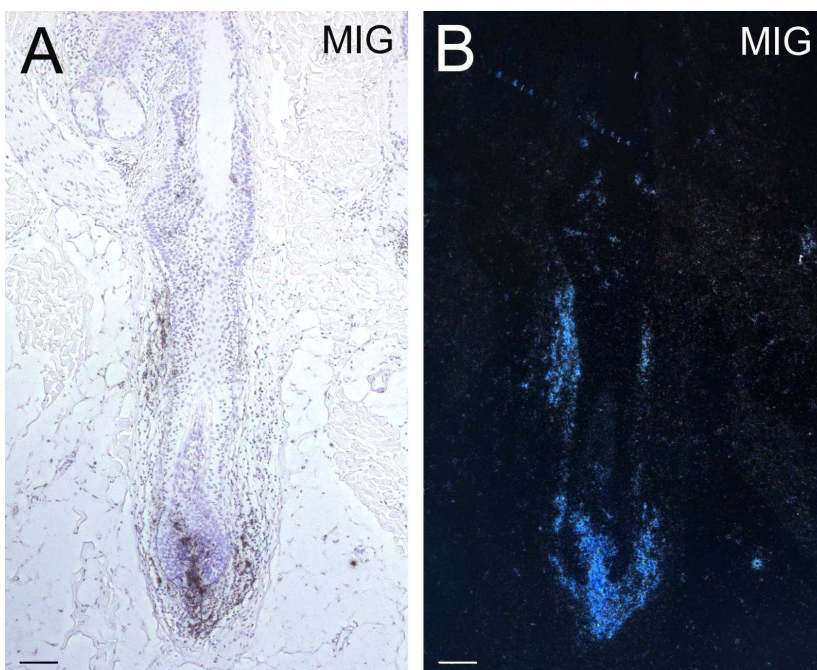
#### *Expression von CXCL9/MIG*

Das CXC-Chemokin CXCL9/MIG zeigte die stärkste Expression unter den untersuchten Chemokinen. Dabei wurde CXCL9/MIG-mRNA hauptsächlich in mononukleären Zellen, wahrscheinlich Monozyten/Makrophagen, in den peri- und intrabulbären Infiltraten und in den folliculären Papillen detektiert. Die Expression von CXCL9/MIG-mRNA korrelierte dabei mit einem Infiltrat von CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten, das durchsetzt war von CD68<sup>+</sup> Makrophagen. In Biopsien mit schwacher CXCL9/MIG-mRNA-Expression konnte entsprechend nur eine schwache intrabulbäre Leukozyteninfiltration beobachtet werden (**Abb. 18, 19**). In einer Gewebprobe konnte CXCL9/MIG-mRNA zusätzlich in der Medulla des Haarschaftes gefunden werden (Daten nicht gezeigt).





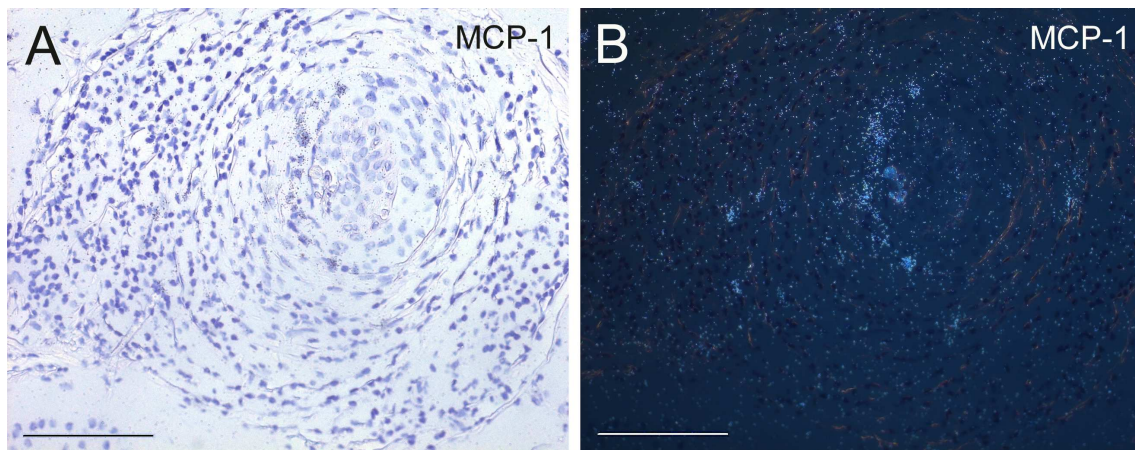
**Abb. 18 Alopecia areata:** *In-situ*-Hybridisierung mit  $^{35}\text{S}$ -UTP markierter CXCL9/MIG anti-sense Probe (A, B) und seriellen Transversalschnitten, die immunhistochemisch für CD3<sup>+</sup> (C) und CD8<sup>+</sup> (D) T-Lymphozyten unter Verwendung der dreistufigen Streptavidin-Peroxidase Methode und AEC als Substrat gefärbt wurden. Hellfeldbeleuchtung (A, C, D), Dunkelfeldbeleuchtung (B), Bar = 100µm



**Abb. 19 Alopecia areata:** Expression von CXCL9/MIG in der Alopecia areata. Longitudinaler Schnitt eines Haarfollikels und *In-situ*-Hybridisierung mit  $^{35}\text{S}$ -UTP markierter CXCL9/MIG anti-sense Probe (A, B). CXCL9/MIG-Signale sind in der Papille des Haarfollikels und im perifollikulären Infiltrat aufzufinden. Hellfeldbeleuchtung (A), Dunkelfeldbeleuchtung (B). Bar = 100µm

### Expression von CCL2/MCP-1

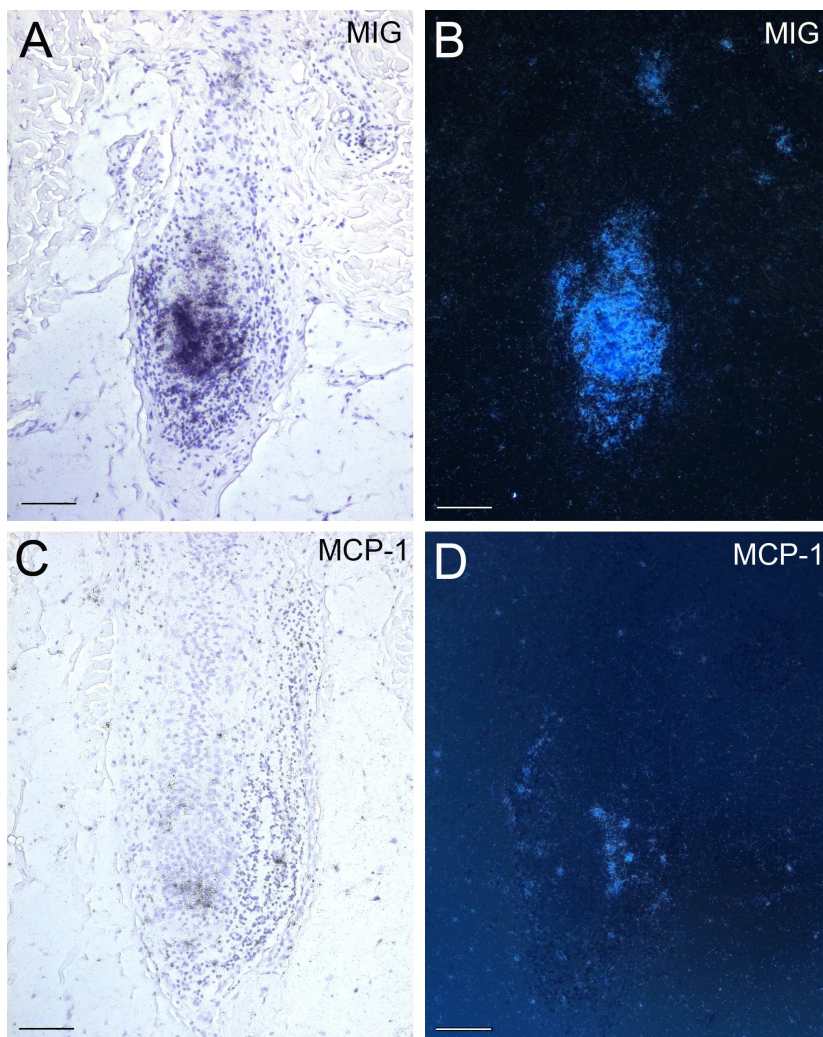
CCL2/MCP-1 war im Vergleich zu CXCL9/MIG schwächer exprimiert und zeigte zudem ein anderes Verteilungsmuster. CCL2/MCP-1-Transkripte wurden im Gegensatz zu CXCL9/MIG-mRNA vereinzelt in Keratinozyten der inneren Wurzelscheide exprimiert (**Abb. 20**).



**Abb. 20 Alopecia areata:** Expression von CCL2/MCP-1-mRNA in der Alopecia areata. *In-situ*-Hybridisierung mit  $^{35}\text{S}$ -UTP markierter CCL2/MCP-1 anti-sense Probe (A, B). CCL2/MCP-1 wird vergleichsweise schwächer exprimiert als CXCL9/MIG. CCL2/MCP-1-Signale befinden sich in der inneren Wurzelscheide des Haarfollikels. Hellfeldbeleuchtung (A), Dunkelfeldbeleuchtung (B). Bar = 100 $\mu\text{m}$

*Differente Expression von CCL2/MCP-1 und CXCL9/MIG*

**Abb. 21** demonstriert die unterschiedliche Verteilung von CXCL9/MIG und CCL2/MCP-1-mRNA im Longitudinalschnitt eines Haarfollikels. CCL2/MCP-1-Signale sind der inneren Wurzelscheide des Haarfollikels zu sehen, CXCL9/MIG wird dagegen in der Papille des Haarfollikels exprimiert. CXCL10/IP-10 Signale konnten nur in einem schwachen Ausmaß detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 21 Alopecia areata:** *In-situ*-Hybridisierung mit <sup>35</sup>S-UTP markierten anti-sense Proben für CXCL9/MIG (A, B) und CCL2/MCP-1 (C, D). Expression von CCL2/MCP-1-Signalen in der inneren Wurzelscheide des Haarfollikels, CXCL9/MIG wird dagegen in der Papille des Haarfollikels exprimiert. Hellfeldbeleuchtung (A, C), Dunkelfeldbeleuchtung (B, D). Bar = 100µm

## 4.0 Diskussion

Im Rahmen krankhafter inflammatorischer Prozesse der Haut kommt es zu einer Invasion von Leukozyten vom Lumen dermalen Gefäße ins dermale Kompartiment und möglicherweise in die Epidermis, wobei Cytokine und Chemokine als Mediatoren für einwandernde Leukozytensubpopulationen eine zentrale Rolle einnehmen. Da die Leukozytendiapedese ein unabdingbarer Prozess für das sich ausbildende Entzündungsgeschehen ist, waren wir an jenen Chemokinen interessiert, die möglicherweise von Endothelzellen produziert werden und chemotaktisch auf Leukozyten wirken.

In der vorliegenden Arbeit wurden exemplarisch Entzündungsreaktionen der Haut unterschiedlicher Pathogenese ausgewählt und versucht, die Funktion relevanter Chemokine zu erforschen und ihren Beitrag am Zustandekommen des charakteristischen Entzündungsmusters und der Zusammensetzung der Leukozytensubtypen zu evaluieren. Dabei stellen die Wundheilung, Psoriasis und Alopecia areata exemplarische Modelle für die Migration von Neutrophilen, Makrophagen und Lymphozyten während der Entzündungsprozesse dar.

Das Muster der Chemokinexpression korrelierte im Wundheilungsprozess, der Psoriasis und der Alopecia areata mit der Verteilung der infiltrierenden Leukozytensubpopulationen. Dies lässt den Schluß zu, dass Chemokine durch die selektive Rekrutierung der Entzündungszellen maßgeblich das Entzündungsgeschehen beeinflussen. Weiterhin exprimierten residente Hautzellen wie Endothelzellen und Fibroblasten Chemokine, was hinweisend auf die Bedeutung der Chemokine bei der Leukozytendiapedese und der Erhaltung der Gewebshomöostase ist.

### 4.1 Chemokine in entzündlichen Hauterkrankungen

Frühere *in vitro* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben eine Expression von CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 in kultivierten Endothelzellen (HDMEC) nach Stimulation mit unterschiedlichen Cytokinen (Goebeler, Yoshimura et al. 1997).

Die exprimierten Chemokine sind verantwortlich für die selektive Rekrutierung von Leukozytensubpopulationen ins entzündliche Gewebe.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir nun weitere potentiell von Endothelzellen exprimierte Chemokine *in situ* anhand von entzündlichen Hautreaktionen (Wundheilung, Psoriasis). Unsere *in situ* Untersuchungen zeigen ein vergleichbares Expressionsmuster von CCL14/HCC-1-, CCL21/Exodus-2- und CXCL12/SDF-1-mRNA bei Wundheilungsprozessen und der Psoriasis. Sowohl in den Wundbiopsien als auch in den Psoriasisläsionen konnte eine endothelzellassoziierte Expression der drei Chemokine beobachtet werden. CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 wurden interessanterweise ausschließlich von Endothelzellen dermalen Gefäße exprimiert. CXCL12/SDF-1 verhielt sich in seiner Verteilung anders als die beiden CC-Chemokine. CXCL12/SDF-1 wurde im Vergleich zu CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 stärker exprimiert und waren nicht allein auf Endothelzellen beschränkt.

#### **4.1.1 CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 in der Wundheilung und Psoriasis**

##### *CCL14/HCC-1, CCL21/Exodus-2*

Christopherson et al. berichteten über die Expression von CCL21/Exodus-2 in Endothelzellen einiger T-Zell-Autoimmunerkrankungen wie atopischer Dermatitis, Lichen planus und Graft-Versus-Host-Disease, wobei die Mehrheit der infiltrierenden T-Zellen CD45R0<sup>+</sup> und CCR7<sup>+</sup> waren (Christopherson, Hood et al. 2003). Weiterhin fanden Weninger et al. CCL21/Exodus-2 in blutgefäßassoziierten Endothelzellen von rheumatoider Arthritis und ulzerativer Colitis, aber, im Gegensatz zu unseren Daten, nicht in psoriatischen Läsionen (Weninger, Carlsen et al. 2003).

In Einklang mit unserer Beobachtung, dass CCL21/Exodus-2 während humaner kutaner Wundheilung exprimiert wird, ergaben *in vitro* Wundheilungsexperimente einen durch CCL21/Exodus-2 vermittelten beschleunigten Wundverschluss (Banas, Wornle et al. 2002).

Es ist bekannt, dass CCL21/Exodus-2  $\beta$ 2-Integrine aktiviert (Gunn, Tangemann et al. 1998) und die durch ICAM-1/LFA-1 vermittelte Adhäsion rollender Lymphozyten auf dem Endothel von Blutgefäßen induziert. Dies entspricht auch der Beobachtung, dass CCL21/Exodus-2 die Adhärenz von naiven T-Zellen an HEV im Lymphknoten unterstützt (Campbell, Hedrick et al. 1998), (Gunn, Tangemann et al. 1998). CCL21/Exodus-2 stimuliert selektiv die Chemotaxis von T-Lymphozyten (Hromas, Kim et al. 1997). Das dermale Infiltrat psoriatischer Hautläsionen ist u.a. geprägt durch die Präsenz von T-Zellen. Möglicherweise gelangen T-Zellen über eine CCL21/Exodus-2 induzierte Interaktion zwischen LFA-1 auf den T-Zellen und ICAM-1 auf dem Endothel von Blutgefäßen in die entzündete psoriatische Haut. Am Entzündungsort angelangt, könnte es über die Freisetzung von Cytokinen aus den eingewanderten T-Zellen zu einer Proliferation von Keratinozyten kommen.

In der Wundheilung kommt es in den Tagen 4-7 nach Wundsetzung zu einer Infiltration von Lymphozyten, die 14 Tage nach Wundsetzung die dominierende Leukozytensubpopulation in der mittlerweile abgeheilten Haut, in der noch Umbauprozesse stattfinden, darstellen (Engelhardt, Toksoy et al. 1998). T-Zellen werden hauptsächlich für die antigenspezifische Immunantwort verantwortlich gemacht, jedoch sind Lymphozyten zusätzlich in der Lage, Wachstumsfaktoren zu produzieren, weshalb sie höchstwahrscheinlich Wundheilungsprozesse und Umbauvorgänge der Haut beeinflussen (Blotnick, Peoples et al. 1994), (Iida, Haisa et al. 1996).

Da CCL21/Exodus-2 ICAM-1/LFA-1 Moleküle zu aktivieren vermag und so die Adhäsion von Lymphozyten auf dem Endothel von Gefäßen fördert, könnte CCL21/Exodus-2 für die Infiltration von T-Zellen und die konsekutiven Krankheitsereignisse eine entscheidende Rolle spielen.

CCL14/HCC-1 zeigte eine dem CCL21/Exodus-2 vergleichbare, ebenso auf Endothelzellen limitierte Expression in der verwundeten Haut und der Psoriasis. Im Gegensatz zu CCL21/Exodus-2 konnten wir CCL14/HCC-1-mRNA auch in normaler, unbehandelter Haut beobachten, was für eine konstitutive Expression des Chemokins spricht. Diese Beobachtung, dass CCL14/HCC-1 konstitutiv in

normaler unbehandelter Haut gesunder Probanden exprimiert wird, steht im Einklang mit den Ergebnissen von Schulz-Knappe et al., die ebenfalls eine konstitutive Expression von CCL14/HCC-1 in verschiedenen Geweben wie Milz, Leber, Skelett- und Herzmuskel, Darm und Knochenmark beobachten konnten (Schulz-Knappe, Magert et al. 1996). Die konstitutive Expression von CCL14/HCC-1 könnte hinweisend dafür sein, dass es eine Rolle in der Gewebshomöostase spielt.

CCL14/HCC-1 zirkuliert als einziges Chemokin in nanomolaren Konzentrationen im Plasma (Schulz-Knappe, Magert et al. 1996). CCL14/HCC-1 ist ein kompetitiver Ligand des CC-Chemokin-Rezeptors 1 (CCR1) und konkurriert mit CCL3/MIP-1 $\alpha$  und CCL5/RANTES um die Bindung am Rezeptor (Schulz-Knappe, Magert et al. 1996).

CCL14/HCC-1 führt wie CCL3/MIP-1 $\alpha$  zu einer vermehrten Proliferation von CD34<sup>+</sup> Zellen (Schulz-Knappe, Magert et al. 1996). CD34 ist ein Oberflächenantigen auf Endothelzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen. Während der Wundheilungsvorgänge kommt es im Rahmen der Angiogenese zur Ausbildung neuer Blutgefäße im neu gebildeten Granulationsgewebe (Singer and Clark 1999). Die Endothelzellen proliferieren und bilden neue Kapillaren aus. Somit könnte CCL14/HCC-1 zusammen mit anderen Angiogenesefaktoren auch für die Proliferation der Endothelzellen für die Formation von Kapillaren mitverantwortlich sein.

CD34 gehört zu den vaskulären Adressinen, die im Lymphknoten auf postkapillären HEV (high endothelial venules) exprimiert werden. Durch Wechselwirkung zwischen L-Selektinen auf T-Zellen und den vaskulären Adressinen kommt es zu einem spezifischen *homing* von T-Lymphozyten, was in der Psoriasis, in der den infiltrierenden T-Zellen eine pathogenetische Rolle zugesprochen wird, entscheidend sein könnte.

Unsere Beobachtung, dass CCL14/HCC-1 ausschließlich in Endothelzellen dermalen Gefäße normaler Haut bzw. in Entzündungssituationen auftritt, ist neu und lässt vermuten, dass das Chemokin einerseits aufgrund seiner konstitutiven Expression entscheidend bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase ist und andererseits bei der Leukozytendiapedese eine Pfortnerfunktion einnimmt

und für die Zusammensetzung des Leukozyteninfiltrates im entzündeten Gewebe ausschlaggebend ist.

#### **4.1.2 CXCL12/SDF-1 in humaner kutaner Wundheilung und Psoriasis**

##### *CXCL12/SDF-1 in humanen kutanen Wundheilungsprozessen*

In normaler Haut gesunder Probanden wird CXCL12/SDF-1-mRNA konstitutiv in residenten Zellen wie Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert (Pablos, Amara et al. 1999). Die Expression des CXC-Chemokins in residenten Zellen der Haut deutet auf eine Rolle dieses Chemokins in der Homöostase normalen Gewebes hin. Wird diese Homöostase durch eine Verletzung gestört, zeigt CXCL12/SDF-1 ein biphasisches Expressionsmuster. Während der frühen Phase nach Verletzung wird das Chemokin in vergleichbarer Intensität und Verteilung wie in normaler Haut exprimiert. In diesem Zeitraum zeigte sich CXCL12/SDF-1 sowohl in den Wundrändern als auch im Wundzentrum gleichmäßig verteilt. Im späteren Verlauf der Wundheilung war die Expression von CXCL12/SDF-1 nahezu komplett im fibrösen Stroma, welches den initialen Wunddefekt ersetzte, supprimiert, obwohl Endothelzellen, Hauptproduzenten von CXCL12/SDF-1, reichlich im Neostroma vorhanden waren. Dieses Expressionsmuster des konstitutiven Chemokins, welches während der Entzündungsstadien und Gewebsneubildung in den Wundrändern hochreguliert und im Neostroma supprimiert wird, stellt ein charakteristisches, reproduzierbares Expressionsmuster des Chemokins in der Wundheilung dar (Toksoy, Muller et al. 2007). Übereinstimmend mit unseren Daten konnten Fedyk et al., die Wundheilungsvorgänge in der Maus untersuchten, ebenfalls CXCL12/SDF-1 in Bindegewebszellen und Gefäßen während der späten Phase der Leukozyten- und Makrophagenmigration ins Wundterrain nachweisen (Fedyk, Jones et al. 2001). Im Gegensatz dazu konnten Florin et al. keine Modulation der CXCL12/SDF-1-mRNA-Expression während der ersten fünf Tage nach Wundsetzung beobachten (Florin, Maas-Szabowski et al. 2005).



Andere Arbeitsgruppen, die kutane Wundheilung in diabetischen (db/db) Mäusen untersuchen, beobachteten eine Zunahme von CXCL12/SDF-1 in den Wundrändern, dabei wurde jedoch die Expression des Chemokins in dem sich bildenden Neostroma nicht untersucht (Asai, Takenaka et al. 2006). Vergleichbare Daten wurden von Avniel et al. publiziert, die CXCL12/SDF-1 in Verbrennungswunden der Haut untersuchten. Dabei fanden sie einen Anstieg von CXCL12/SDF-1-Protein in der frühen Phase der Wundheilung (Avniel, Arik et al. 2006).

Die CXCL12/SDF-1-Hochregulation im Wundheilungsgeschehen korreliert mit den Änderungen in den Proliferationscharakteristika der ansässigen Zellpopulationen wie Endothelzellen und Fibroblasten; in dieser Phase (ungefähr ab Tag 4) bildet sich das Neostroma (Granulationsgewebe) im Wundraum und verschließt diesen; das Granulationsgewebe ist dabei von zahlreichen neugebildeten Kapillaren (Neoangiogenese) durchsetzt (Singer and Clark 1999). Die Neoangiogenese ist entscheidend für die Gewebeneubildung. 4-7 Tage nach Wundsetzung verdoppelt sich die Anzahl der Gefäße in der verletzten Haut (Engelhardt, Toksoy et al. 1998). *In vitro* führt CXCL12/SDF-1 zu einer Proliferation und Migration von Endothelzellen, während *in vivo* die subkutane Injektion von CXCL12/SDF-1 in Mäusen die Ausbildung von Blutgefäßen induziert (Salcedo, Wasserman et al. 1999). Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass CXCL12/SDF-1 eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung proangiogenetischer Subpopulationen hämatopoetischer Zellen in periphere Gewebe einnimmt, indem es aus dem Knochenmark stammende, zirkulierende Zellen in periphere Gewebe positioniert und dafür sorgt, dass diese dort persistieren (Grunewald, Avraham et al. 2006). Im späteren Wundheilungsverlauf nimmt die Neoangiogenese ab und die Anzahl der vorhandenen Gefäße bleibt konstant. Dieser Vorgang korreliert mit der Suppression der CXCL12/SDF-1-Expression im fibrösen Stroma der Wunde.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass Endothelzellen und Fibroblasten Hauptproduzenten von CXCL12/SDF-1 während kutaner Wundheilungsprozesse sind. Auch isolierte HDMEC (Endothelzellen) und Fibroblasten produzieren konstitutiv signifikante Mengen dieses Chemokins. Nach Stimulation der

isolierten Zelllinien mit den proinflammatorischen Cytokinen  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  kam es zu einer Reduktion der CXCL12/SDF-1-mRNA- und Proteinexpression in diesen Zellen. Unsere Ergebnisse stehen somit zumindest teilweise im Einklang mit denen von Fedyk et al., bei denen eine Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  zu einer Suppression von CXCL12/SDF-1 in Fibroblasten führte, jedoch  $\text{IFN}\gamma$  keinen regulatorischen Effekt auf die CXCL12/SDF-1-Produktion in Fibroblasten hatte (Fedyk, Jones et al. 2001). Salvucci et al. beobachteten, entsprechend unserer Ergebnisse, eine Reduktion von CXCL12/SDF-1 und seines Rezeptors CXCR4 in Endothelzellen *in vitro* (HUVEC) und in einem *in vivo* Matrixgel Angiogenese Assay (Salvucci, Basik et al. 2004). Der Regulationsmechanismus der proinflammatorischen Cytokine  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  auf die CXCL12/SDF-1 Expression ist noch nicht klar, scheint aber unabhängig vom NF- $\kappa$ B Signalweg zu sein, da der CXCL12/SDF-1-Promotor keine Bindestelle für diesen Transkriptionsfaktor besitzt (Shirozu, Nakano et al. 1995).

Mit Hilfe von Microarrayanalysen wurde festgestellt, dass es in Endothelzellen, die dominant negatives IKK2 exprimieren, zu einer Blockade der  $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Genexpression kommt (Viemann, Goebeler et al. 2004).

Entsprechend den Endothelzellen proliferieren auch Fibroblasten im Wundheilungsverlauf. Fibroblasten, denen JUN, eine AP-1 Transkriptionsfaktor-Untereinheit, fehlt, exprimieren kein CXCL12/SDF-1. Dies ist hinweisend dafür, dass diese Signalkomponente Bedingung für die basale Expression des Chemokins ist (Florin, Maas-Szabowski et al. 2005).

Fibroblasten zeigen ein den Endothelzellen vergleichbares Proliferationsverhalten während der Wundheilung. Veränderungen der Proliferationsdynamik korrelieren mit den Veränderungen der CXCL12/SDF-1-Expression. Während der späten Zeitpunkte der Wundheilung kommt es zu einer Suppression von CXCL12/SDF-1, korrelierend hört die Fibroblastenproliferation auf, und die Matrixsynthese wird herunterreguliert (Clark et al., 1996), resultierend kommt es zur Transformation eines fibroblastenreichen Granulationsgewebe in eine relativ azelluläre Narbe. Weiterhin wird angenommen, dass die Freisetzung von CXCL12/SDF-1 durch dermale Zellen wie z.B. Fibroblasten die Keratinozytenproliferation über CXCR4 fördert und somit einen potentiellen Beitrag zur

Reepithelialisierung leistet. Experimente mit Cokulturen aus Fibroblasten und Keratinozyten weisen darauf hin, dass die Proliferation der Keratinozyten CXCL12/SDF-1-abhängig ist (Florin, Maas-Szabowski et al. 2005).

CXCR4, der Rezeptor von CXCL12/SDF-1, konnte im Wundgewebe in entsprechender Verteilung wie sein Ligand nachgewiesen werden. Auch *in vitro* konnte CXCR4 sowohl auf Endothelzellen als auch auf Fibroblasten nachgewiesen werden. Tachibana et al. beobachteten eine abnorme Entwicklung gastrointestinaler Vaskularisation in CXCR4 Knock-out Mäusen (Tachibana, Hirota et al. 1998), was für eine wichtige Funktion der CXCL12/SDF-1/CXCR4-Bindepartner bezüglich der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase spricht.

#### *CXCL12/SDF-1 in Psoriasis*

Sowohl in der Psoriasis als auch in der Wundheilung sind neben einwandernden Leukozytensubpopulationen Keratinozyten, Endothelzellen und Fibroblasten am Entzündungsgeschehen beteiligt. In der Psoriasis konnten wir eine starke, mit der Wundheilung vergleichbare, CXCL12/SDF-1- Expression in Endothelzellen und Stromazellen (Fibroblasten) nachweisen. Gu et al. fanden CXCL12/SDF-1 in der Synovialflüssigkeit von Patienten, die an einer Psoriasis arthropathica litten (Gu, Marker-Hermann et al. 2002).

In der Psoriasis kommt es zu einer Elongation und Hyperplasie von Blutgefäßen in der papillären Dermis. Endothelzellen, die die Gefäße auskleiden, sind in psoriatischen Läsionen aktiviert. Es kommt zur chemokinvermittelten Transmigration von Leukozyten durch die aktivierten Gefäße in das psoriatische Parenchym. Unsere Ergebnisse zeigen eine endothelzellosoziierte Expression von CXCL12/SDF-1, die für die Migration von Leukozyten ins psoriatische Gewebe mitverantwortlich sein könnte.

Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass dermale Fibroblasten über die Produktion von Chemokinen die Migration von T-Zellen induzieren (Clark, Chong et al. 2006). Da T-Zellen das histologische Bild der Psoriasis prägen, könnte die

CXCL12/SDF-1-Expression in dermalen Fibroblasten psoriatischer Läsionen die Migration von T-Zellen in läSIONALES Gewebe begünstigen.

Mikroarrayanalysen von Gu et al. ergaben eine starke Expression von CXCR4 (Gu, Marker-Hermann et al. 2002), dem einzigen Rezeptor von CXCL12/SDF-1, in psoriatischer Arthritis (Nagasawa, Tachibana et al. 1999).

In der Psoriasis nimmt das Zytokin  $TNF\alpha$  eine zentrale Rolle ein.  $TNF\alpha$  ist im psoriatischen Entzündungsgeschehen um ein Vielfaches erhöht.  $TNF\alpha$  aktiviert über Bindung an den TNF-Rezeptor und die Inangsetzung des  $NF\kappa B$ -Signalwegs die Produktion von weiteren Cytokinen/Chemokinen (Han, He et al. 2001). CXCL12/SDF-1 $\alpha$  induziert über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $NF\kappa B$  die  $TNF\alpha$ -Produktion.

#### **4.2 Die leukozytenchemotaktischen Chemokine in der Psoriasis und Wundheilung**

*CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10*

In verschiedenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte eine Korrelation zwischen Chemokinen und Leukozytensubpopulationen nachgewiesen werden. Wir konnten eine vermehrte Expression von CCL2/MCP-1, CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 in Biopsien von Psoriasispatienten und Wundheilungsvorgängen detektieren (Gillitzer, Wolff et al. 1993), (Gillitzer, Ritter et al. 1996), (Goebeler, Toksoy et al. 1998), (Engelhardt, Toksoy et al. 1998). Sowohl in der Psoriasis als auch in der Wundheilung konnte eine räumliche Korrelation zwischen neutrophilen Granulozyten einerseits und CXCL8/IL-8 und CXCL1/GRO $\alpha$  andererseits nachgewiesen werden. Das makrophagenchemotaktische Chemokin CCL2/MCP-1 war in der Psoriasis und in der Wundheilung mit Makrophagen assoziiert. CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 Signale korrelierten in der Wundheilung und der Psoriasis mit der Infiltration von Lymphozyten.

Im Folgenden untersuchten wir weitere leukozytenchemotaktische Chemokine in der Wundheilung und der Psoriasis. Weiterhin analysierten wir die in 4.2

genannten Chemokine in einem Tiermodell, in dem Mäuse ein mit der Psoriasis vergleichbares Hautbild entwickelten, und der Autoimmunerkrankung Alopecia areata.

#### **4.2.1 CCL18/PARC**

Interessanterweise konnte das CC-Chemokin CCL18/PARC nur in psoriatischen Läsionen und nicht im Wundheilungsgewebe detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Expression von CCL18/PARC u.a. mit dem Auftreten perivaskulärer Zellen und CD163<sup>+</sup> Makrophagen korreliert.

Microarraydaten von Nomura et al. ergaben allerdings keine CCL18/PARC-Expression bei der Psoriasis (Nomura, Gao et al. 2003), wofür die Gründe noch unklar sind. Möglicherweise wies der Microarray eine geringere Sensitivität auf als unsere *In-situ*-Hybridisierung.

In normaler Haut gesunder Probanden konnten wir keine CCL18/PARC Expression detektieren. Andere Arbeitsgruppen konnten CCL18/PARC u. a. in der Lunge und einigen lymphatischen Geweben (Lymphknoten, Thymus, Appendix) eine konstitutive Expression des Chemokins nachweisen (Hieshima, Imai et al. 1997).

*In vitro* Daten zeigten, dass CCL18/PARC chemotaktisch auf CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, naive CD45R<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Adema, Hartgers et al. 1997), Haut-Homing Gedächtnis T-Zellen (CD45R0, CLA<sup>+</sup>) (Gunther, Bello-Fernandez et al. 2005), B-Zellen (Lindhout, Vissers et al. 2001) und dendritische Zellen (DC) (Vulcano, Struyf et al. 2003) wirkt, Zellen also, die in der Pathogenese der Psoriasis mitwirken.

#### **4.2.2 CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 in IKK2-defizienten Mäusen**

Weitere Untersuchungen der Chemokinexpression in entzündlichen Hauterkrankungen erfolgten in einem Mausmodell, das eine der Psoriasis entsprechende Erkrankung ausbildete.

Übereinstimmend mit bisher publizierten Daten über exprimierte Chemokine in der Psoriasis konnte eine entsprechende Expression von CC- und CXC-Chemokinen postnatal (nach 4 bis 7 Tagen) in der Haut IKK2-defizienter Mäuse beobachtet werden. IKK2, eine keratinozytenspezifische katalytische Untereinheit der I $\kappa$ B-Kinase, ist für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B verantwortlich. NF- $\kappa$ B besitzt eine wachstumsregulierende Funktion auf epidermale Keratinozyten, die bei der Ausbildung des psoriatischen Krankheitsbildes eine zentrale Rolle einnehmen. So konnten die CC- und CXC-Chemokine Ccl2/MCP-1, Ccl6/C10 (MRP-1), LIX, MIP-2, Cxcl10/IP-10 und Cxcl9/MIG in der Haut IKK2-defizienter Tiere detektiert werden, die eine mit der Psoriasis vergleichbare Hauterkrankung mit erhöhter TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Expression aufwiesen. Zudem ist in der Dermis die Zahl der Makrophagen, Granulozyten und CD4<sup>+</sup> T-Zellen erhöht.

Das murine Cxcl5/LIX, das dem humanen CXCL5/ENA78 vergleichbar ist, konnte in der Dermis von IKK<sup>-/-</sup> Tieren nachgewiesen werden, wohingegen kein CXCL5/ENA78 in humaner psoriatischer Haut beobachtet werden konnte (Gillitzer, Ritter et al. 1996). CXCL5/ENA-78 ist für seine Neutrophilen-chemotaktische Aktivität bekannt und wird vielfach begleitend mit CXCL8/IL-8, einem humanen Homolog von MIP-2, als Reaktion auf eine IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$ -Stimulation synthetisiert. Sowohl Cxcl5/LIX als auch MIP-2 wurden in IKK2-defizienten Tieren beobachtet. MIP-2 wurde dabei hauptsächlich in den subcornealen Pusteln in der Epidermis der IKK2-defizienten Tiere gefunden, entsprechend der CXCL8/IL-8-Expression epidermaler neutrophiler Granulozyten (Munrosche Mikroabszesse) humaner psoriatischer Haut (Gillitzer, Ritter et al. 1996).

Ccl6/C10, für das kein humanes Homolog existiert, konnte ebenso in den IKK2-defizienten Tieren in dermalen Anordnung detektiert werden; es wirkt *in vitro* und *in vivo* chemotaktisch auf Makrophagen (Berger, Taub et al. 1996), (Asensio, Lassmann et al. 1999). Möglicherweise ist Ccl6/C10 mitverantwortlich für die Rekrutierung von Makrophagen ins inflammatorische Gewebe der IKK2-defizienten Mäuse. Zudem ist Ccl6/C10 dafür bekannt, in der Frühphase von Entzündungsreaktionen zu erscheinen und wird dabei für die Rekrutierung von

Leukozyten benötigt (Hogaboam, Gallinat et al. 1999), (Ma, Zhu et al. 2004), (Kaesler, Regenbogen et al. 2002); in anderen Modellen erscheint Ccl6/C10 dagegen erst spät und wird für die Auflösung der Entzündung verantwortlich gemacht (Wu, Prystowsky et al. 1999), (Steinhauser, Hogaboam et al. 2000).

Entsprechend seinem humanen Homolog CCL2/MCP-1 wurde das murine Ccl2/MCP-1 in der Haut der IKK2<sup>-/-</sup> Tiere exprimiert. Gillitzer et al. konnten das makrophagenchemotaktische CC-Chemokin CCL2/MCP-1 in basalen Keratinozyten psoriatischer Läsionen nachweisen, was für die Anordnung von Makrophagen unterhalb der Reteleiste verantwortlich gemacht wird (Gillitzer, Wolff et al. 1993).

Auch die beiden CXC-Chemokine Cxcl9/MIG und Cxcl10/IP-10 konnten wir in den IKK2-deletierten Tieren nachweisen; diese Daten stehen in Einklang mit den Ergebnissen bei der Psoriasis, wo CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 ebenso detektiert wurden; hier wurden die beiden CXC-Chemokine in den Papillenspitzen psoriatisch veränderter Haut detektiert und korrelierten mit der Akkumulation von CD68<sup>+</sup> Makrophagen und CD3<sup>+</sup> T-Zellen (Goebeler, Toksoy et al. 1998). CXCL9/MIG wirkt ausschließlich auf T-Zellen chemotaktisch und aktivierend, jedoch nicht auf Makrophagen und Neutrophile (Farber 1993).

Im weiteren Verlauf untersuchten wir das Chemokinprofil in der generalisierten Psoriasis (vom Zumbusch Typ) vor und nach spezifischer Blockade des proinflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  durch die klinische Behandlung eines Psoriasispatienten mit einem monoklonalen Antikörper gegen TNF $\alpha$ .

#### **4.2.3 Chemokinexpression in der Psoriasis pustulosa vor und nach Infliximabtherapie**

Wie u.a. aus den Untersuchungen von Pasparakis et al. ersichtlich, spielt TNF $\alpha$  eine zentrale Rolle in der Entwicklung eines psoriasisformen Phänotyps. In zahlreichen klinischen Studien konnte die Effektivität von anti-TNF $\alpha$  Behandlungsstrategien der Psoriasis überzeugend nachgewiesen werden. Nicht zuletzt sind solche auch bei der häufig schwer therapierbaren generalisierten Psoriasis pustulosa erfolgversprechend (Newland, Weinstein et al. 2002),

(Elewski 2002), (Benoit, Toksoy et al. 2004); diese Studien deuten darauf hin, dass TNF $\alpha$  entscheidend für die Entwicklung und das Bestehen der Krankheit ist. In Bezug auf die Psoriasis geht man davon aus, dass TNF $\alpha$  Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 auf dem Endothel und auf Keratinozyten hochreguliert und so die Extravasation und die anschließende Einwanderung von T-Lymphozyten in die Dermis und Epidermis ermöglicht (Lebwohl 2003), (Krueger 2002). Desweiteren induziert TNF $\alpha$  die Expression und Sekretion vieler Chemokine, die ihrerseits Leukozyten zum Entzündungsort leiten. Im Falle der Plaquepsoriasis wurde zwar von der Expression von Chemokinen wie CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8 und CXCL1/GRO $\alpha$  berichtet (Gillitzer, Berger et al. 1991), (Gillitzer, Wolff et al. 1993), (Gillitzer, Ritter et al. 1996), (Goebeler, Toksoy et al. 1998), jedoch existieren keine entsprechenden Daten für die pustulöse Psoriasis. In unserer klinischen Studie konnten wir eine simultane Expression von CXCL1/GRO $\alpha$  und CXCL8/IL-8 um pustulöse Psoriasisläsionen beobachten, welche vermutlich als chemotaktische Faktoren für Neutrophile wirken.

CCL2/MCP-1-mRNA wurde in der epidermalen Basalzellschicht in einem mit der Plaquepsoriasis vergleichbaren Expressionsmuster exprimiert. Bei der Plaquepsoriasis geht man davon aus, dass CCL2/MCP-1 chemotaktisch auf Makrophagen wirkt und diese nahe an die Reteleisten lockt (Gillitzer, Wolff et al. 1993).

Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen bei der Plaquepsoriasis konnten wir keine signifikante Expression von CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10-mRNA in der pustulösen Psoriasis vorfinden. Diese T-Lymphozyten-chemotaktischen Chemokine werden exprimiert, wenn IFN $\gamma$  reichlich vorhanden ist, beispielsweise in Situationen, in denen eine TH1-Immunantwort vorherrscht. Die Abwesenheit von CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 bei der pustulösen Psoriasis, welche tendenziell eher als akute und nicht als chronische entzündliche Erkrankung charakterisiert wird (Terui, Ozawa et al. 2000), könnte hinweisend für andere Mechanismen sein und dafür sprechen, dass IFN $\gamma$  vermutlich nur eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese der pustulösen Psoriasis spielt. Der durch Infliximab induzierte, rasch eintretende Therapieerfolg steht



wahrscheinlich in engem Zusammenhang mit der Herunterregulation der neutrophilenchemotaktischen Chemokine CXCL1/GRO $\alpha$  und CXCL8/IL-8 und dem makrophagenchemotaktischen Chemokin CCL2/MCP-1.

Zusammenfassend unterstützen unsere Ergebnisse klar das Konzept, dass TNF $\alpha$  eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der pustulösen Psoriasis einnimmt und an der Induktion bestimmter Chemokine mitwirkt.

#### **4.2.4 Leukozytenchemotaktische Chemokine in der Alopecia areata**

Eine weitere Erkrankung, die mit einer Entzündungsreaktion der Haut einhergeht, ist die Alopecia areata. Hier kommt es zur perifollikulären und intrafollikulären Entzündungsreaktion der anagenen Haarbulbi.

Lokal infiltrierende CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten sind die dominante Zellpopulation und werden für den reversiblen Umbau des Haarfollikels verantwortlich gemacht und bewirken einen sogenannten kreisrunden Haarverlust (Alopecia areata) (Gilhar, Shalaginov et al. 1999). In einer Studie untersuchten wir das Chemokinexpressionsmuster in Biopsien betroffener Patienten, wobei auch hier jene Chemokine im Mittelpunkt standen, welche vermutlich für die Rekrutierung mononukleärer Leukozyten verantwortlich sein könnten. Von den untersuchten Chemokinen konnten CXCL9/MIG-, CCL2/MCP1- und CXCL10/IP-10-mRNA detektiert werden, jedoch nicht CXCL1/GRO $\alpha$ -, CCL3/MIP-1 $\alpha$ - und CCL4/MIP-1 $\beta$ -mRNA (Benoit, Toksoy et al. 2003). Das Chemokinexpressionsmuster der Alopecia areata ist durch das lymphozyten-chemotaktische Chemokin CXCL9/MIG dominiert. Korrelierend mit seiner Expression konnte ein lymphozytendominiertes, hauptsächlich perifollikuläres Infiltrat detektiert werden; zudem konnte CCL2/MCP-1-mRNA in moderater Ausprägung vorgefunden werden.

Die mRNA-Expression aller anderen untersuchten Chemokine war gering (CXCL10/IP-10), bzw. vernachlässigbar (CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ ). Die unterschiedliche Expression einzelner Chemokine, mit beispielsweise ausgeprägten CXCL9/MIG- und CCL2/MCP-1-Signalen wurde außer in der Alopecia areata auch in vielen anderen entzündlichen

Hautveränderungen beschrieben (Ritter, Moll et al. 1996), (Goebeler, Toksoy et al. 1998), (Spandau, Toksoy et al. 1998), (Goebeler, Trautmann et al. 2001), so dass die Expression von CXCL9/MIG und CCL2/MCP-1 kein spezifisches Merkmal der Alopecia areata zu sein scheint.

Die Dominanz von CXCL9/MIG und des in einem schwächeren Ausmaß exprimierten CXCL10/IP-10 spricht für eine persistierende TH1-Immunantwort. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen, die die Expression von IFN $\gamma$ -induzierbaren Molekülen, wie des MX1-Genprodukts bei der Alopecia areata beschreiben (Tazi-Ahnini, di Giovine et al. 2000), (Gilhar, Landau et al. 2003). Unterschiede in der CXCL9/MIG-Expressionstärke und ebenso die unterschiedlichen Muster der anderen Chemokine korrespondieren möglicherweise mit verschiedenen Stadien der Entzündung, wie es vor einiger Zeit in einem Mausmodell der Alopecia areata postuliert wurde (Carroll, McElwee et al. 2002).

Interessanterweise wurde CCL3/MIP-1 $\alpha$ , welches in der diffus kutanen Leishmaniose stark exprimiert wird, in 10 von 11 Alopecia areata Fällen exprimiert. Bei der diffus kutanen Leishmaniose handelt es sich um einen lokal entzündlichen Zustand mit einer Defizienz von TH1-Effektorzellen (Ritter, Moll et al. 1996). Im Gegensatz dazu wurden Chemokinprofile mit einer starken CXCL9/MIG-Expression, die von einer moderaten CCL2/MCP-1-Expression begleitet werden, in anderen TH1-bezogenen Hauterkrankungen, wie beim Lichen planus (Spandau, Toksoy et al. 1998) und in der allergischen Kontaktdermatitis (Goebeler, Trautmann et al. 2001) beschrieben.

Möglicherweise kommt es bei der Alopecia areata zu einer Interaktion zwischen T-Helferzellen und dem putativem Autoantigen der Erkrankung in anagenen Haarfollikeln, was eine CCL2/MCP-1-Expression in den Keratinozyten induziert. Die CCL2/MCP-1-Expression könnte für die Rekrutierung von T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen in der unmittelbaren Nachbarschaft verantwortlich sein. Diese Monozyten/Makrophagen werden durch IFN $\gamma$ -produzierende T-Zellen zur CXCL9/MIG-Synthese stimuliert, und in einem geringeren Ausmaß auch zur Produktion von CXCL10/IP-10. CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10

ihrerseits erhalten die Lymphozytenrekrutierung aufrecht, die eine permanente Entzündungsreaktion vermitteln.

Zusammenfassend kann man vermuten, dass die erhöhte CXCL9/MIG- und CCL2/MCP-1-Expression auf eine wichtige Rolle dieser Chemokine während des Verlaufs der Alopecia areata verweist und die Verteilung der Effektorzellen reflektiert. Deshalb könnte eine Inhibition der Zielchemokine CXCL9/MIG und CCL2/MCP-1 möglicherweise eine angemessene Strategie für eine vorzugsweise lokale anti-inflammatorische Therapie der Alopecia areata sein.

Wie in unseren unterschiedlichen Studien demonstriert, korreliert das Auftreten bestimmter Immunzellen mit der Expression von Chemokinen/Zytokinen. Zudem konnten wir für einige Krankheitsbilder ein charakteristisches Chemokinexpressionsmuster beobachten. Unsere Beobachtungen implizieren mögliche neue Therapieansätze für die Behandlung entzündlicher Hauterkrankungen, die auf die Herunterregulation bestimmter Zytokine/Chemokine abzielt, wie sie im Falle der Anti-TNF $\alpha$ -Therapien (Infliximab, Etanercept) bei der Psoriasis bereits erfolgreich durchgeführt werden.

## 5.0 Zusammenfassung

Die Zusammensetzung des Entzündungsinfiltrates und die Verteilung der inflammatorischen Zellen sind wichtige Kriterien für eine pathohistologische Diagnose von entzündlichen Hauterkrankungen und begleiten die reparativen Prozesse der Wundheilung. Chemokine sind dabei wesentliche Mediatoren für die Extravasation und Migration von Entzündungszellen ins dermale und epidermale Gewebe.

Chemokine, die von Endothelzellen exprimiert bzw. sezerniert werden, spielen dabei eine zentrale Rolle, da sie eine „Pfortnerfunktion“ ausführen. Dies ist entscheidend bei der Rekrutierung und Akkumulation der für das Erkrankungsbild und bei reparativen Vorgängen der Wundheilung spezifischen Leukozytensubpopulation ins dermale bzw. epidermale Gewebe.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir Gewebe von 11 gesunden Probanden, denen artifizielle Wunden gesetzt wurden, 11 Patienten mit einer floriden Psoriasis vulgaris und 13 Patienten mit einer Alopecia areata auf das jeweilige Chemokinexpressionsprofil. Der Nachweis von Chemokinen in Wundheilungsläsionen, in der Psoriasis und Alopecia areata ergab folgende Resultate:

### *Wundheilung*

Von den in der Wundheilung untersuchten Chemokinen wurde die Genexpression folgender CC- und CXC-Chemokine nachgewiesen: CCL14/HCC-1, CCL21/Exodus-2 und CXCL12/SDF-1. Andere untersuchte Chemokine, wie CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL20/LARC und CXCL11/I-TAC, waren in der Wundheilung nicht nachweisbar. CCL14/HCC-1 und CXCL12/SDF-1 wurden im Gegensatz zu CCL21/Exodus-2 zusätzlich in normaler, unbehandelter Haut gesunder Probanden exprimiert. Die konstitutive Expression dieser Chemokine ist hinweisend auf ihre Funktion für die Erhaltung der Gewebshomöostase.

CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 wurden sowohl in den Wundheilungs- als auch in den psoriatischen Läsionen ausschließlich in Endothelzellen exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde CXCL12/SDF-1 zusätzlich von Fibroblasten und perivaskulären Zellen exprimiert. CXCL12/SDF-1 wurde im Vergleich zu CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 am stärksten exprimiert. In den Wundheilungsläsionen zeigte CXCL12/SDF-1 ein biphasisches Expressionsmuster: Zu den frühen Zeitpunkten (Tag 1-4) wurde es in gleicher Intensität wie in normaler, unbehandelter Haut exprimiert. Im späteren Wundheilungsverlauf (Tag 7-21) post incisionem stieg die Expression an, wobei das Chemokin ausschließlich in den Wundrändern exprimiert wurde. Im fibrösen Stroma, das den initialen Wunddefekt ersetzte, konnte keine CXCL12/SDF-1-mRNA detektiert werden, obwohl Gefäße in diesem Gebiet vorhanden waren.

*In vitro* Untersuchungen mit Fibroblasten und Endothelzellen, bei denen die CXCL12/SDF-1-Expression jeweils vor und nach Stimulation mit den proinflammatorischen Cytokinen TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  untersucht wurde, ergaben folgende Resultate: Vor der Stimulation der Endothelzellen und Fibroblasten mit TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  konnte eine konstitutive Expression von CXCL12/SDF-1-mRNA und -Protein in den beiden Zelltypen detektiert werden. Nach Stimulation wurde eine dosisabhängige Herunterregulation der CXCL12/SDF-1-mRNA- und CXCL12/SDF-1-Protein-Expression in diesen Zelltypen beobachtet.

Immunhistochemische Färbungen der Wundheilungsläsionen mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch CXCR4, den einzigen Rezeptor für CXCL12/SDF-1, erkennt, zeigte in Wundheilungsläsionen eine vergleichbare Verteilung des Rezeptors wie sein Ligand. Auch CXCR4 wurde wie sein Ligand durch Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert, zusätzlich wurde CXCR4 in Keratinozyten der Basalmembran vorgefunden. *In vitro* konnte CXCR4, entsprechend der *in vivo* Ergebnisse, ebenso in Fibroblasten und Endothelzellen nachgewiesen werden, wobei Fibroblasten vergleichsweise eine stärkere Expression des Rezeptors aufwiesen.

## *Psoriasis*

In Psoriasisläsionen wurden die gleichen Chemokine untersucht wie in unserer Wundheilungsstudie. Auch in der Psoriasis konnten die Chemokine CCL14/HCC-1, CCL21/Exodus-2 und CXCL12/SDF-1 detektiert werden. Im Gegensatz zu den Wundheilungsläsionen konnte in der Psoriasis zudem das CC-Chemokin CCL18/PARC nachgewiesen werden. Die restlichen untersuchten Chemokine waren in den Psoriasisläsionen nicht nachweisbar.

CCL14/HCC-1 und CCL21/Exodus-2 wurden ausschließlich von Endothelzellen exprimiert, CXCL12/SDF-1 zusätzlich noch von spindelförmigen Stromazellen, wahrscheinlich Fibroblasten, exprimiert. CCL18/PARC-mRNA wurde vorwiegend von mononukleären Entzündungszellen im Bereich der Papillen exprimiert. Es besteht eine Korrelation zwischen dem Auftreten CCL18/PARC-mRNA-exprimierender Zellen und CD163<sup>+</sup> Makrophagen in der Psoriasis.

Weitere Untersuchungen der Chemokinexpression unternahmen wir in einem Mausmodell, in dem IKK2 in Keratinozyten spezifisch deletiert war. In der Folge ist der NF $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg in Keratinozyten blockiert. Diese Tiere entwickelten einen psoriasiformen Hautphänotyp. Die Chemokinexpression in der Haut der IKK2-defizienten Mäuse erinnert denen von Psoriasispatienten. Die Beobachtungen, die in den IKK2-defizienten Mäusen gemacht wurden, lassen vermuten, dass diese Entzündungsreaktion durch TNF $\alpha$  vermittelt wird, jedoch eine von  $\alpha\beta$ T-Zellen unabhängige und keine antigenspezifische Immunantwort ist.

Im Rahmen eines individuellen Heilversuches wurde einem Patienten mit therapieresistenter Psoriasis pustulosa eine Therapie mit Infliximab, einem anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, durchgeführt. Durch die Blockade von TNF $\alpha$  kam es zur klinischen Remission des an Psoriasis pustulosa erkrankten Patienten. Hautbiopsien vor und nach Therapie mit Infliximab wurden auf ihr Chemokinexpressionsprofil untersucht und ergaben, dass das klinische Ansprechen des Psoriasispatienten auf Infliximab sich durch Herunterregulation der mRNA der Chemokine CXCL1/GRO $\alpha$ , CXCL8/IL-8 und CCL2/MCP-1 in der Haut des Patienten widerspiegelt. Vor Infliximab-Therapie wurden diese

Chemokine stark exprimiert. Die durch IFN $\gamma$  induzierten Chemokine CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 wurden weder vor noch nach Infliximab-Therapie detektiert.

### *Alopecia areata*

In den Biopsien der Alopecia areata wurden folgende Chemokine untersucht: CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL1/GRO $\alpha$ , CCL3/MIP-1 $\alpha$  und CCL4/MIP-1 $\beta$ . Dabei konnten CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 und CXCL10/IP-10 detektiert werden, wobei CXCL9/MIG am stärksten exprimiert war. CXCL9/MIG-mRNA war in den peri- und intrabulbären Infiltraten und in den follikulären Papillen verteilt und korrelierte dabei mit einem Infiltrat zusammengesetzt aus CD3 $^+$ , CD4 $^+$  und CD8 $^+$  Lymphozyten und einigen CD68 $^+$  Makrophagen. CCL2/MCP-1 war im Vergleich zu CXCL9/MIG schwächer und in anderer Verteilung exprimiert. CCL2/MCP-1-Transkripte korrelierten mit Keratinozyten der inneren Wurzelscheide

Unsere Studien demonstrieren, dass den o.g. Dermatosen zwar ähnliche molekulare Vorgänge und klinische Kardinalsymptome gemein sind, es gibt jedoch Unterschiede in der Expression der Chemokine, die anhand unserer Studien demonstriert werden konnten.

Diese Ergebnisse deuten auf mögliche gezielte therapeutische Ansatzpunkte durch die beispielsweise selektive Blockade des Liganden bzw. seines Chemokinrezeptors oder proinflammatorischer Chemokine, wie es schon im Falle von Infliximab bei einem an Psoriasis pustulosa erkrankten Patienten demonstriert wurde. Ebenso wäre eine Applikation eines Chemokinantagonisten denkbar, der mit dem Chemokin und die Rezeptorbindung konkurriert. Derartige medikamentöse Strategien könnten zur Suppression der inflammatorisch wirksamen Chemokine und somit zur Unterdrückung des Entzündungsinfiltrates und der damit einhergehenden Entzündungsreaktion führen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adema, G. J., F. Hartgers, et al. (1997). "A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells." *Nature* **387**(6634): 713-7.
- Asai, J., H. Takenaka, et al. (2006). "Dibutyl cAMP influences endothelial progenitor cell recruitment during wound neovascularization." *J Invest Dermatol* **126**(5): 1159-67.
- Asensio, V. C., S. Lassmann, et al. (1999). "C10 is a novel chemokine expressed in experimental inflammatory demyelinating disorders that promotes recruitment of macrophages to the central nervous system." *Am J Pathol* **154**(4): 1181-91.
- Avniel, S., Z. Arik, et al. (2006). "Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns." *J Invest Dermatol* **126**(2): 468-76.
- Banas, B., M. Wornle, et al. (2002). "Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis." *J Immunol* **168**(9): 4301-7.
- Bazan, J. F., K. B. Bacon, et al. (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." *Nature* **385**(6617): 640-4.
- Benoit, S., A. Toksoy, et al. (2004). "Treatment of recalcitrant pustular psoriasis with infliximab: effective reduction of chemokine expression." *Br J Dermatol* **150**(5): 1009-12.
- Benoit, S., A. Toksoy, et al. (2003). "Selective expression of chemokine monokine induced by interferon-gamma in alopecia areata." *J Invest Dermatol* **121**(4): 933-5.
- Berger, M. S., D. D. Taub, et al. (1996). "The chemokine C10: immunological and functional analysis of the sequence encoded by the novel second exon." *Cytokine* **8**(6): 439-47.
- Blotnick, S., G. E. Peoples, et al. (1994). "T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8): 2890-94.
- Campbell, J. J., J. Hedrick, et al. (1998). "Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions." *Science* **279**(5349): 381-4.
- Carroll, J. M., K. J. McElwee, et al. (2002). "Gene array profiling and immunomodulation studies define a cell-mediated immune response underlying the pathogenesis of alopecia areata in a mouse model and humans." *J Invest Dermatol* **119**(2): 392-402.
- Christopherson, K. W., 2nd, A. F. Hood, et al. (2003). "Endothelial induction of the T-cell chemokine CCL21 in T-cell autoimmune diseases." *Blood* **101**(3): 801-6.
- Clark, R. A., B. F. Chong, et al. (2006). "A novel method for the isolation of skin resident T cells from normal and diseased human skin." *J Invest Dermatol* **126**(5): 1059-70.
- D'Ambrosio, D., P. Panina-Bordignon, et al. (2003). "Chemokine receptors in inflammation: an overview." *J Immunol Methods* **273**(1-2): 3-13.
- Elewski, B. E. (2002). "Infliximab for the treatment of severe pustular psoriasis." *J Am Acad Dermatol* **47**(5): 796-7.
- Engelhardt, E., A. Toksoy, et al. (1998). "Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific



- infiltration of leukocyte subsets in human wound healing." Am J Pathol **153**(6): 1849-60.
- Farber, J. M. (1993). "HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines." Biochem Biophys Res Commun **192**(1): 223-30.
- Fedyk, E. R., D. Jones, et al. (2001). "Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing." J Immunol **166**(9): 5749-54.
- Florin, L., N. Maas-Szabowski, et al. (2005). "Increased keratinocyte proliferation by JUN-dependent expression of PTN and SDF-1 in fibroblasts." J Cell Sci **118**(Pt 9): 1981-9.
- Furutani, Y., H. Nomura, et al. (1989). "Cloning and sequencing of the cDNA for human monocyte chemotactic and activating factor (MCAF)." Biochem Biophys Res Commun **159**(1): 249-55.
- Gilhar, A., M. Landau, et al. (2003). "Transfer of alopecia areata in the human scalp graft/Prkdc(scid) (SCID) mouse system is characterized by a TH1 response." Clin Immunol **106**(3): 181-7.
- Gilhar, A., R. Shalaginov, et al. (1999). "Alopecia areata is a T-lymphocyte mediated autoimmune disease: lesional human T-lymphocytes transfer alopecia areata to human skin grafts on SCID mice." J Invest Dermatol Symp Proc **4**(3): 207-10.
- Gillitzer, R., R. Berger, et al. (1991). "Upper keratinocytes of psoriatic skin lesions express high levels of NAP-1/IL-8 mRNA in situ." J Invest Dermatol **97**(1): 73-9.
- Gillitzer, R., U. Ritter, et al. (1996). "Differential expression of GRO-alpha and IL-8 mRNA in psoriasis: a model for neutrophil migration and accumulation in vivo." J Invest Dermatol **107**(5): 778-82.
- Gillitzer, R., K. Wolff, et al. (1993). "MCP-1 mRNA expression in basal keratinocytes of psoriatic lesions." J Invest Dermatol **101**(2): 127-31.
- Goebeler, M., A. Toksoy, et al. (1998). "The C-X-C chemokine Mig is highly expressed in the papillae of psoriatic lesions." J Pathol **184**(1): 89-95.
- Goebeler, M., A. Trautmann, et al. (2001). "Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity." Am J Pathol **158**(2): 431-40.
- Goebeler, M., T. Yoshimura, et al. (1997). "The chemokine repertoire of human dermal microvascular endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines." J Invest Dermatol **108**(4): 445-51.
- Grunewald, M., I. Avraham, et al. (2006). "VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells." Cell **124**(1): 175-89.
- Gu, J., E. Marker-Hermann, et al. (2002). "A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthritis patients." Rheumatology (Oxford) **41**(7): 759-66.
- Gunn, M. D., K. Tangemann, et al. (1998). "A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(1): 258-63.
- Gunther, C., C. Bello-Fernandez, et al. (2005). "CCL18 is expressed in atopic dermatitis and mediates skin homing of human memory T cells." J Immunol **174**(3): 1723-8.

- Han, Y., T. He, et al. (2001). "TNF-alpha mediates SDF-1 alpha-induced NF-kappa B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes." J Clin Invest **108**(3): 425-35.
- Hieshima, K., T. Imai, et al. (1997). "A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes." J Immunol **159**(3): 1140-9.
- Hogaboam, C. M., C. S. Gallinat, et al. (1999). "Immunomodulatory role of C10 chemokine in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis." J Immunol **162**(10): 6071-9.
- Hromas, R., C. H. Kim, et al. (1997). "Isolation and characterization of Exodus-2, a novel C-C chemokine with a unique 37-amino acid carboxyl-terminal extension." J Immunol **159**(6): 2554-8.
- Iida, N., M. Haisa, et al. (1996). "Leukocyte-derived growth factor links the PDGF and CXC chemokine families of peptides." Faseb J **10**(11): 1336-45.
- Kaesler, S., P. Bugnon, et al. (2004). "The chemokine receptor CCR1 is strongly up-regulated after skin injury but dispensable for wound healing." Wound Repair Regen **12**(2): 193-204.
- Kaesler, S., J. Regenbogen, et al. (2002). "The healing skin wound: a novel site of action of the chemokine C10." Cytokine **17**(3): 157-63.
- Kelner, G. S. and A. Zlotnik (1995). "Cytokine production profile of early thymocytes and the characterization of a new class of chemokine." J Leukoc Biol **57**(5): 778-81.
- Kennedy, J., G. S. Kelner, et al. (1995). "Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin." J Immunol **155**(1): 203-9.
- Krueger, J. G. (2002). "The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents." J Am Acad Dermatol **46**(1): 1-23; quiz 23-6.
- Lebwohl, M. (2003). "Psoriasis." Lancet **361**(9364): 1197-204.
- Liao, F., R. L. Rabin, et al. (1995). "Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization." J Exp Med **182**(5): 1301-14.
- Lindhout, E., J. L. Vissers, et al. (2001). "The dendritic cell-specific CC-chemokine DC-CK1 is expressed by germinal center dendritic cells and attracts CD38-negative mantle zone B lymphocytes." J Immunol **166**(5): 3284-9.
- Ma, B., Z. Zhu, et al. (2004). "The C10/CCL6 chemokine and CCR1 play critical roles in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling." J Immunol **172**(3): 1872-81.
- McDonagh, A. J. and A. G. Messenger (2001). "Alopecia areata." Clin Dermatol **19**(2): 141-7.
- McElwee, K. J. and R. Hoffmann (2002). "Alopecia areata - animal models." Clin Exp Dermatol **27**(5): 410-7.
- Nagasawa, T., K. Tachibana, et al. (1999). "A CXC chemokine SDF-1/PBSF: a ligand for a HIV coreceptor, CXCR4." Adv Immunol **71**: 211-28.
- Newland, M. R., A. Weinstein, et al. (2002). "Rapid response to infliximab in severe pustular psoriasis, von Zumbusch type." Int J Dermatol **41**(7): 449-52.
- Nomura, I., B. Gao, et al. (2003). "Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis." J Allergy Clin Immunol **112**(6): 1195-202.

- Pablos, J. L., A. Amara, et al. (1999). "Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin." Am J Pathol **155**(5): 1577-86.
- Pan, Y., C. Lloyd, et al. (1997). "Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation." Nature **387**(6633): 611-7.
- Pasparakis, M., G. Courtois, et al. (2002). "TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2." Nature **417**(6891): 861-6.
- Piali, L., C. Weber, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig." Eur J Immunol **28**(3): 961-72.
- Ritter, U., H. Moll, et al. (1996). "Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis." J Infect Dis **173**(3): 699-709.
- Salcedo, R., K. Wasserman, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha." Am J Pathol **154**(4): 1125-35.
- Salvucci, O., M. Basik, et al. (2004). "Evidence for the involvement of SDF-1 and CXCR4 in the disruption of endothelial cell-branching morphogenesis and angiogenesis by TNF-alpha and IFN-gamma." J Leukoc Biol **76**(1): 217-26.
- Schroder, J. M. and E. Christophers (1986). "Identification of C5ades arg and an anionic neutrophil-activating peptide (ANAP) in psoriatic scales." J Invest Dermatol **87**(1): 53-8.
- Schroder, J. M., U. Mrowietz, et al. (1987). "Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity." J Immunol **139**(10): 3474-83.
- Schulz-Knappe, P., H. J. Magert, et al. (1996). "HCC-1, a novel chemokine from human plasma." J Exp Med **183**(1): 295-9.
- Shirozu, M., T. Nakano, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." Genomics **28**(3): 495-500.
- Singer, A. J. and R. A. Clark (1999). "Cutaneous wound healing." N Engl J Med **341**(10): 738-46.
- Spandau, U., A. Toksoy, et al. (1998). "MIG is a dominant lymphocyte-attractant chemokine in lichen planus lesions." J Invest Dermatol **111**(6): 1003-9.
- Steinhauser, M. L., C. M. Hogaboam, et al. (2000). "Chemokine C10 promotes disease resolution and survival in an experimental model of bacterial sepsis." Infect Immun **68**(11): 6108-14.
- Tachibana, K., S. Hirota, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature **393**(6685): 591-4.
- Tazi-Ahnini, R., F. S. di Giovine, et al. (2000). "Structure and polymorphism of the human gene for the interferon-induced p78 protein (MX1): evidence of association with alopecia areata in the Down syndrome region." Hum Genet **106**(6): 639-45.
- Terui, T., M. Ozawa, et al. (2000). "Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop." Exp Dermatol **9**(1): 1-10.
- Toksoy, A., V. Muller, et al. (2007). "Biphasic expression of stromal cell-derived factor-1 during human wound healing." Br J Dermatol **157**(6): 1148-54.

- Viemann, D., M. Goebeler, et al. (2004). "Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells." *Blood* **103**(9): 3365-73.
- Vulcano, M., S. Struyf, et al. (2003). "Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells." *J Immunol* **170**(7): 3843-9.
- Weninger, W., H. S. Carlsen, et al. (2003). "Naive T cell recruitment to nonlymphoid tissues: a role for endothelium-expressed CC chemokine ligand 21 in autoimmune disease and lymphoid neogenesis." *J Immunol* **170**(9): 4638-48.
- Wu, Y., M. B. Prystowsky, et al. (1999). "Sustained high-level production of murine chemokine C10 during chronic inflammation." *Cytokine* **11**(7): 523-30.
- Yoshimura, T., N. Yuhki, et al. (1989). "Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE." *FEBS Lett* **244**(2): 487-93.
- Zlotnik, A., J. Morales, et al. (1999). "Recent advances in chemokines and chemokine receptors." *Crit Rev Immunol* **19**(1): 1-47.



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Gillitzer und Herrn Prof. Dr. med. Matthias Goebeler danke ich sehr herzlich für die interessante Aufgabenstellung, für die Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten und die ständige Diskussionsbereitschaft bei der Erstellung der Arbeit. Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Dr. rer. nat., Dr. sc. nat. Edgar Serfling für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Eva-Bettina Bröcker für den lehrreichen Forschungsaufenthalt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg.

Herrn Dr. Marc Schmidt danke ich herzlich für die Korrektur dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Freunden Pat, Karsten, Babs und Michael für ihre grenzenlose Solidarität und Unterstützung.

## Veröffentlichungen

---

1. Toksoy, A., V. Muller, et al. (2007). "Biphasic expression of stromal cell-derived factor-1 during human wound healing." *Br J Dermatol* 157(6): 1148-54.
2. Benoit S, Toksoy A, Ahlmann M, Schmidt M, Sunderkotter C, Foell D, Pasparakis M, Roth J, Goebeler M: Elevated serum levels of calcium-binding S100 proteins A8 and A9 reflect disease activity and abnormal differentiation of keratinocytes in psoriasis. *Br J Dermatol* 2006; 155(1):62-6
3. Buttman M, Goebeler M, Toksoy A, Schmid S, Graf W, Berberich-Siebelt F, Rieckmann P: Subcutaneous interferon-beta injections in patients with multiple sclerosis initiate inflammatory skin reactions by local chemokine induction. *J Neuroimmunol* 2005; 168(1-2):175-82
4. Benoit S, Toksoy A, Brocker EB, Gillitzer R, Goebeler M: Treatment of recalcitrant pustular psoriasis with infliximab: effective reduction of chemokine expression. *Br J Dermatol* 2004; 150(5):1009-12
5. Benoit S, Toksoy A, Goebeler M, Gillitzer R: Selective expression of chemokine monokine induced by interferon-gamma in alopecia areata. *J Invest Dermatol* 2003; 121(4):933-5
6. Spandau UH, Toksoy A, Verhaart S, Gillitzer R, Kruse FE: High expression of chemokines Gro-alpha (CXCL-1), IL-8 (CXCL-8), and MCP-1 (CCL-2) in inflamed human corneas in vivo. *Arch Ophthalmol* 2003; 121(6):825-31
7. Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, Schmidt-Supprian M, Nenci A, Toksoy A, Krampert M, Goebeler M, Gillitzer R, Israel A, Krieg T, Rajewsky K, Haase I: TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 2002; 417(6891):861-6
8. Schmidt M, Gillitzer R, Toksoy A, Brocker EB, Rapp UR, Paus R, Roth J, Ludwig S, Goebeler M: Selective expression of calcium-binding proteins S100a8 and S100a9 at distinct sites of hair follicles. *J Invest Dermatol* 2001; 117(3):748-50
9. Goebeler M, Trautmann A, Voss A, Brocker EV, Toksoy A, Gillitzer R: Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am J Pathol* 2001; 158(2):431-40
10. Eck M, Schmausser B, Scheller K, Toksoy A, Kraus M, Menzel T, Muller-Hermelink HK, Gillitzer R: CXC chemokines Gro(alpha)/IL-8 and IP-10/MIG in *Helicobacter pylori* gastritis. *Clin Exp Immunol* 2000; 122(2):192-9
11. Gillitzer R, Toksoy A, Voss A: [Role of chemokines in human skin wound healing]. *Zentralbl Chir* 2000; 125 Suppl 1:56-9

12. König A, Krenn V, Toksoy A, Gerhard N, Gillitzer R: Mig, GRO alpha and RANTES messenger RNA expression in lining layer, infiltrates and different leucocyte populations of synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Virchows Arch* 2000; 436(5):449-58
13. Trautmann A, Toksoy A, Engelhardt E, Brocker EB, Gillitzer R: Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *J Pathol* 2000; 190(1):100-6
14. Kunz M, Toksoy A, Goebeler M, Engelhardt E, Brocker E, Gillitzer R: Strong expression of the lymphoattractant C-X-C chemokine Mig is associated with heavy infiltration of T cells in human malignant melanoma. *J Pathol* 1999; 189(4):552-8
15. Kunz M, Hartmann A, Flory E, Toksoy A, Koczan D, Thiesen HJ, Mukaida N, Neumann M, Rapp UR, Brocker EB, Gillitzer R: Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness. *Am J Pathol* 1999; 155(3):753-63
16. Hartmann A, Kunz M, Kostlin S, Gillitzer R, Toksoy A, Brocker EB, Klein CE: Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res* 1999; 59(7):1578-83
17. Spandau U, Toksoy A, Goebeler M, Brocker EB, Gillitzer R: MIG is a dominant lymphocyte-attractant chemokine in lichen planus lesions. *J Invest Dermatol* 1998; 111(6):1003-9
18. Engelhardt E, Toksoy A, Goebeler M, Debus S, Brocker EB, Gillitzer R: Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol* 1998; 153(6):1849-60
19. Kolb AF, Lechermaier M, Heister A, Toksoy A, Siddell SG: Isolation and recombinant expression of an MHV-JHM neutralising monoclonal antibody. *Adv Exp Med Biol* 1998; 440:657-64
20. Goebeler M, Toksoy A, Spandau U, Engelhardt E, Brocker EB, Gillitzer R: The C-X-C chemokine Mig is highly expressed in the papillae of psoriatic lesions. *J Pathol* 1998; 184(1):89-95
21. Goebeler M, Schnarr B, Toksoy A, Kunz M, Brocker EB, Duschl A, Gillitzer R: Interleukin-13 selectively induces monocyte chemoattractant protein-1 synthesis and secretion by human endothelial cells. Involvement of IL-4R alpha and Stat6 phosphorylation. *Immunology* 1997; 91(3):450-7



22. Goebeler M, Yoshimura T, Toksoy A, Ritter U, Brocker EB, Gillitzer R: The chemokine repertoire of human dermal microvascular endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. *J Invest Dermatol* 1997; 108(4):445-51

Würzburg, den 13.07.2008