

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunologische Veränderungen im Blut und in der Haut bei Patienten mit
mittelschwerer bis schwerer Psoriasis unter systemischer (subkutaner) Therapie mit
einem Selektin-Antagonisten (TBC 1269Z)

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
Universitätsmedizin Berlin

von

Nina Ludwig
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Sterry
2. Prof. Dr. med. F. Buttgereit
3. Prof. Dr. med. W.-H. Boehncke

Datum der Promotion: 27.04.2009

meiner Mutter
zum 60. Geburtstag

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Psoriasis.....	1
1.2	Pathogenese	2
1.3	Therapien der Psoriasis	5
1.4	Selektine	8
1.4.1	Pan-Selektin-Antagonist	11
1.4.2	Bimosioamose disodium (TBC 1269Z)	12
1.5	Aufgabenstellung.....	13
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Studiendesign	16
2.1.1	Patienten.....	17
2.2	Proben.....	17
2.2.1	Blut.....	17
2.2.2	Biopsien	18
2.3	Statistik.....	18
2.4	Graphische Darstellung.....	18
2.5	Antikörper und Chemikalien	19
2.5.1	Antikörper zum Einsatz in der Durchflusszytometrie.....	19
2.5.2	Antikörper zum Einsatz in der Immunhistologie	20
2.5.3	Chemikalien	20
2.6	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	22
2.6.1	Geräte	22
2.6.2	Verbrauchsmaterialien	22
2.7	Lösungen	23
2.8	Software	25
2.9	Durchflusszytometrie peripherer mononucleärer Zellen (PBMC)	25
2.9.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung der Lymphozyten- subpopulationen	27
2.10	Immunhistologie	28
2.10.1	Immunhistologische Auswertung von Hautbiopsien vor und nach Therapie	29
2.11	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	30
2.11.1	RNA-Gewinnung aus den Hautbiopsien	31
2.11.2	RNA-Qualitäts- und Quantitätsbestimmung	32
2.11.3	Synthese der cDNA	32
2.11.4	Quantitativer Nachweis der Expression von Zytokin mRNA (mittels Real-Time-PCR oder auch TaqMan-PCR).....	34
3	Ergebnisse	40
3.1	Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	40
3.1.1	CD45RO-Expression auf T-Zell-Subpopulationen im Verlauf der Therapie mit TBC 1269Z	40
3.1.2	CD45RA-Expression auf T-Zell Subpopulationen im Verlauf der Therapie mit TBC 1269Z.....	44
3.1.3	HLA-DR-Expression auf T-Zell-Subpopulationen im Verlauf der Therapie mit TBC 1269Z	47
3.1.4	CD62-L-Expression auf T-Zell Subpopulationen im Verlauf der Therapie mit TBC 1269Z	50
3.2	Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen.....	53

3.2.1	Gesamtdarstellung der immunhistologischen Untersuchungen vor während und nach der Therapie mit TBC1269Z	54
3.2.1.1	Immunhistologische Untersuchung der CD3-positiven Zellen im Gewebeschnitt.....	56
3.2.1.2	Immunhistologische Untersuchung der CD4-positiven Zellen im Gewebeschnitt.....	57
3.2.1.3	Immunhistologische Untersuchung der CD8-positiven Zellen im Gewebeschnitt.....	59
3.2.1.4	Immunhistologische Untersuchung der CD20-positiven Zellen im Gewebeschnitt.....	61
3.2.1.5	Immunhistologische Untersuchung der HLA-DR-positiven Zellen im Gewebeschnitt.....	61
3.2.1.6	Immunhistologische Untersuchung der CD45RO-positiven Zellen im Gewebeschnitt.....	63
3.2.1.7	Immunhistologische Untersuchung der CD62-E-, CD62-L- und der CD62-P-positiven Zellen im Gewebeschnitt	64
3.3	Ergebnisse der Real-Time-(<i>TaqMan</i>)-PCR	68
3.3.1	Ergebnisse der CD3-mRNA-Expression	69
3.3.2	Ergebnisse der IFN- γ -mRNA-Expression	70
3.3.3	Ergebnisse der IL-1- β -mRNA-Expression	71
3.3.4	Ergebnisse der TNF- α -mRNA-Expression	72
3.3.5	Ergebnisse der IL-10-mRNA-Expression	73
3.3.6	Ergebnisse der IL-12p35-mRNA-Expression	74
3.3.7	Ergebnisse der IL-12p40-mRNA-Expression	75
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	76
3.4.1	Durchflusszytometrie	76
3.4.2	Immunhistologie.....	78
3.4.3	Real-Time-PCR.....	79
4	Diskussion	80
	Wirkung von TBC 1269Z auf die Lymphozytensubpopulationen im Blut	82
	<i>CD45RO-positiv markierte Lymphozyten</i>	82
	<i>CD45RA-positiv markierte Lymphozyten</i>	83
	<i>HLA-DR-positiv markierte Lymphozyten</i>	83
	<i>CD62-L positiv markierte Lymphozyten</i>	83
	Wirkung von TBC 1269Z auf die Zellverteilung in der Haut	84
	<i>CD3-positiv markierte Zellen in der Haut</i>	84
	<i>CD4-positiv markierte Zellen in der Haut</i>	85
	<i>CD8-positiv markierte Zellen in der Haut</i>	87
	<i>CD20-positiv markierte Zellen in der Haut</i>	88
	<i>CD45RO-positiv markierte Zellen in der Haut</i>	88
	<i>CD62-E-positiv markierte Zellen in der Haut</i>	89
	<i>CD62-L-positiv markierte Zellen in der Haut</i>	90
	<i>CD62-P-positiv markierte Zellen in der Haut</i>	90
	<i>Selektive Zusammenfassend</i>	91
	<i>HLA-DR-positiv markierte Zellen in der Haut</i>	92
	<i>Vergleich der immunhistologischen Daten</i>	93
	Wirkung von Bimosiamose disodium auf die Expression ausgesuchter Zytokine in der Haut.....	94
	<i>CD3-mRNA-Expression</i>	94
	<i>IFN-γ-mRNA-Expression in der Haut</i>	94

	<i>TNF-α-mRNA-Expression in der Haut</i>	95
	<i>IL-1-β-mRNA-Expression in der Haut</i>	96
	<i>IL-12p35- und IL-12p40-mRNA-Expression in der Haut</i>	96
	<i>IL-10-mRNA-Expression in der Haut</i>	97
	Abschlussbetrachtung	97
	<i>Andere Selektin-Antagonisten in der klinischen Entwicklung (zur Therapie der Psoriasis)</i>	100
5	Zusammenfassung.....	102
6	Literaturverzeichnis	104
7	Selbstständigkeitserklärung	115
8	Danksagung	116

Abbildungsverzeichnis

1. Abbildung: Veränderungen von normaler Haut zu psoriasiformer Haut (modifiziert nach Schoen 2005c).....	5
2. Abbildung: Selektive sind maßgeblich an der Einwanderung von Leukozyten beteiligt. (Modifiziert nach Löffler-Petrides Biochemie und Pathobiochemie.)	10
3. Abbildung: Strukturformel von TBC 1269.....	12
5. Abbildung: Schema TaqMan PCR (modifiziert aus der Anleitung von Applied Biosystems zur Real-Time-PCR).....	35
6. Abbildung: Mit CD3-primär-Antikörpern gefärbte Gefrierschnitte eines Patienten vor (links) und nach (rechts) Therapie mit TBC 1269Z. (1: 10)	57
7. Abbildung: Mit CD8-primär-Antikörpern gefärbte Gefrierschnitte eines Patienten vor (links) und nach (rechts) Therapie mit TBC 1269Z (1: 10).	60
8. Abbildung: Mit CD62-P-primär-Antikörpern gefärbte Gefrierschnitte eines Patienten vor (links) und nach (rechts) Therapie mit TBC 1269Z (1:10) .	68
9. Abbildung: Darstellung der PASI-Entwicklung der einzelnen Patienten an Tag 14. Der Ausgangswert wurde 100 % gesetzt.	81
10. Abbildung: Darstellung der Plaqueentwicklung (Dicke der Epidermis und die Länge der Reteleisten in der Zielleision) der einzelnen Patienten unter der Therapie mit TBC 1269Z. (Der Ausgangswert wurde 100 % gesetzt.).....	81
11. Abbildung: Stark positiv gefärbte Zellen, die zur Auswertung herangezogen wurden (grüne Pfeile) und gering gefärbte Zelle (gelber Pfeil; Vergrößerung 1: 40).	86
12. Abbildung: Vergleich der PASI-Reduktion zwischen Bimosiamose disodium und Efalizumab nach 14-tägiger Therapie.....	99

Diagrammverzeichnis

1. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD45RO auf peripheren CD3-positiven Lymphozyten.....	41
2. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD45RO auf peripheren CD4-positiven Lymphozyten.....	41
3. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD45RO auf peripheren CD8-positiven Lymphozyten.....	43
4. Diagramm: Darstellung der CD45RO-markierten CD3-positiven, CD4-positiven und CD8-positiven Lymphozyten.....	43
5. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie, von CD45RACD3-positiven Lymphozyten.	45
6. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD45RA auf peripheren CD4-positiven Lymphozyten.....	45
7. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD45RA auf peripheren CD8-positiven Lymphozyten.....	46
8. Diagramm: Darstellung der CD45RA CD3-positiven, CD45RA CD4-positiven und CD45RAC D8-positiven Lymphozyten	46
9. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von HLA-DR auf peripheren CD3-positiven Lymphozyten.....	48
10. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von HLA-DR auf peripheren CD4-positiven Lymphozyten.....	48
11. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von HLA-DR auf peripheren CD8-positiven Lymphozyten.....	49
12. Diagramm: Darstellung der HLA-DR-markierten CD3-positiven, CD4-positiven und CD8-positiven Lymphozyten.....	49
13. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD62-L auf peripheren CD3-positiven Lymphozyten.....	51
14. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD62-L auf peripheren CD4-positiven Lymphozyten.....	51
15. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD62-L auf peripheren CD8-positiven Lymphozyten.....	52
16. Diagramm: Darstellung der CD62-L-markierten CD3-positiven, CD4-positiven und CD8-positiven Lymphozyten.....	52
17. Diagramm: Werte der CD3-positiv gefärbten Zellen zusammengefasst: Epidermis und Dermis.....	56
18. Diagramm: Kutane CD3-Expression in Dermis und Epidermis. Einzelwerte.....	56
19. Diagramm: Anteil der kutanen CD4-positiven Zellen in der Epidermis und der Dermis.....	58

20. Diagramm: Einzelwerte der CD4-positiven Zellen in der Dermis und der Epidermis.	58
21. Diagramm: Der Anteil der kutanen CD8-positiven Zellen in der Dermis und der Epidermis	59
22. Diagramm: Einzelwerte der CD8-positiven Zellen in der Dermis und der Epidermis	60
23. Diagramm: Einzelwerte der CD20-positiven Zellen in der Dermis.....	61
24. Diagramm: Darstellung der HLA-DR-positiv gefärbten Zellen	62
25. Diagramm: Einzelwerte HLA-DR-positiv gefärbten Zellen in der Dermis und der Epidermis.	62
26. Diagramm: Darstellung der Durchschnittswerte, der CD45RO-positiv gefärbten Zellen in der Dermis	63
27. Diagramm: Darstellung der Einzelwerte, der CD45RO-positiv gefärbten Zellen in der Dermis.....	64
28. Diagramm: Darstellung der Durchschnittswerte, der CD62-E-positiv gefärbten Zellen in der Dermis.	65
29. Diagramm: Darstellung der Einzelwerte, der CD62-E-positiv gefärbten Zellen in der Dermis.....	65
30. Diagramm: Darstellung der Durchschnittswerte, der CD62-L-positiv gefärbten Zellen in der Dermis.	66
31. Diagramm: Darstellung der Einzelwerte, der CD62-L-positiv gefärbten Zellen in der Dermis.....	66
32. Diagramm: Darstellung der Durchschnittswerte, der CD62-P-positiv gefärbten Zellen in der Dermis	67
33. Diagramm: Darstellung der Einzelwerte, der CD62-P-positiv gefärbten Zellen in der Dermis.....	67
34. Diagramm: Gesamtdarstellung der Veränderungen aller PCR-Produkte in % ..	69
35. Diagramm: Darstellung der CD3-mRNA-Expression.....	70
36. Diagramm: Darstellung der IFN- γ -mRNA-Expression.	71
37. Diagramm: Darstellung der IL-1- β -mRNA-Expression.....	72
38. Diagramm: Darstellung der TNF- α -mRNA -Expression.....	73
39. Diagramm: Darstellung der IL-10-mRNA-Expression.....	74
40. Diagramm: Darstellung der IL-12p35-mRNA-Expression.....	75
41. Diagramm: Darstellung der IL-12p40-mRNA-Expression.....	76
42. Diagramm: Zusammenfassung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	77

Tabellenverzeichnis

1. Tabelle: Antikörper für die Durchflusszytometrie	19
2. Tabelle: Antikörper für die Immunhistologie	20
3. Tabelle: Chemikalien	20
4. Tabelle: Oberflächenantigene m.d. Zuordnung zu Lymphozytensubpopulationen	26
5. Tabelle: Antikörpermarkierungen für die Durchflusszytometrie	27
6. Tabelle: PCR-Protokoll zur RNA-Kontrolle	33
7. Tabelle: Sequenzen der Primer und Sonden.....	37
8. Tabelle: TaqMan-PCR-Ansatz für selbst etablierte Primer/Sonden.....	37
9. Tabelle: TaqMan-PCR-Ansatz für die Verwendung von Assays on demand	38
10. Tabelle: TaqMan-PCR-Protokoll für Thermocycler.....	38
12. Tabelle: positiv gefärbte Zellen pro mm ² Gewebe.....	54

Abkürzungen

APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APZ oder APC	Antigenpräsentierende Zelle
BMI	Body mass index
BSA	Body Surface Area
CAM	Cellular Adhesion Molecules
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Copy-DNA
CLA	Cutaneous lymphocyte-associated antigen
CyA	Ciclosporin A
d	Tag
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxiribonukleinacid
dNTP's	Desoxy Nukleotid Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FP	Forward primer
FSC	Forward light scatter
GCP	Good clinical practise
HLA	Human leukocyte antigen
HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
ICAM-1	Intercellular adhäsions molecule-1
ICH	International conference on harmonisation
IFN- γ ,	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LFA	Leukozyte function associated antigen
MAC	Leukozyten-Adhäsionsrezeptor, CD11B/CD18

MCP	Monocyte chemotactic protein
MIP	Macrophage inflammatory protein
MHCII	Major histocompatibility complex II
MTX	Metothrexat
OdT	Oligo desoxnukleotid tymidin
PASI	Psoriasis area and severity index
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin chlorophyll protein
PGA	Psoriasis global assesment
PUVA	Psoralen plus Ultraviolett A
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed, and Secreted heute CCL5
RNA	Ribonucleic acid
RP	Reverse primer
rpm	Rounds per minute
SCID	Severe combined immune defficient
SEM	Standard error of the mean
SSC	Side light scatter
TBC 1269Z	Bimosiamose disodium
TBS	Tris-buffered saline
TCR	T-cell-rezeceptor
TNF- α ,	Tumornekrosefaktor-alpha
UNG	Uracil-N-Glycosylase
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	Vascular leukocyte associated antigen

1 Einleitung

1.1 Psoriasis

Psoriasis ist eine chronische, rezidivierende Immundermatose. Durch eine T-Zell-vermittelte kutane Entzündungsreaktion kommt es zu einer epidermalen Hyperproliferation. Die so entstehenden Plaques sind gekennzeichnet durch gerötete, erhabene, scharf begrenzte, schuppene Hautveränderungen. Die abgelösten Schuppen wirken silbrig.

Es werden verschiedene Formen der Psoriasis unterschieden, wie Psoriasis vulgaris (chronisch, stationärer Plaquetyp), Psoriasis pustulosa, Psoriasis erythrodermatica, die sich vor allem in der Größe der Läsionen und den Prädispositionsstellen unterscheiden. Auch die Fingernägel und die Gelenke (Psoriasis Arthritis) können betroffen sein (Checkliste Dermatologie).

Die Schuppenflechte ist keine moderne Zivilisationskrankheit. Schon weit vor Christi Geburt finden sich Aufzeichnungen, die Hinweise auf das Vorhandensein der Schuppenflechte liefern, (im Alten Testament, 3. Buch Mose, Kapitel 13./14. werden verschiedene Formen von Aussatz erklärt; im 2. Buch der Könige, 5. Kapitel, Absatz 26-27: verwünscht Prophet Elias seinen Diener Gehasi).

Jedoch scheint die industrielle Lebensweise die Entstehung der Schuppenflechte zu begünstigen. In Europa leiden ca. 2–3 % der Bevölkerung an Psoriasis, in Nordamerika bis zu 4 %. Schwarzafrikaner (0,7 %) und Asiaten (0,4 %) sind deutlich seltener betroffen und bei traditionell lebenden Eskimos tritt sie so gut wie nie auf (Christophers 2001, Schoen und Boencke 2005a). Hiermit gehört die Schuppenflechte zu einer der häufigsten Hauterkrankungen, die mit hohem persönlichen Aufwand für die Betroffenen verbunden ist und neben den körperlichen Beschwerden oft eine große psychische Belastung mit sich bringt, vor allem, wenn gut sichtbare Körperregionen wie Kopf, Hände und Gesicht oder der Intimbereich betroffen sind (Fouéré *et al.* 2005).

Um den Schweregrad einer Psoriasis bestimmen zu können, wurden verschiedene Analysemethoden entwickelt. Es kann der PASI (**P**soriasis **a**rea and **s**everity **i**ndex), der BSA (**b**ody **s**urface **a**rea), der PGA (**P**soriasis **g**lobal **a**ssessment) und der DLQI (**D**ermatology **L**ife **Q**uality **I**ndex) bestimmt werden. Der PASI ist ein ermittelter Wert, der sich aus befallener Körperoberfläche, Rötung, Dicke der Plaques und Stärke der

Schuppung zusammensetzt (Frederiksson *et al.* 1978). Man kann so mit sehr wenig befallener Körperoberfläche und einem sehr ausgeprägten Befund den gleichen Wert ermitteln wie mit einem weniger ausgeprägten Befund auf größerer Körperoberfläche. Aus diesem Grund wird zur Ermittlung des Schweregrades der PASI oft in Verbindung mit dem BSA oder dem PGA verwendet. Der BSA gibt an, wie viel Prozent der Körperoberfläche betroffen ist. Hierbei gilt als Faustregel: ein Handabdruck (ohne Finger) des Patienten entspricht einem Prozent seiner Körperoberfläche. Der PGA gilt als Maß für die Aktivität der Erkrankung und teilt sich in eine Skala von 1 (kein Befall - clear) bis 6 (sehr schwerer Befall - very severe). Der DLQI befasst sich mit dem individuellen Empfinden der Erkrankung, dieses wird bei vergleichbarem Hautbefall sehr unterschiedlich von den Patienten gewertet. Man spricht von einer schweren Psoriasis, wenn der PASI entweder > 10 ist, oder mehr als 10 % der Körperoberfläche betroffen sind, oder wenn sich beim DLQI ein Wert > 10 ergibt (Finlay 2005).

1.2 Pathogenese

Nach Sabat *et al.* unterteilt sich die Pathogenese in drei Phasen. In der ersten Phase findet die so genannte Sensibilisierung statt (*sensitization phase*). Hierbei finden Makrophagen und andere Dendritische Zellen ein Antigen, das sie zu einer antigenpräsentierenden Zelle (APZ) macht. Welches konkrete Antigen an der Entstehung der Psoriasis beteiligt ist, ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch wird häufig eine Homologie zu Streptokokken (speziell *Streptococcus pyogenes*) gefunden. Anschließend wandert die antigenpräsentierende Zelle in sekundär lymphatische Organe wie die Lymphknoten oder die Tonsillen, wo sie das Antigen naiven CD4-positiven T-Zellen präsentiert. Dies geschieht über den Haupthistokompatibilitätskomplex-II (MHC II; **M**ajor **H**istocompatibility **C**omplex) und den T-Zell-Rezeptor (TCR).

Die wichtigsten Bindungen sind hierbei die Bindung von ICAM-I (**I**ntracellular **a**dhesions **m**olecule) von den Dendritischen Zellen (DC) mit dem LFA-I (**L**eukozyte **f**unction associated antigen) der naiven CD4-positiven T-Zellen und der Bindung von LFA-III der Dendritischen Zelle mit CD2 auf der naiven CD4-positiven T-Zelle. Der Einfluss der DC (das vorherrschende Zytokinmilieu) entscheidet darüber, ob die

naiven CD4-positiven T-Zellen zu Th₁-Zellen, Th₂-Zellen, zu einer Th₁₇-Zellen oder zu regulatorischen T-Helferzellen aktiviert wird. Das Zytokinmilieu von IFN- γ und IL-12 lassen vor allem Th₁-Zellen entstehen, die ihrerseits IFN- γ (Interferon), TNF- α (Tumornekrosefaktor) und IL-22 (Interleukin) sezernieren (Romagnani *et al.* 1998, Rajiv 2004, Pietrzak *et al.* 2008).

Die zweite Phase besteht aus einer Ruhephase, der so genannten *silent phase*, deren Dauer unbestimmt ist.

Die dritte Phase wird bezeichnet als *effector phase*. Hierbei kommt es zur Dilatation der Blutgefäße in den dermalen Papillen und zur Einwanderung von Immunzellen in die Haut (siehe 1.4 Selektine). Hierbei ist auffällig, dass auch schon unbefallene Haut von Psoriasispatienten E- und P-Selektin an der Endothelwand exprimiert (Terajima *et al.* 1998). Dies verhält sich anders beim Gesunden, bei denen E- und P-Selektin erst auf aktivierten Endothelien zu finden ist. Nach der Einwanderung der Immunzellen kommt es zu einer gegenseitigen Aktivierung durch die Ausschüttung der entsprechenden Zytokine sowie eine vermehrte Bildung von E- und P-Selektin an den Endothelien, wodurch Immunzellen, angezogen durch das herrschende Zytokinmilieu, noch leichter in die Haut einwandern können. Dendritische Zellen (DC) produzieren vor allem TNF- α , welches zur Aktivierung der T-Zellen führt, während die T-Zellen über die Ausschüttung von vor allem IL-23 und IL-6 die DC aktivieren. Die Th₁-Zellen bilden IFN- γ , welches einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Keratinozytenproliferation hat. Das sich hieraus ergebende Zytokinmilieu hat eine stark proliferative Wirkung auf die Keratinozyten. Als Folge dieser Kaskade wird unter anderem der starke Einstrom neutrophiler Granulozyten gesehen. Dadurch kommt es zu einer weiteren Selbstverstärkung der Immun-/Entzündungsreaktion. Durch die überschießende Reaktion der Keratinozyten, die mit einem überschießenden Wundheilungsprozess zu vergleichen ist, entsteht das für die Psoriasis typische Bild der Hyperparakeratose (Sabat *et al.* 2007).

Als externe Triggerfaktoren der Psoriasis sind folgende Einflüsse beschrieben worden: Infektionen (z.B. Streptokokken-Angina), Stress oder die Einnahme bestimmter Medikamente wie z. B. Lithium (Lazarus 1979), beta-Blocker (Gold 1988), Antimalaria-Mittel (Baker 1971), Angiotensin-Converting-Enzyme (Wolf 1990) und einige andere.

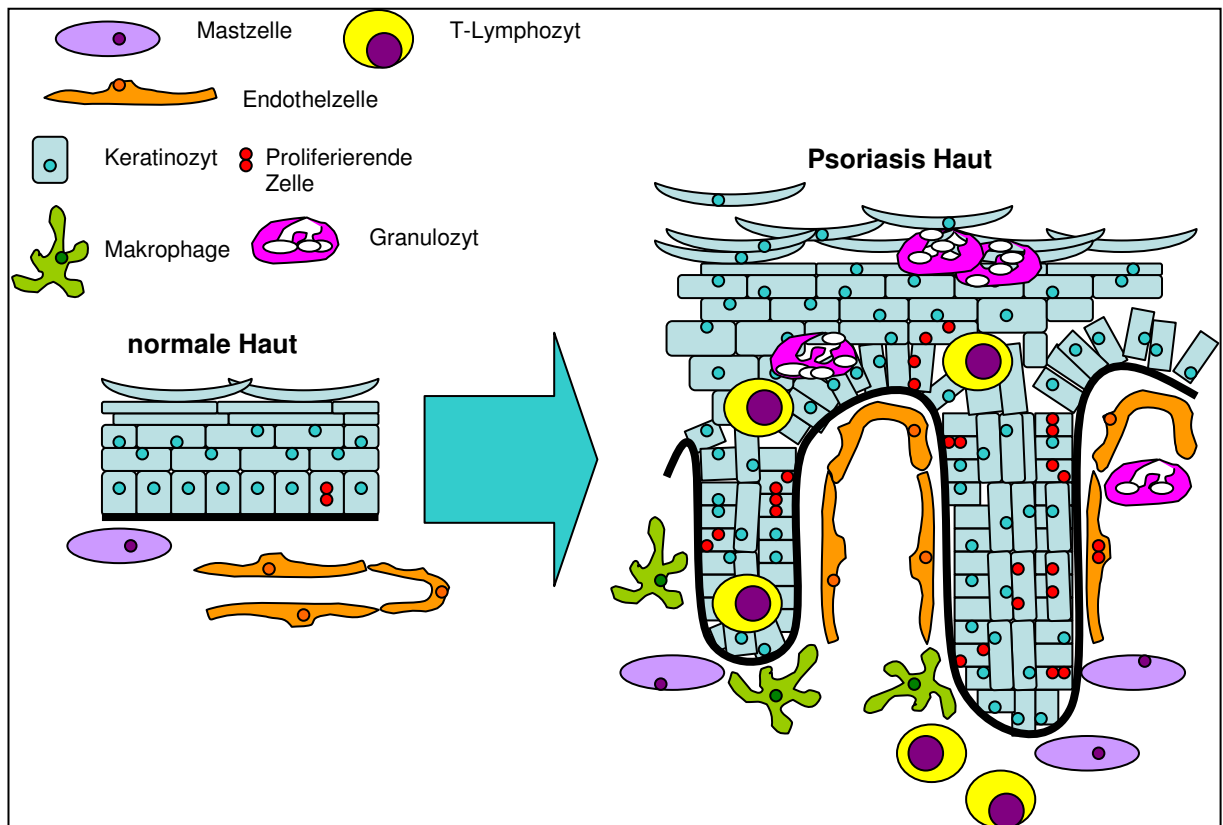
Auch eine genetische Prädisposition spielt eine Rolle bei der Entstehung der Psoriasis. Hierbei werden zwei Typen der Psoriasis unterschieden:

- Der Typ I mit frühem Krankheitsbeginn, d. h. bis zum 40. Lebensjahr, meist jedoch in der zweiten Lebensdekade, und mit familiärer Häufung. Der Typ I Psoriasis wird mit den HLA (humanes Leukozytenantigen) Klasse I und II Genen HLA-Cw6, -Cw7, -B13, -B17, B39, -B57, -DR4 und DR7 assoziiert (Elder *et al.* 1994).
- Der Typ II mit spätem Krankheitsbeginn, d. h. jenseits des 40. Lebensjahres, besonders um das 60. Lebensjahr, ohne familiäre Häufung. Hierbei fehlt die strenge Genassoziiierung, wie sie bei Typ I gefunden wird (Ortonne 1999).

75 % der Psoriatiker gehören dem Typ I an, verbunden mit oft schweren, therapieresistenten Formen der Psoriasis. Der Typ II verläuft im Allgemeinen milder als Typ I (Sabat *et al.* 2007). Es scheint eine genetische Prädisposition dahingehend zu bestehen, dass die Keratinozyten bei Patienten mit Psoriasis sehr viel stärker auf die lokale Freisetzung von Mediatoren reagieren. Auch der bei der Psoriasis beobachtete isomorphe Reizeffekt (Köbner Phänomen), deuten auf diese Prädisposition hin (Pietrzak *et al.* 2008, Boyd und Neldna 1990).

Große Fortschritte sind beim Verständnis der molekularen Mechanismen zur Leukozyten-Rekrutierung aus dem Blut in entzündete Gewebe gemacht worden. Diese haben dazu beigetragen, verschiedenste therapeutische Ansatzpunkte zur Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen zu finden und neue innovative Substanzen zu entwickeln (Robert und Kupper 1999, von Adrian und Mackay 2000). Aufgrund des bisherigen Kenntnisstandes der Pathogenese der Psoriasis ergeben sich folgende Ansatzpunkte, um therapeutisch einzugreifen:

- Blockierung der Interaktion der T-Zellen mit den antigenpräsentierenden Zellen, mit Folge der Aktivierung der T-Zellen,
- Depletion der T-Zellen,
- Inhibition der Migration der T-Zellen in die Haut durch Unterbindung der Interaktion zwischen T-Zelle und Endothelzelle,
- Antagonisierung von Zytokinen mit proinflammatorischer Wirkung (Philipp *et al.* 2006).



1. Abbildung: Veränderungen von normaler Haut zu psoriasisformer Haut (modifiziert nach Schoen 2005c).

1.3 Therapien der Psoriasis

Die Psoriasis ist bis heute nicht heilbar, so dass alle Therapien nur zur Verbesserung des Befundes, maximal zur Symptombefreiheit führen. Hierzu stehen eine Reihe lokal zu verwendender Cremes, Lotionen und Salben sowie systemisch wirkende Medikamente zur Verfügung. Es gibt einige Berichte über so genannte „Spontanheilungen“. Diese stehen jedoch nicht mit einer bestimmten Medikation in Zusammenhang.

Die derzeit zur Verfügung stehenden Therapien können oft nur dem chronisch-stationärem Plaque-Typ eine zufriedenstellende Behandlung ermöglichen. Patienten mit einer chronisch aktiven Psoriasis (etwa 20 % aller Psoriasis Patienten) benötigen neben einer topischen Behandlung häufig noch eine zusätzliche Behandlung mit systemisch wirkenden Pharmaka bzw. eine Phototherapie (Friedrich *et al.* 2003). Beide Behandlungsformen (systemisch und phototherapeutisch) sind noch mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Auch kann eine langjährige Phototherapie mit dem Auftreten von Tumoren in Verbindung gebracht werden (Braun-Falco *et al.* 1995; Czarnetzki *et al.* 1992).

Zu den topischen Therapien gehören vor allem Cremes und Salben mit Dithranol, Glukocortikoiden, Salizylsäure, Retinoiden, Vitamin-D₃-Analoga und Teer. Salizylsäure dient in erster Linie der Abschuppung und Glättung der Haut. Sie macht die Haut zudem durchlässiger für andere Antipsoriatika. Glukocortikoide wirken antientzündlich und Dithranol, die Vitamin-D₃-Analoga und die Retinoide wirken direkt auf die Keratinozyten, indem sie die Hyperproliferation hemmen.

Zu den systemischen Psoriasis-Therapien gehören die klassischen systemischen Therapien mit Ciclosporin A (CyA), Methotrexat (MTX), Fumarsäureester und Psoralen plus UVA-Therapie (PUVA). Ciclosporin A wirkt zum einen über die Inhibierung der T-Zellaktivierung und hat zum anderen eine antiproliferatorische Wirkung auf die Keratinozyten (Reynolds und Al-Daraj 2002), während MTX die T-Zell-Aktivierung und die Expression der T-Zell-Adhäsionsmoleküle reduziert, (cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)) und intercellular adhesion molecule (ICAM-1) (Johnston *et al.* 2005). Auch die Fumarsäureester wirken über die Reduzierung der zytokininduzierten Expression der T-Zelladhäsionsmoleküle sowie über eine Verschiebung des Zytokinmilieus von TNF- α und IFN- γ zu Gunsten von antientzündlichen Zytokinen wie IL-10, wodurch weniger Th₁-Zellen gebildet werden (Roll *et al.* 2007). Die PUVA-Therapie funktioniert vor allem über die induzierte Apoptose von Keratinozyten (Caffieri *et al.* 2007). Die klassischen systemischen Therapien erzielen häufig unerwünschte Wirkungen wie z. B. gastroenterale Beschwerden bei Fumarsäureestern, sie sind kontraindiziert (Kinderwunsch bei MTX), weisen kumulative Toxizität (MTX, Ciclosporin A) auf oder sind für die Dauertherapie nicht geeignet, wie zum Beispiel Ciclosporin A (Boehncke *et al.* 2003).

Viele der besonders therapieresistenten Formen der Psoriasis lassen sich mit den so genannten Biologics therapieren. Unter Biologics versteht man biotechnologisch hergestellte Moleküle, die die Wirkung natürlich vorkommender, funktionaler Membranstrukturen hemmen oder imitieren. Hierbei handelt es sich um Proteinstrukturen, die aus lebendem Material wie Mikroorganismen, Pflanzen, menschlichen oder tierischen Zellen gewonnen werden. Es werden verschiedene Vertreter unterschieden:

- Fusionsproteine,
- monoklonale Antikörper,
- rekombinante Zytokine.

Fusionsproteine bestehen aus einem Rezeptor und Immunglobulin-G-(IgG)Anteilen. Sie binden Liganden, behindern dadurch die physiologische Signalübertragung und nutzen die biologische Wirkung des Immunglobulins (Zellbindung, Komplementaktivierung) oder sie bestehen aus Rezeptor-, Antikörper- oder Zytokinmolekülanteilen und Toxin, binden an ihre Zielzelle und eliminieren diese mit Hilfe des Toxins.

Monoklonale Antikörper werden unterschieden in murine monoklonale Antikörper, chimäre Antikörper (variabler Mausanteil und konstanter humaner Bereich) und humanisierte Antikörper, die komplett aus humanem Material bestehen. Je größer der humane Bereich, desto besser verträglich ist der Antikörper im Allgemeinen.

Rekombinante Zytokine wirken antagonistisch mit den Mediatoren einer zentralen proinflammatorischen Funktion oder inhibieren die Interaktion von T-Zellen mit Endothelzellen und/oder antigenpräsentierenden Zellen (Pschyrembel Handbuch Therapie, 3. Auflage 2005).

Die Wirksamkeit des eingesetzten Biologics ist häufig sehr gut. Die zur Zeit für die Therapie der Psoriasis vulgaris zugelassenen Biologics sind Infliximab (Remicade™), Adalimumab (Humira™), Efalizumab (Raptiva™), Etanercept (Enbrel™) und Alefacept (Amevive™, Zulassung nur in den USA).

Infliximab, Adalimumab und Etanercept sind TNF- α Antagonisten.

- Infliximab: Chimärer IgG anti-TNF- α -Antikörper (Maus/Human).
- Adalimumab: Rekombinanter humaner monoklonaler anti-TNF- α Antikörper.
- Etanercept: Humaner TNF- α -Rezeptor, der im Gegensatz zum natürlich vorkommenden TNF- α -Rezeptor zwei Bindungsstellen aufweist und eine höhere Bindungsaffinität hat als der native TNF- α -Rezeptor.
- Efalizumab: Rekombinanter, humanisierter, monoklonaler Antikörper. Dieser blockiert durch die Bindung an CD11a des LFA-1 zum einen den Weg der T-Zell-Aktivierung, zum anderen wird dadurch auch die Einwanderung von T-Zellen in die Haut gehemmt (Fachinformationen).
- Amevive: Fusionsprotein aus LFA-3 und der konstanten Region eines humanen IgG1-Antikörpers. Die LFA-3-Untereinheit bindet an den CD2-Rezeptor der T-Zellen und blockiert so eine wichtige Interaktion mit APCs,

verhindert somit die Aktivierung der T-Zellen und führt durch natürliche Killerzellen über die IgG-Einheit schnell zur induzierten Apoptose. Da der CD2-Rezeptor auf den für die Pathogenese der Psoriasis wichtigen T-Zellen (CD45RO-positive) in besonders hoher Dichte vorkommt, werden zum größten Teil diese Zellen eliminiert.

Aufgrund der Proteinstruktur sind alle bisher zugelassenen Biologics oral nicht bioverfügbar und müssen deswegen subkutan, intravenös oder intramuskulär verabreicht werden. Die Halbwertszeiten und die Eliminationszeiten sowie Abbauege sind substanzspezifisch. Die Kosten für eine Behandlung mit einem Biologic sind sehr hoch, die Folgen der Langzeitmedikation im Vorfeld nur schwer einzuschätzen. Es kann unter anderem zur Bildung von Autoantikörpern und Antikörpern kommen, was im besten Falle nur zu einem Wirksamkeitsverlust des genutzten Medikaments führt. Der Einsatz von Biologics ist sorgfältig abzuwägen, da diese zu unerwünschten Wirkungen führen können, sehr teuer sind, kontraindiziert sein können und ein ansprechen auf die Therapie nicht gewährleistet ist (Philipp *et al.* 2006).

1.4 Selektine

Der erste Schritt der T-Zellen, ihre Fließgeschwindigkeit zu reduzieren und sich an das Endothel der Gefäßwand zu binden, um in umliegende Gewebe auszuwandern, wird hauptsächlich von Selektinen beeinflusst (Groves *et al.* 1991, Shimizu *et al.* 1993, von Adrian *et al.* 1991, Smith *et al.* 1993, Butcher und Picker 1996).

Selektine sind transmembrane Glykoproteine, die hauptsächlich auf Endothelien vorkommen und eine extrazelluläre Lektindomäne tragen. Diese erkennt und bindet spezifische, auf Leukozyten und Lymphozyten vorkommende Kohlenhydratketten. Damit wird eine Bindung der entsprechenden Zellen an die Endothelien ausgelöst (Marinier 2001, Feizi 2001).

Die Adhäsion und die sich daran anschließende Wanderung durch das Endothel findet vor allem in den postkapillären Venolen statt, wo die Scherkräfte nicht so groß sind (Alon *et al.* 1998).

Der schwimmende Leukozyt gerät zunächst nur in kurzen Kontakt mit der Gefäßwand, verlangsamt daraufhin seine Geschwindigkeit und rollt dann am Endothel entlang.

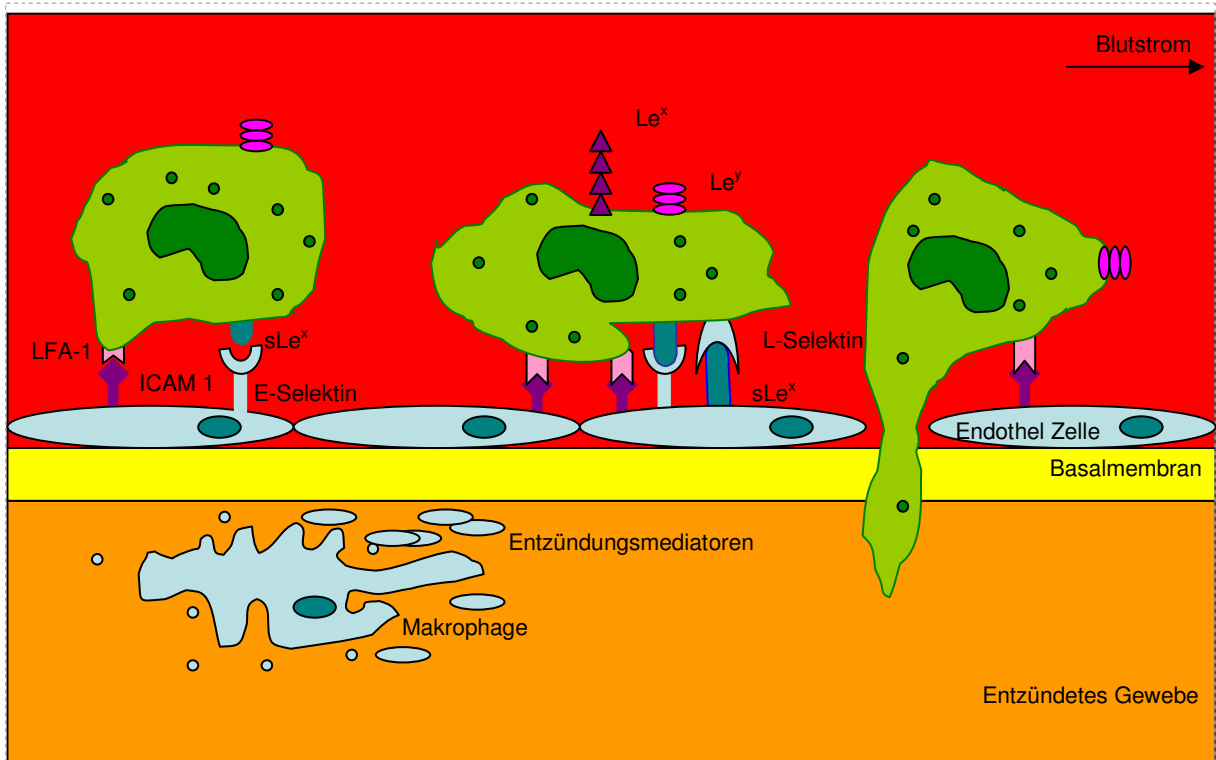
Für das Andocken an die Endotheloberfläche sind lektinähnliche, kohlenhydratbindende Proteine, die Selektine, verantwortlich, die mit den Kohlenhydratresten von Glycoproteinen (Sialyl-Lewis^x) eine Bindung eingehen (Varki 1994).

Einige Zellen lösen sich wieder von der Gefäßwandoberfläche, wohingegen andere zum Stillstand kommen und ihre Gestalt innerhalb von Sekunden ändern, indem sie eine abgeflachte adhärente Struktur annehmen. Innerhalb der nächsten Minuten wandern die Zellen zwischen den Endothelzellen hindurch in das Gewebe.

Die hierfür verantwortlichen Selektine sind

- das L-Selektin, welches sich auf den meisten Leukozyten findet,
- das E-Selektin, welches nach Aktivierung durch Zytokine von Endothelzellen synthetisiert und exprimiert wird,
- das P-Selektin, welches von aktiviertem Endothel und von Thrombozyten (plateles) exprimiert wird (Kansas 1996).

Jedes dieser Selektine erkennt spezifische Kohlenhydratsequenzen auf den Leukozyten oder dem Endothel. Die Selektine sind für diese Anheftung gut geeignet, da sie lang ausgestreckt sind, so dass Leukozyten, die den entsprechenden Rezeptor aufweisen, eingefangen werden können (Shimizu *et al.* 1999). Die vorübergehende Natur dieser Wechselwirkung ist wichtig, da Leukozyten das Endothel auf spezifische Auslösefaktoren absuchen können, welche zu einer Aktivierung der Leukozyten und damit zu einer Auswanderung in entzündete Gewebe führen (Ley 2001). Fehlen solche Faktoren, so führt die nur leichte Bindung an Selektine zu einer schnellen Lösung, so dass die Leukozyten im Blut weiter schwimmen können. Die feste Anheftung an das Endothel wird durch Adhäsionsmoleküle (Integrine) vermittelt. Dazu gehören die β 2-Integrine LFA-1 (Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen, CDLFA/CD18), MAC-1 (Leukozyten-Adhäsionsrezeptor, CD11B/CD18) und das β 1-Integrin VLA-4, die am CAM (Cellular Adhesion Molecules) wie ICAM 1 oder 2 an Endothelzellen binden (Detmers 1990). Die Aktivierung dieser Integrine kann innerhalb von Sekundenbruchteilen geschehen (Campbell 1998, Grabovsky 2000).



2. Abbildung: Selektine sind maßgeblich an der Einwanderung von Leukozyten beteiligt. (Modifiziert nach Löffler-Petrides Biochemie und Pathobiochemie.)

Diese Integrine auf zirkulierenden Leukozyten binden nur dann gut an Endothelien, wenn ihre Bindungsaktivität durch Aktivierung erhöht wird. Diese Aktivierung erfolgt durch Signale, die vorwiegend von Endothelzellen freigesetzt werden namentlich durch chemotaktisch aktive Zytokine, zu denen Interleukin 8, MCP 1 (**M**onocyte **c**hemotactic **p**rotein), MIP 1 (**M**acrophage **I**nflammatory **P**rotein) und CCL5 (Rantes) gehören, wobei letztere vor allem auf Monocyten, Lymphozyten und Eosinophile wirken. Nach Adhäsion an das Endothel folgt die Transmigration durch das Endothel, ein Vorgang, der als „Diapedese“ bezeichnet wird. Hierbei wandern die Leukozyten unter dem Einfluss chemotaktischer Faktoren in das Gewebe. Dazu gehören die Anaphylatoxine des Komplementsystems wie C_{5a} oder das Arachidonsäurederivat Leukotrien B_4 (Zlotnik 2000). Unter dem Einfluss lokal gebildeter Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel $TNF-\alpha$ oder IL-1, werden interzelluläre Adhäsionsmoleküle (wie ICAM-1) auf Endothelzellen sowie die Selektine verstärkt exprimiert, so dass noch mehr Leukozyten aus dem Blutstrom rekrutiert werden können (Bevilaqua 1989). Auf chemotaktische Reize ändern die Neutrophilen nach Einwanderung in das Gewebe ihre Gestalt, richten sich nach den Gradienten aus und bewegen sich kontinuierlich auf den Ausgangspunkt der chemoattraktiven

Substanz zu. Die sich nun anschließenden Prozesse sind eigentlich dafür gedacht, mit Hilfe der ausgelösten Entzündungsreaktion anwesende Mikroorganismen zu zerstören. Die Unterbrechung des initialen Kontakts zwischen Leukozyten und der Endothelwand ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt, um Entzündungsreaktionen zu verhindern (Boehncke und Schoen 2003, Ulbrich *et al.* 2003, Schoen und Ludwig 2005b).

1.4.1 Pan-Selektin-Antagonist

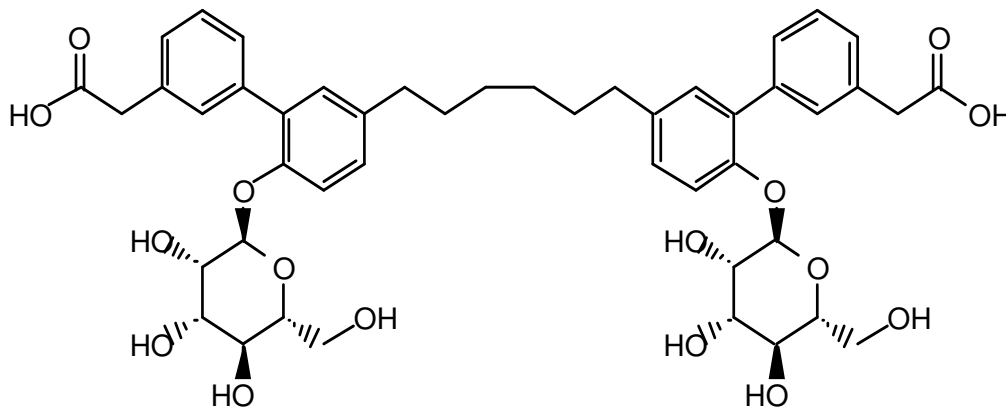
Der hier verwendete so genannte Pan-Selektin-Antagonist Bimosiamose disodium, antagonisiert sowohl E-, P- als auch L-Selektin. In Voruntersuchungen ist gezeigt worden, dass die gleichzeitige Hemmung von E- und P-Selektin effizienter ist als die Hemmung eines der beiden Selektine allein (Issekutz und Issekutz 2002). Ebenso ist dargestellt worden, dass eine Blockierung des L-Selektins effektiv vor Leukozyten-Migration schützen kann (Watson *et al.* 1991). Es wurde gezeigt, dass dem L-Selektin-vermitteltem „Rollen an der Endothelwand“ eine zunehmend wichtigere Rolle bei der gleichzeitigen Hemmung von E- und P-Selektin zugeordnet wird (Alon und Feigelson 2002, Dwir 2002).

Die Funktion eines einzelnen Selektins zu hemmen, scheint nicht auszureichen, um die Entzündungskaskade zu unterbrechen. Ein Antagonist, der in der Lage ist, die Funktion von mehreren Selektinen zu behindern, verspricht eine selektive, die Pathogenese unterbrechende Therapiemöglichkeit für die Psoriasis darzustellen (Schoen *et al.* 2004). Aus Voruntersuchungen ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine Hemmung aller drei Selektine ein guter therapeutischer Ansatz sein kann, entzündliche Erkrankungen zu therapieren (Sperandio *et al.* 2004). In dieser Arbeit ist die Wirkung des Pan-Selektin-Antagonisten Bimosiamose disodium (TBC 1269Z) an 5 Patienten mit einer Psoriasis des chronisch stationären Plaque-Typs bei einer 14-tägigen Anwendung untersucht worden.

1.4.2 Bimosioamose disodium (TBC 1269Z)

Aufgrund der Belastung des Patienten durch die Erkrankung und die Unzufriedenheit über derzeitige Therapien (zeitaufwändig, unzureichende Wirksamkeit, unerwünschte Wirkungen) ergibt sich ein Handlungsbedarf zur Entwicklung neuer Therapieansätze zur Behandlung der Psoriasis (Friedrich *et al.* 2003).

Bimosiamose disodium (TBC 1269Z) ist ein Pan-Selektin-Antagonist, der von Texas Biotechnology Corporation entwickelt wurde. Hierbei handelt es sich um 1,6-Bis[3-(3-carboxymethylphenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)-phenyl]hexane mit der Gesamtsummenformel $C_{46}H_{54}O_{16}$ (Kogan 1998). Es wird als *small-molecule drug* bezeichnet und bindet so an die Lektinuntereinheit des E-, L- oder P- Selektins, dass eine Ligandenbindung über die Untereinheit Sialyl Lewis^x nicht mehr möglich ist.



3. Abbildung: Strukturformel von TBC 1269.

Zuvor hatten verschiedene Tiermodelle zu Psoriasis und atopischer Dermatitis gezeigt, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Entzündungsreaktion und den Selektinen gibt (Teixeira *et al.* 1998). Es konnte dargestellt werden, dass es zu einem Anstieg der Selektinexpression während des Psoriasis-Schubes kommt (Terajima *et al.* 1998). Im Tierversuch wurde gezeigt, dass sich Selektinantagonisten eignen, um Entzündungsreaktionen zu behandeln (Todderund *et al.* 1997).

Da die Selektine einen entscheidenden Beitrag dazu leisten, dass Lymphozyten aus dem Blutstrom migrieren können, und diese nach dem aktuellen Kenntnisstand maßgeblich an der Entstehung und Aufrechterhaltung psoriasiformer Plaques beteiligt sind, müsste eine Hemmung der Selektine zu einer Besserung des Hautbefundes führen. Im Psoriasis-Studienzentrum an der Berliner Charité wurde

eine Pilotstudie mit dem Pan-Selektin-Antagonisten Bimosiamose disodium (TBC 1269Z) nach dem Protokoll der Firma Revotar Biopharmaceuticals AG aus dem Jahr 2001 mit dem Titel: „*Efficacy, tolerability, and pharmacokinetics of bimosiamose disodium (TBC 1269Z) in patients with moderate to severe psoriasis after once-daily intralesional injection of TBC 1269Z given over a period of 14 days*“ durchgeführt. Zur Beurteilung der primären Wirksamkeit des *small-molecule drugs* wurde der PASI, der PGA und die Schuppung, Rötung und Dicke der behandelten Hautlesion sowie einer Vergleichslesion vom durchführenden Prüfarzt bestimmt. Zur weiteren Beurteilung der Wirkung wurden immunologische Veränderungen im Blut und in der Haut der Patienten untersucht.

Es sind zuvor Versuche mit SCID (Severe combined immune deficient)-Mäusen gelaufen, um die Wirksamkeit von TBC 1269Z im Psoriasisherd zu testen (Dam *et al.* 1999). Hierzu wurde den SCID-Mäusen humane, plaquefreie Psoriasis Haut transplantiert, randomisiert, mit Bimosiamose (200 mg/kg KG) oder PBS (phosphate buffered saline) als Placebo behandelt, indem subkutan appliziert wurde und anschließend durch Applikation mit aktivierten T-Zellen ein Psoriasis-Schub ausgelöst wurde. Das Ergebnis belegte eindeutig bessere Hautbefunde innerhalb der Behandlungsgruppe mit TBC1269Z (Friedrich *et al.* 2003). Bei gesunden Freiwilligen ist die Sicherheit und Verträglichkeit von TBC 1269Z bei intravenöser Gabe getestet worden (Projekt 011159: Ascending dose tolerance i.v. bolus study of TBC 1269Z in healthy volunteers with preliminary pharmacokinetic assessments. Inveresk, Report 14825. 28 October 1997). Im Folgenden wird der Begriff Bimosiamose disodium synonym verwendet mit TBC 1269Z.

1.5 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss des Pan-Selektin-Antagonisten Bimosiamose disodium (TBC 1269Z) in der Haut, im Blut und auf zellulärer Ebene näher zu beschreiben. Hierzu wurden mittels Durchflusszytometrie die Lymphozytensubpopulationen im Blut der Patienten vor, während, am Ende und 14 Tage nach der Therapie analysiert und quantifiziert. Die Lymphozytensubpopulationen CD45RO+, CD45RA+ und HLA-DR+ der CD3+, CD4+ und CD8+ sind bei stark ausgeprägter Psoriasis (PASI \geq 12) stärker erhöht als bei Gesunden, bzw. bei Patienten mit einer milden Psoriasis (Langewouters *et al.* 2008, Abul *et al.*

2002, Baker *et al.* 1984, Cameron *et al.* 2003). Auf Grund des erwarteten Wirkmechanismus des Medikaments Bimosiamose disodium wäre eine Zunahme der CD62-L-positiven Lymphozyten im Blut unter Therapie zu erwarten. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass nur ca. 5 % aller im Körper vorhandenen Lymphozyten im peripheren Blut zu finden sind. Mit Hilfe der Immunhistologie werden aus Hautbiopsien, die aus der behandelten Plaqueregion stammen, die in die Haut eingewanderten T-Zellen analysiert und quantifiziert. Veränderungen der Zellzahlen in der Epidermis und der Dermis werden verglichen. Zellen, auf deren Oberflächen die Selektine E, L und P exprimiert waren, werden in der Dermis bestimmt. Bei Gesunden kommen T-Zellen in der Haut nicht vor, bei Psoriasispatienten sind auch in nicht-lesionaler Haut T-Zellen zu finden, allerdings in geringerer Anzahl als im Psoriasisplaque. Durch die Hemmung der Selektine mit dem eingesetzten Medikament Bimosiamose disodium soll die T-Zellmigration in die Haut reduziert werden und damit auch die Anzahl der T-Zellen in der Haut. Aus diesem Grund wird untersucht, ob es unter der Therapie zu einer Reduktion der CD3+ Zellen kommt bzw. ob die T-Zellsubpopulationen CD4+ und CD8+ reduziert werden. Auch der Aktivierungsmarker HLA-DR wird in lesionaler, psoriasiformer Haut exprimiert, im Vergleich zu nicht-lesionaler Haut (Gottlieb *et al.* 1986). Ebenso werden die Zellen untersucht, die Selektine exprimieren (CD62-E+, CD62-L+ und CD62-P+). Da auch diese hauptsächlich im Entzündungsprozess exprimiert werden, sollten sie unter einer erfolgreichen Therapie mit TBC 1269Z abnehmen.

Ebenfalls aus Gewebeproben wurde RNA isoliert, um mit Hilfe einer Real-Time-PCR (TaqMan-PCR oder auch RT-PCR) die mRNA-Expression von Zytokinen zu bestimmen, welche im Entzündungsprozess der Psoriasis eine Rolle spielen. IL-10 und IL-1- β sind in der Psoriasis-Lesion im Vergleich zu gesunder Haut reduziert (Asadullah 1998, Terajima 1998), während IL-12p35, IL-12p40, TNF- α und IFN- γ erhöht sind (Asadullah 1999b und c).

Die Erhebung der Daten der Durchflusszytometrie, der Immunhistologie und der Real-Time-PCR, die wissenschaftliche Aufarbeitung des gewonnenen Datenmaterials sowie die Ergebnisse vor dem aktuellen Kenntnisstand der Psoriasis-Forschung zu interpretieren, waren die Aufgabe dieser Dissertation. Die Auswertung der primären Wirksamkeit des getesteten Medikaments erfolgte über den PASI, den Verlauf des PGAs, die Dokumentation und den Vergleich der behandelten Lesion mit einer Kontrolllesion im Zusammenhang mit der Epidermisdicke; die Auswertung der

Pharmakokinetik und Verträglichkeit des Pan-Selektin Antagonisten Bimosiamose disodium erfolgt durch die Dissertation von Frau Sandra Philipp mit dem Titel: „*Psoriasisstudieversuch mit dem Pan-Selektin-Antagonisten TBC 1269Z*“.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Der Selektin-Antagonist TBC 1269Z wurde in einer offenen klinischen Studie („proof-of-concept“) der Phase II getestet. Untersucht wurde vor allem der Einfluss des Prüfpräparates auf die Psoriasis von Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Psoriasis. Auch die Pharmakokinetik sowie die Medikamentensicherheit wurden erforscht. Im Verlauf der Studie wurden jedem Patienten täglich 6 ml (3 x 2 ml) der Bimosiamose-disodium-Lösung in Form von subkutanen, intralesionalen Injektionen verabreicht. Diese Injektionen erfolgten über einen Zeitraum von zwei Wochen täglich in eine definierte, von Psoriasis betroffene Hautlesion (Ziellesion).

An der Studie nahmen fünf Patienten teil. Alle erhielten das Prüfpräparat TBC 1269Z, die Studie war nicht Placeb- kontrolliert. Einschlusskriterien waren:

- Eine vor mindestens sechs Monaten diagnostizierte mittelschwere bis schwere Psoriasis, von der mehr als 10 % der Körperoberfläche betroffen sind (PASI > 8).
- Die Patienten mussten über 18 Jahre alt und kaukasischer Abstammung sein.
- Die Patienten-Information musste unterschrieben vorliegen.
- Frauen im gebärfähigen Alter mussten sich einverstanden erklären, mindestens zwei medizinisch akzeptierbare Formen der Empfängnisverhütung für den gesamten Zeitraum der Studie (28 Tage) anzuwenden, falls sie nicht sterilisiert waren.
- Hepatitis und HIV-Infektionen mussten ausgeschlossen werden können.
- Ein BMI (Body mass index) ≥ 18

Ausschlusskriterien waren:

- Schwangerschaft oder stillende Frauen
- Systemische Psoriasis-Therapie innerhalb der letzten vier Wochen
- PUVA- oder Lichttherapie innerhalb der letzten zwei Wochen
- Lokale Psoriasis-Therapie innerhalb der letzten zwei Wochen (außer Eurcerin cum aqua und Asche Basiscreme)
- Schwere Infektionen innerhalb der letzten drei Monate (z. B.: Sepsis, Hepatitis, Pneumonie)
- Begleitmedikation, die den Studienablauf beeinflussen könnte

- Bestehende oder anamnestisch bekannte Erkrankung, die der Studiendurchführung entgegenstehen (z. B. Malignome oder Kollagenosen)
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie innerhalb der letzten drei Monate vor Studienbeginn
- Blutspende oder vergleichbarer Blutverlust innerhalb der letzten drei Monate vor Studienbeginn
- Anamnestisch bekannte Alkohol- oder Drogenabhängigkeit in den letzten sechs Monaten vor Studienbeginn sowie ein positiver Urin-Drogentest bei der Voruntersuchung zur Studie
- Vorliegen oder Vorgeschichte irgend einer medizinischen oder psychiatrischen Erkrankung, die einen erfolgreichen Studienabschluss entgegenstehen könnte

Im Verlauf der Studie wurde von allen Patienten vor Beginn der Therapie mit TBC 1269Z am Screening-Tag (Tag 0) und an Tag 14 von der behandelten Plaqueregion eine 6 mm große Stanzbiopsie entnommen. Optional war eine weitere Biopsieentnahme am Tag 28 möglich. Die Biopsieproben wurden mit dem Skalpell geteilt und sofort in flüssigem Stickstoff konserviert und bis zur immunhistologischen Untersuchung und zur Real-Time-PCR bei - 80 °C im Tiefkühlgerät gelagert.

Blutentnahmen wurden von Tag 1 bis Tag 14 täglich vor der Medikation entnommen, ebenso an Tag 1 und 14 jeweils noch 1, 2, 4 und 6 Stunden nach der Medikation, um die Pharmakokinetik zu bestimmen. Immunologische Blutuntersuchungen erfolgten an Tag 1, 7 und 14.

2.1.1 Patienten

Die Auswahl der fünf Patienten, die an dieser Phase II Studie teilgenommen haben, erfolgte nach den unter 2.1 genannten Kriterien. Es wurden zwei Frauen und drei Männer ausgewählt, die zwischen 29 und 59 Jahren alt waren. Sie hatten einen PASI von $12,8 \pm 1,9$.

2.2 Proben

2.2.1 Blut

Die Blutentnahmen für die immunologischen Untersuchungen erfolgten an den Tagen 1, 7, 14 und 28. Es wurden 9 ml Vollblut in eine Lithium-Heparin-Monovette

entnommen und zur Überprüfung des allgemeinen Gesundheitszustandes wurden weitere hämatologische Untersuchungen an den Tagen 1, 2, 7, 10, 14 und 28 durchgeführt. Zur Bestimmung des Immunstatus wurden an den Tagen 1, 7, 14 und 28 100 µl Vollblut zur FACS-Messung aufgearbeitet. Weitere Blutentnahmen erfolgten zur Bestimmung der Pharmakokinetik am Tag 1 (erster Behandlungstag) vor der Injektion 1, 2, 4 und 6 Stunden danach und an Tag 14. An den Tagen 2 bis 13 erfolgte die Blutentnahme vor der Medikation.

2.2.2 Biopsien

Pro Patient sind zwei bzw. drei Stanzbiopsien während der Studie entnommen worden. Diese erfolgten am Screening-Tag (d = 0), nach Beendigung der Therapie (d = 14) und optional am Tag der Abschlussbegutachtung (d = 28).

Die 6 mm großen Stanzbiopsien sind unter sterilen Bedingungen unter Lokalanästhesie mit 1%iger Lidocainlösung entnommen worden und sofort in Eppendorf-Tubes in flüssigem Stickstoff (– 196 °C) schockgefroren worden. Bis zur Aufarbeitung für die Immunhistologie und die Real-Time-PCR wurden die Biopsien bei – 80 °C gelagert.

2.3 Statistik

Die Durchführung der statistischen Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 13.0. Es erfolgte eine deskriptive Analyse, bei der Mittelwerte und SEM bestimmt wurden. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests für gepaarte Stichproben untersucht. Hierbei wurde ein p-Value von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant bewertet, und ein p-Value von $\leq 0,01$ als statistisch hoch signifikant eingestuft. Die Korrelation wurde nach Spearman berechnet (nach Skarabis).

2.4 Graphische Darstellung

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2000.

2.5 Antikörper und Chemikalien

2.5.1 Antikörper zum Einsatz in der Durchflusszytometrie

1. Tabelle: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Hersteller	Klon	Markierung
CD3	Becton Dickinson	SK7	PerCP
CD4	Becton Dickinson	SK3	APC
Anti-HLA-DR (humanes Leukozyten Antigen)	Becton Dickinson PharMingen	L243 G46-6	PE FITC
CD62-L	Serotec	AK-6	PE
CD45RO	Biosource	UCHL1	FITC
CD45RA	PharMingen	HI100	FITC

2.5.2 Antikörper zum Einsatz in der Immunhistologie

2. Tabelle: Antikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Hersteller
Antikörper APAAP mouse monoclonal	DAKO, Hamburg, Germany
Antikörper CD20	DAKO, Hamburg, Germany
Antikörper CD3	DAKO, Hamburg, Germany
Antikörper CD4	DAKO, Hamburg, Germany
Antikörper CD45RO	DAKO, Hamburg, Germany
Antikörper CD62-E	DAKO, Hamburg, Germany
Antikörper CD62-L	DAKO, Hamburg, Germany
Antikörper CD62-P	DAKO, Hamburg, Germany
Antikörper CD8	DAKO, Hamburg, Germany
Antikörper HLA-DR	DAKO, Hamburg, Germany
Antikörper rabbit-anti-mouse Immunglobulin	DAKO, Hamburg, Germany

2.5.3 Chemikalien

3. Tabelle: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
10 x TAE-Puffer (pH = 8,4)	Gibco, Paisley, Scotland
10 x TBE-Puffer (pH = 8,3)	Gibco, Paisley, Scotland
2-Amino-2-methyl-1,3-Propandiol	Merck, Darmstadt, Germany
2-Mercapthoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
5 x First Stand buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Aceton	Merck, Darmstadt, Germany
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen, Germany
Aqua-Roti®-Phenol	Roth, Karlsruhe, Germany
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Germany
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Citronensäure	Merck, Darmstadt, Germany
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
DNA-free™ 50rxns.	Ambion, Darmstadt, Germany
DTT 100 mM (Dithiothreitol)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Ficoll-Paque Research Grade	Amersham, Uppsala, Schweden

Chemikalien	Hersteller
Glycogen	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
Guanidinium-Isothiozyanat	Gibco, Paisley, Scotland
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt, Germany
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Kalialaun	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Levamisol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg, Germany
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt, Germany
Naphtol AS-BI Phosphorsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Natriumacetat-Trihydrat (pH = 4, 2 M)	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumcitrat-2-Hydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Natriumjodat	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Neufuchsin	Merck, Darmstadt, Germany
N-Laurosylsarcosine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
OdT-Primer pd (T) 12-18 5'-PO4	Amersham, Uppsala, Schweden
Assay on demand Hs00168405_m1 für IL-12p35	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Assay on demand Hs00233688_m1 für IL-12p40	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Assay on demand Hs99999909_m1 für HPRT	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Reverse Transkriptase (M-MLV 200 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, Germany
Primer für CD3, IL-10, IL-1b, IFN-γ und TNF-α	Tib Molbiol, Berlin, Germany
Sonden für CD3, IL-10, IL-1b, IFN-γ und TNF-α	Metabion, Martinsried, Germany
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim, Germany
Salzsäure 2 M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
TaqMan® Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Trishydroxymethylaminomethan-Base (Tris-Base)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Ultrapure dNTP Set (100 mM)	Amersham, Uppsala, Schweden
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Germany

2.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.6.1 Geräte

ABI PRISM [®] 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Blockthermostat, Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany
FACS-Scan	Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Färbeküvette n. Hellendahl	Roth, Karlsruhe, Germany
Kyrostat Jung frigocut 2800N	Leica, Wetzlar, Germany
Mikroskop	Olympus, Hamburg, Germany
Minishaker	IKA, Staufen, Germany
Schüttler	IKA, Staufen, Germany
Heraeus Tiefkühlgerät – 80 °C	Heraeus, Hanau, Germany
Kühl-/Gefrierkombination bis – 20 °C	Liebherr, Ochsenhausen, Germany
Ultra Turrax T25	IKA, Staufen, Germany
Wägelchen	IKA, Staufen, Germany
Zählkammer	Olympus, Hamburg, Germany
Zentrifuge MR22 und A14	Jouan, Unterhaching, Germany

2.6.2 Verbrauchsmaterialien

Cover Plates	Thermo-Shandon, Frankfurt, Germany
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe, Germany
Einbettmedium (Tissue Tek)	Sakura, Finetek, USA
Verdünnungsmadum für Antikörper	Dako, Hamburg, Germany
Lithium-Heparin Monovette	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
Invisorb [®] RNA Kit II	Invitek, Berlin, Germany
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt, Germany
RNA 6000 Ladder	Ams Biotechnology, Frankfurt, Germany
RNA 6000 Nano Chip Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Germany
Kit « Simultest IMK Lymphocyte »	Becton Dickinson, Heidelberg, Germany
Micro Amp [™] 96 well tray	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Micro Amp [™] base holder	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Micro Amp [™] optical caps	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Micro Amp [™] tubes 0,2 ml	Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
Reaktionsgefäße 1,5/2ml	Eppendorf, Hamburg, Germany
Super Frost [®] /Plus Objektträger	Menzel Glas, Braunschweig, Germany

2.7 Lösungen

DEPC-H₂O

1 ml DEPC

mit Aqua dest auf 1 Liter auffüllen.

FACS-Puffer

20 g FBS

1 g NaAcid

Diese Chemikalien in PBS lösen und auf 1 Liter auffüllen.

Hexazotierte Astraneufuchsin-Entwicklungslösung

Tris-Puffer für Entwicklungslösung:

0,98 g Tris-Base

0,3 g Tris-HCl

1,74 g Natriumchlorid

Diese Chemikalien in destilliertem Wasser lösen und mit destilliertem Wasser auf 200 ml auffüllen.

Lösung A:

62,5 ml Propandiol-Stammlösung

175,0 ml Tris-Puffer

100 mg Levamisol

Die Chemikalien mischen.

Lösung B:

125 mg Naphtol AS-BI Phosphat

1,5 ml DMF

Das Naphtol im DMF unter dem Abzug lösen.

Lösung C:

50 mg Natriumnitrit

1250 µl destilliertes Wasser

500 µl Neufuchsin-Stammlösung

Das destillierte Wasser tropfenweise zu dem Natriumnitrit geben und es darin lösen. Das Neufuchsin langsam hinzugeben.

Nun wird Lösung C zu Lösung A gegeben, gerührt, und anschließend Lösung B hinzugegeben. Der pH-Wert wird mit 2 M Salzsäure auf 8,8 eingestellt. Die Lösung wird filtriert und sofort verwendet.

Die Arbeiten werden unter dem Abzug durchgeführt.

Lösung D

0,7 % Natriumcitrat-2-Hydrat
47 % Guanidinium-Isothiozyanat
0,5 % N-Laurosyllacrosine
pH-Wert auf 7,0 einstellen.

Lysispuffer

100 µl Lösung D
7 µl 2-Mercaptoethanol

Mayers saures Hämalaun

1,0 g Hämatoxilin
0,2 g Natriumjodat
50 g Kalialaun
50 g Chloralhydrat
1,0 g Citronensäure

Hämatoxilin, Natriumjodat und Kalialaun werden in 1 Liter destilliertem Wasser über Nacht gelöst. Chloralhydrat und Citronensäure werden zu den bereits gelösten Substanzen hinzugegeben und ebenfalls über Nacht gelöst. Diese Lösung muss eine Woche reifen. In einer dunklen Flasche ist sie bei Raumtemperatur lagerfähig, muss jedoch vor Gebrauch filtriert werden. Sie kann mehrfach verwendet werden.

Neufuchsin-Stammlösung

5,0 g Neufuchsin

werden in 100 ml 2 M Salzsäure schrittweise auf dem Schüttler gelöst. Lösung wird bei 4 °C in einer dunklen Flasche gelagert.

Propandiol-Stammlösung 0,2 M

21 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol

werden in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst. Lagerung erfolgt bei 4 °C in einer dunklen Flasche.

Tris-gepufferte-Saline (TBS, 0,05 M)

Ansatz für fünf Liter:

4,50 g Tris-Base

34,25 g Tris-HCl

43,90 g NaCl

Die Chemikalien in destilliertem Wasser lösen, mit destilliertem Wasser auf 5 Liter auffüllen und den pH-Wert mit 2 M Salzsäure oder mit 2 M Natriumhydroxid auf 7,4 - 7,6 einstellen.

2.8 Software

Benutzte Software: Microsoft™ Office 2000, Microsoft™ SPSS, Macintosh CellQuest, Macintosh 2100 Expert und Macintosh Sequenz Detector v.1.6.3.

2.9 Durchflusszytometrie peripherer mononucleärer Zellen (PBMC)

Zellen besitzen Oberflächenmoleküle, die über monoklonale Antikörper identifiziert werden und damit auch bestimmten Zellentwicklungen zugeordnet werden können. Monoklonale Antikörper, die gleiche Oberflächenstrukturen erkennen, werden in internationalen Workshops einem „Cluster of Differentiation“ (CD) zugeordnet. Die Entwicklung der monoklonalen Antikörper zusammen mit der Durchflusszytometrie hat es ermöglicht, in großem Umfang die Lymphozyten anhand ihrer Oberflächenantigene (CD) weiter in T-, B- und NK-Zellen zu unterteilen und von diesen Hauptuntergruppen weitere Subpopulationen zu definieren (Sack *et al.* 2000; Pechhold *et al.* 1994). In der Durchflusszytometrie können auf der Grundlage der

Lichtstreuung und der Fluoreszenzeigenschaften bis zu vier verschiedene Fluorochrome für die Messung von Tausenden von Einzelzellen verwendet werden. Hierzu werden die eingesetzten Antikörper mit verschiedenen Fluorochromen gekoppelt. Die Probenflüssigkeit wird im Durchflusszytometer durch eine Kapillare gepumpt, wobei ein Strom von Einzelzellen entsteht. Dieser wird von einem Laser erfasst. Die entstehende Lichtstreuung ist abhängig von den physikalischen Eigenschaften der einzelnen Zellen. Die über die Antikörper an die Zellen gebundenen Fluorochrome absorbieren einen Teil des Lichtes und emittieren in einer anderen, spezifischen Wellenlänge. Sowohl das gestreute als auch das emittierte Licht wird von Photodetektoren gemessen. Das Vorwärtsstreulicht FSC (forward light scatter) ist abhängig von der Größe der einzelnen Zellen, das Seitwärtsstreulicht SSC (side light scatter) wird hingegen von der Granularität der Zelle bestimmt. Die Fluorochrome können aufgrund überlappender Absorptionsspektren alle durch einen Argonlaser im Wellenbereich von 488 nm angeregt werden. Durch verschiedene Emissionsmaxima ist mit Hilfe eines Filtersystems eine separate Auswertung der einzelnen Fluoreszenzen (Fluoresceinisothiocyanat (FITC) 525 nm, Phycoerythrin (PE) 578 nm, Allophycocyanin (APC) 660 nm und Peridin chlorophyll protein (PerCP) 680 nm) und damit eine gleichzeitige Bestimmung der Antigene möglich (Pechhold *et al.* 1994, Sack *et al.* 2000).

In dieser Arbeit sind Antikörper, die folgende Oberflächenmoleküle kennzeichnen, verwendet worden:

4. Tabelle: Oberflächenantigene mit der Zuordnung zu Lymphozytensubpopulationen

Oberflächenantigen	Lymphozytensubpopulation
CD3	Identifizierung reaktiver T-Zellen
CD4	Identifizierung von T-Helfer-Zellen
CD8	Identifizierung zytotoxischer T-Zellen
CD45RA	Identifizierung naiver T-Zellen
CD45RO	Identifizierung von T-Zellen mit Antigenkontakt (memory T-Zellen)
HLA-DR	Aktivierungsmarker für Lymphozyten

Da sich die CD3-positiven Zellen (CD3+) noch einmal aufteilen in CD4-positiven (CD4+) und CD8-positiven Zellen (CD8+), wurden von den CD3+ die CD4-negativen (CD4-) abgezogen, um die CD8+ Zellen zu ermitteln, d. h. die CD8+ Zellen sind nicht

gefärbt worden, sondern mit Hilfe des Softwareprogramms CellQuest ermittelt worden.

2.9.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Lymphozyten-Subpopulationen

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Oberflächen- und intrazellulären Antigene auf Leukozyten werden monoklonale Antikörper (mouse-anti-human) verwendet. Die Antikörper werden zur Färbung der isolierten Zellen mit den Farbstoffen Phycoerythrin, Fluoresceinisothiocyanat, Peridin chlorophyll protein oder Allophycocyanin konjugiert. Diese Farbstoffe können aufgrund ihrer überlappenden Absorptionsspektren im gleichen Wellenbereich durch einen Argonlaser bei 488 nm angeregt werden. Sie zeigen aber unterschiedliche Emissionsmaxima, so dass eine getrennte Auswertung der Fluoreszenzintensitäten und damit eine simultane Bestimmung verschiedener Antigene möglich werden. Die monoklonalen Antikörper, die zur Untersuchung von Oberflächen- und intrazellulären Antigenen genutzt werden, sind spezifisch für folgende Antigene:

5. Tabelle: Antikörpermarkierungen für die Durchflusszytometrie

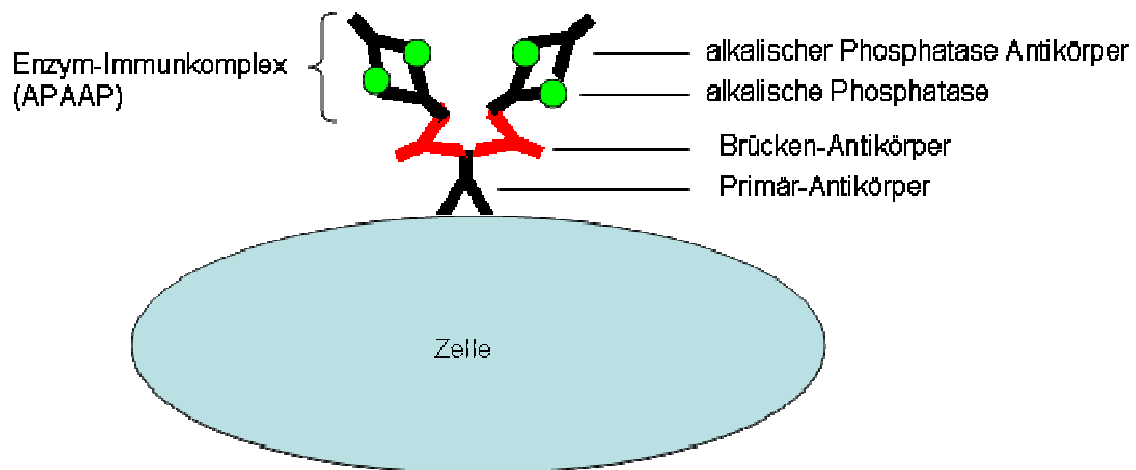
Markierung: Färbung:	FITC	PE	PerCP	APC
1	HLA-DR	CD62-L	CD3	CD4
2	CD45RO	CD62-L	CD3	CD4
3	CD45RA	CD62-L	CD3	CD4

Zur Messung mit dem FACS-Scan werden zuerst die benötigten Antikörper zusammengegeben (siehe Tabelle oben). Dazu werden jeweils 5 µl des Antikörpers in ein Röhrchen pipettiert. Anschließend werden 100 µl heparinisiertes Vollblut dazugegeben, vorsichtig gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden 2 ml der Lysing-Solution, die zuvor 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde, dazugegeben, gemischt und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend bei 300 g für 5 Minuten bei 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgezogen und verworfen, zum Sediment werden 2 ml FACS-Puffer gegeben, vorsichtig vermischt und erneut für 5 Minuten bei 300 g

und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgezogen und verworfen, zum Sediment werden 0,5 ml FACS-Puffer gegeben, vermischt, im FACS-Scan gemessen und anschließend mit dem Programm CellQuest ausgewertet. Die Auswertung erfolgt in % der positiv gefärbten Lymphozyten (45 % CD45RO+ CD8+ Lymphozyten heißt, dass 45 % der CD8+ Lymphozyten auch CD45RO+ sind).

2.10 Immunhistologie

Die Immunhistologie dient der Erkennung spezifischer Antigenkomponenten über die Bildung einer Antigen-Antikörper-Reaktion im mikroskopischen Bild. Bei der hier verwendeten APAAP-Methode (alkalische-Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase-Methode) wird der für das markierte Antigen spezifische Primär-Antikörper indirekt über eine Kopplung mit dem Enzym alkalische Phosphatase und anschließender Substratreaktion sichtbar gemacht, gleichzeitig erfolgt eine Signalverstärkung durch die eingesetzten Brückenantikörper. Hierbei wird ein farbloses Chromogen in ein farbiges Enzymprodukt umgesetzt.



4. Abbildung: Schematischer Aufbau des Antikörperkomplexes bei der Immunhistologie.

Bei diesem Verfahren werden drei verschiedene Antikörper eingesetzt: der Primär-Antikörper, der sich gegen das spezifische Antigen richtet, der Brücken-Antikörper, der sich gegen das Immunglobulin der Spezies richtet, aus der der Primär-Antikörper und der im Enzym-Immunkomplex verwendete Antikörper stammt, und dem APAAP-Komplex, hier aus der Maus.

2.10.1 Immunhistologische Auswertung von Hautbiopsien vor und nach der Therapie

Zur immunhistologischen Auswertung der Hautbiopsien werden mit Hilfe des Kryostaten bei - 27 °C 4 µm dünne Gefrierschnitte von der Probe angefertigt und auf Super Frost[®]/Plus-Objektträger gezogen. Für jeden Patienten wird je ein Schnitt jeder vorhandenen Biopsie (maximal drei von Tag 0, Tag 14 und Tag 28) auf einen Objektträger gezogen, damit die Schnitte der verschiedenen Biopsien gleich behandelt werden. Die Schnitte werden offen bei Raumtemperatur 2 Stunden luftgetrocknet, anschließend erfolgt eine 10-minütige Fixierung in - 20 °C kaltem Aceton. Hiernach können die Schnitte bei - 20 °C gelagert werden oder direkt in der Immunhistologie eingesetzt werden. Bei Lagerung erfolgt am Tag der Immunhistologie eine weitere Fixierung bei - 20 °C in Aceton für 10 Minuten. Nach der Fixierung werden die Schnitte kurz trocknen gelassen und mit TBS auf Cover-Plates aufgezogen. Auf jeden Objektträger werden 100 µl 5%iges Magermilchpulver in TBS zum Blocken gegeben, d. h. unspezifische Bindungen zwischen Gewebekomponenten und dem primären Antikörper werden verhindert, wodurch die unspezifische Hintergrundfärbung minimiert wird. Es folgt ein Waschgang, bei dem auf jeden Objektträger für 3 Minuten ausreichend TBS (500 µl) gegeben wird. Anschließend wird für 30 Minuten mit 100 µl der primären Antikörperverdünnung inkubiert. Hierfür wird für die Antikörper CD3, CD4, CD8, CD20, HLA-DR, CD45RO, CD62-P und -E jeweils eine Verdünnung von 1: 1000, für den Antikörper CD62-L eine Verdünnung von 1: 500, eingesetzt. Zur Verdünnung der Antikörper wird das Verdünnungsmedium eingesetzt.

Als Negativ-Kontrolle wird auf einem Objektträger für 30 Minuten mit Verdünnungsmedium inkubiert.

Danach wird fünfmal für 3 Minuten mit 500 µl TBS gewaschen. Es folgt die 30-minütige Inkubation mit dem Brücken-Antikörper. Hierzu werden auf jeden Objektträger 100 µl des Antikörpers Kaninchen gegen Maus IgG in einer Verdünnung von 1: 40 gegeben. Anschließend wird dreimal für 3 Minuten mit 500 µl TBS gewaschen. Hinterher wird für 30 Minuten mit 100 µl des APAAP-Komplexes ebenfalls in der Verdünnung 1: 40 inkubiert. Nun wird dreimal für 3 Minuten mit 500 µl TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Brücken-Antikörper wird für 10 Minuten wiederholt, danach dreimal für 3 Minuten mit TBS gewaschen. Ebenso wird die Inkubation des APAAP-Komplexes für 10 Minuten wiederholt, es folgt ein

weiterer Waschgang. Die Objektträger werden nun aus den Cover-Plates ausgespannt und in eine Färbeküvette nach Hellendahl mit TBS überführt. Zur Entwicklung wird die Küvette für 30 Minuten mit hexazotierter Astraneufuchsin-Entwicklungslösung auf den Schüttler gestellt. Eine leere Küvette dient dabei als Gegengewicht. Danach wird fünfmal mit TBS gewaschen. Es erfolgt eine Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun für 60 Sekunden. Die anschließende Spülung mit TBS erfolgt so lange, bis die Blaufärbung in der Lösung verschwunden ist. Die Schnitte werden nun mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt und können so bis zur Auszählung bei Zimmertemperatur gelagert werden.

Die Auszählung der positiv gefärbten Zellen erfolgt mit Hilfe einer Zählkammer bei einer Vergrößerung von 1:40 unter dem Mikroskop. Die Bestimmung der Fläche erfolgt ebenfalls mit Hilfe der Zählkammer, jedoch bei einer Vergrößerung von 1:20.

2.11 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR beruht auf einer *in-vitro*-Vervielfachung eines definierten DNA-Abschnitts. Durch Temperaturerhöhung wird die DNA zunächst in Einzelstränge aufgespaltet (durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen) und denaturiert. Hierdurch liegt die DNA in ihrer Primärstruktur vor. Anschließend werden durch Zugabe spezifischer Primer die zu vermehrenden DNA-Abschnitte flankiert. Die Bindung der Primer an die DNA erfolgt bei einer Temperatur, die abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) des Primers ist, bei der noch keine Wiederzusammenlagerung der beiden Einzelstränge stattfindet. Der an die DNA gebundene Primer dient mit seiner 3'OH-Gruppe als Erkennungssequenz für die hitzestabile DNA-Taq-Polymerase, die nun die Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges katalysiert. In einem zweiten Zyklus (Denaturierung und Abkühlung) kann ein Primer nun am komplementären Strang des anderen DNA-Fragments binden. Die anzureichernde DNA-Sequenz wird vom 5'-Ende des Primers begrenzt. Durch wiederholtes Durchlaufen des Temperaturzykluses kommt es jedes Mal zu einer Verdopplung der DNA-Stücke, die durch den Primer flankiert werden. So kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung dieser DNA-Fragmente, und es kann genetisches Material, welches nur in Spuren vorhanden ist, mit Hilfe der PCR einer molekularbiologischen Analyse zugänglich gemacht werden.

2.11.1 RNA-Gewinnung aus den Hautbiopsien

Zur RNA-Gewinnung werden die geteilten Stanzbiopsien im gefrorenen Zustand mit Hilfe des Ultra Turrax T25 und 0,5 ml Lysispuffer homogenisiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Probe nicht erwärmt wird (Eisbad). Zur RNA-Isolierung wird das RNA-Isolationskit von Invitex verwendet. Die Zentrifugationen erfolgen alle bei 14000 rpm und 4 °C.

Das lysierte Gewebe wird mehrfach auf- und abpipettiert, bis die Viskosität sinkt. Danach wird das Gewebe 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Der Lyseansatz wird gemischt, es werden 30 µl Adsorbin zur Bindung der DNA hinzugegeben und für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für 1 Minute zentrifugiert. DNA und Adsorbin befinden sich im Pellet, der Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es werden 500 µl DEPC-Wasser-gesättigtes Phenol, 50 µl Buffer A und 100 µl Chloroform hinzugegeben, gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für 10 Minuten zentrifugiert. Die Probe wird nicht zurück ins Eisbad gestellt, stattdessen wird die wässrige Oberphase vorsichtig abgenommen, wobei eine etwa 2 mm hohe Schicht über der Interphase stehen bleibt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wird. Es werden 2 µl Glycogen als Fällungshilfe dazugegeben und gevortext. Isopropanol wird im gleichen Volumen hinzugegeben und für eine Stunde bei –20 °C zur RNA-Fällung (Präzipitation) inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 10 Minuten. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen, das RNA-Pellet wird zweimal mit 1 ml –20 °C kaltem, 75%igem Ethanol gewaschen, jeweils 5 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen und verworfen. Abschließend wird das Pellet für etwa 2 Minuten bei 60 °C getrocknet und dann in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

2.11.2 RNA-Qualitäts- und Quantitätsbestimmung

Die RNA-Qualitäts- und Quantitätsbestimmung erfolgt mittels des 2100 Bioanalyzers von Agilent Technologies und der dazugehörigen Software 2100 Expert. Es wird hierzu auf den RNA 6000 Nano LabChip[®] jeweils 9 µl Gel-dye-Mix und 1 µl Probe bzw. RNA 6000 ladder (Leiter) aufgetragen. Zur Reduzierung der Sekundärstrukturen wird zuvor sowohl die Probe, als auch der RNA 6000 ladder 2 Minuten auf 70 °C erhitzt.

2.11.3 Synthese der cDNA

Vor dem Umschreiben der RNA in cDNA (copy-DNA) muss ein DNase-Verdau durchgeführt werden, um eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA auszuschließen. Das Umschreiben der mRNA in cDNA (reverse Transkription) erfolgt mit Hilfe der reversen Transkriptase. Hierzu wird der Ansatz für die reverse Transkription mit der DNase gebildet, das Enzym Reverse Transkriptase jedoch bis nach dem abgeschlossenen DNA-Verdau nicht hinzugegeben. Es werden 8 µl 5 x First Stand Buffer, 4 µl DTT, 4 µl dNTP's, 2 µl OdT-Primer (pd(T)₁₂₋₁₈-5'PO₄), 1 µl RNase Inhibitor und 2 µl DNase gemischt und zur eluierten RNA hinzu gegeben und für 30 Minuten im Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um die DNase zu inaktivieren und die Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen, und danach sofort auf Eis gelagert. Als Qualitätskontrolle wird eine PCR mit der isolierten RNA und dem Housekeeping-Gen „hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase-1“ (HPRT) gemacht. Lässt sich HPRT exprimieren, ist das ein Zeichen dafür, dass noch genomische DNA vorhanden ist. Hierzu wird folgender PCR-Ansatz (25 µl) gebildet: 1 µl RNA-Lösung, 17,8 µl Reinstwasser, 2,6 µl 10 x PCR Buffer II; 1,5 µl MgCl₂, 1 µl Primermix (HPRT vorwärts und rückwärts 10 µM), 1 µl dNTP's, 0,1 µl DNA-Polymerase und nach folgendem PCR-Protokoll amplifiziert:

6. Tabelle: PCR-Protokoll zur RNA-Kontrolle

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung	Zurück zu Schritt
1. Denaturierung	94 °C	5 Minuten	1 x	
2. Denaturierung	94 °C	15 Sekunden	35 x	
3. Hybridisierung	68 °C	15 Sekunden		
4. Elongation	72 °C	15 Sekunden		2. Denaturierung
5. Hybridisierung	68 °C	15 Sekunden	1 x	
6. Polymerisation	72 °C	5 Minuten	1 x	
Ende	4 °C	∞	1 x	

Es wird eine Positiv-Kontrolle mitlaufen gelassen, die statt RNA ein DNA-Kontrollfragment von 438 bp enthält, sowie eine Negativ-Kontrolle mit Reinstwasser. Die Auswertung erfolgt wie die Qualitätsbestimmung der RNA mit Hilfe des Agilent-2100-Bioanalysers (s. 2.11.2).

Ist keine genomische DNA nachzuweisen, wird 1 µl Reverse-Transkriptase und 1 µl RNase-Inhibitor zum RNA-Ansatz hinzugegeben, gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert, damit die Reverse-Transkriptase die DNA-Kopie der mRNA ausgehend vom Primer herstellt. Zur Unterbrechung der Reaktion wird der Ansatz für 8 Minuten auf 95 °C erhitzt, für 3 Minuten auf Eis gestellt, kurz zentrifugiert und wird dann bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

Die Qualitätskontrolle der gebildeten cDNA erfolgt wieder über eine PCR mit dem Housekeeping-Gen HPRT. Als Kontrolle dient ein Ansatz mit dem bekannten DNA-Fragment. Die Banden der beiden Ansätze sollten gleich stark sein. Für die Effizienzbestimmung werden PCRs mit unterschiedlichen Zyklenzahlen (15, 20, 25, 30) durchgeführt. Es wird das gleiche PCR-Protokoll und die gleiche Auswertung verwendet wie oben.

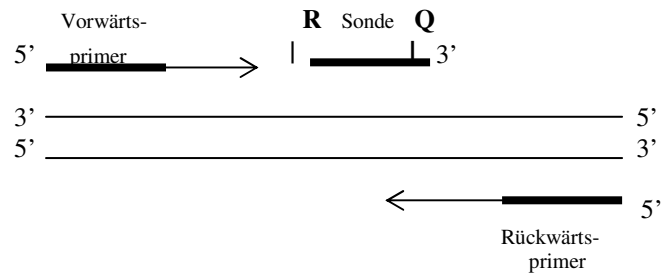
2.11.4 Quantitativer Nachweis der Expression von Zytokin mRNA (mittels Real-Time-PCR oder auch TaqMan PCR)

Für die quantitative Bestimmung der Zytokin-mRNA in den Hautbiopsien wurde die Real-Time-PCR, auch TaqMan-PCR genannt, eingesetzt.

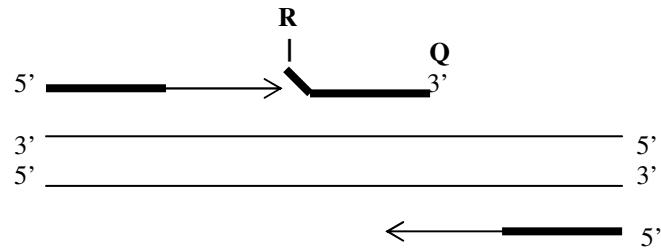
Die TaqMan-PCR beruht auf dem 5'-Nuklease-Assay. Während der PCR wird ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (TaqMan[®]-Sonde, auch Hydrolyse-Sonde), das sich spezifisch an die zu amplifizierende Sequenz bindet, über die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Ampli-Taq[®]-Polymerase gespalten und die freiwerdende Fluoreszenz in Echtzeit mit dem Sequence-Detector gemessen. Dieser stellt eine Kombination aus einem Thermocycler (Gene Amp[®] PCR System 9700), einem Lasersystem (Argonlaser), das mit jedem der Reaktionsgefäße verbunden ist und periodisch die Fluoreszenz misst, und einem integrierten Computer mit einer auf Windows basierenden Software dar.

Die TaqMan[®]-Sonde besteht aus 25 - 30 Oligonukleotiden und ist mit einem Reporter- und mit einem Quencher-Farbstoff markiert. Bei dem fluoreszenzmarkierten Reporter handelt es sich um den Farbstoff 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM), der kovalent an das 5'-Ende des Oligonukleotids gebunden ist. Am 3'-Ende der TaqMan[®]-Sonde befindet sich der Quencher TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin), der in der intakten Probe die Emission der Fluoreszenz des Reporters hemmt. Während der PCR lagert sich die Sonde zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer spezifisch an die zu amplifizierende Sequenz an (siehe 5. Abbildung: Schema TaqMan-PCR). Durch Försters-Energie-Transfer (Förster 1948) wird durch die Nähe des Reporter-Farbstoff zum Quencher-Farbstoff in der intakten Probe die Abgabe der Fluoreszenz gehemmt. Wenn die Taq-DNA-Polymerase während jeder Extensionsphase der PCR auf die hybridisierte Probe trifft, wird der Reporter-Farbstoff von der Probe abgespalten; damit dissoziiert auch die Probe von der Zielsequenz und die Polymerase kann die Zielsequenz weiter synthetisieren. Durch die Trennung des Reporters vom Quencher gibt der Reporter seine charakteristische Fluoreszenz ab. Der Anstieg an Fluoreszenz im Laufe der PCR ist proportional zu der Menge an akkumuliertem Produkt und wird in Echtzeit alle 10 Sekunden aufgezeichnet.

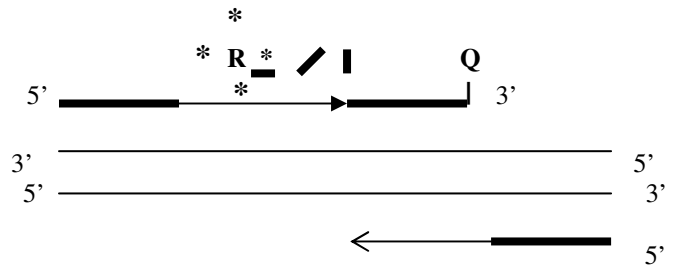
1. Anlagerung der TaqMan-Sonde



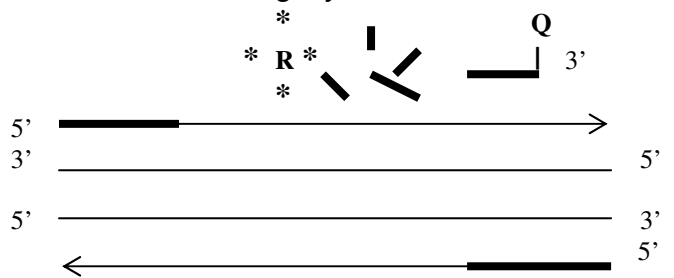
2. Hemmung der Fluoreszenzemission in der intakten Probe



3. Spaltung des Reporter-Farbstoffs



4. Ende der Strang-Synthese, Detektion Fluoreszenzsignal



R = Reporter
Q = Quencher

5. Abbildung: Schema TaqMan PCR (modifiziert aus der Anleitung von Applied Biosystems zur Real-Time-PCR)

Die Spezifität des 5'-Nuklease-Assays beruht darauf, dass die nukleolytische Aktivität der Taq-Polymerase nur zum Tragen kommt, wenn die TaqMan-Sonde aufgrund ihrer Sequenz-Komplementarität spezifisch mit der Zielsequenz hybridisiert. Ein Fluoreszenzsignal wird nur generiert, wenn die Zielsequenz für die Probe in der PCR amplifiziert wird. Bei unspezifischer Amplifikation wird kein Signal generiert. Hinzukommt, dass durch die Messung in geschlossenen Reaktionsgefäßen die Öffnung nicht notwendig ist und damit die Möglichkeit einer Produktkontamination entfällt.

Die Veränderungen in der Intensität der Fluoreszenzemission werden vom Sequence-Detection-System als ein normalisiertes Reportersignal (R_n) nach jedem Zyklus angegeben. Das Reportersignal wird normalisiert, indem die vom Reporter abgegebene Fluoreszenzintensität durch eine passive Referenz dividiert wird. Durch die Anwendung einer kinetischen Analyse kann auf die anfangs vorhandene Menge der Probe geschlossen werden. Das Prinzip ist, dass die anfänglich vorhandene Menge der Probe umso größer ist, je weniger Zyklen für die Generierung eines nachweisbaren Fluoreszenzsignals nötig sind.

Dabei ist der Schwellenzyklus C_T derjenige Zyklus, an dem zuerst ein statistisch signifikanter Anstieg in ΔR_n nachgewiesen wird. Dabei stellt R_n die Differenz des R_n -Wertes einer Reaktion mit allen Reaktionskomponenten, eingeschlossen der Probe, und des R_n -Wertes einer nicht reagierenden Probe dar. Der Sequence-Detector berechnet den C_T , indem in den ersten PCR-Zyklen der durchschnittliche Wert für R_n sowie die Standardabweichung für R_n berechnet wird (meistens repräsentieren die ersten 15 Zyklen diese Grundlinie) und diese dann mit einem adjustierbaren Faktor von 10 multipliziert werden, um einen Schwellenwert zu erhalten. Schließlich wird der Punkt definiert, an dem diese Schwelle überschritten wird. Dieser Schwellenzyklus C_T markiert den Punkt, an dem der Sequence-Detector einen Anstieg am Fluoreszenzsignal assoziiert mit einem exponentiellen Wachstum am PCR-Produkt nachweist. C_T ist abhängig von der anfangs vorhandenen Menge an Kopien sowie der Effizienz der Amplifikation während der PCR und der Spaltung der TaqMan-Sonde (Applied Biosystems, Perkin-Elmer 1998).

Die Primer-Sondensysteme für die Real-Time-PCR wurden für folgende Gene etabliert: CD3, IFN- γ , TNF- α , IL-10 und IL-1 β . Für die Gene IL-12p35, IL-12p40 und HPRT wurden die Assays on demand mit den Assaynummern Hs00168405_m1 für

IL-12p35, Hs00233688_m1 für IL-12p40 und Hs99999909_m1 für HPRT verwendet. Folgende Sequenzen hatten die Primer und die Sonden:

7. Tabelle: Sequenzen der Primer und Sonden

		5'-Ende	3'-Ende
CD3	Sonde	TCA TTA TCG AAT GTG CCA GAG CTG TGT GG	
	FP	AGG ACA AAG AAT CTA CCG TGC AAG	
	RP	TGA CAT CAG TGA CAA TGA TGC CA	
IFN- γ	Sonde	TTT CTG TCA CTC TCC TCT TTC CAA TTC TTC AAA	
	FP	CAG GTC ATT CAG ATG TAG CGG ATA A	
	RP	AGG AGA CAA TTT GGC TCT GCA TT	
TNF- α	Sonde	TGT AGC CCA TGT TGT AGC AAA CCC TCA AGC	
	FP	TCT CGA ACC CCG AGT GAC AA	
	RP	TCA GCC ACT GGA GCT GCC	
IL-10	Sonde	AAA GAA AGT CTT CAC TCT GCT GAA GGC ATC TCG	
	FP	CAA GTT GTC CAG CTG ATC CTT CAT	
	RP	GGC AAC CTG CCT AAC ATG CTT	
IL-1 β	Sonde	ATG GCC CTA AAC AGA TGA AGT GCT CCT TCC	
	FP	GGC AAT GAG GAT GAC TTG TTC TTT	
	RP	GTA GTG GTG GTC GGA GAT TCG TAG	

Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen für das Zielgen und das Housekeeping-Gen angesetzt. Die Bestimmungen zu einer Probe laufen auf derselben 96well-Platte („96er optical well“-Platte). Ansatz pro Well:

8. Tabelle: TaqMan-PCR-Ansatz für selbst etablierte Primer/Sonden

Komponente	Volumen in μ l
2 x Mastermix mit UNG	12,5
5 pM/ μ l TaqMan-Sonde	1,0
30 pM/ μ l Primergemisch (forward/reverse)	6,0
cDNA in Rnase/Dnase-freiem Wasser (1 μ l cDNA + 4,5 μ l Wasser)	5,5
Gesamt	25,0

Ansatz pro Well:

9. Tabelle: TaqMan-PCR-Ansatz für die Verwendung von Assays on demand

Komponente	Volumen in μl
2 x Mastermix mit UNG	12,5
20 x Assays-on-Demand Gene Expression Assay Mix	1,25
cDNA in Rnase/Dnase-freiem Wasser (1 μl cDNA + 10,25 μl Wasser)	11,25
Gesamt	25,0

Die vorverdünnten cDNAs werden in der 96well-Platte mit dem Mix zusammenpipettiert und durch „optical caps“ verschlossen.

Die Real-Time PCR findet im SDS 7700 nach folgendem Ablauf statt:

10. Tabelle: TaqMan PCR-Protokoll für Thermocycler

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung	Zurück zu Schritt
1. Deaktivierung von UNG	50 °C	2 Minuten	1 x	
2. Denaturierung	95 °C	10 Minuten	1 x	
3. Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	45 x	
4. Hybridisierung Elongation	60 °C	1 Minute	45 x	3. Denaturierung

Die hier verwendete 2-Schritt-PCR bietet sich an, da die im Mastermix befindende TaqPolymerase bereits bei Temperaturen von mehr als 55 °C eine signifikante Aktivität besitzt. D. h. Hybridisierung (Anlagerung) und Elongation (Polymerisation) können zusammen bei einem Temperaturschritt ablaufen.

Die relative Quantifizierung erfolgt über die Expression des Zielgens im Vergleich zur Expression des Housekeeping-Gens (HPRT). Der Mittelwert der C_T -Werte aus den Dreifachbestimmungen des Housekeeping-Gens wird von dem Mittelwert der C_T -Werte aus den Dreifachbestimmungen des Zielgens abgezogen (dC_T). Es folgt die Anwendung der Formel

Relative Expression des Zielgenes als:

$$\text{'fold expression of Housekeeping-Gen'} = 2^{-dC_T}$$

Die ‚fold expression‘ wird logarithmisch (log) dargestellt.

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software *Sequenz Detector v.1.6.3* von Macintosh.

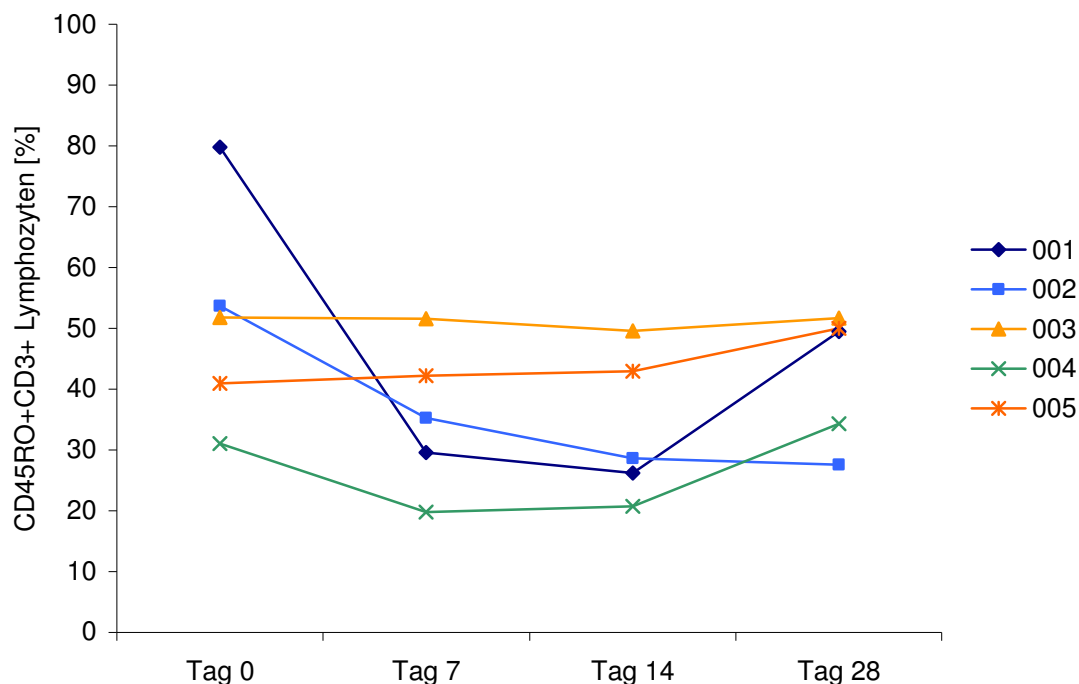
3 Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert mit SEM. Aufgrund des kleinen Patientenpools ($n = 5$), der untersucht worden ist, ist es in den meisten Fällen nicht möglich gewesen, eine statistische Signifikanz nachzuweisen. Bei allen Ergebnissen ist der t-Test für gepaarte Stichproben der Software SPSS 13.0 verwendet worden. Alle statistisch signifikanten Veränderungen werden explizit erwähnt. Die Nennung der einzelnen Patienten erfolgt aufgrund der erforderlichen Anonymisierung nur in Form von Nummern.

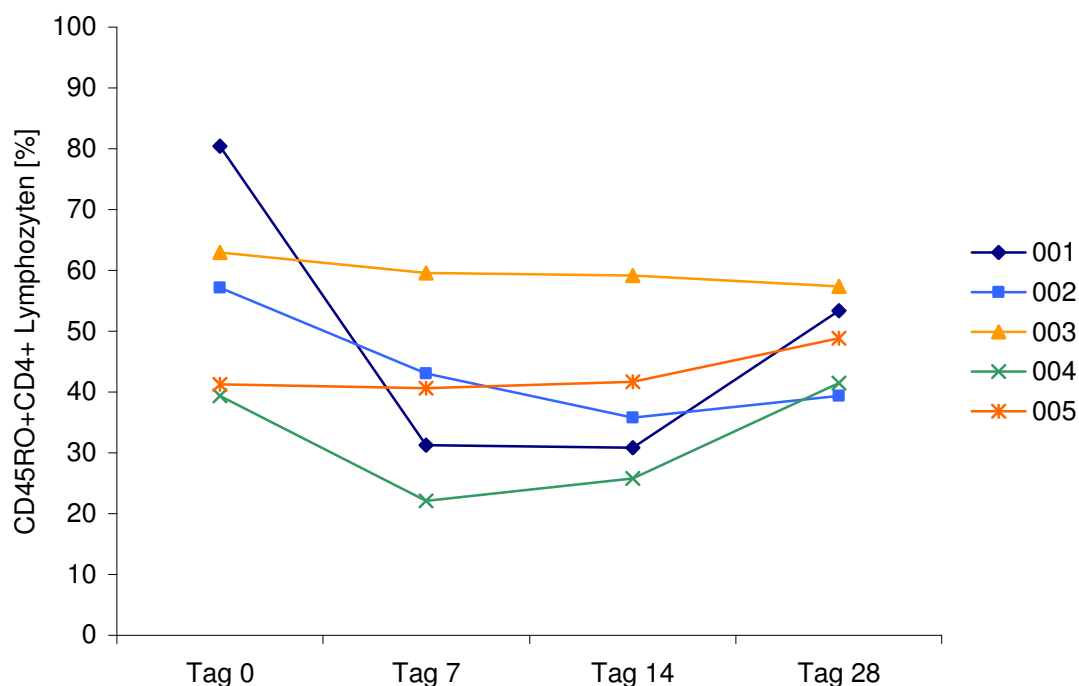
3.1 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

3.1.1 CD45RO-Expression auf T-Zell-Subpopulationen im Verlauf der Therapie mit TBC 1269Z

Betrachtet man die Einzelwerte der Patienten der CD45RO-markierten CD3-positiven Lymphozyten vor und nach der Therapie, so ist eine Abnahme bei vier von fünf Patienten (siehe Diagramm 1) zu beobachten, davon bei einem nur leicht (003). Lediglich bei einem Patienten (005) kam es unter der Therapie mit TBC 1269Z zu einer Zunahme der CD45RO-markierten CD3-positiven Lymphozyten um 4,8 % (von 40,93 % auf 42,9 %). In der Nachbeobachtungsphase stiegen die CD45RO CD3-positiven bei vier der fünf Patienten wieder an (vgl. Diagramm 1).



1. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD45RO auf peripheren CD3-positiven Lymphozyten. Tag 0 = screening Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.

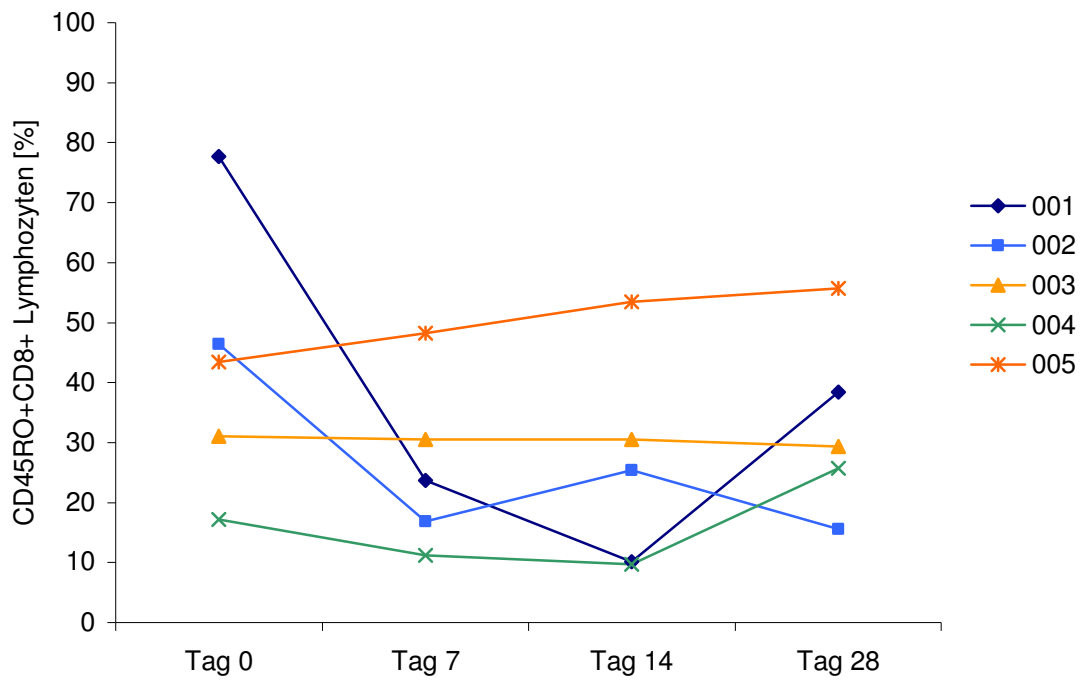


2. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD45RO auf peripheren CD4-positiven Lymphozyten. Tag 0 = screening Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.

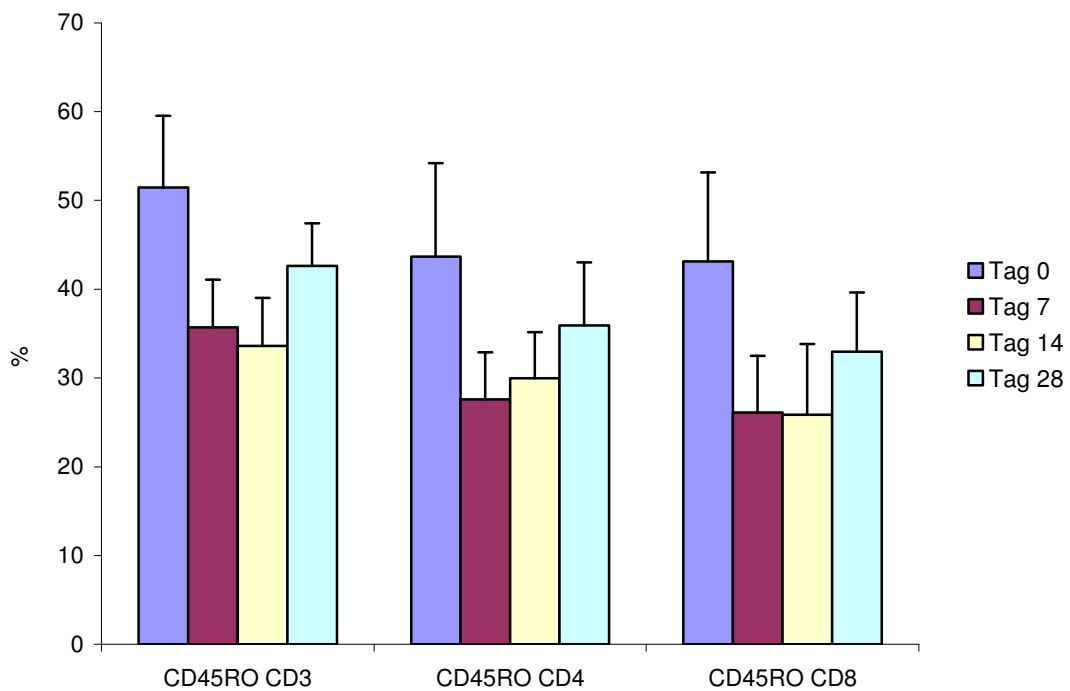
Vergleichbare Ergebnisse liefern die Betrachtungen der Einzelwerte der CD45RO-markierten CD4-positiven Lymphozyten: eine Abnahme der Zellen bei vier von fünf Patienten (001, 002, 003, 004). Bei einem Patienten (005) kam es zu einer minimalen Zunahme um 0,9 % (von 41,3 % auf 41,7 %; vgl. Diagramm 2). Die gleiche Tendenz der Ergebnisse liefern die Einzelwerte der CD45RO-markierten CD8-positiven Lymphozyten. Auch hier zeigte sich eine Abnahme der Zellen bei vier von fünf Patienten (001, 002, 003, 004) und die Zunahme bei einem Patienten (005), allerdings um 23,7 % (von 43,4 % auf 53,4 %; vgl. Diagramm 3).

Unter der Therapie mit TBC 1269Z nahm die Anzahl CD45RO-markierten Lymphozyten durchschnittlich ab. Von Tag 0 (vor Therapie) zu Tag 14 (nach Therapie) betrug die durchschnittliche Abnahme der CD45ROCD3-positiven Lymphozyten 34,65 % (von 51,43 % zu 33,61 %). Die CD45ROCD4-positiven Lymphozyten nahmen um 31,4 % (von 43,69 % zu 29,97 %) und die CD45ROCD8-positiven Lymphozyten um 41,1 % (von 43,14 % zu 25,83 %) ab.

In der Nachbeobachtung an Tag 28 zeigte sich ein Anstieg der CD45RO-markierten CD3-positiven Lymphozyten um 26,8 % auf 42,63 %. Die CD45RO-markierten CD4-positiven Lymphozyten stiegen um 19,9 % auf 35,94 % und die CD45RO-markierten CD8-positiven Lymphozyten um 27,6 % auf 32,95 % (vgl. Diagramm 4).



3. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD45RO auf peripheren CD8-positiven Lymphozyten. Tag 0 = screening Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.



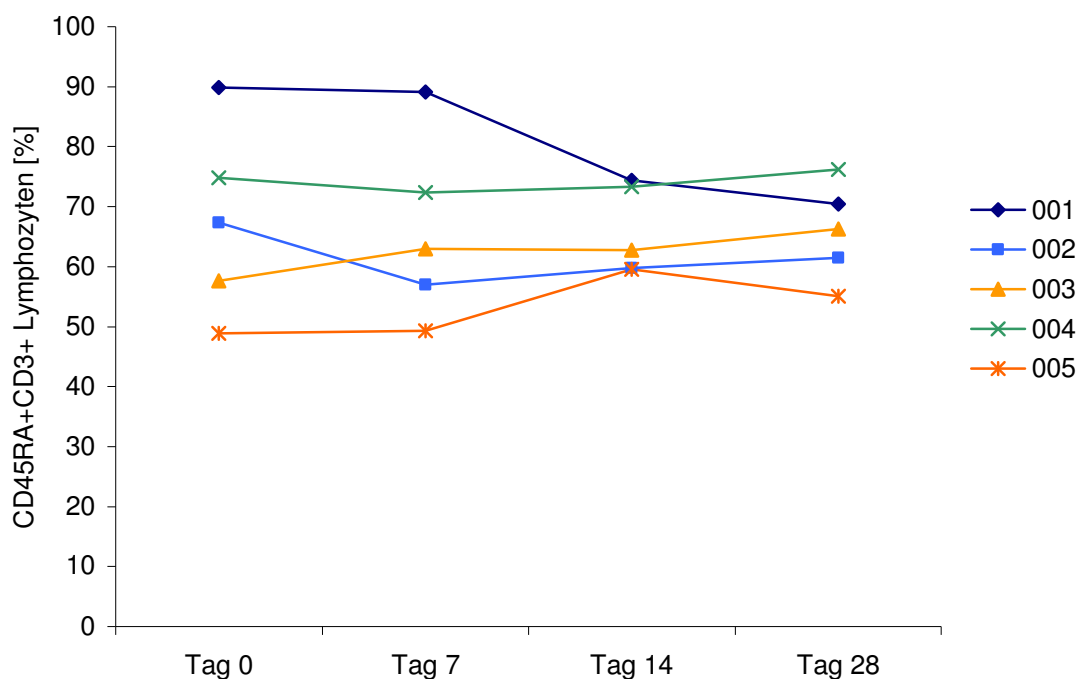
4. Diagramm: Darstellung der CD45RO-markierten CD3-positiven, CD4-positiven und CD8-positiven Lymphozyten unter der Therapie mit TBC 1269Z. Mittelwerte und SEM der Patienten (n = 5) an den Tagen 0 (vor Therapie), 7 (während Therapie), 14 (Ende der Therapie) und 28 (14 Tage nach Ende der Therapie).

3.1.2 CD45RA-Expression auf T-Zell-Subpopulationen im Verlauf der Therapie mit TBC 1269Z

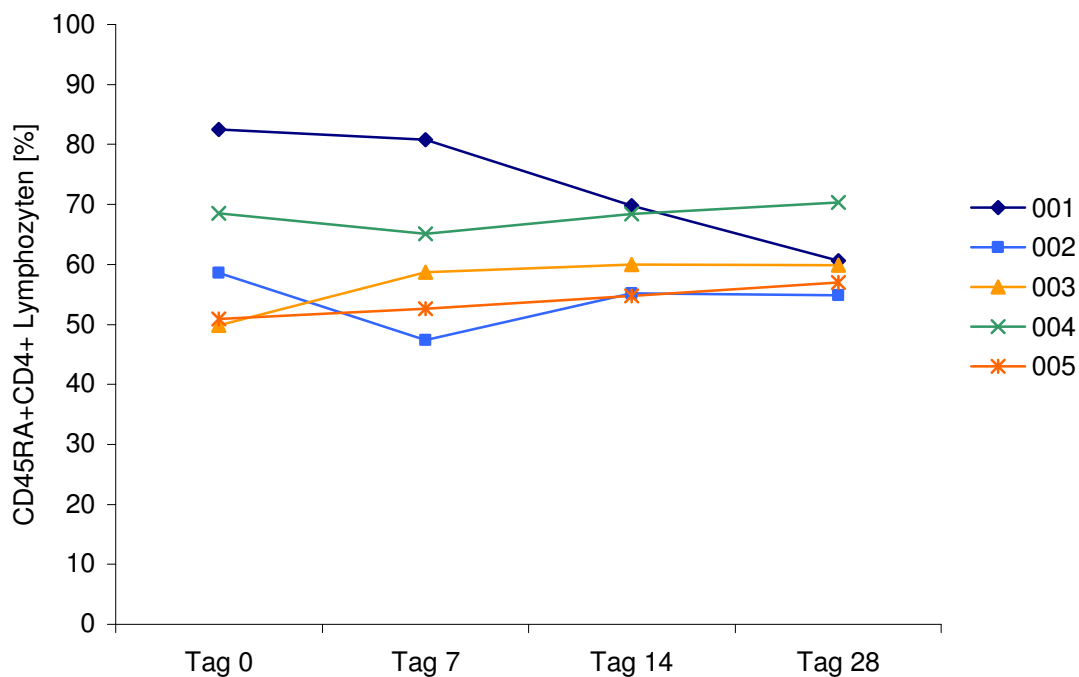
Unter der Therapie mit Bimosiamose disodium war bei drei der fünf Patienten eine Abnahme der CD45RA CD3-positiven Zellen im Blut zu messen. Bei zwei Patienten kam es zu einem leichten Anstieg der CD45RA CD3-positiven Zellen im Blut (003 und 005). Während der Nachbeobachtungsphase kam es bei drei Patienten zu einem Wiederanstieg, bei zwei Patienten zu einer Abnahme der CD45RA CD3-positiven Zellen (vgl. Diagramm 5). Eine sehr ähnliche Tendenz zeigten die Messungen der CD45RA CD4-positiven Zellen im Blut der behandelten Patienten. Unter der Therapie kam es bei drei der fünf Patienten zu einer Abnahme der CD45RA CD4-positiven Zellen, bei zwei zu einer Zunahme. In der Nachbeobachtungsphase fiel der Wert bei drei Patienten ab, bei zwei Patienten stieg er an (vgl. Diagramm 6). Unter der Therapie mit Bimosiamose sind bei allen Patienten die CD45RA CD8-positiven Zellen im Blut reduziert worden, in der Nachbeobachtungsphase sind sie bei vier der fünf Patienten wieder angestiegen (vgl. Diagramm 7).

Bildet man aus diesen Ergebnissen einen Mittelwert, ergibt sich folgendes Bild: unter der Therapie mit TBC 1269Z nahm die Anzahl aller CD45RA-markierten Lymphozyten von Tag 0 (vor Therapie) zu Tag 14 (nach Therapie) ab. Von Tag 14 zu Tag 28 (14 Tage nach Therapie) nahmen die CD45RA CD3- und CD45RA CD4-positiven Lymphozyten weiter ab, bei den CD45RA CD8-positiven Zellen kam es wieder zu einem leichten Anstieg nach der Therapie (vgl. Diagramm 8).

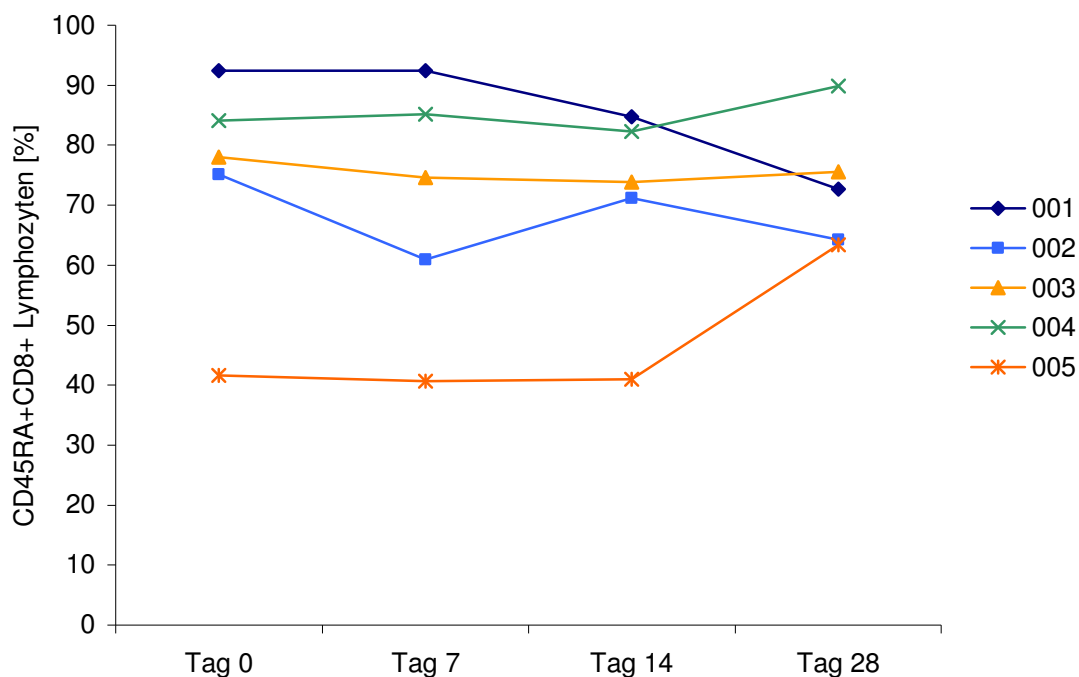
Die Anzahl der CD45RA CD3-positiven Lymphozyten nahm von durchschnittlich 67,68 % auf 65,98 % ab, dies entspricht einer Reduzierung von 2,5 %, ist jedoch nicht statistisch signifikant. Die Anzahl der CD45RA CD4-positiven Lymphozyten sank von durchschnittlich 62,06 % auf 61,62 %, dies entspricht einer nicht signifikanten Reduzierung von 0,7 %. Die Anzahl der CD45RA CD8-positiven Lymphozyten wurde von durchschnittlich 74,27 % auf 70,61 % reduziert, dies entspricht einer Abnahme von 4,9 %. Bei allen fünf Patienten war diese Verringerung zu beobachten. Dies entspricht einem Signifikanzwert von $p = 0,037$ auf (vgl. Diagramm 7).



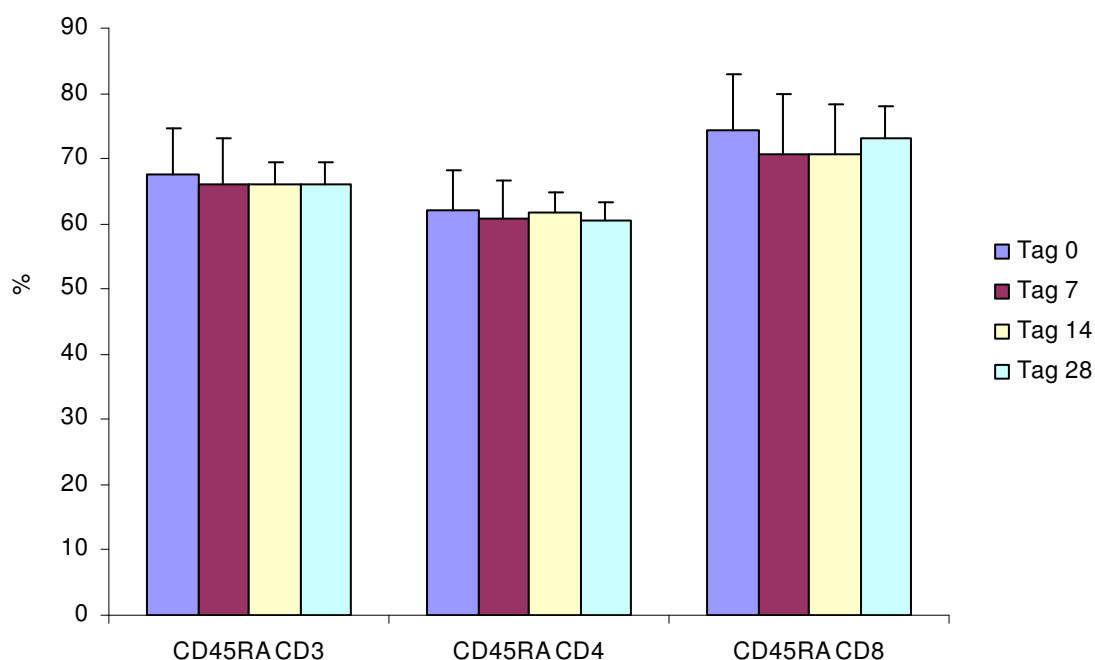
5. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie, von CD45RA+CD3-positiven Lymphozyten. Tag 0 = Screening-Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.



6. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD45RA auf peripheren CD4-positiven Lymphozyten. Tag 0 = Screening-Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.



7. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD45RA auf peripheren CD8-positiven Lymphozyten. Tag 0 = Screening-Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.



8. Diagramm: Darstellung der CD45RA CD3-positiven, CD45RA CD4-positiven und CD45RA CD8-positiven Lymphozyten unter der Therapie mit TBC 1269Z. Mittelwerte und SEM der Patienten (n = 5) an den Tagen 0 (vor Therapie), 7 (während Therapie), 14 (Ende der Therapie) und 28 (14 Tage nach Ende der Therapie) und SEM; statistisch signifikant war die Reduktion von CD45RA CD8 von Tag 0 zu Tag 14 mit $p = 0,037$.

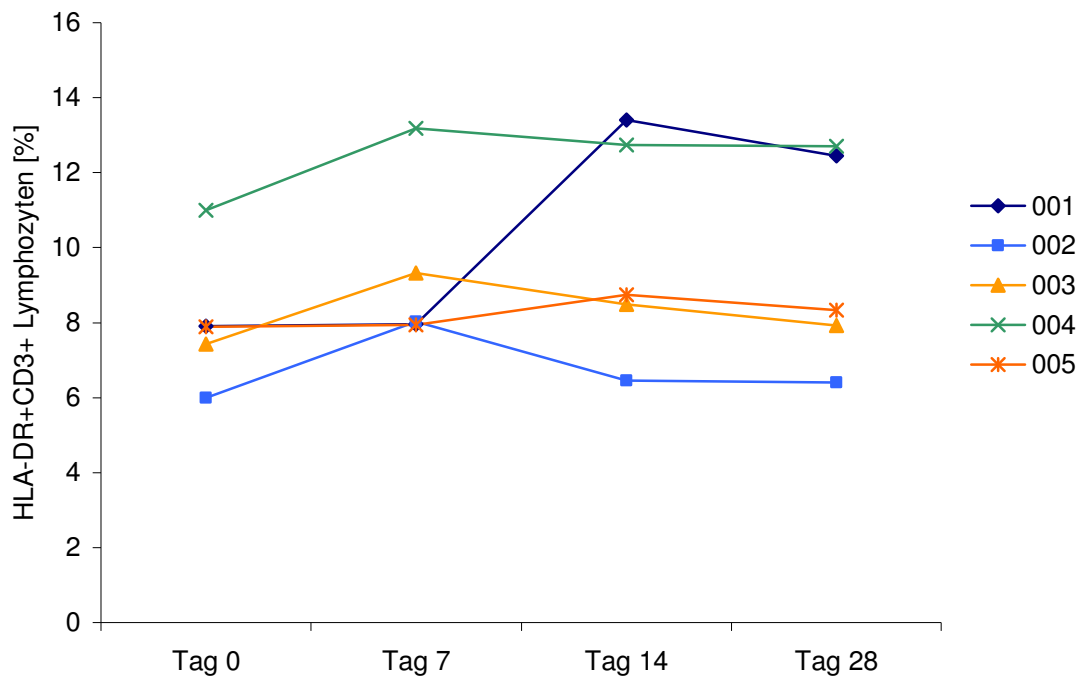
3.1.3 HLA-DR-Expression auf T-Zell-Subpopulationen im Verlauf der Therapie mit TBC 1269Z

Die Anzahl der HLA-DR CD3-positiven Zellen nahm bei allen fünf Patienten unter der Therapie mit Bimosiamose disodium zu. Zu beobachten war bei drei Patienten ein schneller Anstieg innerhalb der ersten 7 Tage der Behandlung mit anschließendem Abfall. Bei zwei Patienten war ein ähnlicher Verlauf zeitverzögert zu beobachten (001 und 005; vgl. Diagramm 9).

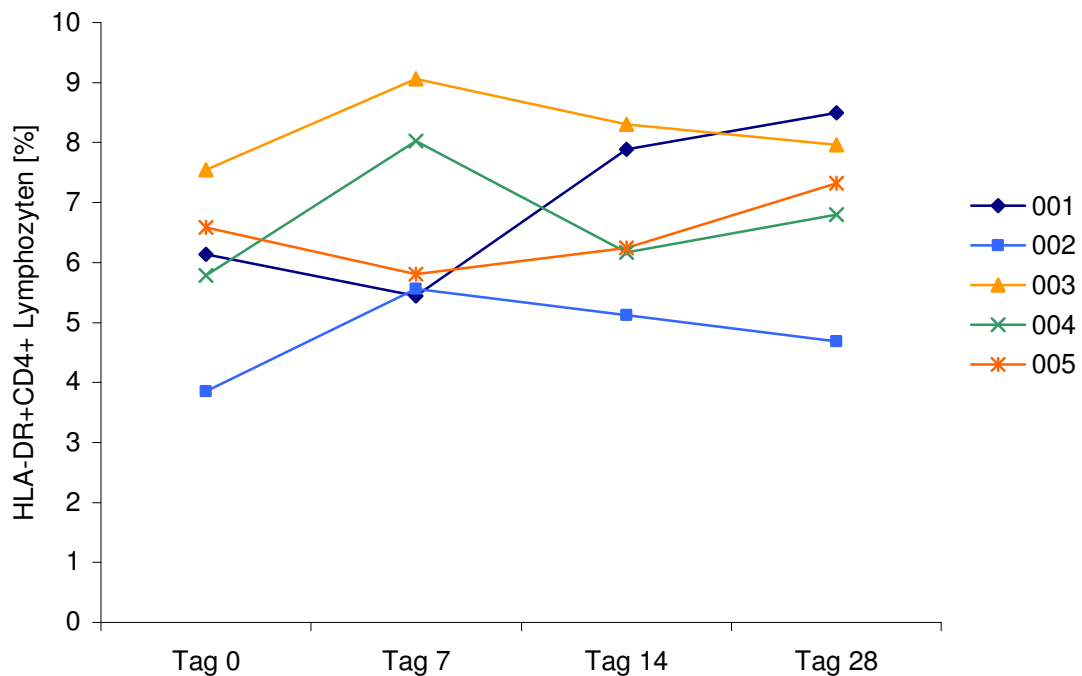
Die HLA-DR CD4-positiven Zellen nahmen unter der Therapie mit Bimosiamose disodium bei vier Patienten zu, bei einem ab (005). Wie schon bei den HLA-DR CD3-positiven Zellen, konnte bei drei Patienten ein schneller Anstieg innerhalb der ersten 7 Tage gemessen werden. Innerhalb der Nachbeobachtungszeit stieg der Wert bei drei Patienten an, bei zwei Patienten nahm er ab (vgl. Diagramm 10).

Die HLA-DR CD8-positiven Zellen nahmen unter der Therapie mit Bimosiamose disodium bei vier der fünf Patienten zu. Davon bei dreien, wie zuvor bei den HLA-DR CD3 und HLA-DR CD4-positiven, relativ schnell (innerhalb der ersten 7 Behandlungstage) und bei zweien zeitverzögert. Insgesamt konnte von Tag 0 zu Tag 14 eine statistisch signifikante Zunahme der HLA-DR CD8-positiven Zellen gemessen werden ($p \geq 0,0469$).

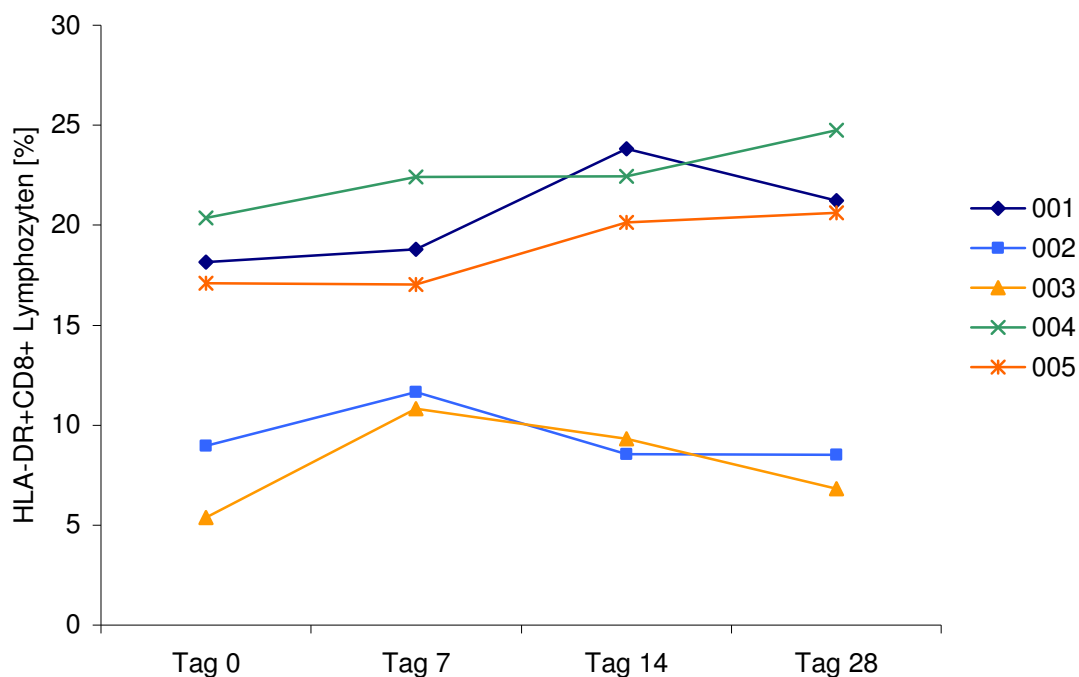
Bei Betrachtung der Mittelwerte sieht man Folgendes: die Anzahl der HLA-DR-markierten Lymphozyten nahm unter der Therapie mit TBC 1269Z zu. Von Tag 0 (vor Therapie) zu Tag 14 (nach Therapie) nahmen die HLA-DR-markierten CD3-positiven Lymphozyten um 24 % (von 8,04 % auf 9,97 %), die CD4-positiven um 12,7 % (von 5,98 % auf 6,74 %) und die CD8-positiven Lymphozyten um 20,5 % zu (von 13,99 % auf 16,86 %, statistisch signifikant mit $p = 0,04639$). In der Nachbeobachtungszeit sanken die CD3-positiven Lymphozyten durchschnittlich von 9,97 % auf 9,56 % um 4,1 %, die CD4-positiven stiegen von 6,74 % auf 7,05 % um 4,6 % und die CD8-positiven fielen von 16,86 % auf 16,39 % um 2,8 % (Diagramm 12). Es gibt nur zwei Einzelwerte, die von dieser durchschnittlichen Entwicklung abweichen. Bei 005 sinken die HLA-DR-markierten CD4-positiven Lymphozyten um 5,2 % von 6,58 % auf 6,24 %, und bei 002 sinken die HLA-DR-markierten CD8-positiven Lymphozyten um 4,4 % von 8,95 % auf 8,56 %; Diagramm 10 und 11).



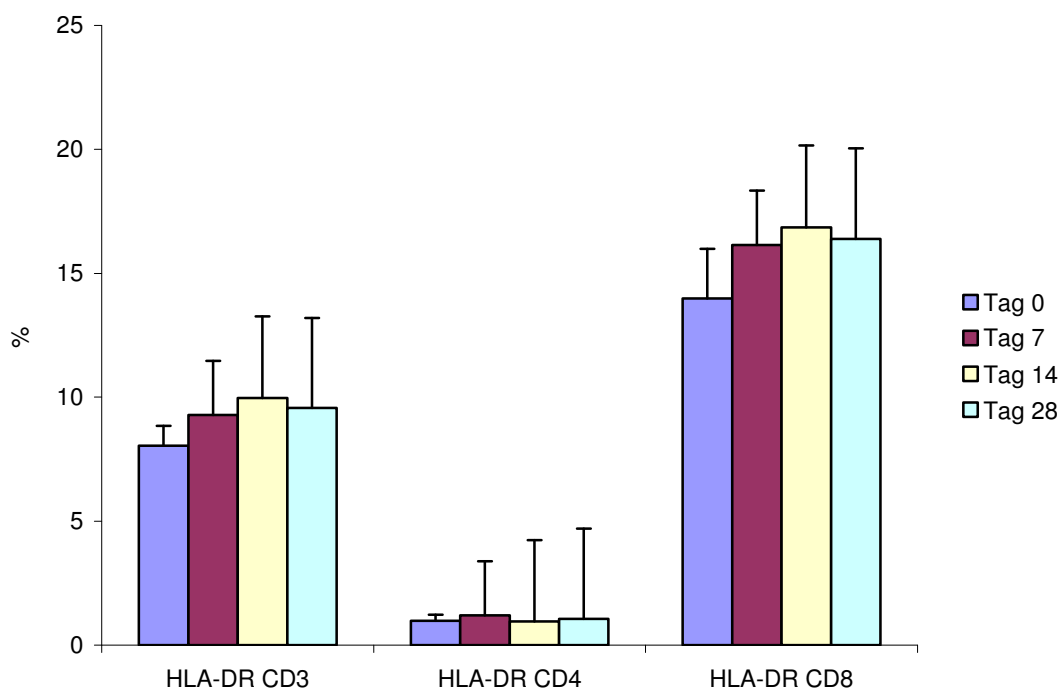
9. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von HLA-DR auf peripheren CD3-positiven Lymphozyten. Tag 0 = Screening-Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.



10. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von HLA-DR auf peripheren CD4-positiven Lymphozyten. Tag 0 = Screening-Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.



11. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von HLA-DR auf peripheren CD8-positiven Lymphozyten. Tag 0 = Screening-Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.

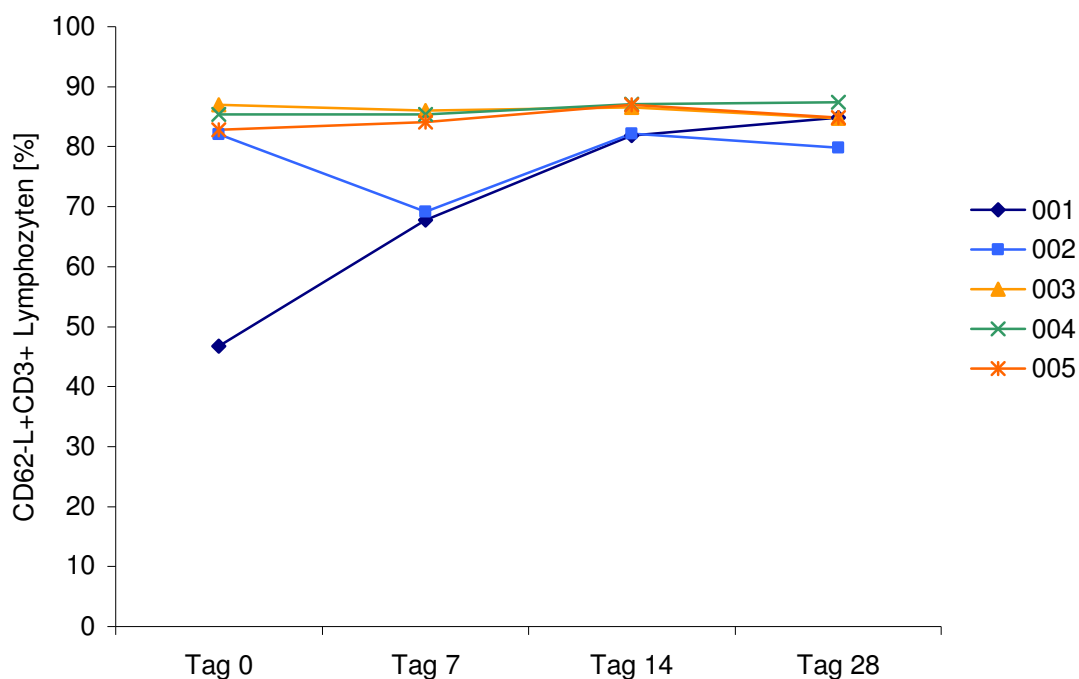


12. Diagramm: Darstellung der HLA-DR-markierten CD3-positiven, CD4-positiven und CD8-positiven Lymphozyten unter der Therapie mit TBC 1269Z. Mittelwerte und SEM der Patienten (n = 5) an den Tagen 0 (vor Therapie), 7 (während Therapie), 14 (Ende der Therapie) und 28 (14 Tage nach Ende der Therapie) und SEM.

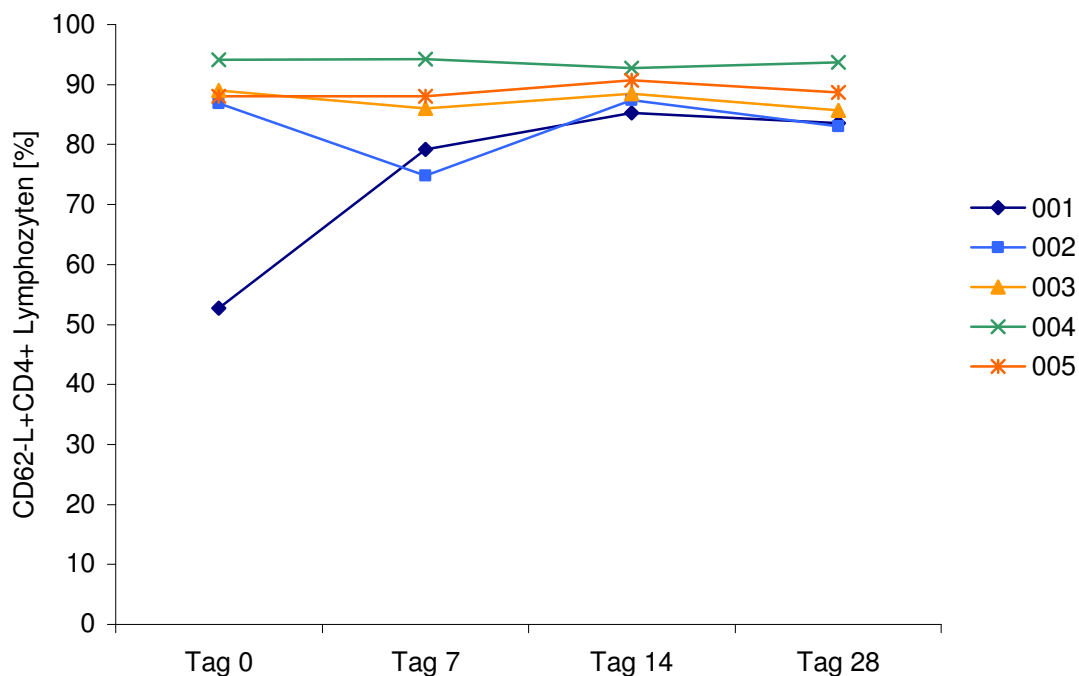
3.1.4 CD62-L-Expression auf T-Zell-Subpopulationen im Verlauf der Therapie mit TBC 1269Z

Betrachtet man die Einzelwerte der Patienten der CD62-L-markierten CD3-positiven Lymphozyten, so ist eine Zunahme bei vier von fünf Patienten (001, 002, 005, 004) zu beobachten. Bei einem Patienten (003) kam es zu einer Abnahme von 0,5 % (von 87,03 % auf 86,59 %; vgl. Diagramm 13). Eine ähnliche Tendenz zeigen die Ergebnisse der Einzelwerte der CD62-L-markierten CD4-positiven Lymphozyten: eine Zunahme war bei vier von fünf Patienten (001, 002, 005, 004) zu beobachten, eine Abnahme bei einem Patienten (003) um 0,7 % (von 89,02 % auf 88,43 %). Bei den Einzelwerten der CD62-L-markierten CD8-positiven Lymphozyten kam es bei drei von fünf Patienten (001, 002, 004) zu einem Anstieg der Zellen um durchschnittlich 18,4 % (von 62,1 % auf 73,5 %). Bei zwei Patienten (003, 005) fielen die CD8-positiven Zellen um 3,2 % (von 77,0 % auf 74,5 %; vgl. Diagramm 15). Der Patient 001 zeigte unter der Therapie mit Bimosiamose disodium eine besonders deutliche Zunahme der CD62-L CD3, CD62-L CD4 und CD62-L CD8-positiven Zellen im Blut. Bei der Darstellung der durchschnittlichen Entwicklung in Diagramm 16 sind diese Werte sowohl für den deutlichen Anstieg der CD62-L CD3, CD62-L CD4 und CD62-L CD8 im Vergleich von Tag 0 zu Tag 14 verantwortlich als auch für die hohe SEM an Tag 0, da dieser Patient im Vergleich zu den anderen Patienten mit einem geringem Ausgangswert in die Studie einging.

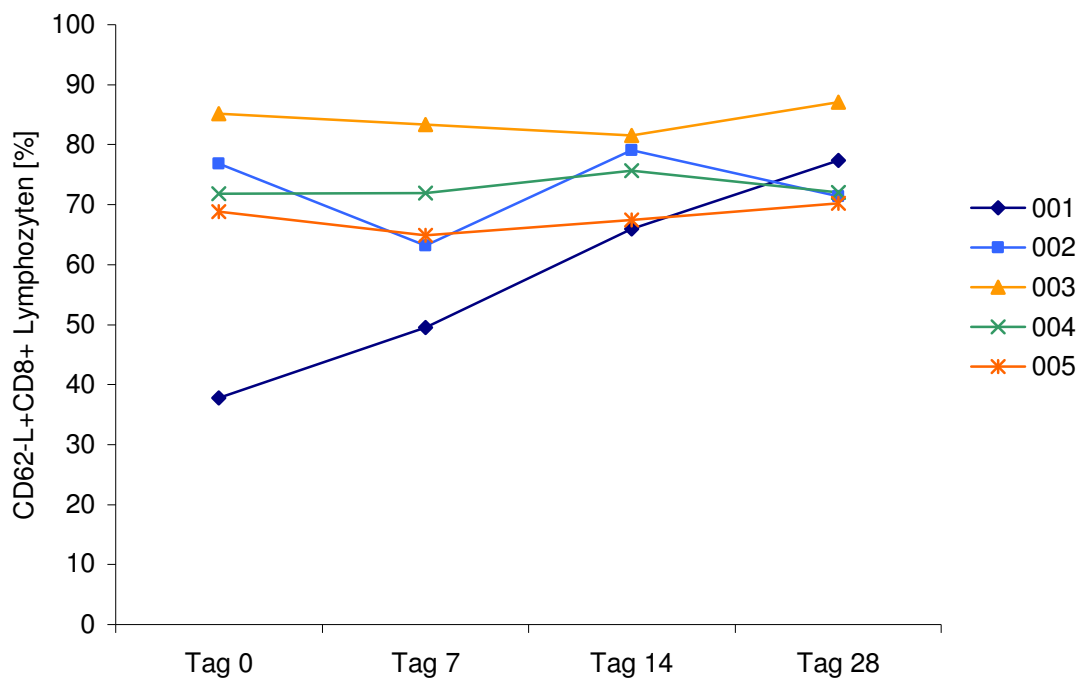
Unter der Therapie mit TBC 1269Z nahm die Anzahl der CD62-L-markierten Lymphozyten zu. Von Tag 0 zu Tag 14 betrug die durchschnittliche Zunahme der CD62-L-markierten CD3-positiven Lymphozyten 10,5 % (von 76,83 % auf 84,92 %), die der CD4-markierten 8,2 % (von 82,16 % auf 88,93 %) und die CD8-markierten stiegen um 8,6 % (von 68,07 % auf 73,91 %). Bei der Nachbeobachtung zeigte sich ein Abfall der CD62-L-markierten CD3- und CD4-positiven Lymphozyten (CD3 sank um 0,6 % von 84,92 % auf 84,43 %, CD4 sank um 2,2 % von 88,93 % auf 86,93 %) und ein Anstieg der CD8-positiven um 2,3 % (von 73,91 % auf 75,61 %; vgl. Diagramm 16).



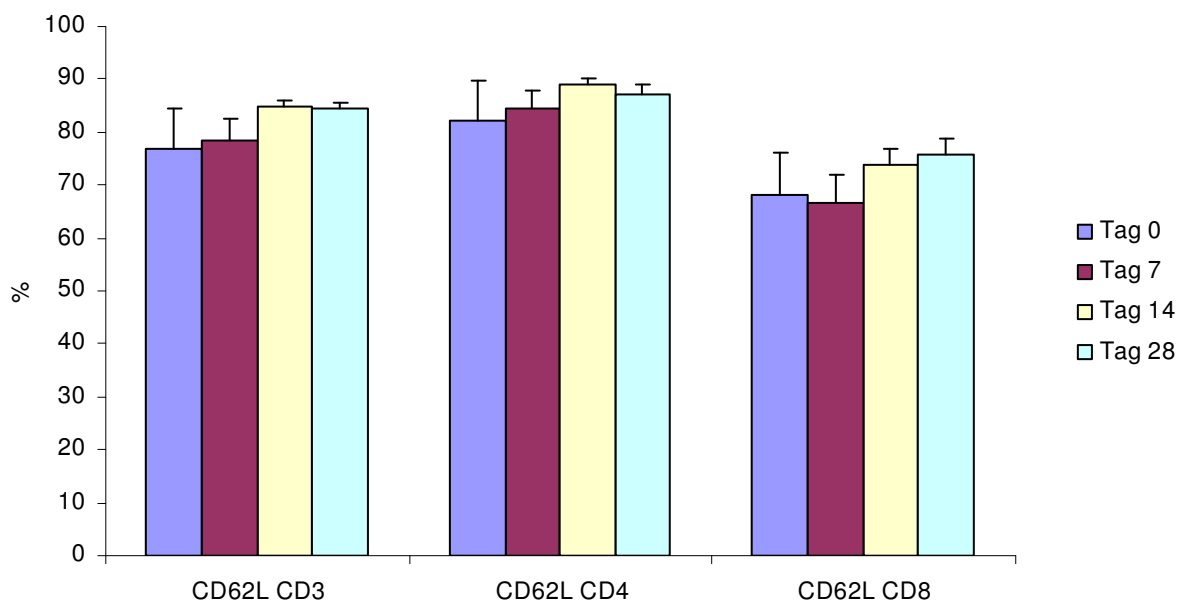
13. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD62-L auf peripheren CD3-positiven Lymphozyten. Tag 0 = Screening-Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.



14. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD62-L auf peripheren CD4-positiven Lymphozyten. Tag 0 = Screening-Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.



15. Diagramm: Einzelwerte der Blutproben der Patienten bei der Durchflusszytometrie. Markierung von CD62-L auf peripheren CD8-positiven Lymphozyten. Tag 0 = Screening-Tag, Tag 7 = siebter Tag der Therapie mit TBC 1269Z, Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z und Tag 28 = 14 Tage nach dem Ende der Therapie mit TBC 1269Z.



16. Diagramm: Darstellung der CD62-L-markierten CD3-positiven, CD4-positiven und CD8-positiven Lymphozyten unter der Therapie mit TBC 1269Z. Mittelwerte und SEM der Patienten (n = 5) an den Tagen 0 (vor Therapie), 7 (während Therapie), 14 (Ende der Therapie) und 28 (14 Tage nach Ende der Therapie) und SEM.

3.2 Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen

Die Quantifizierung der Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen erfolgte in positiv gefärbten Zellen pro mm^2 Gewebeschnitt. Tag 0 stellt die Werte der Biopsien dar, die am Screening-Tag vor Beginn der Therapie mit TBC 1269Z entnommen wurden. Tag 14 stellt die Werte der Biopsien dar, die direkt nach Beendigung der Therapie entnommen wurden, und Tag 28 zeigt die Werte der Biopsien, die bei der Nachbeobachtung 2 Wochen nach dem Ende der Therapie entnommen worden sind. Die Biopsieentnahme zu diesem Zeitpunkt war optional. Nur drei der fünf Patienten gaben ihre Einwilligung, so dass für Tag 28 nur drei Biopsien ausgewertet werden konnten.

3.2.1 Gesamtdarstellung der immunhistologischen Untersuchungen vor, während und nach der Therapie mit TBC1269Z

12. Tabelle: Positiv gefärbte Zellen pro mm² Gewebe. Mittelwert ± SEM (mathematisch gerundet).

Antikörper	Epidermis			Dermis		
	d = 0 (n = 5)	d = 14 (n = 5)	d = 28 (n = 3)	d = 0 (n = 5)	d = 14 (n = 5)	d = 28 (n = 3)
CD3	184 ± 17	188 ± 29	189 ± 24	169 ± 26	143 ± 23	157 ± 3
CD4	124 ± 35	97 ± 17	88 ± 18	135 ± 13	157 ± 22	131 ± 14
CD8	87 ± 14	94 ± 14	77 ± 11	40 ± 11	52 ± 10	64 ± 15
HLA-DR	26 ± 8	23 ± 6	42 ± 11	29 ± 11	28 ± 8	37 ± 4
CD62-E				135 ± 42	102 ± 23	69 ± 28
CD62-L				89 ± 50	68 ± 17	74 ± 2
CD62-P				173 ± 23	☆135 ± 15	☆142 ± 17
CD45-RO				62 ± 13	65 ± 13	80 ± 21
CD20				0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,05	0,3 ± 0,1

Die Mittelwerte in der Stichprobe der CD3-positiven Zellen nahmen pro mm² unter Therapie mit TBC 1269Z in der Dermis durchschnittlich um 15 % ab, nach dem Ende der Therapie wieder um 9,7 % zu. In der Epidermis kam es zu einer minimalen Veränderung der CD3-positiven Zellen von plus 2,2 % während der Therapie und plus 0,5 % in den zwei folgenden Wochen.

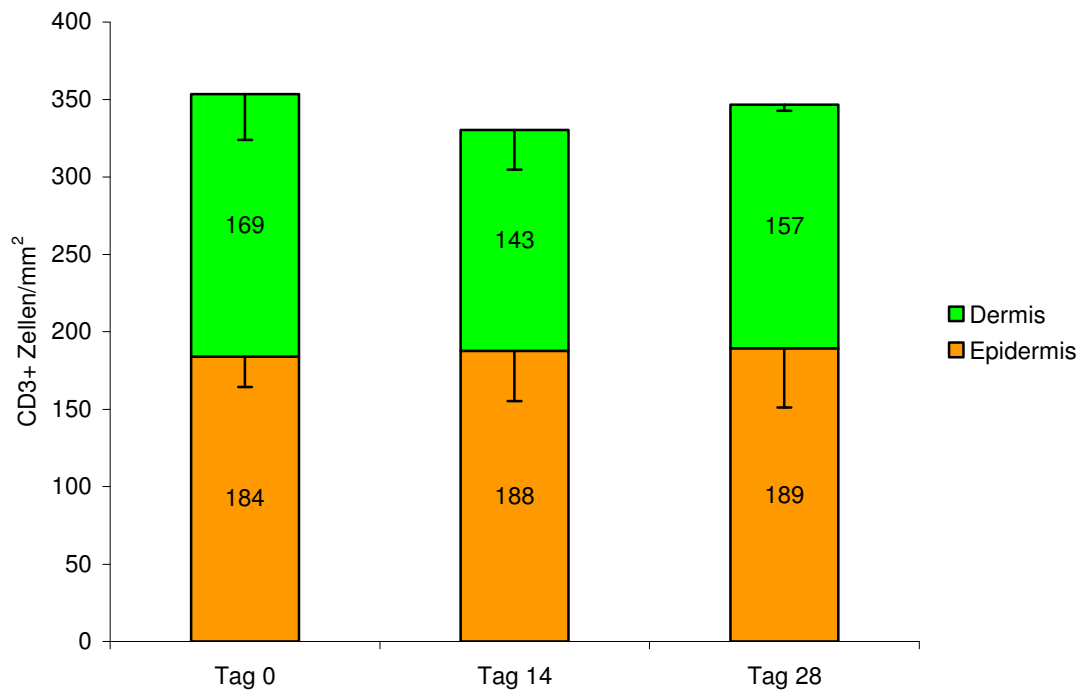
Unter der Therapie mit TBC 1269Z nahmen die CD4-positiven Zellen in der Epidermis von Beginn der Behandlung bis zum Ende der Behandlung um durchschnittlich 21,8 % ab. Vom Ende der Behandlung bis zur Nachkontrolle sank die Anzahl der CD4-positiven Zellen in der Epidermis noch einmal um 9,3 %. In der Dermis kam es unter der Behandlung mit TBC 1269Z zu einer Zunahme der CD4-positiven Zellen um 16,3 %, im Zeitraum bis zur Nachbeobachtung sank die Anzahl der CD4-positiven Zellen wieder um 16,6 %. Die Anzahl der CD8-positiven Zellen stieg während der Behandlung um 8 % in der Epidermis und um 30 % in der Dermis. Nach der Behandlung mit TBC 1269Z sank die Anzahl der CD8-positiven Zellen in der Epidermis um 18 %, während in der Dermis eine weitere Zunahme um 23 % zu beobachten war.

Die HLA-DR-positiven Zellen nahmen während der Behandlung in der Epidermis um 11 % ab, in der Dermis um 3,4 %. Im Zeitraum bis zur Nachuntersuchung nahmen die HLA-DR-positiven Zellen in der Epidermis um 82,6 % und in der Dermis um 32,1 % zu.

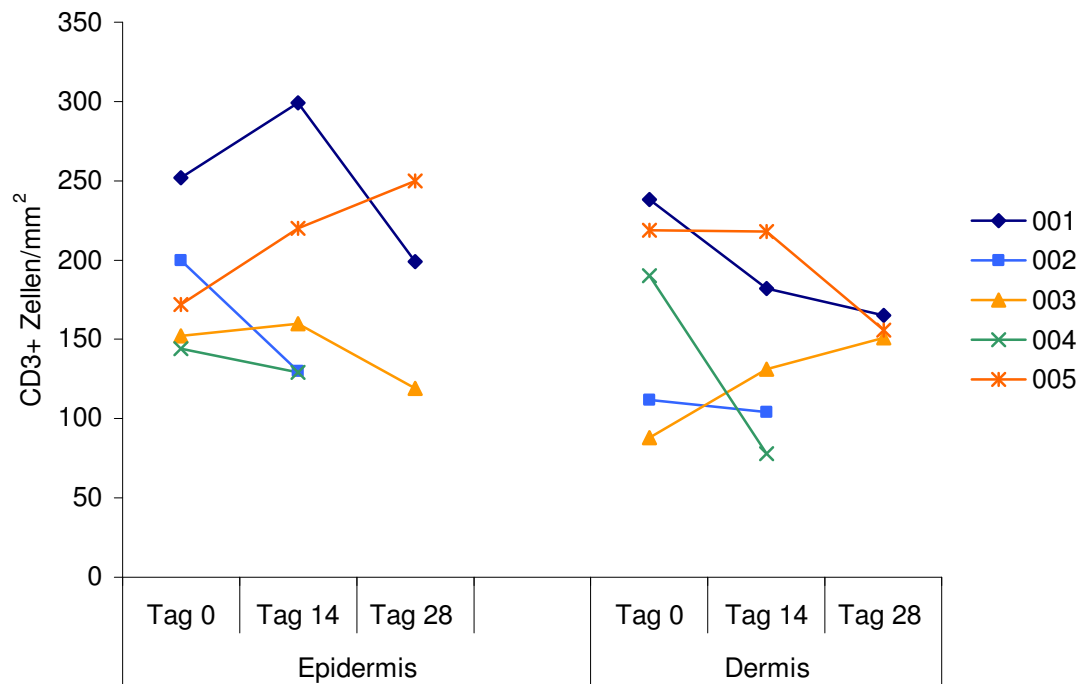
Unter der Behandlung mit TBC 1269Z nahmen alle Selektine in der Dermis ab. Die CD62-E-positiven Zellen sanken um 24,4 %, die CD62-L-positiven um 23,6 % und die CD62-P-positiven Zellen um 22 % ($p = 0,0136$). In den folgenden zwei Wochen sanken die CD62-E-positiven Zellen um weitere 32,4 %. Die CD62-L-positiven stiegen wieder um 8,8 % und die CD62-P-positiven stiegen um 5,2 % ($p = 0,0161$). Die einzigen Veränderungen mit statistischer Signifikanz waren die CD8-positiven Zellen in der Epidermis und die CD62-P-positiven Zellen in der Epidermis. Die Zahl der CD45RO-positiven Zellen stiegen während der Behandlung in der Dermis um 4,8 %, nach der Behandlung um 23,1 %.

Die Anzahl der CD20-positiven Zellen war sehr gering. Es konnten kaum positiv gefärbte Zellen in den Gewebeschnitten gefunden werden (siehe Diagramm 23).

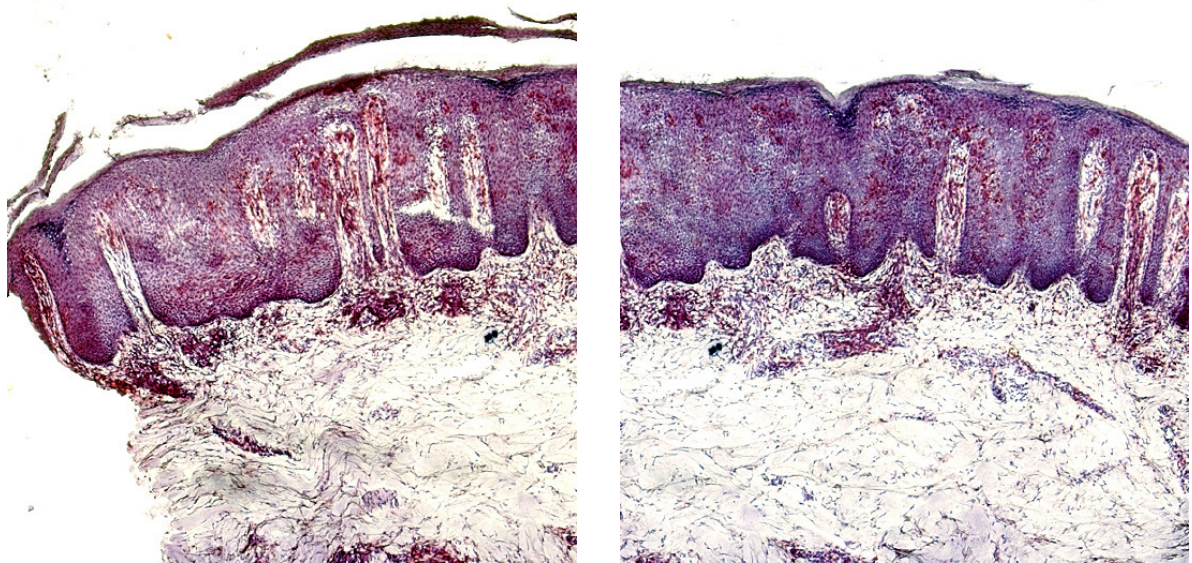
3.2.1.1 Immunhistologische Untersuchung der CD3-positiven Zellen im Gewebeschnitt



17. Diagramm: Werte der CD3-positiv gefärbten Zellen zusammengefasst: Epidermis und Dermis. Darstellung der Mittelwerte und SEM aller Patienten.



18. Diagramm: Kutane CD3-Expression in Dermis und Epidermis. Einzelwerte vor und nach der Therapie mit TBC 1269Z sowie 14 Tage nach Ende der Behandlung (Tag 28).



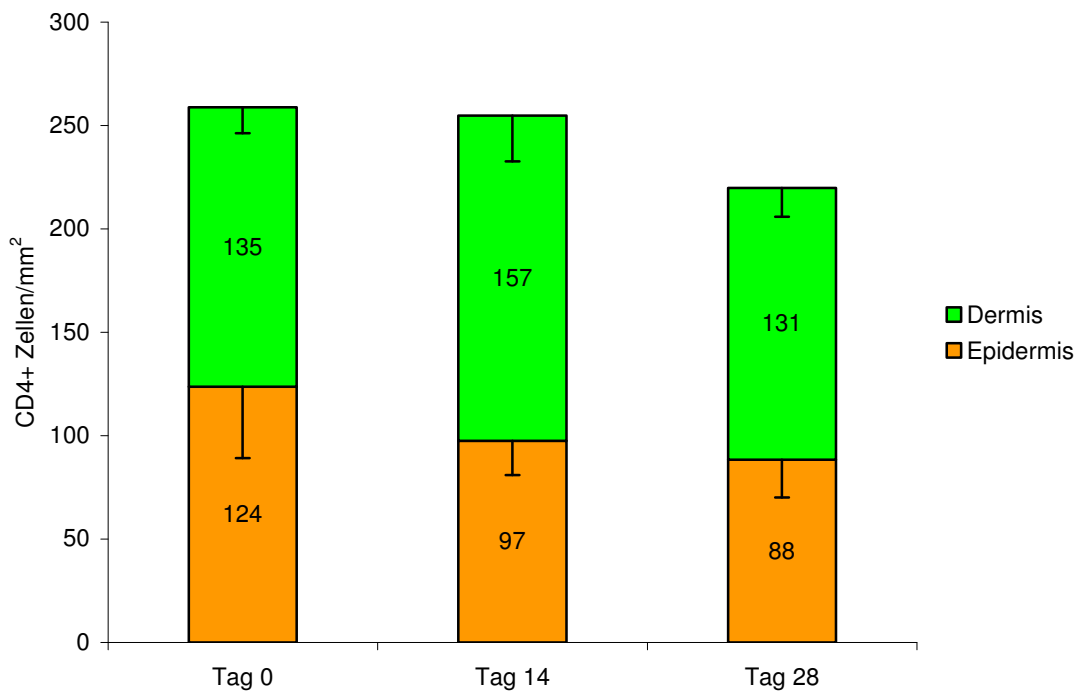
6. Abbildung: Mit CD3-primär-Antikörpern gefärbte Gefrierschnitte eines Patienten vor (links) und nach (rechts) Therapie mit TBC 1269Z. (1: 10)

In Diagramm 17 sind die Gesamtzahlen der CD3-positiv gefärbten Zellen pro mm^2 dargestellt. Unter der Therapie kam es zu einer minimalen Zunahme der CD3-positiv markierten Zellen, wenn man die Dermis zusammen mit der Epidermis betrachtet. Diese Veränderung ist ebenso wie der Abfall der CD3-positiven Zellen nach Therapie nicht statistisch signifikant. Diagramm 18 zeigt, dass es bei drei Patienten zu einem Anstieg der CD3-positiven Zellen in der Epidermis kam und bei zweien zu einem Abfall. In der Dermis kam es bei vier Patienten zu einer Abnahme, wobei einer davon nur minimal reduziert war, und bei einem Patienten zu einer Zunahme der Zellen.

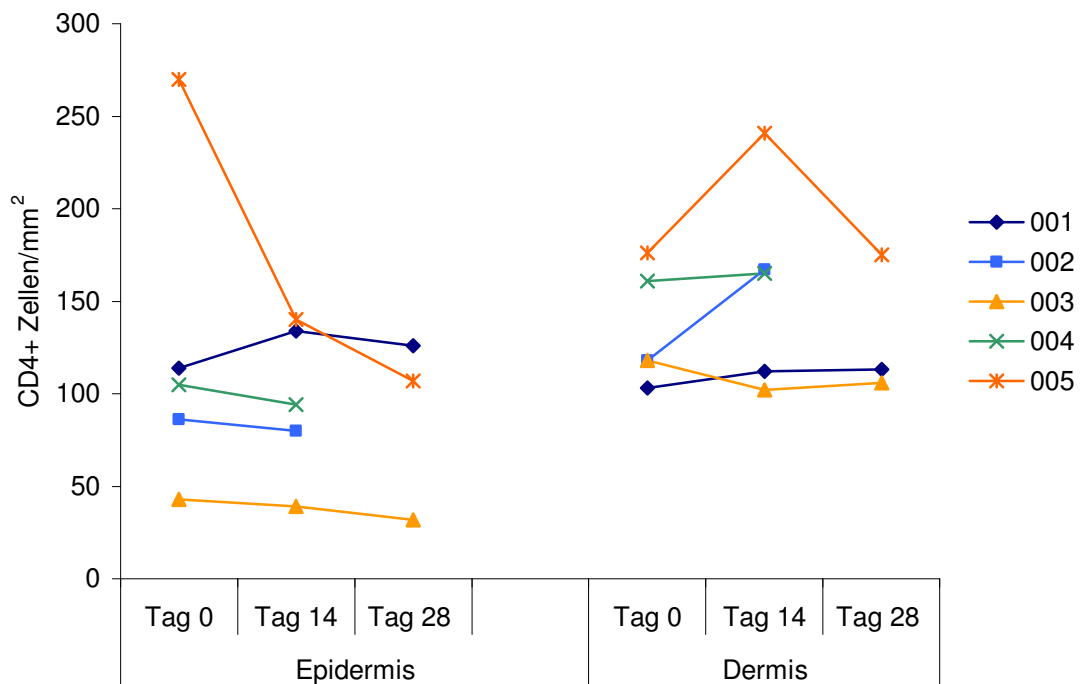
3.2.1.2 Immunhistologische Untersuchung der CD4-positiven Zellen im Gewebeschnitt

Die Anzahl der CD4-positiven gefärbten Zellen in der Epidermis nahm unter Behandlung mit TBC 1269Z und in den folgenden 14 Tagen der Nachbeobachtung ab. In der Dermis kam es während des Behandlungszeitraumes zu einer Zunahme der CD4-positiven Zellen, die jedoch innerhalb der Nachbeobachtungsphase abfallen. Die genauen Zahlen sind der Tabelle 12 zu entnehmen. Eine statistische Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden. Betrachtet man die Einzelwerte der Patienten im Diagramm 20, ist festzustellen, dass bei vier von fünf Patienten die Anzahl der CD4-positiven Zellen unter der Therapie in der Epidermis abgenommen hat und es in der Dermis zu einer Zunahme der CD4-positiven Zellen bei ebenfalls

vier von fünf Patienten kam, jedoch handelt es sich bei den beiden Ausnahmen nicht um den gleichen Patienten.



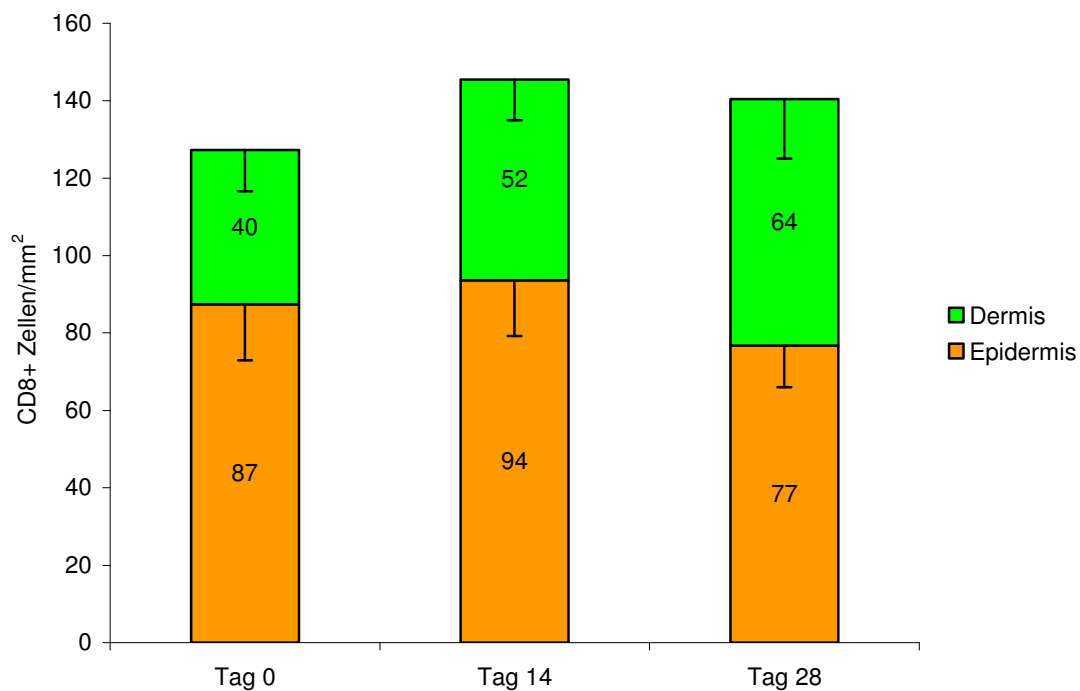
19. Diagramm: Anteil der kutanen CD4-positiven Zellen in der Epidermis und der Dermis unter Therapie mit TBC 1269Z. Tag 0 (n = 5) zeigt die Werte vor der Therapie, Tag 14 (n = 5) zeigt die Werte am Ende der Therapie und Tag 28 (n = 3) zeigt den Wert der Nachbeobachtung zwei Wochen nach Beendigung der Therapie.



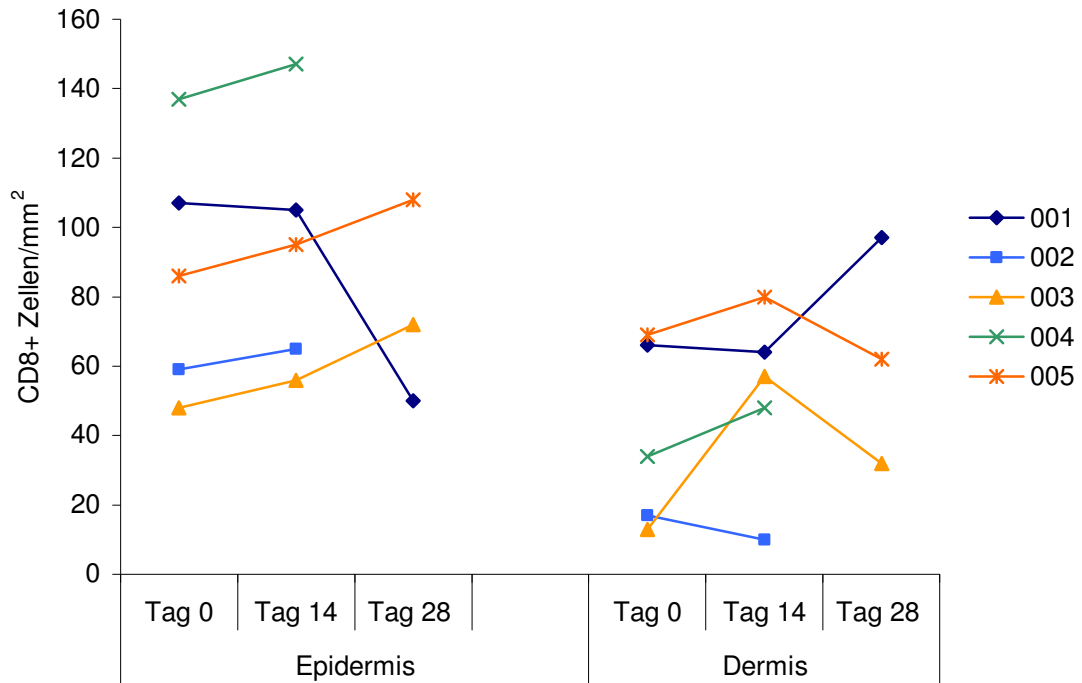
20. Diagramm: Einzelwerte der CD4-positiven Zellen in der Dermis und der Epidermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) der Behandlung mit TBC 1269Z sowie 14 Tage nach Ende der Behandlung (Tag 28).

3.2.1.3 Immunhistologische Untersuchung der CD8-positiven Zellen im Gewebeschnitt

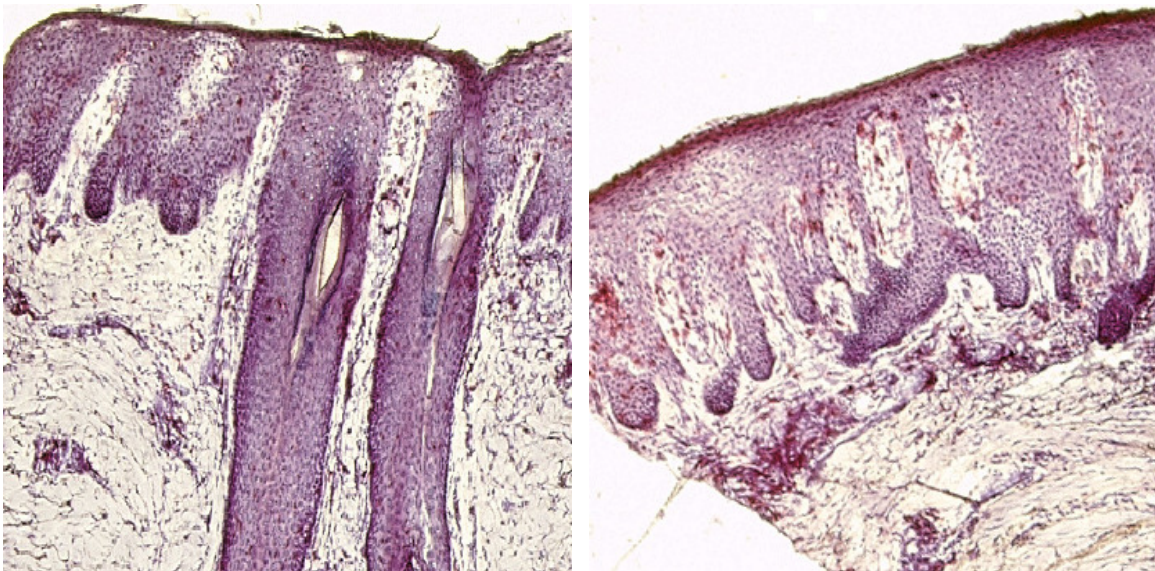
In der Epidermis hat der Anteil an CD8-positiven Zellen unter der Behandlung mit TBC 1269Z bei vier Patienten zugenommen und bei einem Patienten abgenommen. In der Dermis hat der Anteil der CD8-positiven Zellen bei zwei Patienten abgenommen und bei drei Patienten zugenommen. In der Nachbeobachtungsphase kam es zu einer Abnahme in der Epidermis und zu einer Zunahme in der Dermis von CD8-positiven Zellen.



21. Diagramm: Der Anteil der kutanen CD8-positiven Zellen in der Dermis und der Epidermis vor, nach und am Ende der Nachbeobachtungsphase bei Behandlung mit TBC 1269Z.



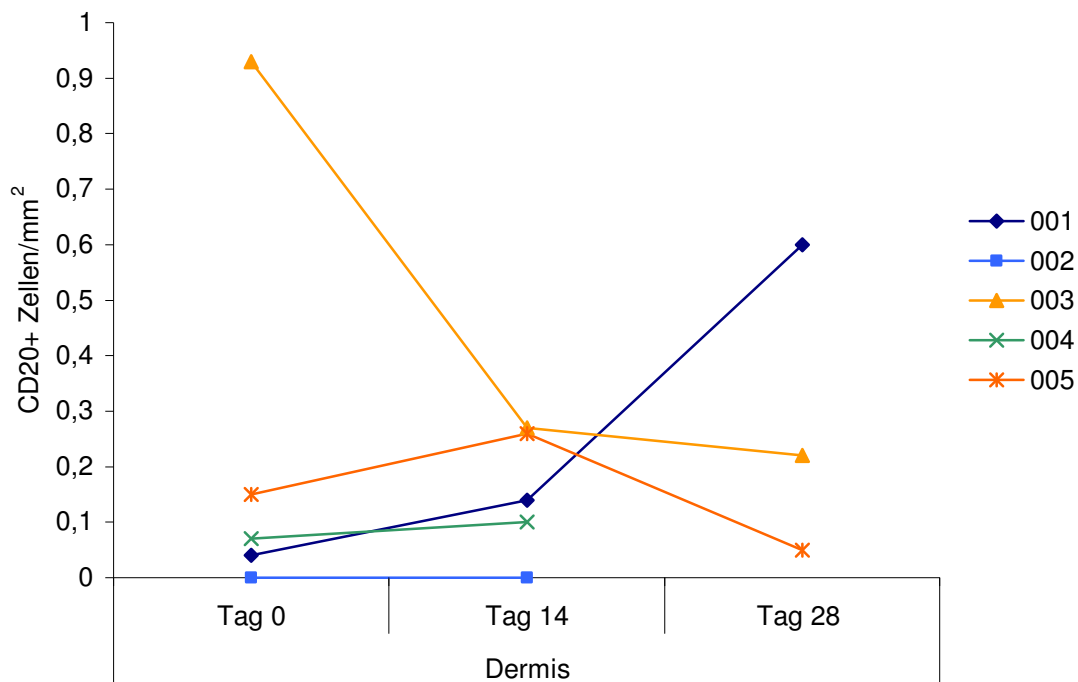
22. Diagramm: Einzelwerte der CD8-positiven Zellen in der Dermis und der Epidermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) der Behandlung mit TBC 1269Z, sowie 14 Tage nach Ende der Behandlung (Tag 28).



7. Abbildung: Mit CD8-primär-Antikörpern gefärbte Gefrierschnitte eines Patienten vor (links) und nach (rechts) Therapie mit TBC 1269Z (1: 10).

3.2.1.4 Immunhistologische Untersuchung der CD20-positiven Zellen im Gewebeschnitt

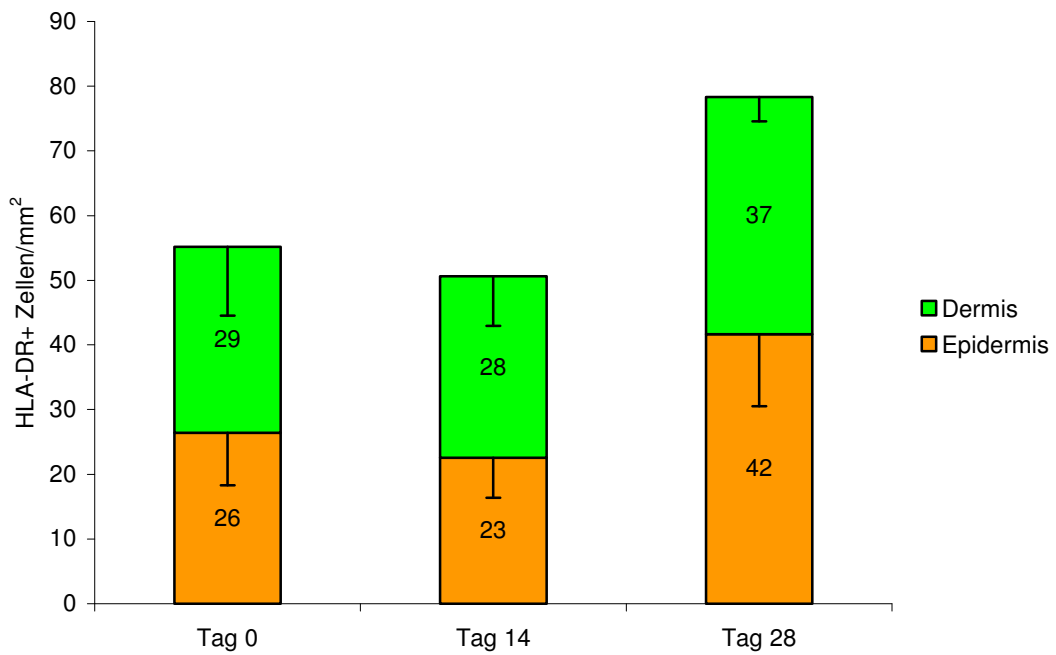
Die Anzahl der CD20-positiv gefärbten Zellen in den Gewebeschnitten war sehr gering. Es kam bei drei Patienten zu einer minimalen Zunahme der CD20-positiven Zellen, bei einem Patient zu einer Abnahme und bei einem Patienten konnten zu keinem Zeitpunkt CD20-positive Zellen im Gewebeschnitt nachgewiesen werden.



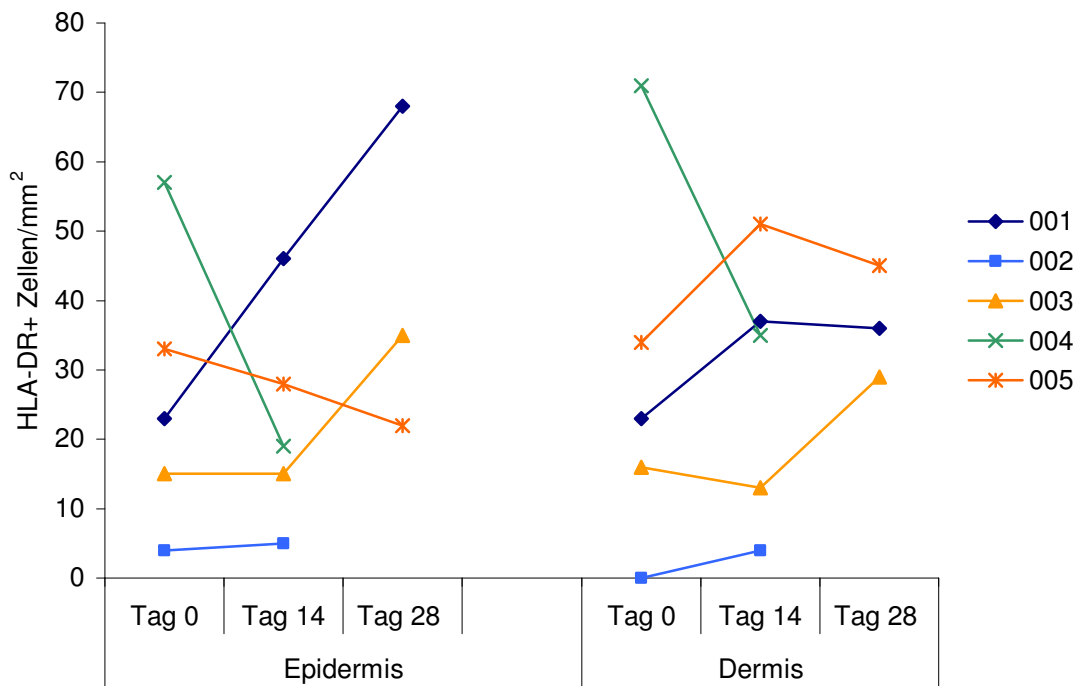
23. Diagramm: Einzelwerte der CD20-positiven Zellen in der Dermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) der Behandlung mit TBC 1269Z sowie 14 Tage nach Ende der Behandlung (Tag 28).

3.2.1.5 Immunhistologische Untersuchung der HLA-DR-positiven Zellen im Gewebeschnitt

Unter der Behandlung mit TBC 1269Z kam es bei zwei Patienten zu einer Zunahme der HLA-DR-positiven Zellen in der Epidermis, bei einem Patienten war keine Änderung zu beobachten und bei zwei Patienten sank die Anzahl. In der Dermis kam es bei drei Patienten zu einer Zunahme der HLA-DR-positiven Zellen, bei zwei zu einer Abnahme. In der Nachbeobachtungsphase kommt es jedoch zu einem Anstieg der HLA-DR-positiven Zellen sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis.



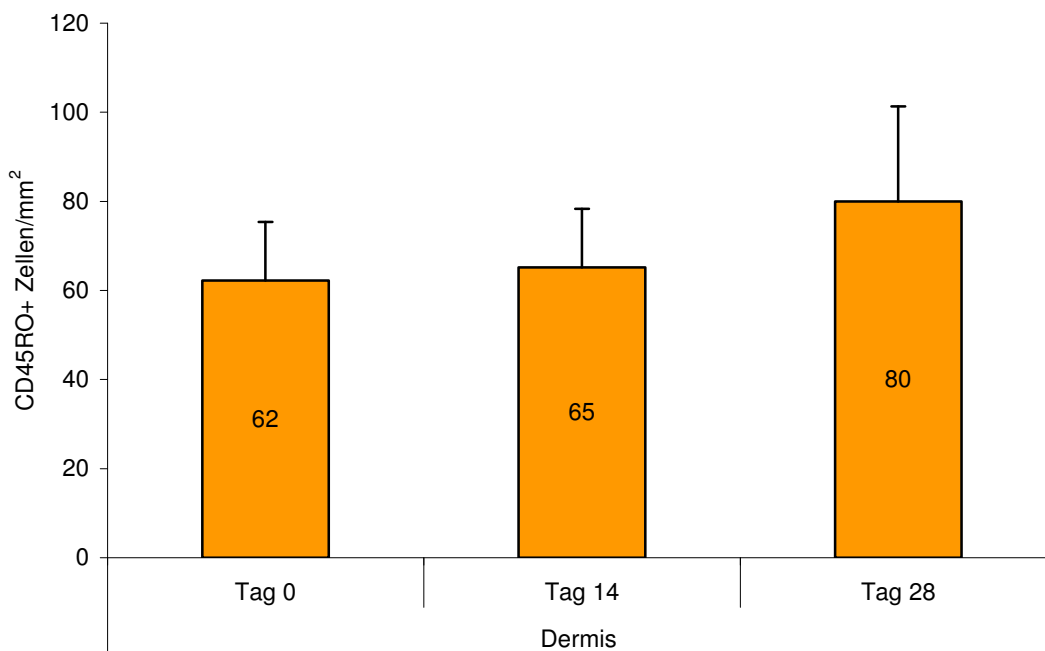
24. Diagramm: Darstellung der HLA-DR-positiv gefärbten Zellen an den Therapie Tagen 0 und 14 und nach der Therapie Tag 28.



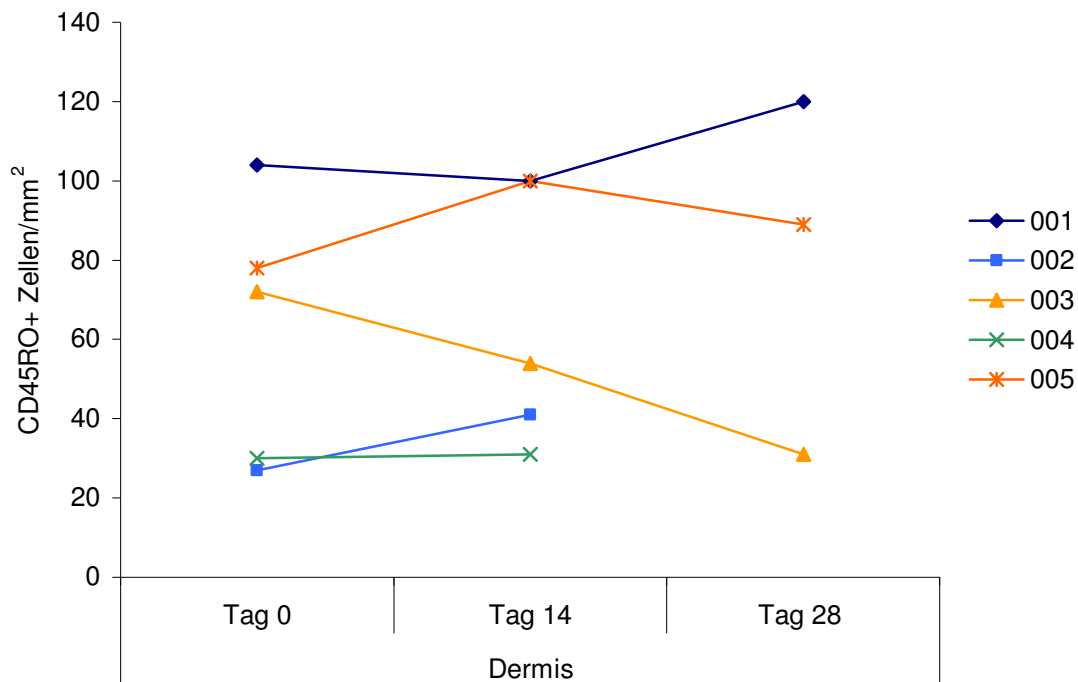
25. Diagramm: Einzelwerte HLA-DR-positiv gefärbten Zellen in der Dermis und der Epidermis.

3.2.1.6 Immunhistologische Untersuchung der CD45RO-positiven Zellen im Gewebeschnitt

Die CD45RO-positiven Zellen nahmen unter der Therapie mit Bimosiamose disodium bei zwei Patienten zu, bei drei Patienten ab. Betrachtet man die Gesamtdarstellung, ergibt sich keine Veränderung unter der Therapie. Der Anstieg in der Nachbeobachtungsphase ist ausschließlich darauf zurückzuführen, dass die beiden Patienten mit der geringsten Zellzahl am Ende der Therapie diejenigen waren, die zu der optionalen Biopsieentnahme an Tag 28 nicht bereit waren. Bei der Nachbeobachtung wurde bei zwei Patienten eine Abnahme der CD45RO-positiven Zellen bestimmt und bei einem eine Zunahme.



26. Diagramm: Darstellung der Durchschnittswerte, der CD45RO-positiv gefärbten Zellen in der Dermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) Therapie, sowie 14 Tage nach Ende der Therapie (Tag 28, n = 3).



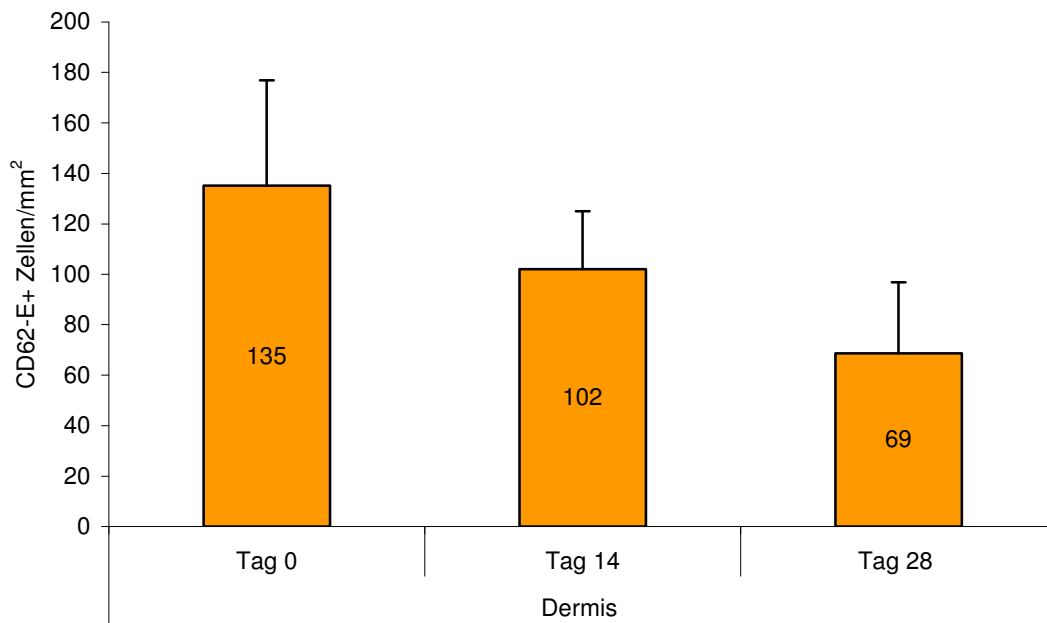
27. Diagramm: Darstellung der Einzelwerte, der CD45RO-positiv gefärbten Zellen in der Dermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) Therapie, sowie 14 Tage nach Ende der Therapie.

3.2.1.7 Immunhistologische Untersuchung der CD62-E-, CD62-L- und der CD62-P-positiven Zellen im Gewebeschnitt

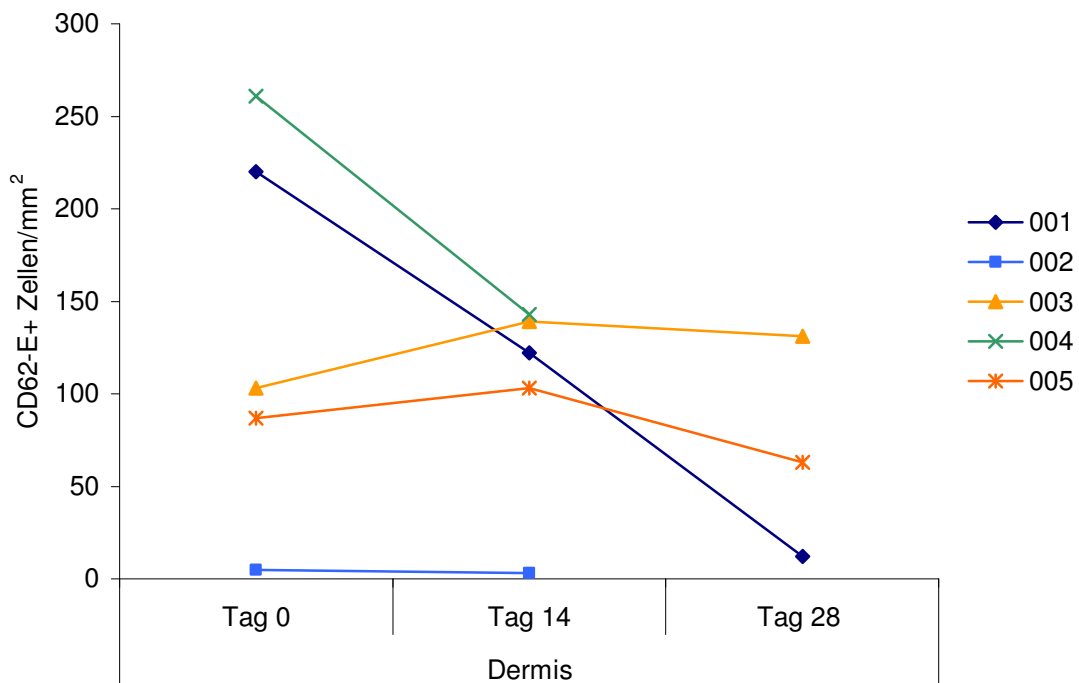
Bei Betrachtung der Mittelwerte sieht man eine Reduktion der CD62-E-, CD62-L- und der CD62-P-positiv gefärbten Zellen unter der Therapie mit TBC 1269Z. In der Nachbeobachtungsperiode sanken die CD62-E-positiven Zellen weiter, während es bei den CD62-L- und den CD62-P-positiven Zellen zu einem leichten Wiederanstieg kam, der jedoch bei weitem nicht das Ausgangsniveau erreichte.

Vergleicht man diese Aussage mit den Einzelwerten der Patienten, kann man feststellen, dass bei den CD62-E- und CD62-L-positiven Zellen jeweils zwei Patienten 003 und 005 entgegengesetzte Tendenzen zeigten. Statistisch signifikant waren aus diesem Grund nur die Veränderungen der CD62-P-positiven Zellen ($p \geq 0,016$).

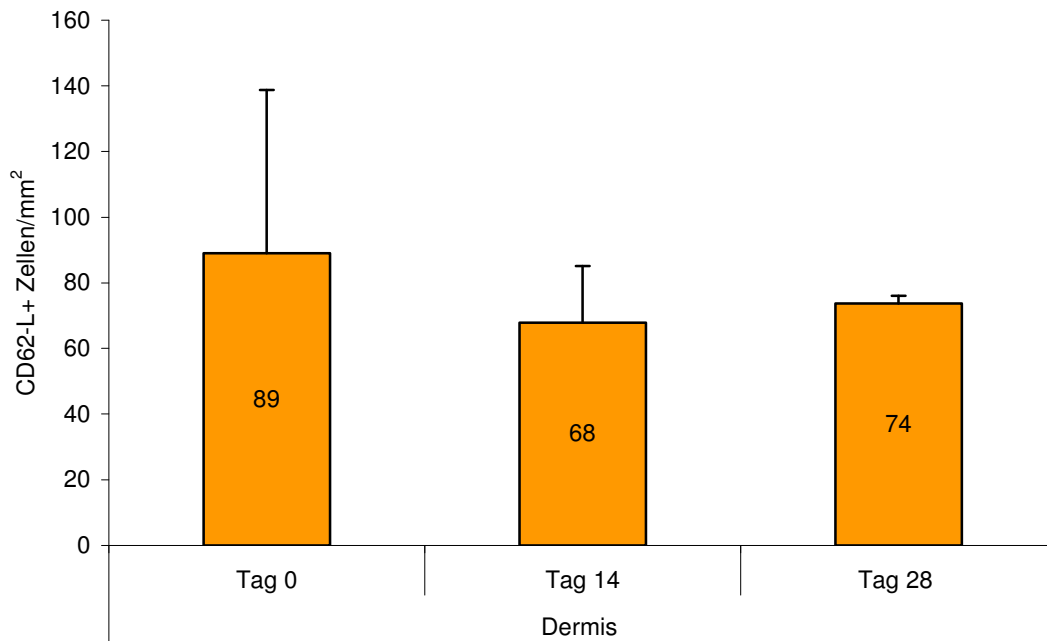
Die positiv gefärbten Zellen waren hauptsächlich in der Dermis zu finden. Es gab nur einzelne Zellen, auf denen die Selektine nachgewiesen werden konnten, die bis in die Epidermis ausgewandert waren. Ergebnisse werden hier aus diesem Grund nicht gezeigt.



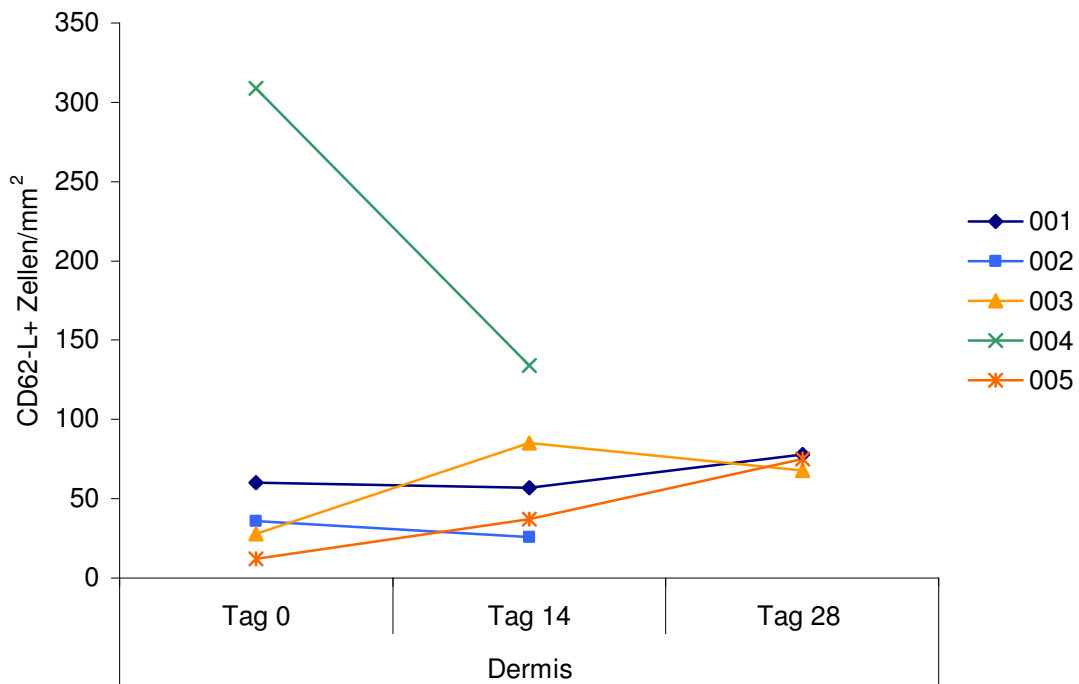
28. Diagramm: Darstellung der Durchschnittswerte, der CD62-E-positiv gefärbten Zellen in der Dermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) Therapie, sowie 14 Tage nach Ende der Therapie (Tag 28, n = 3).



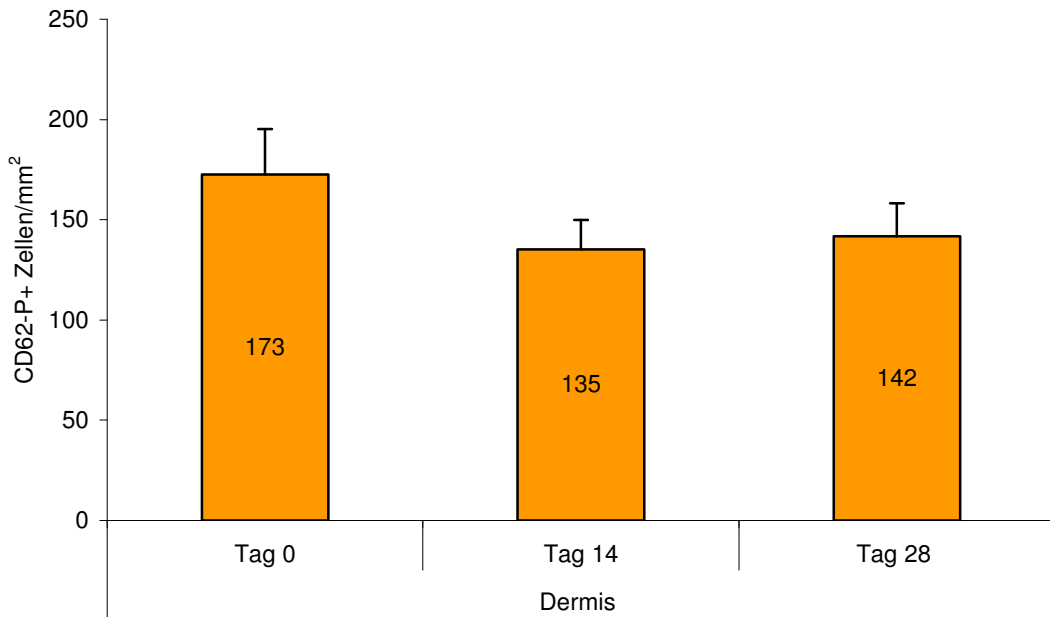
29. Diagramm: Darstellung der Einzelwerte, der CD62-E-positiv gefärbten Zellen in der Dermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) Therapie, sowie 14 Tage nach Ende der Therapie.



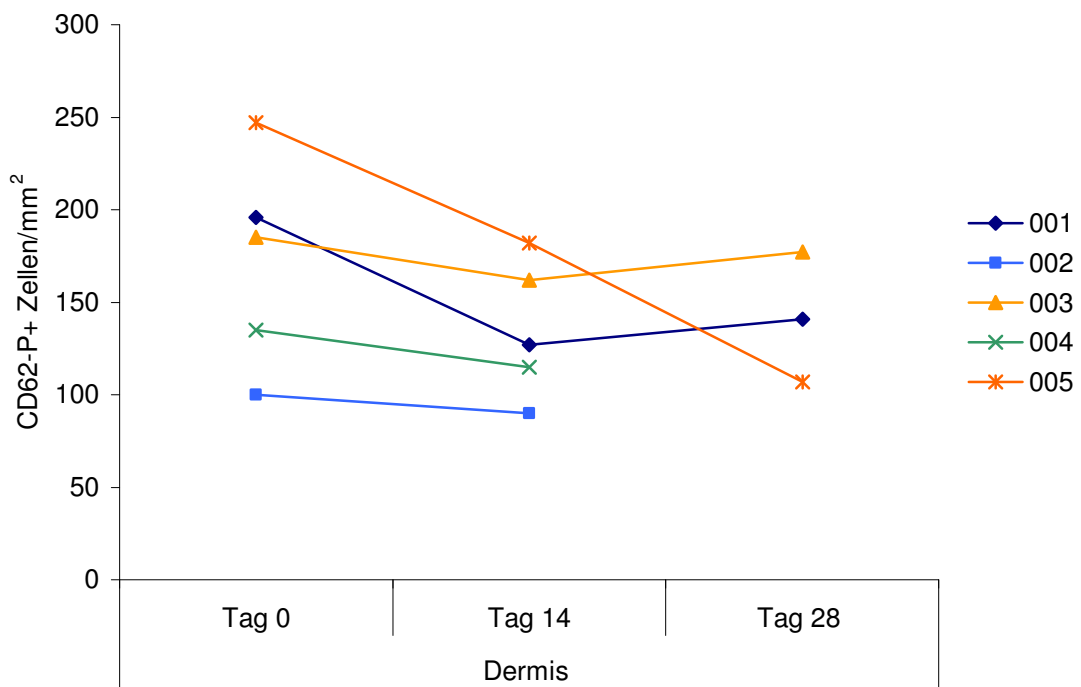
30. Diagramm: Darstellung der Durchschnittswerte, der CD62-L-positiv gefärbten Zellen in der Dermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) Therapie, sowie 14 Tage nach Ende der Therapie (Tag 28, n = 3).



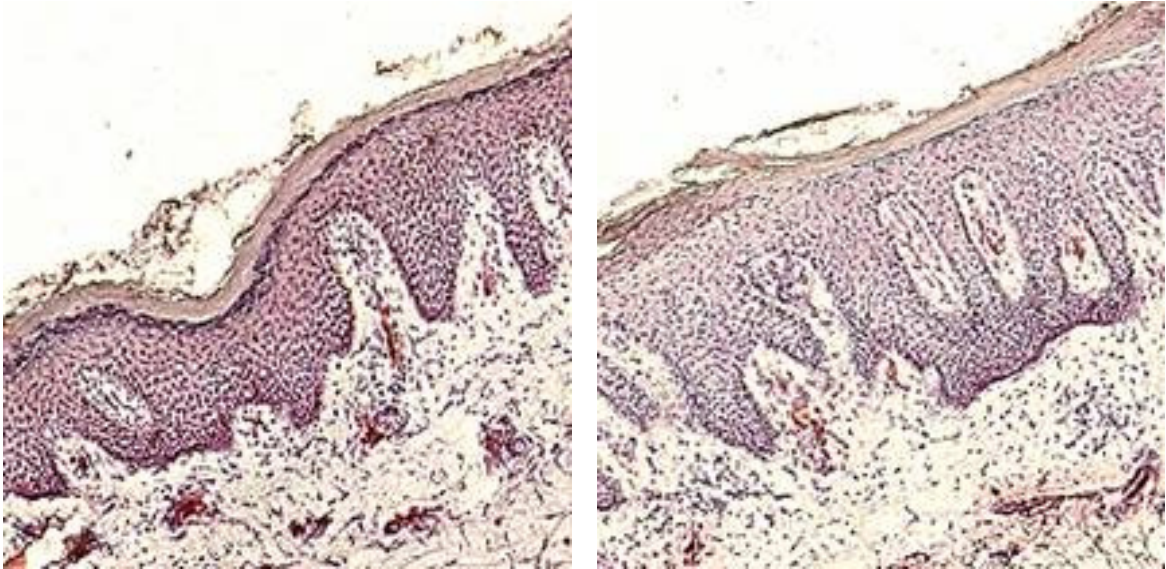
31. Diagramm: Darstellung der Einzelwerte, der CD62-L-positiv gefärbten Zellen in der Dermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) Therapie, sowie 14 Tage nach Ende der Therapie.



32. Diagramm: Darstellung der Durchschnittswerte, der CD62-P-positiv gefärbten Zellen in der Dermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) Therapie, sowie 14 Tage nach Ende der Therapie (Tag 28, n = 3).



33. Diagramm: Darstellung der Einzelwerte, der CD62-P-positiv gefärbten Zellen in der Dermis vor (Tag 0) und nach (Tag 14) Therapie, sowie 14 Tage nach Ende der Therapie.



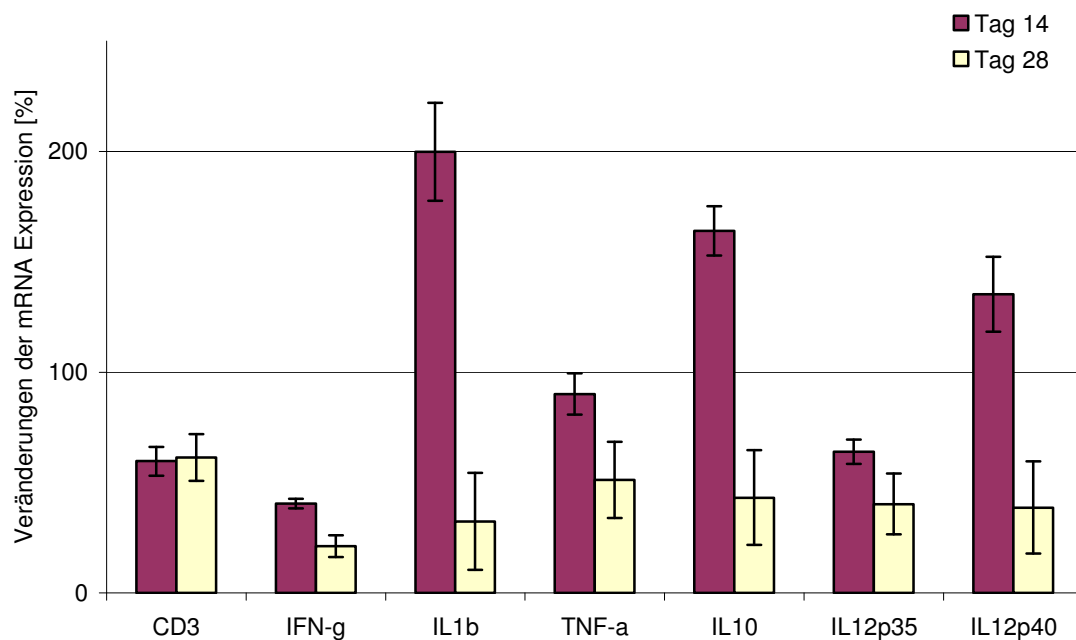
8. Abbildung: Mit CD62-P-primär-Antikörpern gefärbte Gefrierschnitte eines Patienten vor (links) und nach (rechts) Therapie mit TBC 1269Z (1:10).

3.3 Ergebnisse der Real-Time-(*TaqMan*)-PCR

Die Darstellung der Ergebnisse der TaqMan-PCR erfolgen als prozentuale Veränderung der mRNA-Expression unter der Therapie mit Bimosiamose disodium, wobei die mRNA-Expression am Tag 0 = 100 % gesetzt wurde. Tag 0 stellt die Werte der Biopsien dar, die am Screening-Tag vor Beginn der Therapie mit TBC 1269Z entnommen wurden. Tag 14 stellt die Werte der Biopsien dar, die direkt nach Beendigung der Therapie entnommen wurden, und Tag 28 zeigt die Werte der Biopsien, die bei der Nachbeobachtung 2 Wochen nach dem Ende der Therapie entnommen worden sind. Die Biopsieentnahme zu diesem Zeitpunkt war optional. Nur drei der fünf Patienten waren zu dieser Biopsieentnahme bereit, so dass für Tag 28 nur drei Biopsien ausgewertet werden konnten.

Im Diagramm 34 sind die Veränderungen unter der Therapie mit Bimosiamose disodium in der Expression der mRNA aller untersuchten Gene dargestellt. Keine der gezeigten Veränderungen war statistisch signifikant, wie auch die folgenden Darstellungen der Einzelwerte zeigen.

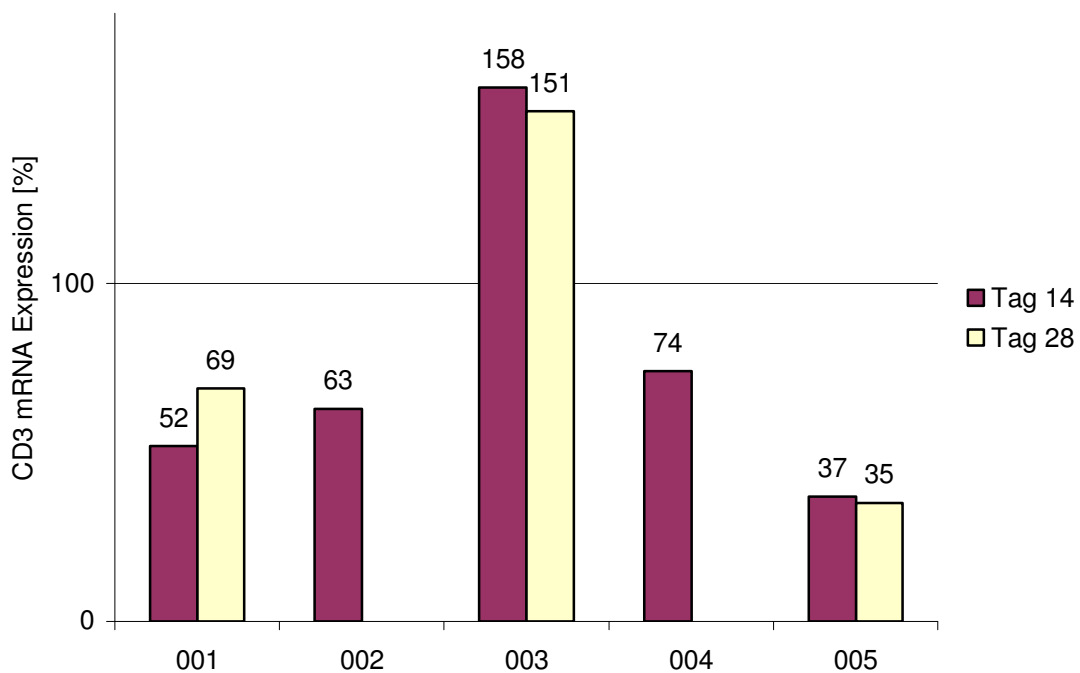
Es kam unter der Therapie mit TBC 1269Z durchschnittlich zu einer Abnahme der Expression von CD3, IFN- γ , TNF- α und IL-12p35, während es zu einer Zunahme von IL-1- β , IL-10 und IL-12p40 kam. Im Folgenden werden die Veränderungen genauer beschrieben.



34. Diagramm: Gesamtdarstellung der Veränderungen aller PCR-Produkte in %. Der Ausgangswert wurde = 100 % gesetzt. An Tag 28 standen nur von 3 Patienten Proben zur Verfügung. Darstellung der Durchschnittswerte mit SEM.

3.3.1 Ergebnisse der CD3-mRNA-Expression

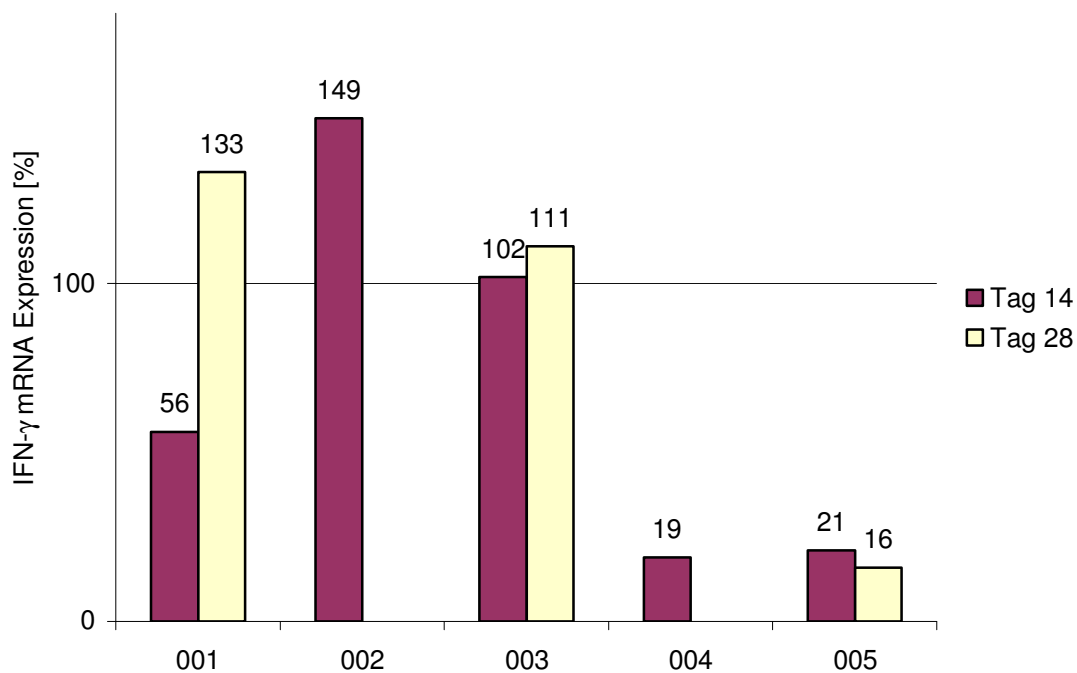
Die Gesamtexpression der CD3-mRNA wurde in der Haut der behandelten Patienten durchschnittlich um 40 % reduziert. Bei dem Patienten 001 kam es unter der Therapie mit Bimosiamose disodium zu einer Abnahme der CD3-mRNA-Expression von 48 %, während der Nachbeobachtungsphase zu einer Zunahme auf 69 % des Ausgangsniveaus. Bei dem Patienten 002 fiel die Expression der CD3-mRNA unter der Therapie mit Bimosiamose disodium um 37 %. Bei dem Patienten 003 kam es zu einer Zunahme der CD3-mRNA-Expression um 58 % unter der Therapie, während der Nachbeobachtungsphase kam es zu einem leichten Abfall auf 151,5 % des Ausgangsniveaus. Bei dem Patienten 005 kam es unter Therapie zu einer 63%igen Reduktion der CD3-mRNA-Expression, während der Nachbeobachtungszeit sank dieser Wert weiter um 64,9 % unter den Ausgangswert. Patient 004 zeigte eine Reduktion von 26 % unter der Therapie.



35. Diagramm: Darstellung der CD3-mRNA-Expression der einzelnen Patienten unter Therapie mit TBC 1269Z. Der Ausgangswert an Tag 0 wurde 100 % gesetzt.

3.3.2 Ergebnisse der IFN- γ -mRNA-Expression

Die IFN- γ Expression wurde unter der 14-tägigen Therapie mit TBC 1269Z durchschnittlich um 59 % reduziert. Bei dem Patienten 001 kam es zu einer Abnahme von 44 %, wobei die IFN- γ -Expression in der 14-tägigen Nachbeobachtungsphase über den Ausgangswert anstieg. Bei dem Patienten 002 kam es unter der Therapie mit Bimosiamose disodium zu einer Zunahme der mRNA-Expression um 49 %. Von diesem Patienten wurde an Tag 28 keine Biopsie entnommen. Bei Patient 003 kam es zu einer minimalen Steigerung der IFN- γ -Produktion von 1,7 % unter der Therapie mit Bimosiamose disodium. Während der Nachbeobachtungsphase stieg der Wert 10 % über den Ausgangswert an. Bei dem Patienten 005 kam es unter der Therapie zu einer Abnahme der IFN- γ von 79 %. Dieser Wert nahm während der Nachbeobachtungsphase weiter ab (94,7 % vom Ausgangswert). Bei dem Patienten 004 wurde die IFN- γ -Expression unter der Therapie mit Bimosiamose disodium um 81 % reduziert. Auch von diesem Patienten wurde an Tag 28 keine Biopsie entnommen.

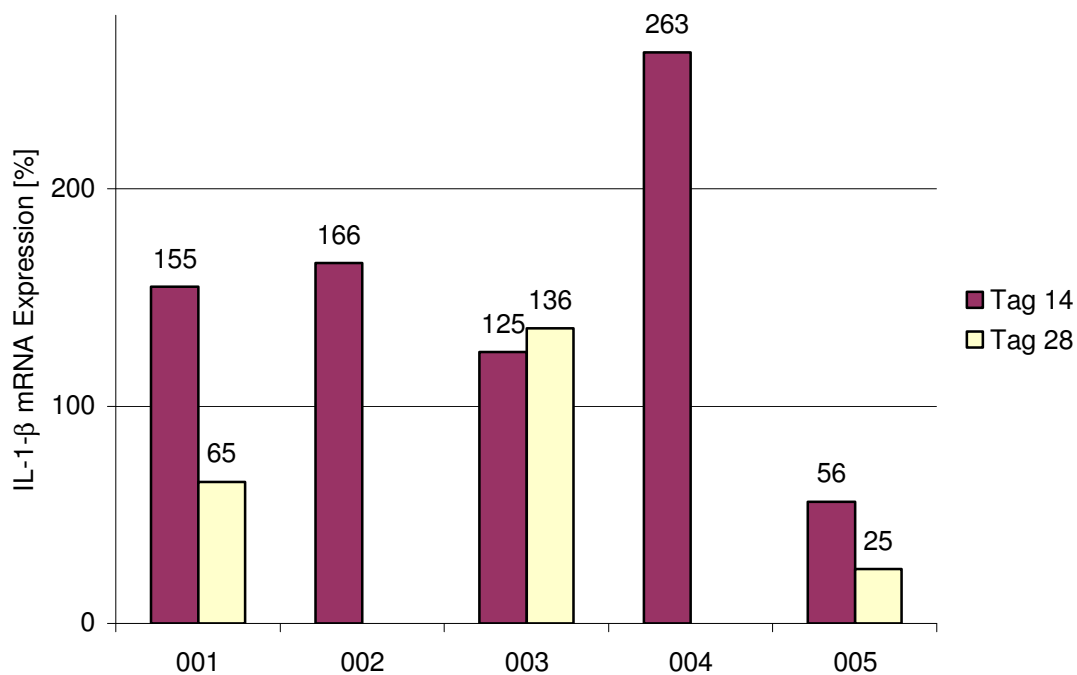


36. Diagramm: Darstellung der IFN- γ -mRNA-Expression der einzelnen Patienten unter Therapie mit TBC 1269Z. Der Ausgangswert an Tag 0 wurde 100 % gesetzt.

3.3.3 Ergebnisse der IL-1- β -mRNA-Expression

Die IL-1- β -Expression wurde durchschnittlich unter der Therapie mit Bimosiamose disodium um 99,9 % erhöht, fiel in der Nachbeobachtungszeit jedoch um 67,5 % unter den Ausgangswert.

Der Patient 001 zeigte eine Zunahme von 55,5 % unter der Therapie, während der Nachbeobachtungsphase sank dieser Wert 35,1 % unter den Ausgangswert. Bei dem Patienten 002 konnte unter der Therapie mit Bimosiamose disodium eine Zunahme von 66,3 % der mRNA-Expression des IL-1- β verzeichnet werden. Bei Patient 003 kam es unter der Therapie mit Bimosiamose disodium zu einer Steigerung der IL-1- β -Expression um 25,4 %, während der Nachbeobachtungsphase stieg die mRNA-Expression auf 36 % über den Ausgangswert. Der Patient 005 zeigte eine Reduktion von 43,6 % unter der Therapie mit Bimosiamose, während der Nachbeobachtungsphase fiel dieser Wert 74,7 % unter den Ausgangswert. Bei dem Patienten 004 konnte unter der Therapie mit Bimosiamose disodium eine Zunahme von 163,3 % der mRNA-Expression des IL-1- β verzeichnet werden.

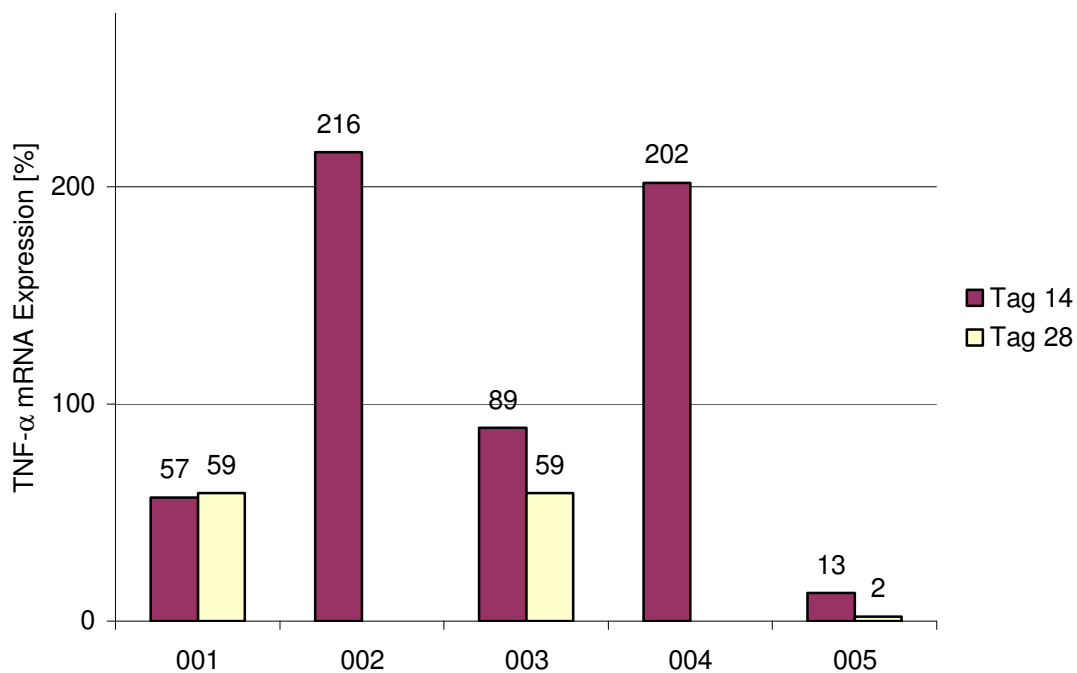


37. Diagramm: Darstellung der IL-1- β -mRNA-Expression unter Therapie mit TBC 1269Z. Der Ausgangswert wurde 100 % gesetzt.

3.3.4 Ergebnisse der TNF- α -mRNA-Expression

Die TNF- α -Expression wurde durchschnittlich unter der Therapie mit Bimosiamose disodium um 9,9 % verringert, stieg in der Nachbeobachtungszeit jedoch auf 48,8 % des Ausgangswerts.

Der Patient 001 zeigte eine Abnahme von 43,2 % unter der Therapie, während der Nachbeobachtungsphase stieg dieser Wert auf 40,5 % unter den Ausgangswert. Bei dem Patienten 002 konnte unter der Therapie mit Bimosiamose disodium eine Zunahme von 116 % der mRNA-Expression des TNF- α verzeichnet werden. Bei Patient 003 kam es unter der Therapie mit Bimosiamose disodium zu einer Abnahme der TNF- α -Expression um 10,8 %, während der Nachbeobachtungsphase fiel die mRNA-Expression um 41,2 % unter den Ausgangswert. Der Patient 005 zeigte eine Abnahme von 87,1 % unter der Therapie mit Bimosiamose disodium, während der Nachbeobachtungsphase sank dieser Wert 97,3 % unter den Ausgangswert. Bei dem Patienten 004 konnte unter der Therapie mit Bimosiamose eine Zunahme von 101,9 % der mRNA-Expression des TNF- α verzeichnet werden.

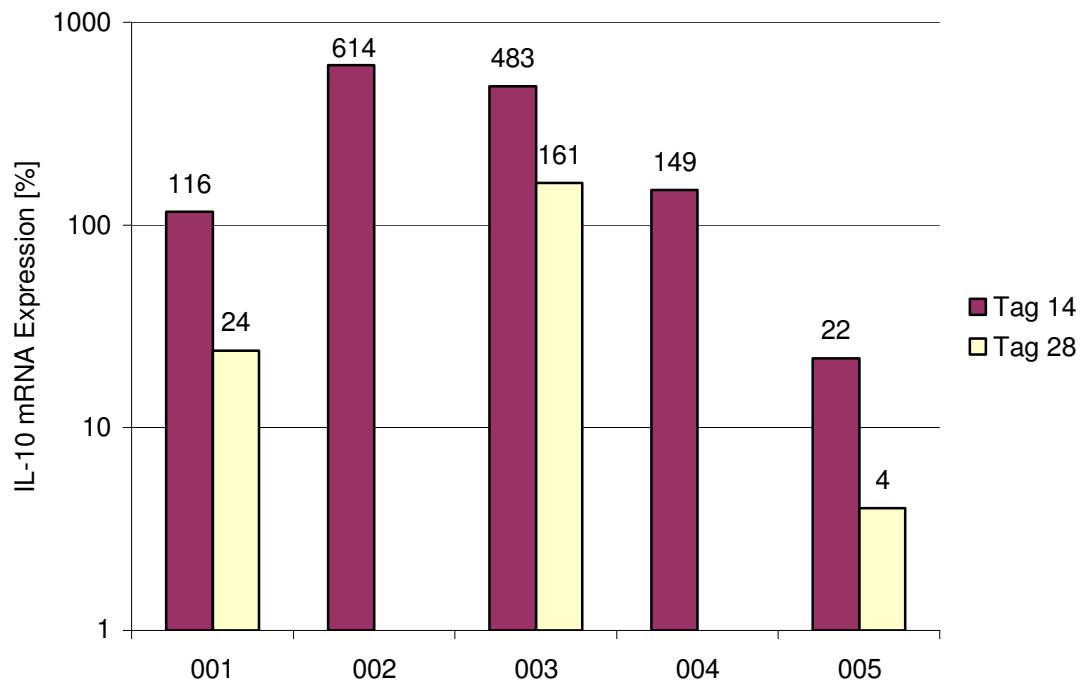


38. Diagramm: Darstellung der TNF- α -mRNA-Expression unter Therapie mit TBC 1269Z. Der Ausgangswert wurde 100 % gesetzt.

3.3.5 Ergebnisse der IL-10-mRNA-Expression

Die IL-10-Expression wurde durchschnittlich unter der Therapie mit Bimosiamose um 64 % erhöht, sank in der Nachbeobachtungszeit jedoch um 56,8 % unter den Ausgangswert.

Der Patient 001 zeigte eine Zunahme von 16,4 % unter der Therapie, während der Nachbeobachtungsphase fiel dieser Wert 76,2 % unter den Ausgangswert. Bei dem Patienten 002 konnte unter der Therapie mit Bimosiamose disodium eine Zunahme von 514 % der mRNA-Expression des IL-10 verzeichnet werden. Bei Patient 003 kam es unter der Therapie mit Bimosiamose disodium zu einer Zunahme der IL-10-Expression um 383 %, während der Nachbeobachtungsphase nahm die mRNA-Expression ab, lag jedoch immer noch 61,3 % über dem Ausgangswert. Der Patient 005 zeigte eine Abnahme von 78,1 % unter der Therapie mit Bimosiamose disodium, während der Nachbeobachtungsphase sank dieser Wert 96 % unter den Ausgangswert. Bei dem Patienten 004 konnte unter der Therapie mit Bimosiamose disodium eine Zunahme von 48,7 % der mRNA-Expression des IL-10 verzeichnet werden.

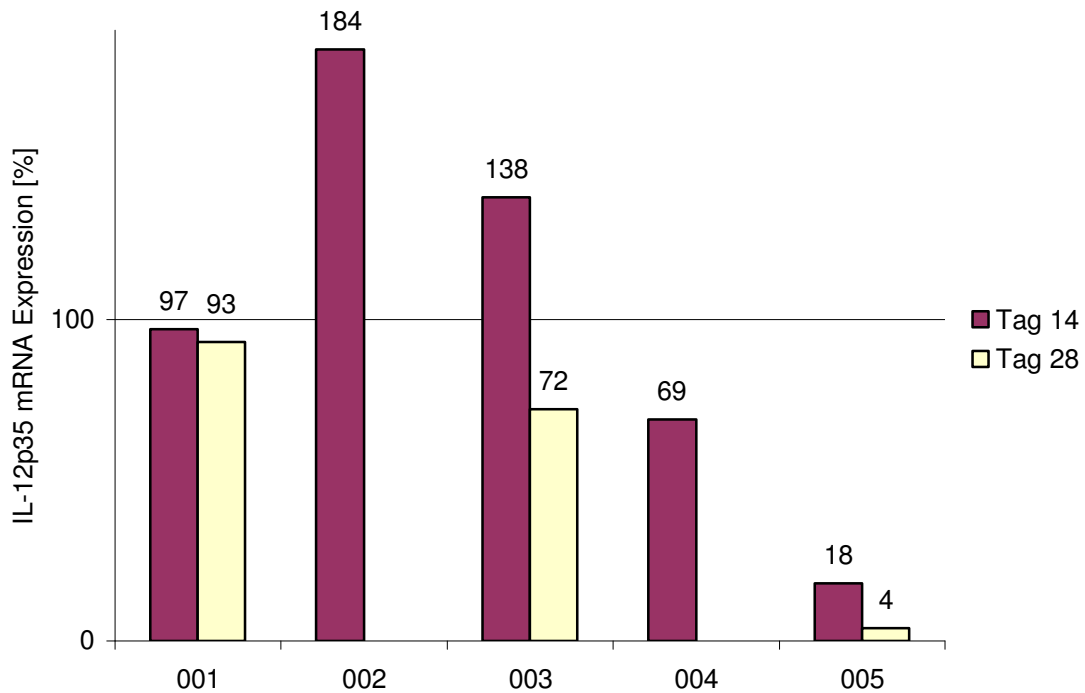


39. Diagramm: Darstellung der IL-10-mRNA-Expression unter der Therapie mit TBC 1269Z. Der Ausgangswert ist 100 % gesetzt worden.

3.3.6 Ergebnisse der IL-12p35-mRNA-Expression

Die IL-12p35-Expression wurde durchschnittlich unter der Therapie mit Bimosiamose disodium um 46 % reduziert und fiel in der Nachbeobachtungszeit weiter auf 40,3 % des Ausgangswerts.

Der Patient 001 zeigte eine Abnahme von 3,3 % unter der Therapie, während der Nachbeobachtungsphase sank dieser Wert 6,5 % unter den Ausgangswert. Bei dem Patienten 002 konnte unter der Therapie mit Bimosiamose disodium eine Zunahme von 84,3 % der mRNA-Expression des IL-12p35 verzeichnet werden. Bei Patient 003 kam es unter der Therapie mit Bimosiamose disodium zu einer Zunahme der IL-12p35-Expression um 38,3 %, während der Nachbeobachtungsphase nahm die mRNA-Expression ab (27,3 % unter den Ausgangswert). Der Patient 005 zeigte eine Abnahme von 81,9 % unter der Therapie mit Bimosiamose disodium, während der Nachbeobachtungsphase fiel dieser Wert 95,3 % unter den Ausgangswert. Bei dem Patienten 004 konnte unter der Therapie mit Bimosiamose disodium eine Abnahme von 31 % der mRNA-Expression des IL-12p35 verzeichnet werden.

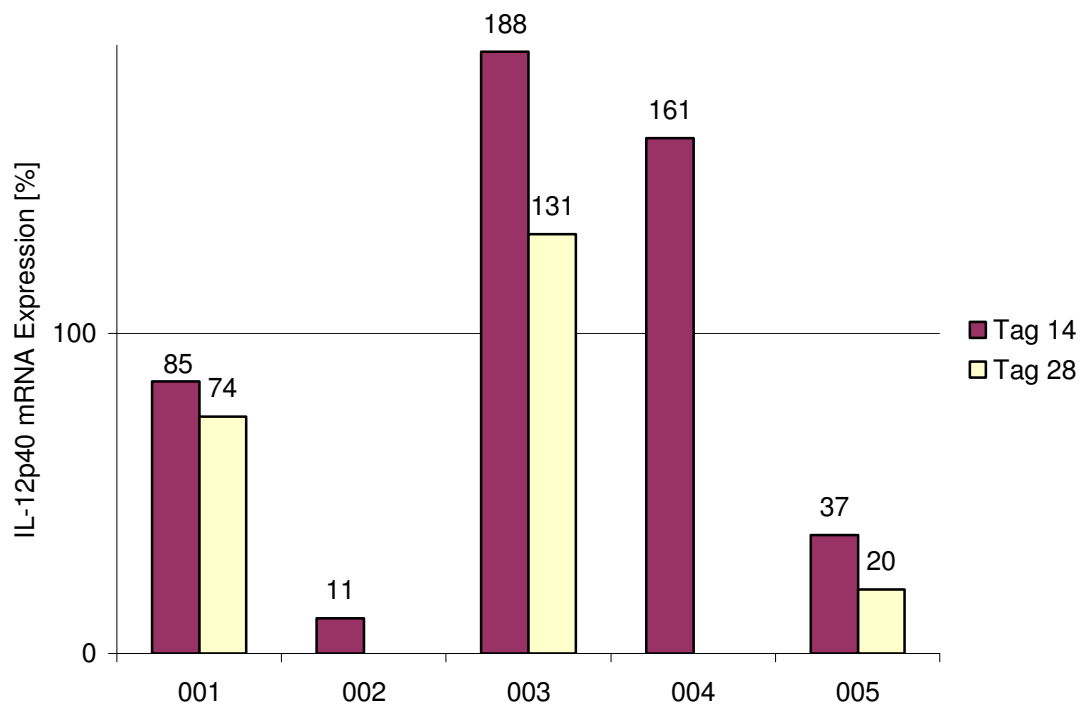


40. Diagramm: Darstellung der IL-12p35-mRNA-Expression unter der Therapie mit TBC 1269Z. Der Ausgangswert wurde 100 % gesetzt.

3.3.7 Ergebnisse der IL-12p40-mRNA-Expression

Die IL-12p40-Expression wurde durchschnittlich unter der Therapie mit Bimosiamose disodium um 35,4 % erhöht, fiel in der Nachbeobachtungszeit jedoch um 61,3 % unter den Ausgangswert.

Der Patient 001 zeigte eine Abnahme von 14,5 % unter der Therapie, während der Nachbeobachtungsphase fiel dieser Wert 26,1 % unter den Ausgangswert. Bei dem Patienten 002 konnte unter der Therapie mit Bimosiamose disodium eine Zunahme von 11,5 % der mRNA-Expression des IL-12p40 verzeichnet werden. Bei Patient 003 kam es unter der Therapie mit Bimosiamose disodium zu einer Zunahme der IL-12p40-Expression um 87,9 %, während der Nachbeobachtungsphase sank die mRNA-Expression, lag jedoch immer noch 30,6 % über dem Ausgangswert. Der Patient 005 zeigte eine Abnahme von 62,6 % unter der Therapie mit Bimosiamose disodium, während der Nachbeobachtungsphase fiel dieser Wert 79,6 % unter den Ausgangswert. Bei dem Patienten 004 konnte unter der Therapie mit Bimosiamose disodium eine Zunahme von 60,1 % der mRNA-Expression des IL-12p40 verzeichnet werden.



41. Diagramm: Darstellung der IL-12p40-mRNA-Expression unter der Therapie mit TBC 1269Z. Der Ausgangswert wurde 100 % gesetzt.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

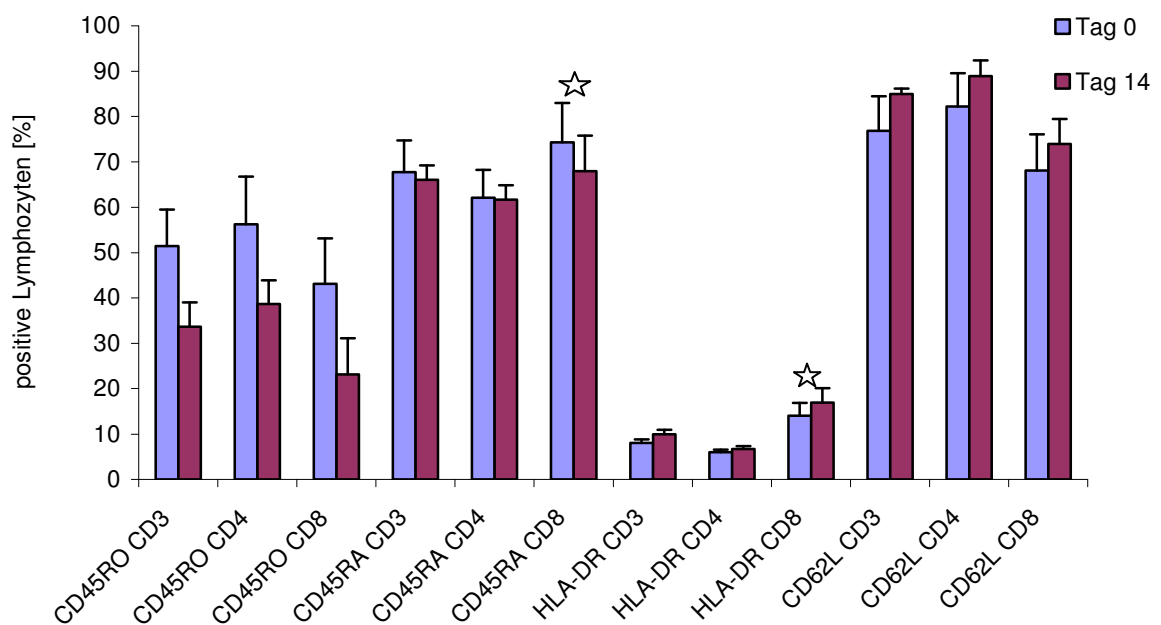
3.4.1 Durchflusszytometrie

Nach der kurzen Studiendauer von nur 14 Tagen Medikation konnte eine Reduktion der CD45RO-positiven Zellen (Memory-Zellen), sowohl bei den CD3-positiven als auch bei den CD4-positiven und den CD8-positiven T-Lymphozyten bei fast allen Patienten nachgewiesen werden, die Ergebnisse jedoch nicht statistisch signifikant.

Ebenso wurde eine Abnahme der CD45RA-positiven Zellen (naive Zellen) bei drei der fünf Patienten bei den CD3- und CD4-positiven Zellen gemessen. Die CD45RA CD8-positiven Zellen nahmen bei allen Patienten ab (statistisch signifikante Reduktion). Es kam unter der Behandlung mit Bimosiamose disodium zu einer prozentualen Zunahme der HLA-DR CD3-, HLA-DR CD4-, und den HLA-DR CD8-positiven Zellen. Die Zunahme der HLA-DRCD8-positiven Zellen war statistisch signifikant.

Es kam zu einer Zunahme der CD62-L CD3-positiven Zellen im Blut, bei einem Patienten deutlich, bei drei weiteren Patienten geringfügig. Die CD62-L CD4-positiven und CD62-L CD8-positiven Zellen im Blut stiegen unter der Behandlung mit Bimosiamose disodium bei drei der fünf Patienten an, bei zwei Patienten kam es zu einer minimalen Reduktion.

Statistisch signifikante Veränderungen zeigten die CD45RA CD8-markierten Zellen mit $p = 0,037$ von Tag 0 zu Tag 14 und die HLA-DR CD8-markierten Zellen mit $p = 0,046$ von Tag 0 zu Tag 14, in dem Diagramm markiert mit \star . Bei allen anderen war $p > 0,5$.



42. Diagramm: Zusammenfassung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie von Tag 0 = screening Tag und Tag 14 = Ende der Therapie mit TBC 1269Z. Dargestellt sind die Mittelwerte und SEM.

3.4.2 Immunhistologie

Die Anzahl der CD3-positiven Zellen nahm bei drei Patienten unter der Behandlung mit TBC 1269Z in der Epidermis zu, bei zwei Patienten ab. In der Dermis wurde bei vier von fünf Patienten eine Abnahme der CD3-positiven Zellen in der Dermis beobachtet.

Die Anzahl der der CD4-positiven Zellen nahm unter der Behandlung mit TBC 1269Z in der Epidermis ab, im gleichen Zeitraum in der Dermis zu. Dies wurde bei vier von fünf Patienten festgestellt.

Die CD8-positiven Zellen waren nach der Behandlungszeit sowohl in der Epidermis (vier Patienten) als auch in der Dermis (drei Patienten) erhöht.

Unter der Therapie mit TBC 1269Z nahmen die HLA-DR-markierten Zellen in der Epidermis und in der Dermis ab, stiegen innerhalb der Nachbeobachtungszeit jedoch über den Ausgangswert an.

Es kam zu einer Abnahme der CD62-E-, CD62-L- und CD62-P-positiv gefärbten Zellen in der Dermis. Die Reduktion der CD62-E-positiven Zellen und die Reduktion der CD62-L-positiven Zellen wurde jeweils von den selben drei Patienten gezeigt. Die Reduktion der CD62-P-positiven Zellen war bei allen Patienten zu verzeichnen.

Im Verlauf der Nachbeobachtungszeit fielen die CD62-E-markierten Zellen weiter ab, während es bei den CD62-L- und den CD62-P-positiven zu einem leichten Anstieg kam. Es waren nur die Veränderungen der CD8-positiven Zellen in der Epidermis und die Veränderungen der CD62-P-positiven Zellen in der Dermis statistisch signifikant.

3.4.3 Real-Time-PCR

Unter der Behandlung mit TBC 1269Z kam es zur Abnahme der mRNA-Expression folgender proinflammatorischer Zytokine: Interferon- γ , Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-12p35.

Auch während der Nachbeobachtungsphase fiel die Expression der mRNA weiter ab. Es kam unter der Therapie mit Bimosiamose zu einem Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-10 sowie des Interleukins-1- β und des Interleukins-12p40, welche jedoch innerhalb der Nachbeobachtungszeit alle wieder abfielen, zum Teil sogar unter das Ausgangsniveau. Die Veränderungen der Zytokinexpression waren nicht statistisch signifikant.

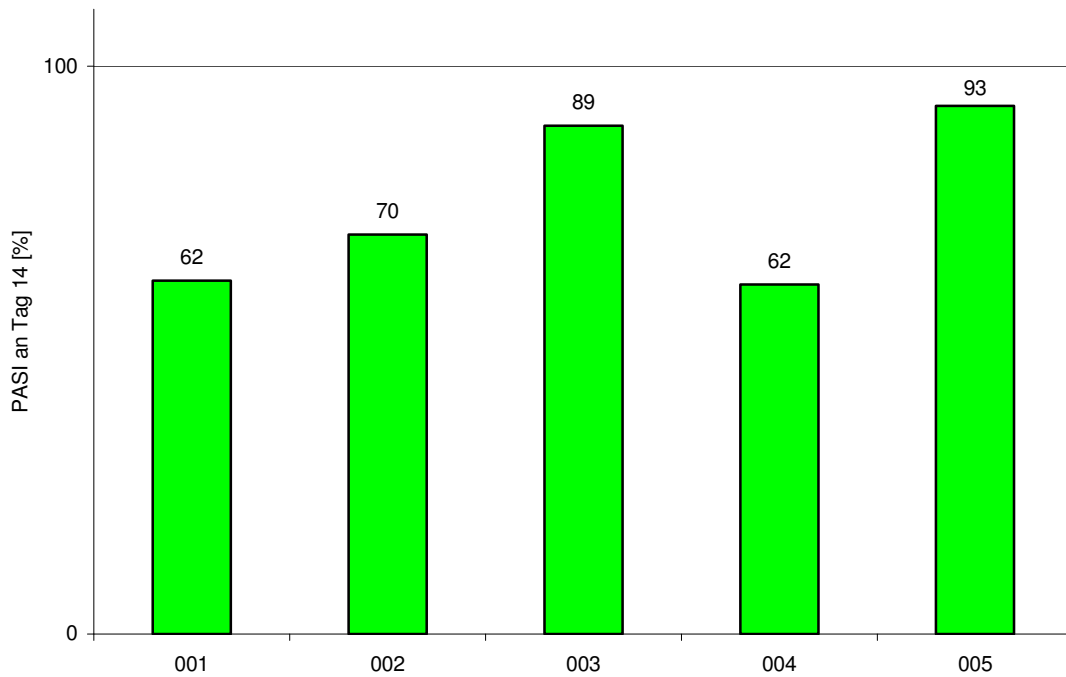
4 Diskussion

Psoriasis ist eine chronische, entzündliche Hauterkrankung an deren Entstehung sowohl Epidermis, Dermis, als auch das Immunsystem beteiligt sind (Christophers 1996, Nickoloff *et al.* 1990). Effektive, klassische systemische Psoriasis-Therapien greifen entweder in das Immunsystem ein (wie Ciclosporin A) oder wirken direkt auf die Epidermis durch Hemmung der Keratinozytenhyperproliferation (Retinoide) bzw. wirken auf beides (Methotrexat).

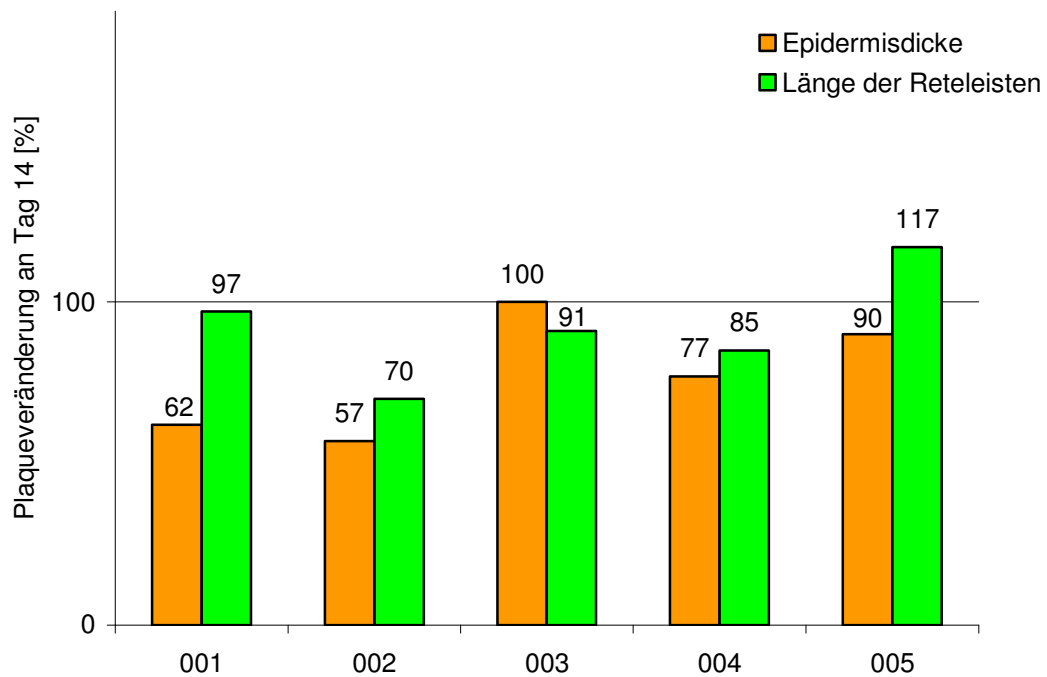
Auch die endotheliale, vaskuläre Aktivierung rückt bei der Entstehung der Psoriasis immer weiter in den Interessenschwerpunkt (Vandermeeren *et al.* 1997).

Hier wurde der Effekt des Selektin-Antagonisten Bimosiamose disodium in einer Pilotstudie mit fünf Patienten untersucht. Es wurden verschiedene Leukozytensubpopulationen im Blut sowie ihre Veränderung unter Therapie untersucht. Die Verteilung von CD3-positiven T-Zellen, CD4-positiven T-Zellen, CD8-positiven T-Zellen und CD20-positiven Zellen wurden in einer betroffenen Psoriasislesion (Ziellesion) mit Hilfe der Immunhistologie vor und nach der Therapie mit Bimosiamose disodium untersucht. Darüber hinaus wurde die Anzahl von CD62-E-positiven, CD62-L-positiven und CD62-P-positiven Zellen in der Dermis bestimmt. Mit Hilfe der TaqMan PCR wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine (IL-1- β , IL-12p35, IL-12p40, IL-10, IFN- γ , TNF- α sowie von CD3) in der betroffenen Ziellesionen vor und nach der Therapie nachgewiesen und quantifiziert. Die Wirksamkeit, Pharmakokinetik und Sicherheit des Selektin-Antagonisten wurde in der Dissertation von Frau Sandra Philipp mit dem Titel „*Psoriasistherapieversuch mit dem Pan-Selektin-Antagonisten TBC 1269Z*“ ausgewertet. Auf die Daten der Wirksamkeit wird im Folgenden Bezug genommen (PASI). Aus diesem Grund wird hier kurz gezeigt, wie sich der PASI-Verlauf unter der Therapie mit Bimosiamose disodium entwickelt hat. Dargestellt werden ebenso die Veränderungen in der Dicke der Epidermis und der Länge der Reteleisten. Die Studie wurde an fünf Patienten durchgeführt. Es haben sich nur vier statistisch signifikante Unterschiede ergeben. Aus diesem Grund werden hier hauptsächlich die Tendenzen der untersuchten Parameter diskutiert. Die Wirkweise des bereits zugelassenen Biologics Raptiva ist mit der vermuteten Wirkungsweise von Bimosiamose disodium vergleichbar, so dass

in der folgenden Diskussion häufig Bezug auf Studienergebnisse dieses Medikaments genommen wird.



9. Abbildung: Darstellung der PASI-Entwicklung der einzelnen Patienten an Tag 14. Der Ausgangswert wurde 100 % gesetzt.



10. Abbildung: Darstellung der Plaquerentwicklung (Dicke der Epidermis und die Länge der Reteleisten in der Ziellesion) der einzelnen Patienten unter der Therapie mitTBC 1269Z. (Der Ausgangswert wurde 100 % gesetzt.)

Wirkung von TBC 1269Z auf die Lymphozytensubpopulationen im Blut

CD45RO-positiv markierte Lymphozyten

Die CD45RO-positiven Zellen nehmen bei den CD3-positiven, den CD4-positiven und bei den CD8-positiven Zellen unter der 14-tägigen Therapie mit TBC 1269Z bei vier der fünf Patienten ab. Dies sind Memory-T-Zellen, die in der frühen und akuten Phase der Psoriasis eine tragende Rolle bei der Entstehung der Psoriasislesion haben (Vissers *et al.* 2004) und mit dafür verantwortlich gemacht werden, dass die Typ 1 Zytokine, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung psoriasiformer Plaques beteiligt sind, exprimiert werden (MacDonald und Burden 2007).

Die Abnahme der gemessenen CD45RO-positiven CD3 Zellen zeigen eine ähnliche Tendenz wie die Entwicklung der Epidermisdicke. Betrachtet man die Einzelwerte der Patienten, so kann man sehen, dass die Patienten, die unter der Medikation die größte Reduktion der Epidermisdicke hatten, auch die deutlichste Reduktion der CD45RO-positiven Zellen hatten, bzw. umgekehrt. Bei dem Patienten 005, der nur eine minimale Reduktion der Epidermisdicke, sowie eine Zunahme der Länge der Reteleisten hatte, kam es unter Therapie mit TBC 1269Z sogar zu einem minimalen Anstieg der CD45RO-positiven CD3-Zellen im Blut (Korrelation CD45RO CD3+/Epidermisdicke von $R^2 = 0,8941$, CD45RO CD4+/Epidermisdicke von $R^2 = 0,8513$ und für die CD45RO CD8+/Epidermisdicke $R^2 = 0,8054$).

Eine ähnliche Beobachtung konnte für die CD45RO-positiven CD4+- und auch für die CD8+-Zellen gemacht werden. Dies ist ein interessantes Ergebnis, vor allem, wenn man den vermuteten Wirkungsmechanismus des Medikaments betrachtet. Sollte doch Bimosiamose disodium die Auswanderung der T-Zellen aus dem Blut verhindern, oder zumindest reduzieren, so wären Ergebnisse zu erwarten gewesen, welche eine Zunahme der CD45RO-positiven Zellen im Blut zeigen.

Die Gesamtanzahl der CD45RO-positiven T-Zellen ist bei Patienten mit Psoriasis im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesunder Probanden erhöht (Lecewicz-Torùn *et al.* 2001, Fife *et al.* 2007).

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die CD45RO-positiven Zellen im Blut sowie die Expression der Typ 1 Zytokine, vertreten durch

IFN- γ , TNF- α , IL-12p35, in der Haut unter der Therapie mit dem Pan-Selektin-Antagonisten reduziert wurden.

Diese Korrelationen zwischen der PASI-Verbesserung und der Abnahme der Memory-Effektor-T-Zellen wurde auch unter der Therapie mit dem Biologic Alefacept beobachtet (Ortonne *et al.* 2003 und Ellis *et al.* 2001). Alefacept übt seine Wirkung vor allem durch Induktion von Apoptose aus. Dies lässt die Frage zu ob Bimosiamose disodium auch Apoptose in T-Zellen induziert.

CD45RA-positiv-markierte Lymphozyten

Die CD45RA-positiven CD3- und die CD4-positiven Zellen nahmen unter der Therapie nur leicht ab, ebenso, die CD8-positiven Zellen. Die Abnahme der CD45RA CD8-positiven Zellen war statistisch signifikant.

Es handelt sich hier um naive T-Zellen, die kontinuierlich vom Körper gebildet werden, mit abnehmender Tendenz im Alter, und erst in verschiedenen lymphatischen Geweben ihre Differenzierung erfahren.

Es gab kaum Veränderungen bei den naiven T-Zellen. Auch nach Fife *et al.* 2007 sind die naiven CD4- und CD8-positiven T-Zellen im psoriasiformen Plaque im Vergleich zu gesunder Haut nicht erhöht (Fife *et al.* 2007), so dass eine Veränderung der naiven T-Zellen vermutlich in keinem Zusammenhang mit der klinischen Ausprägung der Psoriasis steht.

HLA-DR-positiv markierte Lymphozyten

Die Analysierung des Aktivierungsmarkers HLA-DR auf T-Zellen zeigt eine Steigerung der HLA-DR-positiven T-Zellen im Blut unter der Therapie mit Bimosiamose disodium. Der Anteil der HLA-DR CD3-positiven Zellen wurde bei allen Patienten erhöht, jedoch in sehr unterschiedlichem Maß. Die Erhöhung der HLA-DR CD4-positiven Zellen war bei vier der fünf Patienten zu beobachten. Die Zunahme der HLA-DR CD8-positiven Zellen im Blut unter der Therapie mit TBC 1269Z war statistisch signifikant. Dies lässt die Vermutung zu, dass speziell diese Untereinheit an der Auswanderung aus dem Blut gehindert worden ist, so dass es zu einer prozentualen Erhöhung im Blut kam.

CD62-L positiv markierte Lymphozyten

Die Zunahme der CD62-L-positiven Zellen im Blut könnte auf die Wirkung des Selektin-Antagonisten hinweisen, leider war eine deutliche Zunahme der CD62-L-

positiven Zellen nur bei einem Patienten zu beobachten. Betrachtet man die Mittelwerte der CD62-L-positiven Zellen, so ist sowohl bei den CD3-positiven als auch bei den CD4- und den CD8-positiven Zellen eine Zunahme im Blut gemessen worden. Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass durch die Blockade der Bindungsstelle die Zellen, auf deren Oberfläche das L-Selektin nachgewiesen worden ist, an ihrem „Auswandern“ aus dem Blut effektiv gehindert worden sind und es somit zu einer Akkumulation im peripheren Blut kam. Allerdings war diese Erhöhung nicht statistisch signifikant. Zur Untermauerung dieser Ergebnisse konnten bisher keine vergleichbaren Versuchsergebnisse in der aktuellen Fachliteratur gefunden werden; weitere Analysen wären hier nötig.

L-Selektin dient den naiven T-Zellen als so genannter homing-Faktor um in primär lymphatische Organe einzuwandern (Abbas und Lichtman 2006). Bei erfolgreicher Blockade des L-Selektins wäre somit auch die Aktivierung der naiven T-Zellen erschwert, was dafür sprechen würde, das hier getestete Medikament als Dauermedikation einzusetzen, und am besten in einer möglichst beschwerdefreien Zeit mit der Therapie zu beginnen.

Wirkung von TBC 1269Z auf die Zellverteilung in der Haut

CD3-positive Zellen in der Haut

Es wurden die CD3-positiven Zellen in der Haut von Psoriasispatienten unter der Therapie mit TBC 1269Z untersucht. Hierbei wurden die Zellzahlen vor und nach der Therapie in der Dermis und der Epidermis bestimmt.

Mit dem Antikörper CD3 werden alle T-Zellen gefärbt, die in der Haut zu finden sind, egal, welcher Subpopulation sie angehören.

Die Gesamtzahl der CD3-positiven Zellen in der Haut wird unter der Therapie mit TBC 1269Z nicht signifikant verändert. Betrachtet man die Epidermis und die Dermis separat, wird eine Reduktion der CD3-positiven Zellen in der Dermis beobachtet. Die Reduktion der CD3-positiven Zellen in der Dermis könnte im Zusammenhang mit dem Hautbefund stehen und entsprechen auch der zuvor gemachten Hypothese, dass durch das Medikament die Einwanderung der T-Zellen in die Haut reduziert wird. Die Anzahl der CD3-positiven Zellen, die sich in der Epidermis befinden,

scheint man mit dem Medikament Bimosiamose disodium nicht verändern zu können, bzw. nicht in der Kürze der durchgeführten Therapie. Die Veränderungen der Zellzahlen in der Epidermis schwanken von Patient zu Patient und korrelierten in unseren Untersuchungen nicht mit der Entwicklung des Hautbefundes. Eine genauere Untersuchung dieser Entwicklung benötigt einen größeren Patientenpool und evtl. auch einen längeren Untersuchungszeitraum, um statistisch signifikante Veränderungen der CD3-positiven Zellen sowohl in der Dermis, als auch in der Epidermis, beobachten zu können.

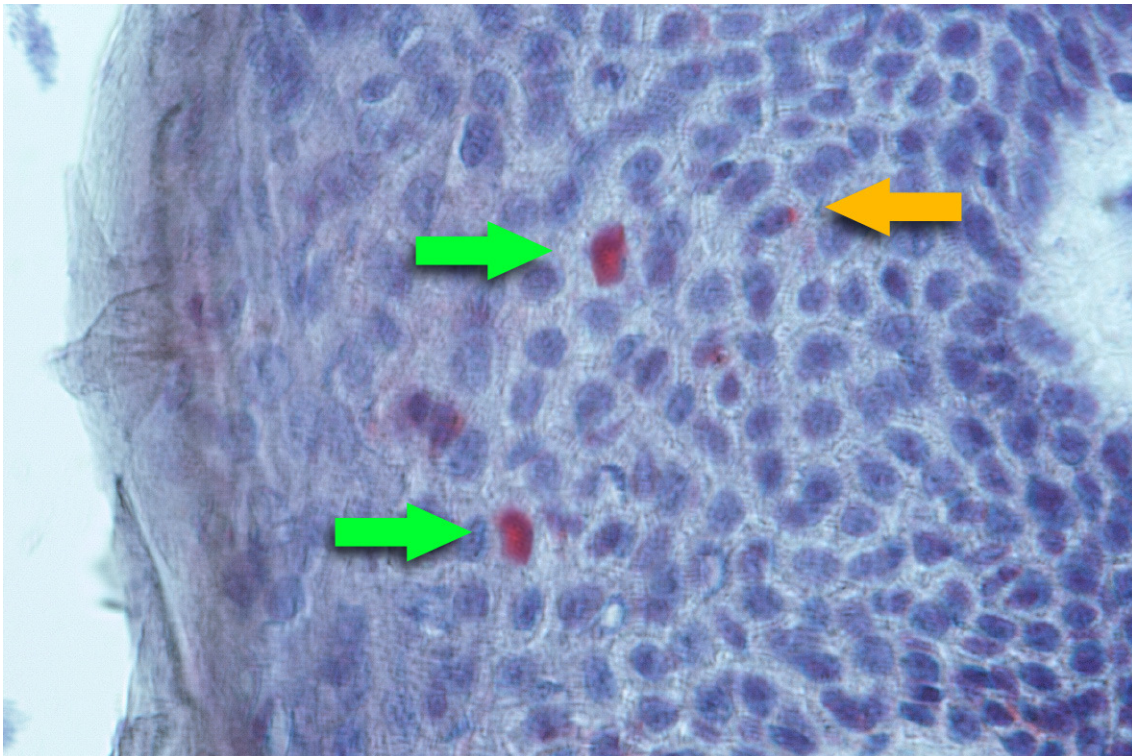
Bimosiamose disodium soll T-Zellen an der Einwanderung in kutane Gewebe hindern. Hier werden Momentaufnahmen jeweils vor und nach der Medikation betrachtet.

Es wird eine Differenz gebildet zwischen der Zellmenge, die eingewandert ist, die Apoptose begangen hat, oder die evtl. auch aus der Haut wieder ausgewandert sein könnte. Bei Betrachtung der Zellzahlen 14 Tage nach Ende der Therapie war eine Abnahme der CD3-positiven Zellen zu beobachten. Allerdings lagen von diesem Zeitpunkt der Studie nur von drei Patienten Hautbiopsien vor, die ausgewertet werden konnten. Beim Nachweis der mRNA für CD3 in den Hautbiopsien kam es bei vier der fünf Patienten zu einer Reduktion. Nimmt man die mRNA als Maß der Extravasion, da man eine deutlich größere Gewebemenge bei der Analyse berücksichtigt als beim Auszählen von drei Gefrierschnitten, so ist immerhin bei vier der fünf Patienten eine deutliche Reduktion zu beobachten gewesen.

CD4-positive Zellen in der Haut

Es wurden die Subpopulation der T-Zellen, die T-Helferzellen in der Haut, mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD4 bestimmt. Die Anzahl der positiv gefärbten Zellen in der Dermis und in der Epidermis wurden vor und nach der Therapie ausgezählt. Am Ende der Nachbeobachtungsphase (14 Tage nach Therapieende) wurden nur noch von drei Patienten die Zellzahlen in der Haut bestimmt.

CD4 dient dem Nachweis von T-Helferzellen. Jedoch zeigen auch Monozyten und Makrophagen eine geringe CD4-Expression. Zur Auswertung in dieser Arbeit wurden aus diesem Grund nur die stark positiv gefärbten Zellen herangezogen.



11. Abbildung: Stark positiv gefärbte Zellen, die zur Auswertung herangezogen wurden (grüne Pfeile) und gering gefärbte Zelle (gelber Pfeil; Vergrößerung 1: 40).

Betrachtet man die Werte der CD4-positiven Zellen, so sieht man eine deutliche Reduktion dieser Zellen in der Epidermis und eine Zunahme in der Dermis.

Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, dass die CD4-positiven Zellen aus der Epidermis ausgewandert und nun in der Dermis zu finden sind. Im Vergleich mit den Einzelwerten wird diese These von drei der fünf Patienten gestützt. Im Verlauf der Nachbeobachtungszeit wurden die CD4-positiven Zellen in der Epidermis weiter reduziert und auch in der Dermis nahmen sie wieder ab. Vergleicht man diese Beobachtung mit den CD4-positiven Zellen im Blut, so wird die These, dass die CD4-positiven Zellen aus der Haut wieder auswandern, gestärkt, da es im Verlauf der Nachbeobachtung zu einer Zunahme der CD45RO CD4-positiven Zellen im Blut kommt. Dieser Marker färbt vor allem reife, aktivierte T-Zellen wie sie innerhalb des Psoriasissschubes in der Haut zu finden sind. Es ist daher möglich, dass diese aus der Epidermis und der Dermis ausgewandert sind.

In anderen Untersuchungen konnte nach Therapie mit Efalizumab eine deutliche Reduktion von CD4-positiven Zellen in der Epidermis nachgewiesen werden. Efalizumab soll, wie auch Bimosiamose disodium, die Einwanderung der T-Zellen in kutanes Gewebe verhindern. Allerdings wurde das Medikament Efalizumab 12

Wochen verabreicht (van Lingen *et al.* 2008). Ob es bei der Therapie mit Bimosiamose disodium auch zu einer signifikanten Abnahme der CD4-positiven Zellen nach 12-wöchiger Therapiedauer kommt, bleibt zu untersuchen.

Passend zu den Ergebnissen von van Lingen, wurde von Mrowietz beschrieben, dass der Influx von CD4-positiven T-Zellen bevorzugt in der Dermis zu einer Verschlechterung des klinischen Bildes führt (Mrowietz und Gläser 1997). Dies widerspricht jedoch unseren Ergebnissen, bei denen trotz Zunahme der CD4-positiven Zellen in der Dermis eine Verbesserung des klinischen Bildes beobachtet werden konnte.

CD8-positive Zellen in der Haut

In weiteren Untersuchungen wurden während der Studie die CD8-positiven T-Zellen in der Haut der behandelten Patienten untersucht. Der Oberflächenmarker CD8 dient der Bestimmung der zytotoxischen T-Zellen. CD8-positive Zellen exprimieren vor allem IFN- γ und TNF- α . Die Anzahl der CD8-positiven Zellen stieg sowohl in der Epidermis, als auch in der Dermis unter der 14-tägigen Therapie mit Bimosiamose disodium bei vier der fünf Patienten an. Unter Therapie mit Efalizumab ist eine Reduktion der CD8-positiven Zellen in der Epidermis zu beobachten. Im Gegensatz zu der Untersuchung von van Lingen konnte in der hier untersuchten Studie keine Reduktion von CD8-positiven Zellen in der Epidermis nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise ebenfalls auf die sehr kurze Studiendauer zurückzuführen. Unter der 12-wöchigen Therapie mit Efalizumab konnte eine deutliche Reduktion der CD4- und der CD8-positiven Zellen in der Haut nachgewiesen werden (van Lingen 2008). Die Erhöhung der CD8-positiven Zellen, vor allem in der Epidermis, führt nach Mrowietz und Gläser zu einer Besserung der Effloreszenzen (Mrowietz und Gläser 1997). Diese Aussage wird von den hier gemachten Beobachtungen unterstützt.

Nach den Beobachtungen, die von Azam *et al.* 2007 gemacht wurden, besteht ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der CD8-positiven Zellen und der Abnahme der proinflammatorischen Zytokine wie IFN- γ (Azam *et al.* 2007). Dieses Ergebnis konnte bei der hier durchgeführten Studie nicht bestätigt werden, es wurde weder eine Abnahme der CD8-positiven Zellen noch eine signifikante Reduktion der IFN- γ -Expression gemessen. Es gab keine statistisch signifikanten Veränderungen bei der IFN- γ -Expression, es gab jedoch auch keine Korrelation zwischen der Anzahl der

CD8-positiven Zellen in der Dermis und der Epidermis und der IFN- γ Expression bei den einzelnen Patienten. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass eine zu geringe Anzahl an Patienten untersucht wurde. Die Anzahl der CD8-positiven Zellen hat unter der Therapie mit TBC 1269Z sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis zugenommen, während die proinflammatorischen Zytokine abnahmen. Bemerkenswert an diesem Ergebnis ist, dass durch die Antagonisierung der Selektine E, P und L die Einwanderung von T-Zellen in das kutane Gewebe verhindert werden soll, es unter der Therapie mit Bimosiamose disodium jedoch zu einer Zunahme der CD8-positiven T-Zellen in der Haut gekommen ist.

Nach den erzielten Ergebnissen ergibt sich folgende Schlussfolgerung: entweder benötigen die CD4- und CD8-positiven Zellen länger, um in der Hautlesion reduziert zu werden, nachdem sich der klinische Befund verbessert hat, oder die Anzahl der vorhandenen CD4- und CD8-positiven Zellen in der Haut ist kein guter Marker für die Schwere der Psoriasis bzw. sie haben eine weniger große Relevanz bei der Ausprägung des klinischen Bildes der Psoriasis, als bisher vermutet.

CD20-positive Zellen in der Haut

Des Weiteren wurden die CD20-positiven Zellen in der Plaqueregion sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis untersucht.

Der Antikörper gegen CD20 reagiert mit B-Zellen, wobei die Funktion des nachgewiesenen Proteins die B-Zell-Aktivierung ist. Aktivierte B-Zellen kommen unter normalen Bedingungen in der Haut nicht vor und auch unter pathologischen Bedingungen ist ihr Auftreten in der Haut selten (Asadullah *et al.* 2000). In dieser Studie wurden die CD20-positiven Zellen untersucht, um ein klares Bild über die eingewanderten Lymphozyten zu bekommen.

Die CD20-positiven Zellen kamen nur in sehr geringer Anzahl vor. Durchschnittlich ergab sich ein Ergebnis, welches unter einer Zelle pro mm^2 lag. Das heißt, bei den eingewanderten Lymphozyten handelte es sich fast ausschließlich um T-Zellen.

CD45RO-positive Zellen in der Haut

Der Antikörper gegen CD45RO reagiert mit aktivierten T-Zellen sowie schwach mit Granulozyten und Monozyten. Es wurden nur die stark positiv gefärbten Zellen ausgezählt und als aktivierte T-Zellen interpretiert. Es gab bei dieser Untersuchung keine statistisch signifikante Veränderung, ebenso keine Korrelation zwischen der

PASI-Entwicklung der einzelnen Patienten und der Entwicklung der CD45RO-positiven Zellen in der Haut. In den Untersuchungen von van Lingen wurden unter zwei verschiedenen erfolgreichen Psoriasis-Therapien gegensätzliche Ergebnisse zu der Anzahl der CD45RO-positiven Zellen gefunden. Unter einer Therapie mit Etanercept kam es zu einer Zunahme der CD45RO-positiven Zellen in der Haut und zu einer größeren PASI-Reduktion als bei der Vergleichstherapie mit Efalizumab, bei der die CD45RO-positiven Zellen reduziert wurden, jedoch die PASI-Verbesserung nach 12 Wochen nicht so effektiv war. Dabei ist an zu merken, dass Etanercept ein TNF- α -Rezeptor-Antagonist ist und nicht über die Anzahl der T-Zellen in der Haut agiert, im Gegensatz zu Efalizumab. Jedoch lieferte auch die Aufteilung in Responder und Non-Responder bei der Efalizumab-Therapie keine einheitlichen Ergebnisse bezüglich der Anzahl der CD45RO-positiven Zellen in der Haut und dem Hautbefund (van Lingen *et al.* 2008). Die hier gemachten Beobachtungen lassen die Interpretation zu, dass die Anzahl der CD45RO-positiven Zellen in der Haut nicht mit der Schwere des klinischen Bildes der Psoriasis zu korrelieren scheinen.

CD62-E-positive Zellen in der Haut

Die Untersuchungen der Zellen, die positiv auf den Marker CD62-E reagieren, ergaben, dass es durchschnittlich zu einer Abnahme der CD62-E-Färbung unter der Therapie mit Bimosiamose disodium kam. CD62-E dient als Erkennungsmarker für exprimiertes E-Selektin. E-Selektin wird hauptsächlich von Endothelzellen gebildet und dient als Anker für vorbeifließende Lymphozyten. E-Selektin wird in der Haut von Gesunden nur von Endothelien exprimiert, wenn kutan-entzündliche Bedingungen vorliegen. Die Endothelien von Psoriatikern exprimieren auch im Ruhezustand E-Selektin.

Bei den Patienten, bei denen es zu einer Abnahme der CD62-E Färbung kam, kam es ebenfalls zu einer Reduzierung der CD3-positiven Zellen in der Dermis. Berechnet man die Korrelation dieser Ergebnisse, ergibt sich für $R^2 = 0,834$. Es gab keine Korrelation zwischen der PASI-Entwicklung und der Abnahme der CD62-E-positiven Zellen.

Auch die Blockierung des E-Selektins durch den untersuchten Pan-Selektin-Antagonisten und die damit verbundene Blockierung des Antigens für den hier zum Nachweis eingesetzten Antikörpers liefern eine mögliche Erklärung für die gemessene Abnahme der CD62-E-positiven Zellen. Dies erklärt jedoch nicht die

weitere Reduktion der CD62-E-positiven Zellen in der untersuchten Haut während der Nachbeobachtungsphase. Ebenfalls möglich wäre die Reduktion der CD62-E-positiven Zellen durch den Rückgang der Entzündungsreaktion und der damit verbundenen Abnahme der E-Selektin fördernden Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und IL-1- β (Kulidjian 2002). Allerdings war zwischen den untersuchten proinflammatorischen Zytokinen und der Abnahme der Expression von E-Selektin kein statistisch signifikanter Zusammenhang zu finden.

CD62-L-positive Zellen in der Haut

Bei den Untersuchungen der CD62-L-positiven Zellen konnte bei drei Patienten eine Abnahme festgestellt werden. CD62-L-positiv sind diejenigen T-Zellen, die das L-Selektin auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass mehr Zellen Apoptose begonnen haben oder ausgewandert sind, als aus dem Blut neu rekrutiert werden konnten. Dies kann im Zusammenhang mit dem eingesetzten Medikament stehen und würde auch für seine Wirksamkeit sprechen. Es besteht jedoch auch bei diesen Untersuchungen die Möglichkeit der Blockierung der Nachweisstellen durch das getestete Medikament.

Die statistischen Analysen ergaben keine Korrelation zwischen der Veränderung der CD62-L-positiven Zellen in der Haut und den Veränderungen der CD62-L-positiven CD3-positiven, CD4-positiven oder CD8-positiven Zellen, die im Blut untersucht worden sind. Gefunden wurde eine Korrelation von $R^2 = 0,79$ zwischen der Abnahme der CD62-L-positiven Zellen in der Dermis und der Veränderung der CD3-positiven in der Dermis.

CD62-P-positive Zellen in der Haut

Die Untersuchungen der CD62-P-positiven Zellen in den Hautbiopsien haben zu folgendem Ergebnis geführt: während der Behandlung mit Bimosiamose disodium kam es bei allen fünf Patienten zu einer Abnahme der CD62-P-positiv gefärbten Zellen in den untersuchten psoriasiformen Plaques. Diese Veränderung war statistisch signifikant ($p \leq 0,016$). Der Antikörper für CD62-P reagiert mit P-Selektin, welches auf der Zelloberfläche von aktivierten Endothelzellen und von Thrombozyten exprimiert wird. Die Blockierung des P-Selektins am aktivierten Endothel, mit Hilfe des Medikaments Bimosiamose disodium, soll dazu beitragen, die Einwanderung der T-Zellen in kutanes Gewebe zu reduzieren und im idealen Fall zu verhindern. Es besteht auch die Möglichkeit unterschiedlicher Bindungsaffinitäten des Medikaments

an die unterschiedlichen Selektine. Nach den hier gemachten Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass die Bindungsaffinität von Bimosiamose disodium *in vivo* zum P-Selektin am höchsten ist.

Im Rahmen der Therapie mit TBC 1269Z wurde in der Dermis von den untersuchten Hautproben eine Reduzierung der CD3-positiven Zellen bei drei Patienten beobachtet. Dieses Ergebnis kann auf die Abnahme der P-Selektine unter der Therapie mit TBC 1269Z zurückzuführen sein. Die Ergebnisse, die bei der Analysierung der P-Selektin Expression generiert wurden, können jedoch genauso wie schon bei den CD62-E- und CD62-L-positiven Zellen auch auf die Blockade der Bindungsstellen durch den verwendeten Antikörper zurückzuführen sein.

Selektine zusammenfassend

Die mit dem getesteten Medikament herbeigeführte Blockade der drei Selektine E, L- und P sollte nicht zwangsläufig zu einer Reduzierung der Selektine in den untersuchten Hautbiopsien führen. Zur Überprüfung, ob es sich bei den hier gemessenen Daten um eine wirkliche Reduzierung der Selektine in der Haut handelt, oder ob nur der Nachweis dieser durch die Bindung des Medikaments an die entsprechenden Bindungsstellen erschwert wurde, würde sich ein Nachweis der Expression der Selektin-mRNA für E- und L-Selektin in den gesammelten Hautproben anbieten. Für P-Selektin wäre dieser Nachweis suboptimal, da die Speichermöglichkeit des P-Selektins in den Weibel-Palade-Körperchen berücksichtigt werden müsste (Kulidjian *et al.* 2002).

Dieser Nachweis war leider in der Versuchsplanung nicht vorgesehen und kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht mehr nachgeholt werden. Auch ein immunhistologischer Versuch wäre denkbar, um nachzuweisen, ob das Medikament die Nachweisstellen der Antikörper blockiert. Hierzu müssten Gewebeschnitte von unbehandelten Patienten vor der Behandlung mit dem primären Antikörper zuerst mit Bimosiamose disodium inkubiert werden. Dies wäre mit der entsprechenden Kontrolle (ohne Behandlung mit Bimosiamose disodium) eine Möglichkeit herauszubekommen, ob der gebundene Selektin Antagonist die Bindungsmöglichkeit des Antikörpers beeinflusst. Dieser Versuch ist zum derzeitigen Zeitpunkt nicht mehr möglich, da zum einen die verwendeten Antikörper von Dako vor einiger Zeit aus dem Programm genommen wurden und zum anderen keine ungefärbten Gewebeschnitte mehr existieren. Somit bleibt die Frage offen, ob es einen direkten Zusammenhang

zwischen der Abnahme der Selektine und der Medikation gibt, oder ob nur der Nachweis unter der Verwendung des Pan-Selektin-Antagonisten beeinträchtigt ist. Eine Wirkweise des Selektin-Antagonisten, die unabhängig vom Einfluss auf die Einwanderung der T-Zellen ist, könnte ebenfalls untersucht werden. Hierbei kommt z. B. eine ungeklärte Signalfunktion des E-Selektins in betracht (Hicks *et al.* 2005).

Interessanterweise scheint die gute Wirksamkeit der klassischen, systemischen Psoriasis-Therapeutika in engem Zusammenhang mit der Reduktion von Selektinen zu stehen. Die Wirksamkeit von Methotrexat wurde früher allein auf seine antiproliferatorische Wirkung, z. B. über die Hemmung von Dihydrofolatreduktase zurückgeführt. Mittlerweile konnte unter der Therapie mit Methotrexat eine deutliche Reduktion von E-Selektin mit gleichzeitiger Reduktion von CLA-positiven T-Zellen (CLA = cutaneous lymphocyte-associated antigen) in psoriasiformer Haut nachgewiesen werden. Diese Reduktion korrelierte mit der Reduktion des PASIs (Sigmundsdottier *et al.* 2004, Johnston *et al.* 2005). Auch bei Dimethylfumarat, dem Wirkstoff aus Fumaderm[®], konnte eine Reduzierung der zytokininduzierten E-Selektin-Expression, ebenso von VCAM-1 und ICAM-1 in Zellkultur gezeigt werden (Vandermeeren *et al.* 1997).

HLA-DR-positive Zellen in der Haut

Keratinozyten in psoriasiformer Haut exprimieren im Gegensatz zu nicht lesionaler Haut HLA-DR (Gottlieb *et al.* 1986, Ghoreschi *et al.* 2007). Es können während eines Psoriasissschubes viele HLA-DR-positive Zellen im Psoriasis Plaque, inkl. Dendritischen Zellen, Keratinozyten, Antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen, nachgewiesen werden (Komine *et al.* 2007). Auch die Langerhansschen Zellen exprimieren im Psoriasis Plaque HLA-DR, während perilesional und in unbefallener Haut diese Zellen kaum HLA-DR-positiv reagieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die stark positiv gefärbten Zellen wie T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen ausgezählt und im weiteren Verlauf ausgewertet. Die Anzahl der HLA-DR-exprimierenden B-Zellen kann aufgrund der insgesamt geringen Zahl der CD20-positiven Zellen vernachlässigt werden.

Die Abnahme der HLA-DR-positiven Zellen unter der Therapie mit Bimosiamose disodium in der Epidermis und in der Dermis war nicht statistisch signifikant. Es

bestand keine Korrelation zwischen der PASI-Entwicklung der einzelnen Patienten und der Menge der gemessenen HLA-DR-positiven Zellen in der Haut. Es bestand kein Zusammenhang zwischen den HLA-DR-positiven Zellen und der Veränderung der untersuchten Plaques.

Da es unter der Therapie mit Bimosiamose disodium nicht zu einer Abheilung der Plaques gekommen ist, konnten auch nach der Therapie mit Bimosiamose disodium weiter HLA-DR-positiv Zellen in der Psoriasislesion nachgewiesen werden. Bei einer längeren Studiendauer müsste untersucht werden, ob, während es zu einer kompletten Revision des Plaques kommt, eine signifikante Reduktion der HLA-DR-positiven Zellen in der Lesion nachgewiesen werden kann bzw. ob HLA-DR erst nach kompletter Revision nicht mehr nachweisbar ist.

Vergleich der immunhistologischen Daten

Unter der Therapie mit Bimosiamose disodium konnte keine Korrelation zwischen der Schwere der Psoriasis in den Ziellesionen (Epidermisdicke und Länge der Reteleisten) und der Expression von den Antigenen für CD3, CD4, CD8, HLA-DR und den Selektinen (CD62-E, CD62-L, CD62-P) gefunden werden. Hierbei könnte das Koebner Phänomen, welches zur Induktion der Psoriasis nach Verletzungen führt, durch die Biopsieentnahmen an Tag 0 eine Rolle gespielt haben. Auch die täglichen subkutanen Injektionen können hierbei einen Reizeffekt gebildet haben. Ob die Reizungen durch die Entnahme der Biopsie und der täglichen, intralesionalen, subkutanen Injektion eines größeren Volumens einen Einfluss auf die Ergebnisse aus der Immunhistologie und der TaqMan-PCR haben, müsste in einer weiteren Placebo kontrollierten Studie untersucht werden.

Unter der Therapie mit PUVA, narrow-band UVB und Ciclosporin A konnte jedoch eine vergleichbare Beobachtung gemacht werden: es kam unter der Therapie zu einer deutlichen Befundverbesserung, jedoch nicht zu einer Abnahme der CD3-, CD4-, CD8- und HLA-DR-positiven Zellen, wobei auch hier die Biopsien vor und nach der Therapie aus dem selben Plaque bzw. möglichst dicht aneinander, entnommen wurden (Erkin *et al.* 2007).

Wirkung von Bimosiamose disodium auf die Expression ausgesuchter Zytokine in der Haut

CD3-mRNA-Expression

Die Expression der mRNA für CD3 im psoriasiformen Plaque wurde gemessen.

CD3 ist ein Oberflächenmolekül (Erkennungsmolekül oder auch Rezeptor), welches ausschließlich auf T-Zellen vorkommt. Die Expression der CD3-mRNA ist aktivierungsabhängig, d. h. bei einer Aktivierung der T-Zellen ist die Expression von CD3 reduziert. Die Expression der CD3-mRNA wurde unter der Therapie mit Bimosiamose disodium bei vier Patienten reduziert, während die Gesamtzahl der CD3-positiven Zellen bei den immunhistologischen Untersuchungen in der Haut zugenommen hat. Unklar ist an dieser Stelle, welcher Marker sich als geeigneter für den Nachweis der eingewanderten T-Zellen in die Haut erweist.

In den hier gemachten Untersuchungen konnte kein Zusammenhang zwischen der gemessenen Menge an mRNA von CD3 und der Schwere der Lesion hergestellt werden, lediglich konnte gezeigt werden, dass es bei einer Verbesserung des Hautbefundes zu einer Reduktion der CD3-mRNA-Expression kommt.

IFN- γ -mRNA-Expression in der Haut

Die Expression der mRNA von IFN- γ wurde ebenfalls untersucht. Wie auch TNF- α ist IFN- γ an der Entstehung und Aufrechterhaltung einer Psoriasis beteiligt. IFN- γ wird ebenfalls von T-Zellen gebildet. Bei der durchgeführten TaqMan-PCR wurde eine Reduktion der mRNA des IFN- γ bei drei Patienten festgestellt. IFN- γ hat unter der Therapie mit Bimosiamose disodium keine signifikante Veränderung erfahren. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Entwicklung der gebildeten mRNA-Menge des IFN- γ und der klinischen Veränderung der Psoriasis unter Bimosiamose disodium gefunden werden. Es wurde jedoch eine Korrelation zwischen der Abnahme der Expression von Interferon- γ und der Abnahme der CD62-E gefunden (Korrelation von $R^2 = 0,860$).

IFN- γ wird in der Pathogenese der Psoriasis hauptsächlich von T-Zellen exprimiert. Da es unter der Therapie mit Bimosiamose disodium kaum zu einer Veränderung der Gesamtzahl an eingewanderten T-Zellen in der Dermis und der Epidermis kam, ist

das Ergebnis, dass es zu keiner signifikanten Veränderung der IFN- γ -Expression gekommen ist, nicht verwunderlich.

TNF- α -mRNA-Expression in der Haut

Auch die mRNA-Expression des Zytokins TNF- α wurde im psoriasiformen Plaque vor und nach der Therapie mit Bimosiamose bei jedem behandelten Patienten untersucht. TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen (Antigen-präsentierenden Zellen) gebildet, bei Psoriasis auch von aktivierten T-Zellen, und ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung der inflammatorischen Prozesse während eines Psoriasis-Schubes beteiligt (Asadullah *et al.* 1999c). Der Einsatz von TNF- α -Antagonisten ist sehr erfolgreich in der Therapie von schwerer bis sehr schwerer Psoriasis. Unter der Therapie mit Bimosiamose konnte bei drei Patienten eine Abnahme der TNF- α -mRNA in den entnommenen Hautbiopsien nachgewiesen werden. Diese korrelierte nicht mit der Entwicklung des klinischen Befundes der untersuchten Patienten.

Obwohl TNF- α maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Psoriasis beteiligt ist und eine Elimination von TNF- α in fast allen Fällen zu einer schnellen Befundverbesserung führt (Fachinformationen von Humira, Infliximab und Enbrel), konnte in dieser Untersuchung kein Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Hautbefundes und der Expression der mRNA von TNF- α gemessen werden. D. h., das Medikament Bimosiamose disodium hat keinen Einfluss auf die Expression von TNF- α -mRNA. Nach neueren Erkenntnissen wird TNF- α posttranskriptional reguliert, so dass die Aussagekraft dieses Ergebnisses der TNF- α -Konzentrationen über die Analyse der Menge an gebildeter mRNA begrenzt ist (Abdelmohsen *et al.* 2008). Interessanterweise konnten wir eine Korrelation zwischen der Abnahme der Expression der mRNA von TNF- α und der Abnahme der CD62-E-positiven Zellen in der Dermis unter der Therapie mit Bimosiamose disodium (Korrelation von $R^2 = 0,899$) finden. Nach den Untersuchungen von Hakkert *et al.* 1991 wurde gezeigt, dass E-Selektin durch die Anwesenheit von Tumornekrosefaktor- α induziert wird (Hakkert *et al.* 1991).

IL-1- β -mRNA-Expression in der Haut

Vor und nach der Therapie mit Bimosiamose disodium wurde die mRNA-Expression des IL-1- β untersucht. Die Hauptquelle des Zytokins IL-1- β in der Psoriasis sind die Keratinozyten, aktivierte Endothelzellen, Fibroblasten, LC und aktivierte T-Zellen. Hohe TNF- α -Spiegel fördern die Bildung von IL-1- β .

Unter der Therapie mit Bimosiamose disodium wurde bei vier Patienten eine Zunahme der IL-1- β -mRNA gemessen. Diese war nicht statistisch signifikant. IL-1- β gilt als sensitiver Indikator für Immunstimulation (Ding *et al.* 2007).

IL-1- β spielt in der Pathogenese der Psoriasislesion vermutlich eine untergeordnete Rolle, betrachtet man Ergebnisse der Studie von Gibbs *et al.* 2005, bei der der Einsatz von Anakinra (IL-1-Rezeptor-Antagonist) nicht zu einer Verbesserung der Hautbefunde führte, jedoch bei der Psoriasis Arthritis zur Befundverbesserung führte (Gibbs *et al.* 2005). IL-1- β ist unter anderem mit verantwortlich für die Bildung von E- und P-Selektin (Kulidjian *et al.* 2002). Es ist in diversen Studien gemessen worden, dass die IL-1- β -mRNA-Expression in der Psoriasis erhöht ist (Mee *et al.* 2006). Die erhöhte Expression der mRNA von Interleukin 1- β könnte durch Gegensteuerung der Blockade des E- und P-Selektins erklärt werden. Allerdings war diese Veränderung nicht statistisch signifikant. Die relativ geringe biologische Bedeutung von IL-1 β bei der Psoriasis trotz der Erhöhung der mRNA von IL-1 β in Läsionen, könnte durch die Anwesenheit von einem IL-1-Rezeptor begründet sein.

Nach den Messungen von Terajima (Terajima *et al.* 1998) im Jahre 1997 wurde bei einer ELISA Messung keine Erhöhung von Interleukin-1- β in psoriasiformer Haut im Vergleich zu unbeeinträchtigter Haut von Psoriatikern und im Vergleich zur Haut von gesunden Kontrollprobanden gefunden. Dies ist ebenfalls durch die Neutralisation des IL-1- β durch den IL-1-Rezeptor, der in psoriasiformer Haut vermehrt gebildet wird, erklärbar.

IL-12p35- und IL-12p40-mRNA-Expression in der Haut

Es wurde die Menge der gebildeten mRNA von IL-12p35 und IL-12p40 vor und nach der Therapie mit Bimosiamose disodium bestimmt. IL-12p35 bildet zusammen mit IL-12p40 das heterodimere Zytokin IL-12. IL-12p40 kann auch ein Homodimer bilden

(Russell *et al.* 2003). Es gibt auch noch die Untereinheit p19, welche zusammen mit der Untereinheit von p40 das IL-23 bildet. IL-12 regt die CD4-positiven und die CD8-positiven Zellen zur Bildung von IFN- γ an.

Unter der Therapie mit Bimosiamose disodium wurde keine deutliche Veränderung der mRNA-Expression von IL-12p35 und IL-12p40 gemessen.

IL-10-mRNA-Expression in der Haut

IL-10-mRNA-Expression wurde in psoriasiformer Haut vor und nach der 14-tägigen Therapie mit Bimosiamose disodium gemessen. IL-10 wird von Monozyten, B-Zellen und T-Zellen gebildet. Es reduziert die Antigenpräsentation von Makrophagen und Dendritischen Zellen sowie die Proliferation der CD4-positiven T-Zellen. IL-10 inhibiert die Produktion der proinflammatorischen Zytokine wie IL-1- β und TNF- α (Boniface *et al.* 2005, Asadullah *et al.* 1998, Mitra *et al.* 1995) und wurde bereits erfolgreich als Therapeutikum bei Psoriasis eingesetzt (Asadullah *et al.* 1999a + b).

Bei den hier gemachten Untersuchungen wurde unter der Therapie mit Bimosiamose disodium bei vier Patienten eine zum Teil deutliche Zunahme der IL-10-mRNA gemessen. Diese Zunahme war jedoch nicht statistisch signifikant. Der einzige Patient, bei dem die IL-10-mRNA unter der Therapie nicht erhöht wurde, war der Patient mit der Nummer 005.

Es konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen der Entwicklung der mRNA von IL-10 und IFN- γ bzw. TNF- α gezeigt werden. Ob die Therapie mit Bimosiamose disodium zu einer Verbesserung des Hautbefundes geführt hat oder der Anstieg des IL-10, bzw., ob das Medikament Bimosiamose disodium einen Einfluss hat auf die Bildung von IL-10, müsste in weiteren Studien mit mehr Patienten und von längerer Dauer genauer untersucht werden.

Abschlussbetrachtung

Zusammenfassend stellt sich die Frage, ob die hier untersuchten Parameter sich als „Biomarker“ eignen, um die Schwere der Psoriasis auf molekularer Ebene beurteilen zu können bzw. um den Erfolg einer Therapie zu messen.

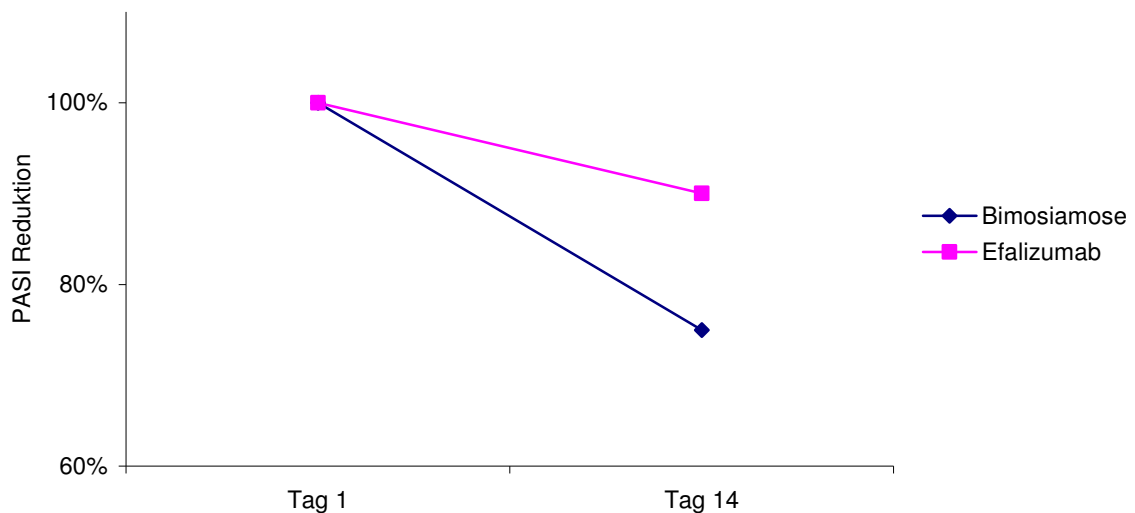
Vermutlich hat das Medikament, welches hier untersucht wurde, keinen Einfluss auf die Bildung der Zytokine. Da ebenfalls kaum Veränderungen bei der Anzahl der eingewanderten T-Lymphozyten, welche für die Produktion der untersuchten Zytokine verantwortlich sind, gefunden wurde, müsste diese Aussage in einer klinischen Studie von längerer Dauer, mit einer größeren Patientenzahl und Placebo kontrolliert bzw. untersucht werden (auch um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen). Ein placebokontrollierter Studienarm ist von großer Bedeutung, möchte man die Auswirkungen des zu testenden Medikaments von dem psychischen Placebo-Effekt trennen.

Ebenfalls gilt es zu bedenken, dass Psoriasis eine schubweise auftretende Erkrankung ist, so dass die Korrelationen, die zwischen dem PASI und den Ergebnissen gefunden worden sind, auch völlig unabhängig vom verabreichten Medikament gewesen sein können, vor allem bei dieser sehr kleinen Patientenpopulation.

Trotz der teilweise kontroversen Laborergebnisse hat das Medikament TBC 1269Z in nur 14 Tagen den klinischen Befund der untersuchten Patienten verbessert. Untersucht werden sollte, ob es noch einen anderen Wirkmechanismus geben kann, der mit diesem Medikament bedient wird. Hier würde sich als erstes eine Untersuchung der von Hicks *et al.* 2005 postulierten Signalwirkung des E-Selektins anbieten.

Vergleicht man die Wirksamkeit (PASI) des Pan-Selektin-Antagonisten mit der Wirksamkeit des gut wirkenden Biologics Efalizumab, welches ebenfalls unter anderem die Einwanderung der T-Zellen in kutanes Gewebe verhindern soll, innerhalb der ersten 14 Tage der Anwendung, so kam es in der hier untersuchten Studie mit Bimosiamose disodium zu einer vergleichbaren PASI-Reduktion (Werte für Efalizumab aus Gordon *et al.* 2003). Betrachtet man die einzelnen Werte, so haben 40 % der behandelten Patienten eine PASI-Reduktion von 38 % innerhalb der ersten 14 Behandlungstage und 60 % der behandelten Patienten hatten eine PASI-Reduktion von 30 % innerhalb der ersten 14 Tage der Behandlung. Insgesamt kam es zu einer PASI-Reduktion von 25,2 % unter der 14-tägigen Behandlung. Allerdings ist im Psoriasis-Studienzentrum eine placebokontrollierte Studie zu einer Vakzinierung gegen TNF- α durchgeführt worden, bei der ein Patient, der subkutan TBS als Placebo injiziert bekam, im Zeitraum von 14 Tagen eine PASI-Reduktion von

45 % zeigte und zwei weitere eine PASI-Reduktion von 25 %. Hiernach besteht für das Ergebnis, welches diese Studie lieferte, auch die Möglichkeit der spontanen Remission bzw. eine Befundverbesserung über den so genannten Placebo-Effekt oder über andere psychologische Faktoren.



12. Abbildung: Vergleich der PASI-Reduktion zwischen Bimosiamose disodium und Efalizumab nach 14-tägiger Therapie.

In der vergleichsweise kurzen Studie konnte eine gute Wirksamkeit des Pan-Selektin-Antagonisten Bimosiamose disodium beim Einsatz gegen die Psoriasis nachgewiesen werden. Das Medikament wurde von allen Studienteilnehmern gut vertragen, es gab keine schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen. Um Aussagen treffen zu können, in wie weit dieses Medikament sich für die Dauertherapie T-Zell-vermittelter Erkrankungen eignet ist, sind klinische Studien von längerer Dauer mit einer größeren Anzahl von Patienten notwendig. Zur Ermittlung der Wirksamkeit auf zellulärer Ebene ist die Anwendung von Biomarkern, die in einem direkten Zusammenhang zur Aktivität und Schwere der Erkrankung stehen, nötig. In verschiedensten Studien zur Wirksamkeit von Psoriasis-Therapeutika wurden verschiedene Biomarker untersucht, deren Veränderungen zum Teil der klinischen Besserung vorrausgehen. Zum Beispiel konnte bei allen Studien bei Verbesserung des klinischen Befundes eine Reduktion der CD3-Expression gefunden werden (Gottlieb *et al.* 2005, Malaviya *et al.* 2006, Tan *et al.* 2007). Viele weitere Parameter wurden in verschiedenen klinischen Studien zu Testung der Wirksamkeit bei Psoriasis untersucht (de Vlam *et al.* 2008).

Hier ist unbedingt anzumerken, dass Biomarker für eine klinische Studie sich primär auf den postulierten Wirkmechanismus der zu testenden Substanz richten sollen. Eine sinnvolle Auswahl an Biomarkern muss jeden Abschnitt des für ein bestimmtes Medikament postulierten Wirkmechanismus abfragen. Darüber hinaus sollen auch die wesentlichen Schritte der Pathogenese der Erkrankung analysiert werden können. Gut ausgewählte Biomarker sollten sowohl die therapeutische Wirksamkeit als auch mögliche unerwünschte Ereignisse vor dem Auftreten klinischer Bilder vorhersagen. Darum erscheint die Auswahl der Biomarker, insbesondere in frühen klinischen Studien, essentiell.

Nach den Untersuchungen von Wolk *et al.* könnte sich die Bestimmung von IL-22 als Biomarker in der Psoriasistherapie eignen, da die gemessenen Plasmalevel mit der Schwere der Erkrankung korrelieren (Wolk *et al.* 2006).

Nach den Voruntersuchungen zur Wirksamkeit des Medikaments mit SCID Mäusen (Friedrich *et al.* 2006), in denen gezeigt worden ist, dass durch die Behandlung mit Bimosiamose disodium im Anschluss eine Auslösung einer Psoriasislesion milder verlief als ohne Behandlung mit Bimosiamose disodium, müsste das Medikament als Dauermedikation eingesetzt werden, um die Auslösung eines Psoriasischubs zu verhindern oder die Schwere zu reduzieren. Auch vor dem Hintergrund, dass die Selektine gerade zu Beginn einer Entzündung eine tragende Rolle zu haben scheinen, würde sich eine Dauermedikation anbieten. Aufgrund der Molekülgröße wäre die Entwicklung einer oralen Applikationsform des Medikaments möglich. Dies ist für den Patienten komfortabler als subkutane Injektionen, die wegen der geringen Halbwertszeit ($t_{1/2} = 4 - 8$ Stunden; Dissertation von Frau Sandra Philipp) in relativ kurzen Abständen nötig wären.

Andere Selektin-Antagonisten in der klinischen Entwicklung (zur Therapie der Psoriasis)

Auch weitere Untersuchungen mit anderen Selektin-Antagonisten (z. B. der Efomycin-Familie) laufen zurzeit (Wienrich *et al.* 2006).

Verschiedene Entwicklungen von Pan-Selektin-Antagonisten hat es fast zeitgleich gegeben. Das *small-molecule drug* CY-1503, ein Kohlenstoffhydrat-Analogum des Sialyl Lewis^x, mit einer Halbwertszeit $t_{1/2} = 10 - 30$ Minuten (Birnbaum *et al.* 1997), hat

sich in verschiedenen klinischen Studien als ineffektiv gezeigt (Kerr 2000), was vermutlich mit der sehr geringen Halbwertszeit zusammenhängt.

Untersucht wurde das *small-molecule drug* BMS-190394, welches ein Strukturanalogum zu Sulfatide ist und damit sowohl E-, L- als auch P-Selektin antagonisiert. Sein Entwicklungstatus ist zurzeit unklar. Es hat jedoch positive Ergebnisse bei kutanen Entzündungsreaktionen in der Ratte gezeigt (Todderud 1997).

Auch die gesamte Gruppe der Efomycine wurde untersucht, von denen das Efomycin M das am vielversprechendsten ist. Zudem sind bisher nur *ex vivo*, bzw. Mausversuche gelaufen (Schoen 2002, Oostingh *et al.* 2007, Shimada *et al.* 2003). Die Ergebnisse mit Efomycin M bei Mäusen zeigen, dass unter der Medikation mit Efomycin M oder einem L-Selektin Antikörper bis zu 60 % weniger naive T-Zellen in die Lymphknoten einwandern (Oostingh *et al.* 2007).

Untersucht wurde auch der Selektin-Antagonist ESA-2, welcher vor allem E-Selektin inhibiert und speziell die Einwanderung der Th₂-Zellen verhindern soll. Dieser ist bisher nur im SCID-Maus-Model an atopischer Dermatitis getestet worden. (Biedermann 2002, Bantley und Ernst 2001, Thomson 1993, Thoma 2001). Hiernach wäre theoretisch ein therapeutischer Ansatzpunkt für allergische, T-Zell-Vermittelte Reaktionen gefunden.

OJ-R9188 ist ebenfalls ein Pan-Selektin-Antagonist, der an die Selektine bindet. OJ-R9188 wurde für die Therapie der Psoriasis entwickelt, hat jedoch in Phase I/II Studien keine ausreichende Wirksamkeit gezeigt (Ikegami-Kuzuhara *et al.* 2001).

Es wurden zwei verschiedene Antikörper gegen E- und L-Selektin untersucht: EL-246 (Carraway 1998). Gegen E- und P-Selektin wurden untersucht: EP-5C7 (Berg 1995, He 1998). Diese befinden sich ebenfalls in der klinischen Entwicklung. Jedoch scheint EL-246 eine suboptimale Selektinkombination zu inhibieren.

Die Medikamente, die zur Zeit am Patienten getestet werden, ob Biologic oder *small-molecule drug*, werden ebenso wie alle bisherigen Medikamente die Psoriasis nicht heilen können. Sie werden jedoch einen erheblichen Beitrag dazu leisten, immer mehr Details der Pathogenese zu enthüllen und weiter aufzuklären.

5 Zusammenfassung

Die Studie mit dem Pan-Selektin-Antagonisten TBC 1269Z wurde im Rahmen einer Pilotstudie an der Berliner Charité im Jahr 2001 durchgeführt. An der Studie nahmen fünf Patienten teil, die an einer mittelschweren bis schweren Psoriasis vulgaris litten. Das Medikament wurde an 14 aufeinander folgenden Tagen intralesional subkutan injiziert. Zur Beurteilung der Wirkung wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Durchflußzytometrische Bestimmung von verschiedenen Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut: CD45ROCD3, CD45ROCD4, CD45ROCD8, CD45RACD3, CD45RACD4, CD45RACD8, HLA-DRCD3, HLA-DRCD4, HLA-DRCD8, CD62-LCD3, CD62-LCD4, CD62-LCD8.
- Immunhistologische Bestimmung von CD3, CD4, CD8, CD20, HLA-DR, CD62-E, CD62-L und CD62-P positiven Zellen in der Haut.
- RT-PCR-Analyse zur Bestimmung der Zytokinexpression in der Haut (IFN- γ , IL-1- β , IL-10, IL-12p35, IL-12p40, TNF- α , sowie von CD3).

Zur Analyse wurden Hautproben an Tag 0 (vor Therapie), an Tag 14 (Ende der Therapie) und optional an Tag 28 (Ende der Nachbeobachtungsphase) entnommen sowie Blutproben für die FACS-Messung an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 28.

Der PASI, die Medikamentensicherheit und die Halbwertszeit wurden ebenfalls untersucht, sind jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit, sondern wurden separat in der Dissertation von Frau Sandra Philipp ausgewertet.

Unter der Behandlung mit Bimosiamose disodium konnten nur vier statistisch signifikante Veränderungen der untersuchten Parameter gefunden werden (Abnahme der CD45RA CD8-positiven Zellen im Blut und Zunahme der HLA-DR CD8-positiven Zellen im Blut; Zunahme der CD8-positiven Zellen in der Epidermis unter der Therapie, Abnahme der CD62-P-positiven Zellen in der Dermis unter der Therapie).

Durch die Selektin-Antagonisierung sollte die Lymphozytenmigration in die psoriasiforme Haut verhindert werden.

Zu erwarten gewesen war eine Reduktion dieser in den untersuchten Biopsien sowie evtl. eine Zunahme im Blut. Misst man die Extravasion der Lymphozyten anhand der mRNA-Expression von CD3, so konnte dies bei vier der fünf Patienten nachgewiesen werden. Die CD45RO-positiven Zellen wurden im Blut reduziert, was einer Normalisierung entspricht. Gleichzeitig kam es zu einer durchschnittlichen PASI-

Reduktion von 25 % in nur 14 Tagen. Das Medikament müsste in einer längeren Studie mit einer größeren Anzahl von Patienten wiederholt werden, um genauere Aussagen über die Wirkung machen zu können. Auch sollte unbedingt untersucht werden, welche anderen Wirkmechanismen es geben kann, die durch dieses Medikament bedient werden könnten. Eine der Überlegungen führt dahin, dem E-Selektin eine Art Signalfunktion zuzusprechen. Die Wirkweise hiervon ist nicht geklärt (Hicks *et al.* 2005).

Die Medikamente, die zur Zeit am Patienten getestet werden, ob Biologic oder *small-molecule drug*, werden ebenso wie alle bislang verfügbaren Medikamente die Psoriasis nicht heilen können. Die Studien, die im Rahmen der Medikamentenerprobung durchgeführt werden, können jedoch einen erheblichen Beitrag dazu leisten, immer mehr Details der Pathogenese zu enthüllen und diese weiter aufzuklären.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas AK**, Lichtman AH. Basic Immunology – Functions and disorders of the Immune System. 2. Auflage, Saunders Elsevier Verlag: 105-111.
- Abbas AK**, Lichtman AH, Pober JS. Cellular And Molecular Immunology. Third edition, W. B. Saunders Company 1997: 249-252.
- Abdelmohsen K**, Kuwanow Y, Kim HH, Gorospe M. Posttranscriptional gene regulation by RNA binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. Biol Chem 2008; 38(3): 243-255.
- Abraham WM**, Ahmed A, Sabater JR *et al.* Selectin blockade prevents antigen-induced late bronchial responses and airway hyperresponsiveness in allergic sheep. Am J Respir Crit Care Med 1999; 159: 1205-1214.
- Abul H**, Mahmoud F, Al Saleh Q, Khajeji M, Haines D. Profiles of activated T lymphocytes in peripheral blood of kuwaiti psoriasis vulgaris patients. J Dermatol 2002; 29(4): 202-208.
- Alon R**, Chen S, Fuhlbrigge R, Puri KD, Springer TA. The kinetics and shear threshold of transient and rolling actions of L-Selectin with its ligand on leukocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 11631-11636.
- Alon R**, Feigelson S. From rolling to arrest on blood vessels: Leukocyte tap dancing on endothelial intergrin ligands and chemokines at sub-seconds contacts. Semin Immunol 2002; 14: 93-104.
- Anaya-Prado R**, Ramos-Kelly JR, Toledo-Pereyra LH, Walsh J, Ward PA. Multiple selectin blockade with a small-molecule selectin inhibitor does not affect survival after second inflammatory challenge with non lethal LPS. J Invest Surg 2002; 15: 171-180.
- Asadullah K**, Döcke WD, Ebeling M *et al.* Interleukin 10 treatment of Psoriasis: clinical result of a phase 2 trial. Arch Dermatol 1999a; 135(2): 187-192.
- Asadullah K**, Döcke WD, Volk HD, Sterry W. The pathophysiological role of cytokines in psoriasis. Drugs Today 1999b; 35: 913-924.
- Asadullah K**, Gellrich S, Haeussler-Quade A *et al.* Cytokine expression in primary cutaneous germinal center cell lymphomas. Exp Dermatol 2000; 9(1): 71-76.
- Asadullah K**, Prösch S, Audring H *et al.* A high prevalence of cytomegalovirus antigenaemia in patients with moderate to severe chronic plaque psoriasis: an association with systemic tumor necrosis factor alpha overexpression. Br J Dermatol 1999c; 141(1): 94-102.
- Asadullah K**, Sterry W, Stephanek K *et al.* IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. J Clin Invest 1998; 101: 783.

- Azam P**, Sankaranarayanan A, Homerih D, Griffey S, Wulff H. Targeting effector memory T-cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP suppresses allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(6) 1419-1429.
- Bagel J**, Garland WT, Breneman D *et al.* Administration of DAB389IL-2 to patients with recalcitrant psoriasis: a double-blind, phase II multicenter trial. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38(6): 938-944
- Baker BS**, Fry L. The immunology of psoriasis. *Br J Dermatol* 1992; 126(1): 1-9.
- Baker BS**, Swain AF, Valdimarsson H, Fry L. T-cell subpopulations in the blood and in the skin of patients with psoriasis. *Brit J Dermatol* 1984; 29(4): 37-44.
- Baker H.** Psoriasis clinical features. *Br Med J* 1971; 3: 231-233.
- Bantely R**, Ernst B. Synthesis of Sialyl Lewis X mimetics: Modifications of the 6-position of galactose. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 459-462.
- Barthel SR**, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11(11): 1473-1491.
- Berg EL**, Fromm C, Lelrose J, Tsurushita N. Antibodies cross-reactive with E- and P-Selectin block both E- and P-selectin functions. *Blood* 1995; 85: 31-37.
- Bevilacqua MP**, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989; 243: 1160-1165.
- Bhushan M**, Bleiker TO, Ballsdon AE *et al.* Anti-E-Selektin is ineffective in treatment of psoriasis: a randomised trial. *Br J Dermatol* 2002; 146: 824-831.
- Biedermann T**, Schwärzler C, Lametschwandter G *et al.* Targeting CLA/E-selectin interactions prevents CCR4-mediated recruitment of human Th2 memory cells to human skin in vivo. *Eur J Immunol* 2002; 32: 3171-3180.
- Birnbaum Y**, Patterson M, Kloner RA. The effect of CY-1503, a Sialyl Lewis X analog blocker of the selectin adhesion molecules, on infarct size "no reflow" in the rabbit model of acute infarction/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2013-2025.
- Boehncke WH**, Friedrich M, Mrowietz U *et al.* Stellenwert von Biologics in der Psoriasis-Therapie: ein Konsensus-Papier der Arbeitsgruppe Psoriasis, Arbeitsgemeinschaft dermatologische Forschung. *JDDG* 2003; 8: 620-628.
- Boehncke WH**, Schoen MP. Interfering with leukocyte rolling – a promising therapeutic approach in inflammatory skin disorders? *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 49-52.
- Boehncke WH**, Sterry W, Hainzl A, Scheffold W, Kaufmann R. Psoriasiform architecture of murine epidermis overlying human psoriatic dermis transplanted onto SCID mice. *Arch Dermatol Res* 1994; 286(6): 325-330.

- Boniface K**, Lecron JC, Bernard FX, Dagregorio G, Guillet G, Nau F, Morel F. Keratinocytes as targets for interleukin-10-related cytokines: a putative role in the pathogenesis of psoriasis. *Eur Cytokine Netw* 2005; 16(4): 309-319.
- Bos JD**, De Rie MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 1999; 20(1): 40-46.
- Boyd AS**, Neldna KH. The isomorphic response of koebner. *Int J Dermatol* 1990; 29: 1-10.
- Braun-Falco O**, Plewig G, Wolff HH. *Dermatologie und Venerologie*. 4. Auflage, Springer Verlag 1995: 541-569.
- Butcher EC**, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272: 60-66.
- Caffieri S**, Di Lsa F, Bolesani F *et al.* The mitochondrial effects of novel apoptogenic generated by psoralen photolysis as a crucial mechanism in PUVA therapy. *Blood* 2007; 109(11): 4988-4894.
- Campbell JJ**, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under shear flow conditions. *Science* 1998; 279: 381-384.
- Carmeron AL**, Kirby B, Fei W, Griffiths CE. Natural killer and natural killer-T cells in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2002; 294: 363-369.
- Carraway MS**, Welty Wolf KE, Kantrow SP *et al.* Antibody to E- and L-selectin does not prevent lung injury or mortality in septic baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 938-949.
- Chamian F**, Lowes MA, Lin SL *et al.* Alefacept reduces infiltrating T cells, activated dendritic cells, and inflammatory genes in psoriasis vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2075-2080.
- Checkliste Dermatologie**, 5. Auflage, Thieme Verlag 2004.
- Christophers E**, The immunopathology of psoriasis. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 110: 199-206.
- Christophers E**. Psoriasis – epidemiology and clinical spectrum. *Clin Dermatol* 2001; 26: 314-320.
- Czarnetzki B**, Kerl H, Sterry W. *Dermatologie und Venerologie mit Repetitorium*, Walter de Gruyter, Berlin, New York 1992: 204-208.
- Dam TN**, Kang S, Nockloff BJ, Voorhees JJ. 1- α -25-dihydroxycholecalciferol and cyclosporine suppress induction and promote resolution of psoriasis in human skin grafts transplanted to SCID mice. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1082-1090.
- de Vlam K**, Gottlieb AB, Fitzgerald O. Biological Biomarkers in Psoriatic disease. A Review. *J Rheumatol* 2008; 35(7): 1443-1448.

- Detmers PA**, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggioloni M, Crohn ZA. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* 1990; 171: 1155-1162.
- Ding T**, Sun J, Zhang P. Immune evaluation of biomaterials in TNF-alpha and IL-1beta at mRNA level. *L Mater Sci Mater Med* 2007; 18(11): 2233-2236.
- Dwir O**, Steeber DA, Schwarz US *et al.* L-Selectin dimerization enhances tether formation to properly spaced ligand. *J Biol Chem* 2002; 277: 21130-21139.
- Elder JT**, Henseler T, Christophers E *et al.* Of genes and antigens: the inheritance of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1994; 103(5): 150-153.
- Elder JT**, Nair RP, Guo SW, Henseler T, Christophers E, Voorheers JJ. The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol* 1994; 130: 216-224.
- Ellis CN**, Krueger GG. Treatment of chronic Plaque Psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. *N Engl J Med* 2001; 345: 248-255.
- Erkin G**, Uğur Y, Gürer CK *et al.* Effect of PUVA, narrow-band UVB and cyclosporin on inflammatory cells of the psoriatic plaque. *J Cutan Pathol.* 2007; 34(3): 213-219.
- Feizi T.** Carbohydrate ligands for the leukocyte-endothelium adhesion molecules, selectins. *Results Probl Cell Differ* 2001; 33: 201-223.
- Fife DJ**, Waller JM, Jeffes EW, Koo JY. Unravelling the paradox of HIV-associated psoriasis: a review of t-cell subsets and cytokine profiles. *Dermatol Online J* 2007; 13(2): 4.
- Finlay A Y.** Current severe of psoriasis and the rule of tens. *Br J Dermatol* 2005; 152: 861-867.
- Förster T.** Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 1997: 437 (1-2): 55 – 75.
- Fouéré S**, Adjadj L, Pawin H. How patients experience psoriasis: results from a European survey. *JEADV* 2005; 3: 2-6.
- Fredriksson T**, Pettersson U. Severe psoriasis-oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 1978; 157(4): 238-244.
- Friedrich M**, Bock D, Philipp S *et al.* Pan-selektin antagonism improves psoriasis manifestation in mice and man. *Arch Dermatol Res* 2006; 297: 345-351.
- Friedrich M**, Philipp S, Sabart R, Asadullah K, Sterry W. Einsatz von Biologics bei Psoriasis in der Dermatologie. *J Rheumatol* 2003; 62: 439-449.
- Friedrich M**, Sterry W. In *Pschyrembel Handbuch Therapie*. 3. Überarbeitete und Ergänzte Auflage de Gryter 2005: 810-811.
- Ghoreschi K**, Weigert C, Röcken M. Immunopathogenesis and role of T cells in psoriasis *Clinics in Dermatology* 2007; 25(6): 574 – 580.

- Gibbs A**, Markham T, Walsh C *et al.* Anakinra (Kineret) in Psoriasis and Psoriasis Arthritis: a single-center, open-label, pilot study. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: Poster 68.
- Gold MH**, Holy AK, Roenigk HH. Beta-blocking drugs and Psoriasis. A review of cutaneous side effects and retrospective analysis of their effects on psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 837-841.
- Gordon KB**, Papp KA, Hamilton TK *et al.* Efalizumab for Patients with moderate to severe plaque psoriasis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290(23): 3073-3080.
- Gottlieb AB**, Chamain F, Masud *et al.* TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in Psoriasis plaques. *J Immunol* 2005; 4: 19-34.
- Gottlieb AB**, Gilleaudeau P, Johnson R *et al.* Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB389IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. *Nat Med* 1995; 1(5): 442-447.
- Gottlieb AB**, Krueger JG, Wittkowski K, Dedrick R, Walicke PA, Garovoy M. Psoriasis as a model for T-cell-mediated Disease. *Arch Dermatol* 2002; 138: 591-600.
- Gottlieb AB**, Lifshitz B, Fu SM *et al.* Expression of HLA-DR molecules by keratinocytes, and presence of Langerhans cells in the dermal infiltrate of active psoriatic plaques, *J Exp Med* 1986; 164: 1013-1028.
- Gottlieb AB**. Immunologic mechanisms in Psoriasis. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 18-19.
- Grabovsky V**, Feigelson S, Chen C *et al.* Subseconds induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med* 2000; 192: 495-506.
- Greng JG**, Bevilacqua MP, Moore KL *et al.* Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990; 343: 757-760.
- Groves RW**, Allen MH, Berker JN, Haskard DO, MacDonald DM. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in cutaneous inflammation. *Br J Dermatol*. 1991; 124: 117-123.
- Guilhou JJ**, Meynadier J, Clot J. New concepts in the pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol* 1978; 98(5): 585-592.
- He XY**, Xu Z, Melrose J *et al.* Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin. *J Immunol* 1998; 160: 1039-1035.
- Hicke BJ**, Watson SR, Koenig A *et al.* DNA aptamers block L-selectin function in vivo. *J Clin Invest* 1996; 98: 2688-2692.

- Hicks** AE, Abbitt KB, Dodd P, Ridger VC, Hellewell PG, Norman KE. The anti-inflammatory effects of a selectin ligand mimetic, TBC-1269, are not a result of competitive inhibition of leukocyte rolling in vivo. *J Leukocyte Biology* 2005; 77: 59-66.
- Ikegami-Kuzuhara** A, Yoshinaka T, Ohmoto H, Inoue Y, Saito T. Therapeutic potential of a novel synthetic selectin blocker, OJ-R9188, in allergic dermatitis. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 1498-1504.
- Issekutz** AC, Issekutz TB. The role of E-Selectin, P-selectin, and very late activation antigen-4 in t-Lymphocyte migration to dermal inflammation. *J Immunol* 2002; 168: 1934-1939.
- Johnston** A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottier H, Ludviksson BR, Vladimiroson H. The anti-inflammatory action of Methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol* 2005; 114(2): 154-163.
- Kansas** GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1996; 88(9): 3259-87.
- Kerr** KM, Auger WR, Marsh JJ *et al.* The use of cylexin (CY1503) in prevention of reperfusion lung injury in patients undergoing pulmonary thromboendarterectomy. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 14-20.
- Kogan** TP, Dupré B, Bui H *et al.* Novel Synthetic Inhibitors of Selectin-Mediated Cell Adhesion: Synthesis of 1,6-Bis[3-(3-carboxymethylphenyl)-4-(2- α -D-mannopyranosyloxy)phenyl]hexane (TBC 1269). *J med Chem* 1998; 41: 1099-1111.
- Kohr** SP, McCarthy K, DuPont M, Murray K, Timony G. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, allometry, and dose selection of rPSGL-Ig for phase I trial. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 618-624.
- Komine** M, Karakawa M, Takekoshi T *et al.* Early Inflammatory Changes in the "Perilesional Skin" of Psoriatic Plaques: Is there Interaction between Dendritic Cells and Keratinocytes? *J Invest Dermatol* 2007; 127: 1915-1922.
- Kormeili** T, Lowe NJ, Yamauchi PS. Psoriasis: immunopathogenesis and evolving immunomodulators and systemic therapies; US experiences. *Br J Dermatol* 2004; 151: 3-15.
- Krueger** GG, Duvic M. Epidemiology of psoriasis: clinical issues. *J Invest Dermatol* 1994; 102(6): 14-18.
- Krüger** GG. Selective targeting of T cell subsets: focus on Alefacept – a remittive therapy for psoriasis. *Expert Opin Biol Ther.* 2002; 2(4): 431-414.
- Kulidijan** AA, Issekutz AC, Issekutz TB. Differential role of E-selectin and P-selectin in T lymphocyte migration to cutaneous inflammatory reactions induced by cytokines. *Int Immunol.* 2002; 14(7): 751-760.

- Langewouters AM**, van Erp PE, de Jong EM, van de Kerkhof PC. Lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with moderate-to-severe versus mild plaque psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2008; 300: 107-113.
- Lazarus GS**, Gilgor RS. Psoriasis, polymorphnuclear leukocytes, and lithium carbonate. An important clue. *Arch Dermatol* 1979; 115: 1183-1184.
- Lecewicz-Torùn B**, Pietrzak A, Rolinski J. 5 CD45RO and CD45RA cells in peripheral blood in psoriatic patients preceded by an infection. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]*. 2001; 56: 465-70.
- Leung DY**, Travers JB, Giorno R *et al*. Evidence for a streptococcal superantigen-driven process in acute guttate psoriasis. *J Clin Invest* 1995; 96(5): 2106-2112.
- Ley K**. Function of selectins. *Results Probl Cell Differ* 2001; 33: 177-200.
- Löffler G**, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1998; 884.
- MacDonald A**, Burden AD. Psoriasis: advances in pathophysiology and management. *Med J* 2007; 83: 690-697.
- Malaviya R**, Sun Y, Tan JK *et al*. Etanercept induces apoptosis of dermal dendritic cells in psoriatic plaques of responding patients. *J AM Acad Dermatol* 2006; 55: 590-597.
- Marinier A**, Martel A, Bachand C *et al*. Novel Mimics of Sialyl Lewis X : Design, Synthesis and Biological Activity of a Series of 2- and 3-Malonate Substituted Galactoconjugates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2001; 9: 1395-1427.
- Mee J**, Cork M, di Giovine F, Duff GW, Groves RW. Interleukin-1: a key inflammatory mediator in psoriasis? *Cytokine* 2006; 33: 72-78.
- Middleton J**, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyteextravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 2002; 100: 3853-3860.
- Mitra RS**, Judge TA, Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Psoriatic skin-derived dendritic cell function is inhibited by exogenous IL-10. Differential modulation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression. *J Immunol* 1995; 154(6): 2668-2677.
- Mrowietz U**, Gläser R. Bedeutung von T-Lymphozyten für die Pathogenese der Psoriasis-interdisziplinäre Ansichten. *Hautarzt* 1997; 48: 766-769.
- Najarian DJ**, Gottlieb AB. Connections between psoriasis and Crohn`s disease. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48(6): 805-821.
- Nickoloff BJ**, Griffiths CEM, Barker JNWN. The role of adhesion molecules, chemotactic factors, and cytokines in inflammatory and neoplastic skin disease-1990 update. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 151-157.

- Norris DA**, Traves JB, Leung DY. Lymphocyte activation in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1997; 109(1): 1-4.
- Obuch ML**, Maurer TA, Becker B, Berger TG. Psoriasis and human immunodeficiency virus infection. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27(5): 667-673.
- Ockenfels HM**, Schultewolter T, Ockenfels G, Funk R, Goos M. The antipsoriatic agent dimethylfumarate immunomodulates T-cell cytokine secretion and inhibits cytokines of the psoriatic cytokine network. *Br J Dermatol* 1998; 139(3): 390-395.
- Oostingh GJ**, Ludwig RJ, Enders S *et al.* Diminished lymphocyte adhesion and alleviation of allergic responses by small-molecule- or antibody-mediated inhibition of L-selectin functions. *J Invest Dermatol*. 2007; 127(1): 90-7.
- Ortonne JP**, Lebwohl M, Griffith C. Alefacept-induced decreases in circulating blood lymphocyte counts correlate with clinical response in patients with chronic plaque psoriasis. *Europ J Dermatol* 2003; 13(2): 117-123.
- Ortonne JP**: Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol* 1999; 140(54): 1-7.
- Pechhold K**, Pohl T, Kabelitz D. Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry 1994; 16: 152-159.
- Philipp S**, Ludwig N, Sterry W, Sabat R. Biologics als neue Therapieoptionen in der Behandlung der Psoriasis und der Psoriasis Arthritis. *Akt Dermatol* 2006; 32: 201-210.
- Perkin-Elmer**, Theorie zur Durchführung der TaqMan PCR. Applied Biosystems, 1998.
- Picker LJ**, Michie SA, Rott LS, Butcher EC. A unique phenotype of skin associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol*. 1990; 136: 1053.
- Pietrzak A**, Zalewska A, Chodorowska G, Nockowski P, Michalak-Stoma A, Osemlak P, Krasowska D., Genes and Structure of selected cytokines involved in pathogenesis of psoriasis. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46(1): 11-21.
- Rajiv, Joshi**, Immunopathogenesis of Psoriasis. *Indian J Dermatol* 2004; 70: 10-12.
- Reynolds NJ**, Al-Daraj WI. Calcineurin inhibitors and sirolimus: mechanisms of action and applications in dermatology. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27(7): 555-561.
- Robert C**, Kupper TS. Inflammatory Skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med* 1999; 341: 1817-1828.
- Roll A**, Reich K, Boer A. Use of Fumaric acid esters in psoriasis. *Indian J Dermatol Venerol Leprol* 2007; 73(2): 133-137.
- Romagnani S**, Kapsenberg M, Radbruch A, Adorini L. TH1 and TH2 cells. *Res Immunol* 1998; 149: 871-873.

- Romagnani**, S. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 1995; 15(3): 121-129.
- Russell** TD, Yan Q, Fan G *et al.* IL-12p40 homodimer-dependent macrophage chemotaxis and respiratory viral inflammation are mediated through IL-12 receptor beta 1. *J Immunol* 2003; 171 (12): 6866-6874.
- Sabat** R, Philipp S, Höflich C *et al.* Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol* 2007; 16(10): 779-798.
- Sack** U, Rothe G, Barlage S *et al.* Durchflusszytometrie in der klinischen Diagnostik. Positionspaper der Arbeitsgruppe Durchflusszytometrie und quantitative Mikroskopie der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie und Deutsche Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin. *J Lab Med* 2000; 24: 277-297.
- Schlaak** JF, Buslau M, Jochum W *et al.* T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th 1 subset. *J Invest Dermatol* 1994; 102(2): 145–149.
- Schoen** MP, Boehncke WH. Efomycin M, a new specific inhibitor of selectin, impairs leukocyte adhesion and alleviates cutaneous inflammation. *Biospektrum* 2003; 2(9): 164-165.
- Schoen** MP, Boehncke WH. Psoriasis. *N Engl J* 2005a; 352: 1899-1912.
- Schoen** MP, Drewniok C, Boehncke WH. Targeting Selectin functions in the therapy of psoriasis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3(2): 163-168.
- Schoen** MP, Ludwig RJ. Lymphocyte trafficking to inflamed skin – molecular mechanisms and implications for therapeutic target molecules. *Expert Opin Ther Targets* 2005b; 9: 225-243.
- Schoen** MP. Advances in psoriasis treatment. *The Lancet* 2005c; 366: 1333-1335.
- Shimada** Y, Hasegawa M, Kaburagi Y *et al.* L-selectin or ICAM-1 deficiency reduces an immediate-type hypersensitivity response by preventing mast cell recruitment in repeated elicitation of contact hypersensitivity. *J Immunol* 2003; 170: 4325–4334.
- Shimizu** Y, Newman W, Gopal TV *et al.* Four molecular pathways of T-cell adhesion to endothelial cells: Roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol* 1991; 113: 1203-1212.
- Shimizu** Y, Rose DM, Ginsberg MH. Integrins in the immune system. *Adv Immunol* 1999; 72: 325-380.
- Sigmundsdottir** H, Johnston A, Gudjonsson JE, Bjarnason B, Vladimirov H. Methotrexate markedly reduces the expression of vascular E-Selectin, cutaneous lymphocyte-associated antigen and the number of mononuclear leucocytes in psoriatic skin. *Exp Dermatol* 2004; 13: 426-434.

- Skarabis** H. Statistik 1, Skript des Kurses SPSS: Einführung in die Programmbedienung.
- Smith** CH, Barker JNWN, Morris RW, MacDonald DM, Lee TH. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J Immunol* 1993; 151: 3274- 3282.
- Sperandio** M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J.* 2006; 273(19): 4377-4389.
- Tan** JK, Aphale A, Malaviya R, Sun Y, Gottlieb AB. Mechanism of action of etanercept in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2007; 12: 38-45.
- Teixeira** MM, Hellewell PG. Contribution of Endothelial Selectins and α_4 Intergrins to eosinophil Trafficking in Allergic and Nonallergic Inflammatory Reactions in Skin. *J Immunol* 1998; 2516-2523.
- Terajima** S, Higaki M, Igarashi Y, Nogita T, Kawashima M. An important role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of adhesion molecules in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 1998; 290(5): 246-252.
- Thoma** G, Magnani JL, Patton JT. Synthesis and biological evaluation of a Sialyl Lewis X mimic with significantly improved E-selectin inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 923-925.
- Thomson** AW, Nalesnik MA, Rilo HR, Woo J, Carroll PB, van Thiel DH. ICAM-1 and E-selectin expression in lesional biopsies of psoriasis patients responding to systemic FK 506 therapy. *Autoimmunity* 1993; 15: 215-223.
- Todderud** G, Nair X, Lee D *et al.* BMS-190394, a Selectin Inhibitor, Prevents Rat Cutaneous Inflammatory Reactions. *J Pharmacol* 1997; 282(3): 1298-1304.
- Traupe**, H. The puzzling genetics of psoriasis. *Clin Dermatol* 1995; 13(2): 99-103.
- Ulbrich** H, Eriksson EE, Lindbom L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as target for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 640-647.
- Uyemura** K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ. The cytokin network in lesional and lesionalfree psoriatic skin is characterized by T-helper type 1 cell-mediated response. *J invest Dermatol* 1993; 101: 701-705.
- Valdimarsson** H, Baker BS, Johnsdottir I, Fry L. Psoriasis: A disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today* 1986; 7: 256-259.
- van Lingen** RG, Körver JE, van de Kerkhof PC *et al.* Relevance of compartmentalization of t-cell subsets for clinical improvement in psoriasis: effect of immune-targeted antipsoriatic therapies. *Br J Dermatol* 2008, 159(1): 91-96.

- Vandermeeren M**, Janssens S, Borgers M, Geysen J. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 19-23.
- Varki A**. Selectin ligands. Review. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 7390-7397.
- Vissers WH**, Arndtz CH, Muys L, van Erp PE, de Jong EM, van de Kerkhoff PC. Memory effector (CD45RO+) and cytotoxic (CD8+) T cells appear early in the margin zone of spreading psoriatic lesions in contrast to cells expressing natural killer receptors, which appear late. *Br J Dermatol* 2004; 150(5): 852-859.
- von Adrian UH**, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arforske E, Butcher EC. Two step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta-2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7538-7542.
- von Adrian UH**, Mackay CR. T-cell functions and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000; 343: 1020-1034.
- Watson SR**. L-selectin-IgG chimera – in vitro and in vivo. *Agents Actions Suppl* 1993; 41: 103-109.
- Weinberg JM**. An overview of Infliximab, Etanercept, Efalizumab and Alefacept as biologic therapy for psoriasis. *Clin Ther* 2003; 25(10): 2487-2505.
- Weinstein GD**. Can immunomodulatory molecules work topically for psoriasis? *J Invest Dermatol* 1996; 106(4): 589.
- Wienrich BG**, Krahn T, Schoen M *et al*. Structure-Function relation of Efomycines, a family of small-molecule inhibitors of Selektin Functions. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 882-889.
- Wolf R**, Tamir A, Brenner S. Psoriasis related to angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Dermatologica* 1990; 181: 51-53.
- Wolk K**, Witte E, Wallace E *et al*. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol*. 2006; 36 (5): 1309-1323.
- Zlotnik A**, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121-127.

Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Nina Ludwig, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Immunologische Veränderungen im Blut und in der Haut bei Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Psoriasis unter systemischer (subkutaner) Therapie mit einem Selektin-Antagonisten (TBC 1269Z)“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Danksagung

Insbesondere bedanke ich mich bei:

- Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. W. Sterry für die Überlassung des Themas.
- Herrn Dr. M. Friedrich für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.
- Der Firma Revotar, ganz besonders Herrn Dr. D. Bock.
- Prof. Dr. O. Speck, Dr. R. Sabat, Dr. S. Phillip, Dr. S. Endesfelder, Dr. M. Hardtke, B. Kethel, B. Pust, und A. Buss für ihre Unterstützung.
- Meinem lieben Mann, meinen Kindern und meinen Eltern.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.