

Aus dem
CharitéCentrum für diagnostische und präventive Labormedizin
Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Dietel

Habilitationsschrift

Morphologische und funktionelle Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors T-bet in erregerbedingten Lymphknotenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und malignen Lymphomen

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Korinna Jöhrens
geboren am 22.02.1967 in Berlin

Eingereicht: 17.02.2012

Dekanin: Frau Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

- 1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Falko Fend, Tübingen**
- 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Andreas Rosenwald, Würzburg**

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	4
2.1. Angeborene Immunantwort	4
2.2. Erworbene Immunantwort	5
2.3. Charakterisierung und Funktion von T-bet	8
2.4. Die Funktion von T-bet in T-Lymphozyten bei nicht neoplastischen Erkrankungen ...	10
2.4.1. Sprue/Zöliakie	10
2.4.2 T-bet Expression in der lymphozytären Kolitis	11
2.5. Funktion von T-bet in B-Lymphozyten bei nicht neoplastischen Erkrankungen.....	12
2.5.1. Die Piringer Lymphadenitis	13
2.6. T-bet Expressionmuster in T-Zell-Lymphomen.....	14
2.7. T-bet Expressionsmuster in B-Zell-Lymphomen	16
3. ZIEL DER EIGENEN ARBEITEN	18
4. EIGENE ARBEITEN	19
4.1. T-bet Expressionsmuster in der Zöliakie, der refraktären Sprue und dem Enteropathie-assozierten T-Zell-Lymphom	19
4.2. Unterschiedliche Muster in der T-bet and GATA-3 Expression bei der Lymphozytären Kolitis und der Sprue/Zöliakie	20
4.3. T-bet-positive and IRTA1-positive monozytoide B-Zellen unterscheiden sich von Marginalzonenzellen und Epithel-assozierten B-Zellen in ihrem Antigenprofil und ihrer topographischen Verteilung.....	21
4.4. Unterschiedliche Expressionsmuster von T-bet sind charakterisch für spezifische reaktive Lymphknotenveränderungen	22
4.5. Interferon-gamma und T-bet Expression in einer Patientin mit einer Piringer-Lymphadenitis	23
4.6. Drei unterschiedliche Expressionsmuster von T-bet in angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphomen.....	24

4.7. Die Detektion des Transkriptionsfaktor T-bet erleichtert die Diagnose der Haarzell-Leukie bei minimaler Infiltration des Knochenmarks	25
4.8. Die Expression von T-box-expressed-in-T-cells (T-bet) in den Tumorzellen der Haarzell-Leukämie korreliert mit der Interferon-gamma Produktion	26
5. DISKUSSION UND AUSBLICK.....	27
6. LITERATURVERZEICHNIS	31
7. DANKSAGUNG	38

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bildung einer effizienten Immunantwort ist für das individuelle Überleben essentiell. Das Zusammenspiel der angeborenen und erworbenen Immunantwort nimmt dabei eine besondere Stellung ein. Die Effizienz der jeweiligen Immunantwort beruht dabei nicht nur auf dem optimalen zeitlichen Ablauf, sondern auch auf dem Interagieren der unterschiedlichen Zelltypen. Für den reibungslosen Ablauf sind unter Anderem sog. Master-Regulatoren verantwortlich, die wesentlich die Bildung der Immunmodulation beeinflussen. Sind sie in ihrer Funktion beeinträchtigt, resultieren schwere häufig mit dem Leben nicht vereinbare Krankheitsbilder.

Während die B-Zellen in erster Linie durch die Antikörperproduktion zu einer gerichteten Immunantwort beitragen, bilden die T-Zellen unterschiedliche Helferzellen aus. Die naiven T-Helfer-Zellen können in Abhängigkeit des Erregers zu Th1, Th2, Treg und Th17 Zellen differenzieren. Dabei wird die Th1-Antwort im Wesentlichen durch T-box-expressed in T-cells (T-bet) gebildet [1]. T-bet ist der Masterregulator der Th1-Antwort, d.h. es wird hauptsächlich durch dieses Molekül die Th1-Antwort angeschoben. T-bet ist für die Differenzierung der Th0 Zelle in Richtung Th1 Zelle verantwortlich. Dabei blockiert es zusätzlich die Differenzierung in Th2 Zellen. Aber hierin besteht nicht die einzige Funktion von T-bet. Funktionelle Untersuchungen in-vitro und an Tiermodellen konnten aufdecken, dass T-bet zusätzlich auch eine wichtige Rolle in der Gestaltung der T-Zell-unabhängigen Immunantwort über die Beeinflussung des IgG Klassenwechsels [2] der B-Zellen und in der Bildung der Th17-Antwort spielt [3]. Letzteres spricht dafür, dass T-bet offenbar in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine wesentliche Bedeutung hat. Nachdem die meisten Untersuchungen dazu in vitro oder an Tiermodellen erfolgten, galt es nun, diese Ergebnisse auf das Primärgewebe zu übertragen. Dabei haben wir zunächst Krankheiten untersucht, die auf einer Th1-Antwort beruhen. Im Falle der Sprue/Zöliakie

konnte dabei durch Doppelmarkierungen gezeigt werden, dass die CD8+ intraepithelialen Lymphozyten offenbar im Sinne einer Umgebungsreaktion die Th1-Antwort mit unterstützen. Bei Erkrankungen, bedingt durch intrazelluläre Erreger, wie der durch Toxoplasmen verursachten Piringer-Lymphadenitis oder der Epstein-Barr Virus-Infektion, beobachteten wir hingegen das zusätzliche Vorhandensein von B-Zellen, die T-bet exprimieren und sich an der Th1-Antwort beteiligen. Dabei fiel auf, dass eine besondere B-Zell Population, die monozytoiden B-Zellen, eine kräftige T-bet Expression zeigten. Bezüglich der Piringer-Lymphadenitis konnte zudem eine Interferon-gamma (IFN- γ) Expression der monozytoiden B-Zellen und eine IL-2 Minderexpression der T-Zellen nachgewiesen werden. Dies gab zu der Hypothese Anlass, dass die B-Zellen versuchen, die Aufgabe ineffizienter T-Zellen zu ersetzen. In einer vergleichenden Studie zwischen der Sprue/Zöliakie und der lymphozytären Kolitis konnten wir zudem zeigen, dass bei der Sprue eine reine Th1-Antwort vorliegt, während die lymphozytäre Kolitis offenbar eine kombinierte Th1- und Th2-Antwort aufweist.

Da sich in eigenen Vorarbeiten und in denen anderer Arbeitsgruppen herauskristallisierte, dass T-bet auch in B- und T-Zell-Lymphomen von den Tumorzellen exprimiert wird [4-6], erfolgten auch weitere immunhistologische und funktionelle Studien an einer Vielzahl von humanen malignen Lymphomen. Im Falle der Haarzell-Leukämie (HCL) konnten wir herausarbeiten, dass die Tumorzellen nicht nur sehr intensiv T-bet exprimieren, sondern auch IFN- γ . Während die T-bet Darstellung sich als ein hilfreiches und empfindliches Werkzeug für die histologische Diagnostik der Haarzelleukämie herausstellte, könnte der IFN- γ Nachweis im Serum als klinischer Verlaufsparemeter genutzt werden.

Die Untersuchungen am angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphom (AITCL) führten zur Identifizierung unterschiedlicher T-bet Expressionsmuster der in diesem Lymphom vorkommenden nicht neoplastischen B- und neoplastischen T-Zellen. Die räumliche Assoziation der T-bet exprimierenden B-Zellen mit den

hohen endothelialen Venolen und die Tatsache, dass die neoplastischen T-Zellen neben T-bet auch VEGF α und CXCL13 exprimieren, legt den Schluss nahe, dass in diesem besonderen Umfeld zusätzlich eine Th17-Antwort gebildet wird, was die charakteristischen klinischen Symptome dieses Lymphoms erklären würde.

2. EINLEITUNG

2.1. *Angeborene Immunantwort*

Die Entstehung und Entwicklung des Immunsystems resultiert aus der Notwendigkeit, den Organismus vor schädlichen Einflüssen zu schützen. Dabei werden nicht nur Mikroorganismen bekämpft, sondern auch fremde Substanzen und bis zu einem gewissen Grad auch fehlerhaft abgewandelte eigene Zellen. Eine Erreger-bedingte Immunantwort kann dabei durch vielfältige Faktoren initiiert werden, wie z.B. durch Viren, Bakterien, Protozoen, Pilze oder Parasiten. Es wird grundlegend zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort unterschieden.

Während die angeborene Immunantwort eine ungerichtete, unselektierte Reaktion auf schädliche Einflüsse darstellt, ist die erworbene Immunantwort hochgradig spezifisch ausgerichtet. Entwicklungsgeschichtlich entstand die angeborene Immunantwort sehr früh und wurde im Laufe der Zeit nicht wesentlich verändert. Die adaptive oder erworbene Immunantwort entwickelte sich jedoch erst deutlich später und in erster Linie in Wirbeltieren. Zu der angeborenen Immunantwort gehören physikalische, chemische und molekulare Barrieren. Dazu zählen die Haut und Schleimhäute genauso, wie Sekrete, der pH-Wert oder hydrolytische Enzyme. Die Leukozyten, die für die Bildung der angeborenen erregerspezifischen Immunantwort verantwortlich sind, erkennen nur eine kleine Anzahl hochkonservierter molekularer Muster, welche als pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns - PAMP) bezeichnet werden. Obwohl physiologische Barrieren, wie die Haut und die Schleimhäute schon einen gewissen Schutz vor dem Eindringen der Erreger bieten, sind dennoch viele Keime in der Lage diese Barriere zu überwinden, so dass die angeborene azelluläre und zelluläre Immunantwort kurz unterhalb der Haut und Schleimhaut ansetzt. Hier wird die angeborene Immunantwort durch das Kom-

plementsystem, pattern recognition receptors (PRR), Makrophagen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten ermöglicht. Zu den PRRs gehören unter anderem die Toll-like Rezeptoren (TLR), die Erreger innerhalb und außerhalb von Zellen erkennen [7], wie auch die zytosolisch lokalisierten Rezeptoren wie z.B. die „retinoic acid inducible genes“ (RIG-1), die sich vermehrende Viren erkennen [8].

2.2. Erworbene Immunantwort

Die adaptive oder erworbene Immunantwort zeichnet sich im Gegensatz zu der angeborenen Immunantwort dadurch aus, dass sie in der Lage ist, durch hochgradig spezifische Strukturen gezielt auf bestimmte Erreger zu reagieren. Sie bewirkt die Flexibilität des Immunsystems. Der Reaktionstyp zeigt eine multifaktorielle Abhängigkeit. Wichtige Einflussgrößen sind die Art und Menge des Agens, aber auch Antigenaufnahme, -präsentation und das Zytokinmilieu. Nach Eintritt der Erreger in den Organismus spricht man von einer Infektion. Dabei werden die Erreger in extrazelluläre und intrazelluläre Keime unterteilt. Während erstere nicht in eine Zelle eindringen müssen, um sich zu vermehren, benötigen letztere die Zelle und ihre metabolischen Funktionen, um sich vermehren zu können.

Für die Ausführung der adaptiven Immunantwort sind in erster Linie die B- und T-Lymphozyten verantwortlich, die T-Zellen als zellvermittelnde Immunantwort und die B-Lymphozyten durch die Antikörper – und Bildung von Gedächtniszellen. Für eine möglichst effiziente Eliminierung von schädlichen Faktoren sind die optimale Abstimmung der humoralen und zellulären Immunantwort sowie die Interaktion der B- und T-Lymphozyten notwendig. Die B-Zellen greifen dabei die extrazellulären pathogenen Keime über eine Antikörper-vermittelte Reaktion an. Die T-Zellen werden nochmals in die zytotoxi-

schen- und die Helfer T-Zellen untergliedert. Die zytotoxischen Zellen zerstören die intrazellulären Keime durch eine Zell-Lyse. Die T-Helfer-Zellen fungieren über Zytokinexpressionsmuster und Makrophagenaktivierung. Sie können über die Th1-Antwort die intrazellulären und über die Th2-Antwort die extrazellulären Keime eliminiert werden.

Die naive T-Helferzelle als ein Teil der adaptiven Immunantwort hat aber noch weitere Differenzierungsmöglichkeiten in Abhängigkeit von der Lage und des auslösenden Agens. Sie kann neben einer Th1-, Th2-, auch in eine Treg oder Th17 Zelle differenzieren. Diese Differenzierung erfolgt in der Regel 48-72 Stunden nach Stimulation der Th0 Zelle. Dies geschieht in Abhängigkeit des Zytokinmusters in der lokalen Umgebung, welche letztlich durch die pathogenen Keime gebahnt und durch die angeborene Immunantwort bedingt wird. Das Leit-Interleukin der Th1-Antwort ist dabei $\text{IFN-}\gamma$, das für die Eradikation von intrazellulären Mikroorganismen (Viren, Protozoen) verantwortlich ist [9]. Es sorgt für die Differenzierung der Th0 Zelle in eine Th1 Zelle. $\text{IFN-}\gamma$ ist weiterhin der entscheidende Faktor, über den die Makrophagen herangelockt und aktiviert werden [9]. Ausdifferenzierte Th1 Zellen exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR5 und CXCR3. Diese Chemokinrezeptoren werden benötigt, um zu dem peripheren Gewebe zu gelangen, wo die Entzündung, bedingt durch intrazelluläre Keime zumeist liegt.

Das Zytokinmilieu der Th2-Antwort setzt sich hingegen aus dem Leit-Interleukin (IL)- 4, aber auch IL-5 und IL-13 zusammen, welche die Eliminierung extrazellulärer Keime verursachen und die B-Zellen in ihrer Produktion von protektiven Antikörpern unterstützen [10]. Sie weisen andere Chemokinrezeptoren auf. In diesem Falle werden CCR3, CCR4 und CCR8 benötigt, um zu der Mucosa zu gelangen. Sie bekämpfen die extrazellulären Keime sowie Toxine.

Die regulatorischen T-Zellen (Treg) produzieren im Wesentlichen IL-10 und sind für eine antiinflammatorische Reaktion und Ausbildung einer Immuntoleranz

ranz verantwortlich. Innerhalb der Th-Balance verhindern sie die Ausbildung einer Autoimmunerkrankung.

Die Th17-Antwort wird durch IL17 geleitet. Dieses, der Th17-Antwort namensgebende Interleukin, wurde erstmals während Studien an Autoimmunerkrankungen beschrieben [11,12]. Es verursacht eine proinflammatorische Wirkung und kann zur Chronifizierung der Infektion führen sowie die Ausbildung einer Autoimmunerkrankung unterstützen. Die Differenzierung der naiven T-Zelle in die Th1, Th2 oder Th17 Effektor Zelle wird als „effector Th cell triade“ bezeichnet [13].

Für die Ausbildung der unterschiedlichen Antworten der T-Helfer-Zellen sind unterschiedliche, essentiell notwendige Transkriptionsfaktoren bekannt, die daher als Masterregulatoren bezeichnet werden.

T-bet (T-box-expressed in T-cells) ist ein T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor, der als der Masterregulator der Th1-Antwort fungiert. Dabei ist er nicht nur für die Differenzierung der ruhenden CD4 Zellen in Richtung Th1 Zellen verantwortlich, sondern ist auch in der Lage, die Th2 Zellen zu blockieren und in Th1 Zellen umzuwandeln, was die Plastizität dieser Zellpopulation widerspiegelt [14]. T-bet ist im Wesentlichen für die Steuerung der Produktion von IFN- γ verantwortlich und wird über ein negatives feed-back von IFN- γ kontrolliert [15]. Wenn ein naiver CD4 T-Lymphozyt in der Gegenwart von IFN- γ einen pathogenen Keim erkennt, erfolgt eine koordinierte Signalkaskade über die Aktivierung des T-Zellrezeptors und STAT-1, welches zu einer erhöhten Expression von T-bet führt. Hierdurch wird eine Induktion von IL12Rbeta2 verursacht, welches seinerseits zu einer Induktion von STAT-4 über IL12 führt und in einer Expression von IFN- γ und IL-18 mündet [16]. Dieser 2. Prozess erfolgt in der Abwesenheit des T-Zellrezeptors. Die Stabilisierung der Immunantwort erfolgt über den Einbezug der Umgebungszellen [15].

Der Masterregulator der Th2-Antwort hingegen ist GATA 3. Dieser von Marine und Winoto 1991 [17] erstmals beschriebene Transkriptionsfaktor ist ein sog.

enhancer-Bindungsprotein, das alle 4 Untereinheiten des T-Zellrezeptors kontrolliert. Er ist essentiell für eine effektive Th2-Antwort und blockiert zusätzlich zur erhöhten Effektivität die Th1-Antwort.

Das Gleichgewicht zwischen T-bet und GATA3 ist für eine adäquate Immunantwort und gesunde Immunbalance des Organismus wichtig [18,19]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Störung des Gleichgewichts bei schweren Krankheitsbildern beobachtet wird, wie z.B. dem Asthma bronchiale und zahlreichen Autoimmunerkrankungen [10,20-23].

2.3. Charakterisierung und Funktion von T-bet

2000 beschrieben Szabo und Glimcher erstmals einen Th1 spezifischen T-box Transkriptionsfaktor, der die Expression von IFN- γ kontrolliert [1]. Das murine *TBX21* Gen kodiert ein aus 530 Aminosäuren bestehendes Protein, das eine 189 Aminosäuren lange T-box DNA-Bindungsdomäne beinhaltet (Szabo 2000). Das humane von *TBX21* klonierte Protein ist 535 Aminosäuren lang und zeigt eine Ähnlichkeit von 88% gegenüber dem murinen Protein [1]. Während sich dieses Gen bei den Mäusen auf dem Chromosom 11 nachweisen lässt, liegt das humane *TBX21* auf dem Chromosom 17. Northern-Blot-Analysen detektierten eine T-bet-Expression in Lunge, Thymus und Milz, sowie in Blutzellen und natürlichen Killer (NK) Zellen [24].

T-bet gehört zu der Familie der T-Box Gene und entspricht *TBX21* und *Tblym* (T-box transcription factor expressed in lymphocytes). Das definierende Element dieses Transkriptionsfaktors ist eine hochkonservierte Sequenz, die als T-box bezeichnet wird und der oben erwähnten 189 Aminosäure-langen DNA-Bindungsdomäne entspricht [1]. Homologe Gene konnten in den unterschiedlichsten Spezies gefunden werden. Eine Spezies hat in der Regel mehrere T-box enthaltende Proteine. In Mäusen wurden 10 davon gefunden, bezeichnet als *Tbx1-6*, 10, 15, 21 und *Tbr*. *In-vitro* binden die Proteine an eine palindrome DNA Sequenz von 20 Basenpaaren [1]. Die wichtigste Funktion dieses Gens ist die Kontrolle der IFN- γ Expression von den CD4 Lymphozyten und den NK-

Zellen [15]. Mäuse, bei denen IFN- γ oder der IFN- γ Rezeptor fehlen, sterben infolge schwerer Infektionen bedingt durch virale oder mikrobielle Erreger. Dies beruht auf dem schweren Defekt der angeborenen und erworbenen Immunität. In *in-vitro* Untersuchungen korreliert die T-bet Expression mit der IFN- γ Expression in den Zellen. T-bet kann das IFN- γ -Gen transaktivieren und sowohl die endogene Produktion als auch das Chromatinremodeling der individuellen IFN- γ Allele [25,26] induzieren. Die funktionelle Ausschaltung des T-bet Gens führt bei Stimulation von CD4 Zellen unter neutralen Bedingungen oder unter Bedingungen, die normalerweise eine Th1-Antwort hervorrufen zu einer sehr schwachen Produktion von IFN- γ , interessanterweise aber zu einem deutlichen Anstieg der Th2 Zytokine wie IL4 und IL-5, der nicht unterdrückt werden kann [27]. Diese Versuche verdeutlichen, dass T-bet nicht nur die Produktion von IFN- γ kontrolliert, sondern auch die Th2 Zellen invers beeinflusst.

Es ist von entscheidender Bedeutung, dass sich die naiven T-Zellen in Richtung CD4 und CD8 T-Zellen entwickeln können, damit das breite Spektrum der Verteidigung gegen pathogene Keime gewahrt bleibt.

In Abhängigkeit der unterschiedlichen pathogenen Keime differenzieren die CD4 positiven T-Zellen entweder zu Th1 oder Th2 Helfer Zellen. Den Zytokinen kommt dabei eine entscheidende Rolle bezüglich der Immunmodulation zu. Der Masterregulator der Th1-Antwort T-bet zeigt dabei eine enge Abhängigkeit zu IFN- γ und STAT I [28,29]. T-bet greift offensichtlich früher in die Entwicklung der Th1-Antwort ein als IL-12 und IL-18 und kann auch unabhängig von STAT4 agieren [16].

Die Th2 Immunantwort wird durch einen anderen Masterregulator-GATA3-reguliert. GATA-3 schaltet dabei die Gene für die Produktion von IL4, IL5 und IL13 ein. Des Weiteren amplifiziert es sich selber durch die Herabregulation von STAT4 und IL12R β 2. Dies hat zur Folge, dass nicht nur die Th2-Antwort forciert, sondern auch die Th1-Antwort durch GATA3 gehemmt wird [30].

Das Gleichgewicht von T-bet und GATA3 in Abhängigkeit der extra- oder in-

trazellulär gelegenen pathogenen Mikroorganismen ist für die eine effektive Immunantwort essentiell.

Ähnlich den Th1 Zellen, werden auch die CD8 Zellen bei Infektionen durch intrazelluläre Keime aktiviert und weisen einige ähnliche Mechanismen zu denen der CD4 positiven T-Zellen, wie die IFN- γ Produktion, auf. Unterschiedliche *in vitro* und *in vivo* Studien an Mäusen zeigten dabei, dass die IFN- γ Expression jedoch nicht über T-bet, sondern über Eomesodermin geregelt wird [31,32]. Diese zusätzliche IFN- γ Expression der CD8+ T-Zellen führt zu einer Stabilisierung der Immunantwort im Sinne eines externen loop [15].

2.4. Die Funktion von T-bet in T-Lymphozyten bei nicht neoplastischen Erkrankungen

Die Störung des Gleichgewichtes zwischen den beiden Masterregulatoren der Th1- (T-bet) und Th2- (GATA-3) Immunantworten korreliert mit charakteristischen Krankheitsbildern. Frühzeitig ist dabei ein Zusammenhang zwischen IFN- γ , T-bet und der Zöliakie beschrieben worden.

2.4.1. Sprue/Zöliakie

Die Zöliakie ist eine Autoimmunerkrankung, die auf Grund einer atypischen Reaktion auf das Klebereiweiß Gluten über eine Zottenreduktion zu einer Zottenatrophie in Kombination mit einem erhöhten Gehalt intraepithelialer CD8+ T-Lymphozyten im Dünndarm führt [33]. Die Diagnose der Sprue/Zöliakie basiert auf einer Korrelation der klinischen Parameter mit den morphologischen Veränderungen. Dabei werden die histologischen Veränderungen nach den modifizierten Marsh-Kriterien [34] klassifiziert, die neben der Erhöhung der intraepithelialen CD8 +T-Zellen auf über 30 T-Zellen auf 100 Enterozyten [32,34] auch die Zottenreduktion bis hin zur Atrophie berücksichtigen.

Eine glutenfreie Diät ist die Therapie der Wahl und führt in der Regel zu einer Symptommfreiheit. Das morphologische Bild beinhaltet neben der oben erwähnten Zottenreduktion/-atrophie und des erhöhten Gehaltes intraepithelialer Lymphozyten zusätzlich unterschiedlich dichte T-zellreiche Infiltrate in der Lamina

propria.

Die Sprue kann in eine refraktäre Sprue übergehen, die mit einem Antigenverlust und einer klonalen T-Zell-Population einhergeht.

Entsprechend der WHO-Lymphomklassifikation [35-37] wird das EATCL in Zusammenhang mit der Zöliakie/Sprue gebracht, insbesondere deswegen, weil das EATCL genau in den geographischen Regionen vermehrt auftritt, in denen auch die Sprue/Zöliakie gehäuft diagnostiziert wird. Das Enteropathie-assoziierte T-Zell-Lymphom (EATCL) ist ein intestinaler lymphatischer Tumor, ausgehend von den intraepithelialen T-Lymphozyten. Die Tumorzellen können blastär abgewandelt sein und die gesamte Darmwand infiltrieren.

Monteleone et al. [28] zeigten als erste, dass die mRNA Transkripte für IFN- γ in Dünndarmbiopsaten von unbehandelten Zöliakiepatienten deutlich hochreguliert waren im Vergleich zu behandelten Patienten und einer Kontrollgruppe mit gesunden Probanden. Zudem konnten sie an Homogenisaten von Dünndarmbiopsaten zeigen, dass T-bet signifikant aktiviert ist und haben dies zudem mit einer Glutenstimulation spezifiziert.

Frisullo et al. [38] konnten in einer später durchgeführten Studie zudem zeigen, dass im peripheren Blut von Patienten mit unbehandelter Zöliakie höhere Expressionsmuster von T-bet, IFN- γ und phosphoryliertem STAT1 nachweisbar waren, als bei Patienten mit behandelter Zöliakie. Dies weist darauf hin, dass T-bet auch als Verlaufsparemeter der Aktivität und Ansprechbarkeit der Diät im peripheren Blut genutzt werden kann.

2.4.2 T-bet Expression in der lymphozytären Kolitis

Eine weitere Erkrankung des Intestinaltraktes, die mit einem erhöhten Gehalt intraepithelialer Lymphozyten einhergeht, ist die lymphozytäre Kolitis. Diese Erkrankung wurde erstmals 1989 von Lazenby [39] beschrieben. Zu den wesentlichen Symptomen gehören wässrige Diarrhöen. Die lymphozytäre Kolitis wird zusammen mit der kollagenen Kolitis unter dem Begriff der mikroskopi-

schen Kolitis subsumiert [40,41]. Dieser Begriff resultiert aus der Tatsache, dass sie bei teils schwerem klinischen und dann Therapie-pflichtigen Krankheitsbild keine endoskopischen Veränderungen aufweisen und erst durch die histologischen Veränderungen diagnostiziert werden können. Die Ätiologie und Pathogenese ist bis heute nicht sicher geklärt. Verschiedene Pathomechanismen wurden diskutiert. Neben einer HLA Assoziation, die kontrovers diskutiert wird, sind auch saisonale Ursachen [42] in der Literatur erwähnt. Interessant ist die Theorie einer abnormalen Reaktion auf luminale Antigene, die die Koinzidenz mit der Zöliakie erklären würde [43-45].

Zudem wurde herausgefunden, dass die lymphozytäre Kolitis häufig mit anderen Autoimmunerkrankungen vergesellschaftet ist, wie z.B. der Sprue/Zöliakie [46], aber auch der rheumatoiden Arthritis [47] oder der Psoriasis [48].

Histologisch wird die lymphozytäre Kolitis dann diagnostiziert, wenn der Gehalt an intraepithelialen T-Zellen bei mehr als 20 auf 100 Deckepithelien liegt [49]. Das Epithel ist häufig vulnerabel und in der lamina propria lässt sich ein unterschiedlich dichtes Entzündungszellinfiltrat, zum Teil auch mit eosinophilen Granulozyten nachweisen. Häufig wird das Rektosigmoideum von der Erkrankung ausgespart, so dass zur Diagnosesicherung Biopsate aus dem oberen Kolonanteil untersucht werden müssen.

2.5. Funktion von T-bet in B-Lymphozyten bei nicht neoplastischen Erkrankungen

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen von T-bet im Rahmen seiner Funktion bei immunologischen Prozessen zeigte sich, dass T-bet nicht nur eine zentrale Rolle in der T-Helfer-Zell-Immunantwort spielt, sondern auch einen erheblichen Einfluss auf die Modulation der B-Zellen und damit der B-Zell-vermittelten Immunantwort hat [50-52]. Peng et al. [2,53] und Gerth et al. [54] konnten dabei aufdecken, dass T-bet offenbar maßgeblich den T-Zell-unabhängigem IgG Klassenwechsel beeinflusst und hier insbesondere die Produktion von IgG2a und die

Bildung von Autoantikörpern verursacht. In reifen B-Zellen kann T-bet demnach durch IFN- γ , IL-12 und IL-27 sowie durch den TLR 9 Liganden induziert werden [55,56].

IgG2a Immunglobuline spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der humoralen Autoimmunität und dem Schutz vor pathogenen Keimen. Sie sind damit ein ganz wesentlicher Bestandteil der adaptiven Immunantwort.

2.5.1. Die Piringer Lymphadenitis

Es ist eine weltweite hohe Durchseuchungsrate durch Toxoplasmen bekannt, wobei die Infektion klassischerweise asymptomatisch verläuft. Nur wenige Menschen entwickeln Symptome, wie eine Lymphknotenschwellung (vorwiegend cervical), allgemeine Schwäche, Fieber Halsschmerzen und eine Hepatosplenomegalie. Hier ließen die häufig extirpierten Lymphknoten das typische Bild erkennen, das erstmals von Piringer und Kuchinka [57] beschrieben worden ist. Wesentliche Charakteristika sind dabei die rasenartig angeordneten monozytoiden B-Zellen entlang der Sinus, die intra- und interfollikulär gelegenen Epitheloid-Zellen ohne eindeutige Granulombildung, die aktivierten Keimzentren und die Kapsulitis. Diese Form der Erkrankung ist selbstlimitierend mit einem Abklingen nach ca. 4 -12 Wochen. Die Infektion durch Toxoplasmen im Sinne einer nekrotisierenden Entzündung stellt hingegen eine lebensbedrohliche Erkrankung bei Patienten dar, die eine Immunsuppression [58,59] aufweisen, sei es angeboren oder erworben.

Die monozytoiden Zellen in der Piringer Lymphadenitis liegen in Rasen entlang der Sinus. Über die anatomische Struktur der Sinus treten die Mikroorganismen in den Lymphknoten, so dass es nicht unwahrscheinlich ist, dass diese Zellen die erste Abwehr bilden. Innerhalb der monozytoiden B-Zellansammlungen liegen Granulozyten, die eine ebenfalls wichtige Stellung in der allgemeinen Immunabwehr einnehmen. Überraschenderweise können innerhalb der monozytoiden B-Zellen jedoch keine T-Zellen nachgewiesen werden. Da, wie oben erwähnt,

T-bet die T-Zell-unabhängige Immunantwort prägt, war unsere Überlegung, ob die Piringer-Lymphadenitis mit dem hohen Gehalt an monozytoiden B-Zellen eventuell hierfür das klinische Korrelat bildet.

2.6. T-bet Expressionmuster in T-Zell-Lymphomen

Die grundlegenden Erkenntnisse der Rolle von T-bet im Rahmen immunologischer Prozesse legten den Schluss nahe, auch maligne Lymphome hinsichtlich einer möglichen T-bet Expression zu untersuchen. Diese Untersuchungen erfolgten von unterschiedlichen Arbeitsgruppen parallel zu der Grundlagenforschung.

Dabei untersuchten Dorfman et al. [60] als erste die T-bet Expression in peripheren T-Zell-Lymphomen mit Hilfe immunhistologischer Färbungen an TMA's. In der Studie wurden 91 T-Zell-Lymphome unterschiedlicher Entitäten hinsichtlich ihres immunhistologischen Expressionsmusters gegen die Antikörper folgender Moleküle untersucht: CD20, CD3, CD45RO, CD43, CD8, CD30, ALK-1, CXCR3, CD134/OX40, CD69, LEF-1, TCF-1, CXCR4 und T-bet. Entsprechend des immunhistologischen Phänotyps wurden die peripheren T-Zell-Lymphome in das bipolare Modell der Th1- und Th2-Antwort kategorisiert. Dabei wurden T-Zell-Lymphome mit Expression von T-bet, CD69, CXCR3, LEF1 und TCF1 denen zugeordnet, die aus maligne entarteten Th1 Zellen entstehen. Hierzu gehörten entsprechend der Ergebnisse das lymphoepitheliale (Lennert)-Lymphom und das angioimmunoblastische T-Zell-Lymphom. T-Zell-Lymphome aus Th2 Zellen hervorgehend, sollten eher CCR4, CXCR4 und CD30 exprimieren während eine Expression von T-bet fehlte. Hierzu gehörte demnach in erster Linie das anaplastische großzellige Lymphom.

Da, wie in der Einleitung erwähnt, das dichotome Muster der Immunantwort (Th1/Th2) zahlreiche Fragen offen ließ, wurde 2005 dem Interleukin 17 eine gesonderte Stellung innerhalb der Interleukine zugeordnet und diese über die

Etablierung der Th17 [61-63] Antwort gefestigt. Die Erkenntnisse zur Th17-Antwort entstanden während Untersuchungen an Mausmodellen zur Klärung von Autoimmunerkrankungen. Im Gegensatz zu der Th1- und Th2-Antwort, die primär einen überlebenswichtigen Mechanismen darstellen, ist die Th17-Antwort eine reine krankmachende Immunantwort. Es ist heute akzeptiert, dass die Th17 Helferzellen eine wichtige Rolle in unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen, der Allergie, im Verlauf von Transplantationen wie auch der Tumorprogression [64-68]spielen. Klinische Symptome, die zu der Diagnose einer Autoimmunerkrankung führen, werden aber auch bei malignen Lymphomen beobachtet.

Das angioimmunoblastische T-Zell-Lymphom (AITCL) wurde erstmals 1975 von Frizzera und Lukes [69,70] unter dem Begriff „immunoblastic lymphadenopathy“ beschrieben. Es gehört zu den selteneren Lymphomen des höheren Lebensalters und wird etwas häufiger bei Männern beobachtet. Entsprechend der WHO Lymphomklassifikation wird es den peripheren T-Zell-Lymphomen zugeordnet.

Histologisch ist es durch den Nachweis hoher endothelialer Venolen, umgeben von follikulär- dendritischer Zellen, und eines polymorphen Infiltrates charakterisiert. Innerhalb dieses Infiltrates sind unterschiedlich viele Immunoblasten nachweisbar. Klinisch fallen die Patienten häufig durch immunologische Erkrankungen wie z.B. durch eine autoimmun-hämolytische Anämie oder eine Polyarthrit auf [71]. Es werden bisher 3 morphologische Stadien unterschieden, die mit dem Progress der Erkrankung korrelieren [72]. Im frühen Stadium sind die follikulären Strukturen zumeist erhalten, sind aber irregulär gestaltet (Muster I). Sie werden von einem verbreiterten Paracortex umgeben. Im weiteren Verlauf wird die Lymphknotenarchitektur zerstört und die Follikel sind deutlich reduziert (Muster II) bis sie im letzten Stadium völlig fehlen (Muster III).

2.7. T-bet Expressionsmuster in B-Zell-Lymphomen

Dorfman et al. [4,5] waren auch die ersten, die die T-bet Expression in B-Zell-Lymphomen beschrieben. Dabei wurden insgesamt 116 Fälle untersucht, die sich unterschiedlichen Entitäten (B-akuter lymphatischer Leukämie (ALL), B-chronischer lymphatischer Leukämie (B-CLL), Haarzelleukämie (HCL), Marginalzonenlymphomen (MZL), Mantelzell-Lymphomen (MCL), follikulären Lymphomen (FZL) und diffusen großzelligen Lymphomen (DLBCL)) zuordnen ließen.

Sie beobachtete eine T-bet Expression in Tumoren, die von Memory-B-Zellen abstammen (B-CLL, HCL, MZL) nicht jedoch in den anderen. Interessanterweise zeigten alle Fälle der HCL im Gegensatz zu den anderen Entitäten eine durchgehende T-bet Expression.

In eigenen Untersuchungen konnten an mehreren TMAs mit insgesamt über 500 Spots unterschiedlichster Lymphome ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Auffällig war dabei, dass die Tumorzellen der HCL nicht nur durchgehend T-bet exprimierten, sondern diese Expressionsintensität identisch zu der der monozytoiden B-Zellen und aktivierten T-Zellen war.

Die Haarzelleukämie (HCL) ist eine seltene maligne Erkrankung des lymphatischen Systems, die aus einer unbekanntem B-Zellpopulation hervorgeht und deren Ätiologie und Pathogenese bis heute unklar ist. Von der Erkrankung sind Erwachsene im mittleren und höheren Lebensalter betroffen. Dabei ist eine Geschlechterprävalenz bezüglich des männlichen Geschlechtes in einem Verhältnis zum weiblichen Geschlecht von 4:1 beschrieben. Die Erkrankung manifestiert sich im Knochenmark - hier insbesondere in den Sinus- der roten Pulpa der Milz und in den Sinusoiden der Leber [73]. Des Weiteren zirkulieren die Tumorzellen im peripheren Blut. Ein Lymphknotenbefall wird hingegen nur sehr selten beobachtet. Trotz unterschiedlicher Untersuchungsansätze zur molekularen Cha-

rakterisierung mittels der Immunglobulinen-Umlagerungs-Analyse, vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) und Interphase Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH) [74] konnte bis heute eine einheitliche genetische Determination nicht bewiesen werden. Die häufigsten genetischen Veränderungen, zumeist Trisomien betreffen die Chromosomen 3,5,6,7,10,12,14,17 und Y. Deletionen konnten am Arm 7p, 8q und 14q gefunden werden [75]. Jüngste Studien konnten aufdecken, dass die Tumorzellen der Haarzell-Leukämie durchgehend eine BRAF Mutation aufweisen. Dabei liegt dieselbe Mutation (V600E) wie bei dem malignen Melanom vor [76-83]. Morphologisch lassen sich die Tumorzellen im formalinfixierten und Paraffin eingebettetem Gewebe als mittelgroß mit zentralständigem Zellkern und leicht aufgelockertem Kernchromatin charakterisieren. Das Zytoplasma ist oft hell und leer, so dass das Bild von „Spiegeleiern“ entsteht. In den peripheren Blutaussstrichen zeigen sie schmale Zytoplasmaausläufer, die zu dem Namen "Haarzelle" geführt haben. Diese Ausläufer lassen sich im formalinfixierten und in Paraffin eingebettetem Gewebe zumeist nicht mehr nachweisen.

Zu sicheren Identifizierung dieser Zellen sind daher immunhistologische Untersuchungen notwendig. Interessant ist hierbei, dass die meisten Moleküle, über die die Identifizierung der Haarzellen erfolgt, eigentlich keine spezifischen B-Zell-Moleküle sind. Ein anerkanntes Antikörperpanel ist der positive Nachweis von CD20, DBA.44, CD103, CD11c, Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP), und CD25 [73,84]. Später wurde das Molekül Annexin A1 durch Genexpressionsprofile als ein weiteres wichtiges Molekül in der Diagnostik der HCL entdeckt [85].

Insbesondere die Moleküle CD25 (IL-2 Rezeptor), AnnexinA1, CD103 und CD11c spielen in der Modulation der Entzündungszellantwort auch bei Makrophagen und/oder T-Zellen eine wichtige Rolle [86-88].

3. ZIEL DER EIGENEN ARBEITEN

Ziel der eigenen Arbeiten war es, über immunhistologische und funktionelle Untersuchungen die in-vitro Untersuchungen von T-bet im Bezug auf seine Funktion in den B- und T-Lymphozyten auf das Primärmaterial zu übertragen. Dabei kam es insbesondere darauf an, sowohl an nicht neoplastischen Erkrankungen wie auch an malignen Lymphomen die T-bet produzierenden Zellen hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu den B- und T-Lymphozyten zu identifizieren als auch ggf. den Subpopulationen zuzuordnen. In weiteren Schritten galt es im Anschluss die Ergebnisse mit den klinischen Parametern zu verbinden, um Erklärungen für einen möglichen Pathomechanismus der unterschiedlichen Erkrankungen zu finden.

4. EIGENE ARBEITEN

4.1. T-bet Expressionsmuster in der Zöliakie, der refraktären Sprue und dem Enteropathie-assoziierten T-Zell-Lymphom

Auf dem Boden der zuvor beschriebenen Untersuchungen stellte sich für uns die Frage, welche Zellen bei der Sprue/Zöliakie T-bet exprimieren und wie sich die T-bet Expression ausgeweitet auf die therapie-refraktäre Sprue [89] und das Enteropathie assoziierte T-Zell-Lymphom (EATCL) verhält.

Es erfolgten Doppelfärbungen gegen CD3/T-bet, CD4/T-bet, CD8/T-bet und CD30/T-bet an Paraffin eingebettetem Gewebe von 20 Patienten mit einer Sprue/ Zöliakie, von 5 Patienten mit refraktärer Sprue und von 6 Patienten mit EATCL. Des Weiteren wurden molekulare Untersuchungen zum Nachweis/Ausschluss einer monoklonalen T-Rezeptorgenumlagerung durchgeführt [90]. Sie zeigten ein polyklonales Umlagerungsmuster in den als Zöliakie diagnostizierten Biopsaten und eine Klonalität in denen der refraktären Sprue und denen der EATCL's.

In allen untersuchten Fällen der Sprue/Zöliakie sowie in denen der refraktären Sprue zeigten die CD8⁺ intraepithelialen Lymphozyten eine T-bet Expression. In den Fällen der refraktären Sprue war diese unabhängig vom Expressionsverlust anderer T-zell-spezifischer Moleküle. In der lamina propria exprimierte ein Großteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zusätzlich T-bet.

Diese Ergebnisse untermauern zum einen die in der Literatur beschriebenen Th1-Antwort im Rahmen der Zöliakie [28,91], zum anderen aber auch die Tatsache, dass die CD8⁺ T-Zellen offensichtlich diese Reaktion mit unterstützen.

Interessanterweise konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Tumorzellen der EATCL T-bet verlieren je pleomorpher die Tumorzellen waren und je mehr Zellen eine zusätzliche CD30 Expression aufwiesen.

4.2. Unterschiedliche Muster in der T-bet and GATA-3 Expression bei der Lymphozytären Kolitis und der Sprue/Zöliakie

Da, wie im Kapitel 2.4.2. erwähnt, eine lymphozytäre Kolitis bei Patienten mit Sprue/Zöliakie gehäuft beschrieben wird, stellte sich für uns die Frage, ob sich die T-Zellen der lymphozytären Kolitis ebenfalls der Th1-Antwort zuordnen lassen und sich ein ähnliches T-bet Expressionsmuster bezüglich der T-Zell-Subpopulationen erkennen lässt.

Für die vergleichende immunhistologische Untersuchung wählten wir jeweils 10 Biopsate mit der Diagnose einer Sprue/Zöliakie bzw. einer lymphozytären Kolitis. Sie wurden mittels Doppelmarkierungen gegen CD3/T-bet, CD3/GATA3, CD4/T-bet, CD4/GATA3, CD8/T-bet, CD8/GATA3, CD20/T-bet, CD20/GATA3 aufgearbeitet. Alle intraepithelialen T-Zellen der lymphozytären Kolitis und der Sprue/Zöliakie konnten der CD8 Subpopulation zugeordnet werden. Unterschiede ließen sich hinsichtlich der GATA3 und T-bet Expression herausarbeiten. Während bei der Sprue/Zöliakie alle intraepithelialen Lymphozyten T-bet exprimierten, zeigten 10-20% der intraepithelialen CD8 positiven T-Lymphozyten in der lymphozytären Kolitis eine GATA3 Expression. Auch die Infiltrate in der lamina propria wiesen Unterschiede auf. Die T-Zellen der lymphozytären Kolitis exprimierten im Vergleich zur Sprue/Zöliakie in einem höheren Prozentsatz GATA3. Während bis zu 20% der CD8+ T-Zellen und bis zu 60% der CD4+ T-Zellen in der lamina propria der lymphozytären Kolitis GATA3 exprimieren, konnte dies bei der Sprue/Zöliakie in nur 5% der CD8+ T-Zellen und bis 20% der CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden. Beide Erkrankungen zeigten ein geringes Infiltrat an B-Zellen, die weder T-bet noch GATA3 exprimierten.

Unsere Ergebnisse lassen insbesondere wegen der Expression von GATA3 an eine kombinierte Th1/Th2-Antwort denken [92], auch wenn andere Arbeitsgruppen eine Th1 assoziierte Autoimmunerkrankung favorisieren [93-95].

4.3. T-bet-positive and IRTA1-positive monozytoide B-Zellen unterscheiden sich von Marginalzonenzellen und Epithel-assoziierten B-Zellen in ihrem Antigenprofil und ihrer topographischen Verteilung

Monozytoide B-Zellen liegen bei verschiedenen reaktiven Lymphknotenveränderungen wie z.B. der Piringer-Lymphadenitis vor. Sie sind charakterisiert durch einen klaren, breiten Zytoplasmasaum und einen homogenen recht dunklen Kern, der zentralständig liegt. Interessanterweise liegen zwischen ihnen zahlreiche neutrophile Granulozyten, aber nie T-Zellen. In der Literatur wird diskutiert, ob diese Zellen eine eigenständige Subpopulation sind oder eine Variante von Marginalzonenzellen darstellen [96-98]. Da von der Lokalisation her betrachtet sowohl monozytoide B-Zellen, als auch intraepitheliale B-Zellen der Gaumentonsillen und splenische Marginalzonen- B-Zellen vermutlich eine wichtige Rolle in der ersten Verteidigung von Mikroorganismen spielen [99,100], haben wir diese Zellgruppen miteinander verglichen. In einer immunhistologischen Studie wurden die Marginalzonenzellen der Milz und des Lymphknotens, intraepitheliale B-Zellen der Tonsille sowie monozytoide B-Zellen mit T-bet, IRTA-1, CD75, CD45RA, BCL-2, CD21 und CD27 gefärbt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die monozytoiden B-Zellen (Positivität von T-bet, IRTA-1, CD75, CD45RA, Negativität von BCL-2, CD21, CD27) von den Marginalzonen-Zellen der Milz und des Lymphknotens (Positivität von BCL-2, CD21, und CD27 bei Negativität von CD45RA, CD75 und überwiegender Negativität für T-bet und IRTA-1) deutlich unterscheiden und Ähnlichkeiten zu den intraepithelialen B-Zellen der Tonsille (Positivität von IRTA-1, CD45RA, partielle Expression von T-bet, CD75 und Negativität von CD21, CD27) aufweisen.

Interessant war dabei insbesondere die kräftige Expression von T-bet in den monozytoiden B-Zellen, die eine gleichartige Intensität wie die der aktivierten CD4 positiven T-Zellen erkennen ließ.

4.4. Unterschiedliche Expressionsmuster von T-bet sind charakteristisch für spezifische reaktive Lymphknotenveränderungen

Da T-bet nicht nur eine Rolle in der Th1-Antwort spielt, sondern auch bei der T-Zell-unabhängigen Immunantwort, haben wir eine Studie etabliert, bei der unterschiedliche, durch intrazelluläre Agentien verursachte Infektionskrankheiten (Toxoplasmose, akute infektiöse Mononukleose, manifeste HIV-Erkrankung, Katzen-Kratz-Erkrankung, Tuberkulose) hinsichtlich einer T-bet Expression in B- oder T-Zellen untersucht und mit einem Kollektiv aus nicht aktivierten Lymphknoten, Lymphknoten mit einer follikulären Hyperplasie, Lymphknoten mit einer nekrotisierenden Kikuchi-Lymphadenitis, oder mit der Rosai-Dorfman Erkrankung, einer Langerhans-Zell-Histiozytose, einem Morbus Castleman und dermatopathischer Lymphadenopathie verglichen wurden.

Die Studie basiert auf Doppelmarkierungen mit T-bet/CD20, T-bet/CD4 und T-bet/CD8 in lymphatischen Geweben von Patienten mit den oben erwähnten Erkrankungen. Dabei konnten folgende Ergebnisse zusammengefasst werden: (i) nur wenige T-Zellen mit T-bet Expression interfollikulär und keine T-bet exprimierenden B-Zellen in inaktiven Lymphknoten und der follikulären Hyperplasie; (ii) keine Vermehrung T-bet positiver T- oder B-Zellen bei der Tuberkulose, der Rosai-Dorfman Erkrankung, der Langerhans-Zell-Histiozytose, der dermatopathischen Lymphadenopathie oder dem M. Castleman; (iii) erhöhte T-bet Expression in CD4, CD8 und B-Zellen in Erkrankungen mit einer Th1-Antwort und der Kikuchi-Lymphadenitis.

Die Ergebnisse untermauern die *in vitro* Studien, die belegten, dass T-bet in Erkrankungen, bedingt durch intrazelluläre Mikroorganismen, verstärkt exprimiert wird. Dabei scheinen die B-Zellen diese Immunantwort zu unterstützen, bzw. eine T-Zell-unabhängige Immunantwort zu bilden, wie z.B. bei der Toxoplasmose. Die nekrotisierende Kikuchi Lymphadenitis könnte infektiöse (intrazelluläre) Genese haben. Hierzu würde auch der Nachweis von TLR9 [101] auf den plasmazytoiden dendritischen Zellen im Bereich der Nekrosen passen.

4.5. Interferon-gamma und T-bet Expression in einer Patientin mit einer Piringer-Lymphadenitis

Im Rahmen einer Schnellschnittuntersuchung konnte Material von einer Patientin gesichert werden, die an einer nachträglich molekular überprüften Toxoplasmose litt. Die an diesem Material durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen bezüglich der T-bet Expression ergaben ein gleichartiges Bild wie in früheren Untersuchungen beschrieben. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen weder expandiert noch wesentlich aktiviert waren.

Weiterhin wurden am unfixierten Lymphknotengewebe und am peripheren Blut dieser Patientin funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen des Lymphknotens isoliert und sowohl diese als auch die des peripheren Blutes über eine durchflusszytometrische Analysen untersucht. Es wurden die Moleküle CD3, CD4, CD401, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-10, T-bet und CD19 miteinander kombiniert. Zusätzlich wurden die Zellen spezifisch (durch das Toxoplasmenantigen) und unspezifisch (SEB und PI) stimuliert.

Die Ergebnisse weisen darauf hin dass die B-Zellen, wenn auch in wesentlich geringeren Mengen als die T-Zellen, IFN- γ exprimieren und dass die T-Zellen des peripheren Blutes eine (im Verhältnis zu gesunden Probanden) deutliche Reduktion von IL-2 erkennen lassen. Diese Ergebnisse untermauern die These, dass die T-Zellen bei Patienten mit Piringer-Kuchinka-Lymphadenitis offensichtlich einen (vorübergehenden?) T-Zelldefekt aufweisen und die B-Zellen diesen zu kompensieren versuchen. Möglicherweise wird die klinische Symptomatik dadurch verursacht, dass diese B-Zell-Antwort nicht so effektiv ist. Dazu würde auch passen, dass die B-Zellen das IFN- γ nur in geringem Masse bilden.

4.6. Drei unterschiedliche Expressionsmuster von T-bet in angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphomen

Nach Dorfman et al. gehört das AITCL zu den Lymphomen, die von entarteten T-Zellen der Th1-Antwort ausgehen. Die klinischen Symptome lassen jedoch vermuten, dass diese Lymphomentität mit einem Defekt in der immunologischen Kette einhergeht. Da inzwischen die Bedeutung von T-bet in immunologischen Prozessen deutlich zugenimmt und T-bet nicht nur der Masterregulator der Th1-Antwort ist, sondern auch die Th17-Antwort beeinflusst [102-104] und zudem eine wichtige Stellung in der T-Zell-unabhängigen Immunantwort spielt, haben wir untersucht, welche Zellen im AITCL tatsächlich T-bet exprimieren. In dieser immunhistologischen Studie wurde Gewebe von 29 Patienten mit AITCL mit histologischen Mustern II und III untersucht. Dabei wurden Doppelmarkierungen durchgeführt, bei der T-bet mit CD20, CD3 und programmed death (PD)-1 kombiniert wurden. PD-1 erstmals an follikulären T-Helferzellen identifiziert [105,106], wird charakteristischerweise von den AITL-Tumorzellen exprimiert. Es wurden 3 verschiedene Muster erkannt, die als Muster A, B und C beschrieben wurden. Im Muster A exprimieren größtenteils die neoplastischen T-Zellen T-bet. Das Muster B ist dadurch charakterisiert, dass B-Zellen T-bet exprimieren. Diese Zellen liegen entweder zu Aggregaten um hohe endotheliale Venolen oder in unmittelbarer Nähe zu den Lymphknotensinus. Im Muster C exprimierten fast ausschließlich die Immunoblasten schwach T-bet. Diese Ergebnisse waren unabhängig von einer EBV Infektion, die häufig bei AITCL's assoziiert ist. Die Resultate führen zu der Annahme, dass bei den Patienten die Th1-Antwort insuffizient ist und B-Zellen versuchen, diese Antwort zu ersetzen. Zudem würde die hohe Expression von VEGF-A, CXCL13 und T-bet in den neoplastischen T-Zellen einen Teil der klinischen Symptome erklären. CXCL13 und VEGF-a unterstützen wie T-bet die Th17-Antwort, der eine wichtige Funktion bei der Entstehung von autoimmunologischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Polyarthritiden und Arthralgien zugeschrieben wird [107-109].

4.7. Die Detektion des Transkriptionsfaktor T-bet erleichtert die Diagnose der Haarzell-Leukie bei minimaler Infiltration des Knochenmarks

Bei ausgedehnten Knochenmarksinfiltraten durch die Haarzelleukämie kann die Diagnose nicht nur durch die typischen morphologischen Auffälligkeiten vermutet, sondern traditionell durch den immunhistologischen Nachweis von DBA.44, der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP), und Annexin A1[85] untermauert werden. Während im peripheren Blut die Tumorzellen zusätzlich durch CD11c, FMC7 und CD103 gut detektierbar sind, gibt es zum Nachweis von FMC7 und CD103-Moleküle bisher keine paraffingängigen Antikörper. Auch für CD11c fehlte dieser lange Zeit. Die Diagnostik minimaler Tumorzellinfiltrate im Knochenmark ist zudem schwierig, da diese Zellen häufig perlschnurartig in den Gefäßen liegen und morphologisch nicht gut erkennbar sind. Der Nachteil der weit verbreiteten, oben beschriebenen paraffingängigen Antikörper besteht darin, dass Annexin A1 zahlreiche Zellen der Hämatopoese färbt und DBA.44 sowie TRAP alleine nicht spezifisch für die Haarzell-Leukämie sind. T-bet wird im Knochenmark hingegen nur von wenigen aktivierte T-Zellen exprimiert, die solitär gelagert sind.

Mittels immunhistologischer Färbungen war aus früheren Studien bereits bekannt, dass die Tumorzellen der HCL durchgehend kräftig T-bet exprimieren und bisher kein weiteres B-Zell-Lymphom ein gleichartiges Expressionsmuster aufweist, so dass die Expression von T-bet in der HCL als charakteristisch und somit als diagnostisch angesehen werden kann.

In dieser Studie konnte mittels Einfach- und Doppelmarkierungen hervorgehoben werden, dass auch minimale Infiltrate der HCL durch T-bet identifiziert und diagnostiziert werden können.

4.8. Die Expression von T-box-expressed-in-T-cells (T-bet) in den Tumorzellen der Haarzell-Leukämie korreliert mit der Interferon-gamma Produktion

Nachdem in einer früheren immunhistologischen Studie herausgearbeitet werden konnte, dass die Tumorzellen der HCL eine ebenso kräftige T-bet Expression wie aktivierte CD4⁺ T-Zellen zeigen, stellte sich nun die Frage ob diese Tumorzellen auch IFN- γ produzieren, wie es auch schon bei den monozytoiden B-Zellen bewiesen werden konnte.

Um dieser Frage nachgehen zu können, wurde peripheres Blut von 5 Patienten mit HCL und 55 gesunden Probanden asserviert.

Die Haarzell-Leukämie der 5 Patienten wurde durch morphologische und immunhistologische Untersuchungen am Knochenmark und durch FACS-Analysen des peripheren Blutes gesichert.

Die Lymphozyten des peripheren Blutes der 5 Patienten und 55 Kontrollprobanden wurden mittels Staphylococcus enterotoxin B (SEB) und phorbol 12-myrisate 13 acetylate/Ionomycin (PMA/I) stimuliert und ihre Zytokinsekretion anschließend über eine 4 Farben FACS-Analyse untersucht. Zudem wurde der IFN- γ Spiegel im peripheren Blut gemessen.

Interessanterweise konnte hierbei dargestellt werden, dass der Interferon- γ Spiegel im Serum bei den Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht ist. In der anschließend durchgeführten FACS Analyse wurde die Interferon- γ Produktion den Zellpopulationen zugeordnet. Die FACS-Analysen des peripheren Blutes ließen eine Expression von T-bet in den CD103 positiven neoplastischen B Zellen und eine kräftige Expression in den T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollpatienten erkennen. Die neoplastischen Zelle ähneln damit in ihrer Funktion offenbar den monozytoiden B-Zellen, wobei die IFN- γ Expression in den Tumorzellen deutlich höher als bei den monozytoiden B-Zellen war.

5. DISKUSSION UND AUSBLICK

Die vorgestellten Publikationen hatten zum Ziel, die über in-vitro Studien und anhand von Tiermodellen gewonnenen funktionellen Daten über T-bet auf das Primärmaterial zu übertragen. Dabei haben wir zunächst versucht, die T-bet exprimierenden T-Zellen in unterschiedlichen nicht-neoplastischen Erkrankungen zu charakterisieren. Wir konnten bei der Sprue/Zöliakie, die als eine Th1 Reaktion in der Literatur bekannt ist, zeigen, dass die intraepithelialen CD8⁺ Zellen T-bet exprimieren, während im Infiltrat der lamina propria auch CD4⁺ T-Zellen eine T-bet Expression aufwiesen. Zudem haben wir Unterschiede hinsichtlich des Expressionsmusters von T-bet und GATA-3 zwischen der Sprue/Zöliakie und der lymphozytären Kolitis hervorheben können. Entsprechend dieser Ergebnisse muss überlegt werden, ob die lymphozytäre Kolitis möglicherweise eine kombinierte Th1/Th2-Antwort ist und keine reine Th1-Antwort [93-95]. Zur Absicherung dieser Vermutung müssen weitere Untersuchungen angeschlossen werden, insbesondere unter der Berücksichtigung des Interleukin-Musters beider Erkrankungen.

Nach der Erstbeschreibung 2000 durch Szabo und Glimcher [1] wurde T-bet eine zentrale Rolle in der Th1-Antwort eingeräumt. T-bet galt zunächst in erster Linie als Masterregulator der Th1-Antwort, der im Wesentlichen durch die Regulation von IFN- γ Einfluss auf die Immunreaktion nimmt. Da die Th1-Antwort gegen intrazelluläre Keime gerichtet ist, haben wir Erkrankungen, bedingt durch intrazelluläre Keime mit Lymphknotenerkrankungen anderer Ursachen hinsichtlich der T-bet Expression in B- und T-Lymphozyten verglichen. Hier korrelierten die Ergebnisse mit den funktionellen Studien: zum einen zeigten die T-Zellen in Erkrankungen bedingt durch intrazelluläre Keime tatsächlich eine vermehrte Expression von T-bet, zum anderen konnten wir zeigen, dass die Th1-Antwort in einem unterschiedlichen Ausmaß von CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen unterstützt wird [15].

Die Tatsache, dass bei der Kikuchi Lymphadenitis nach unseren Untersuchungen zahlreiche T-Zellen, die teils der CD4, teils der CD8 Subpopulation angehören kräftig T-bet exprimieren haben wir als einen Hinweis darauf gedeutet, dass diese Erkrankung möglicherweise durch einen bisher nicht identifizierten intrazellulären Keim hervorgerufen wird. Dieser Verdacht wird auch von anderen Autoren diskutiert, die eine Expression von TLR-9 bei der Kikuchi Lymphadenitis nachweisen konnten [101]. Die Toll-like-receptors (TLR) gehören in die Gruppe der pattern recognition molecules und hier in die Untergruppe der pattern recognition receptors (PRR). Die TLR sind an der Membran der Leukozyten lokalisiert und setzen sich aus hoch konservierten und repetitiven Strukturen zusammen. Sie vermitteln eine antimikrobielle angeborene Immunantwort. Studien konnten zeigen, dass TLR9 bei der Kikuchi Lymphadenitis von den plasmazytoiden dendrischen Zellen exprimiert wird. Da der TLR 9 bei intrazellulären Keimen hochreguliert ist, wird auch über diese Untersuchung unsere Vermutung erhärtet. Dennoch ist die Ätiologie der Kikuchi-Lymphadenitis bis heute ungeklärt, daher wäre hier eine Korrelation der Expressionsmuster von T-bet und TLR- 9 sinnvoll, um der Klärung dieser reaktiven Lymphadenitis ein Stück näher zu kommen.

Im weiteren Verlauf der *in-vitro* Untersuchungen von T-bet sowie von Ergebnissen an Tiermodellen stellte sich schon bald heraus, dass T-bet zusätzlich eine bedeutende Rolle in der Immunmodulation der B-Zellen hat [2,50-52,54-56,110].

Hier liegt die Bedeutung insbesondere in der Bildung der T-Zell-unabhängigen Immunantwort. Dabei konnte zunächst durch *in vitro*-Versuche aufgezeigt werden, dass T-bet den IgG2 Klassenwechsel wesentlich mit beeinflusst.

Unsere eigenen immunhistologischen und funktionellen Untersuchungen an monozytoiden B-Zellen im lymphatischen Gewebe bei unterschiedlichen Infektionskrankheiten legen zudem den Verdacht nahe, dass bestimmte Subpopulationen der B-Zellen versuchen, eine T-Zell-unabhängige Immunantwort mit

(wenngleich auch schwacher) IFN- γ Expression zu bilden, um Infektionskrankheiten einzudämmen. Diese Ergebnisse sprechen für die Plastizität der B-Zell-Immunantwort.

Da wir die IFN- γ Expression der B-Zellen bisher nur exemplarisch und an einer Erkrankung am Primärmaterial nachweisen konnten, wären hier weitere Studien sinnvoll. Insbesondere wären hier Untersuchungen am Primärmaterial von HIV-Patienten interessant, da sich hier ebenfalls monozytoide B-Zellen darstellen lassen.

Sowohl die Arbeitsgruppe um Dorfman [6] als auch unsere eigene konnten eine intensive Expression von T-bet in den Tumorzellen der Haarzell-Leukämie nachweisen. Sie sind die bisher einzigen beschriebenen B-Zellen, die als maligne Zellen eine gleichartig kräftige Expression von T-bet aufweisen, wie aktivierte T-Zellen der Th1-Antwort.

Die Ätiologie und Pathogenese der Haarzelleukämie konnte trotz intensiver Forschung insbesondere in Richtung chromosomaler Aberrationen bisher nicht geklärt werden. Hier ist insbesondere der immunhistologische Immunphänotyp von Interesse, da die Tumorzellen der Haarzelleukämie mehrere Moleküle exprimieren, die auch bei Makrophagen und T-Zellen nachgewiesen werden können. Möglicherweise kann hier über die Expression von T-bet ein neuer Forschungsansatz sinnvoll sein, um zur Klärung der Ätiologie und Pathogenese der Haarzelleukämie beitragen zu können.

Der Verzicht der Aufrechterhaltung des dichotomen Musters der Immunantwort nach der Entdeckung der Th17-Antwort [61-63] hat zu einer Flut neuer Untersuchungen geführt, in denen auch der Frage nachgegangen wurde, welche Funktion T-bet hier inne hat. Wesentliche Ergebnisse konnten dabei durch die Untersuchung an den Autoimmun-Arthritiden [67] erzielt werden, die eine Beteiligung von T-bet an der Th17 Immunantwort beweisen konnten. Dabei hat nicht nur unsere Arbeitsgruppe [111] durch Untersuchungen am Primärmaterial von angioimmunoblastischen T-Zelllymphom belegt, dass diese Erkrankung of-

fenbar nicht, wie bisher vermutet, durch eine Entartung von Th1 Zellen, sondern von Th17 Zellen entsteht. Die Bedeutung von T-bet in Rahmen der Ausbildung der Th17-Antwort wirft die Fragestellung auf, inwiefern hier eine Neuordnung der entzündlich bedingten Erkrankungen und der T-Zell-Lymphome erfolgen sollte.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000;100:655-669.
2. Peng SL, Szabo SJ, Glimcher LH. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:5545-5550.
3. Gocke AR, Cravens PD, Ben LH, et al. . T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity. *Journal of immunology* 2007;178:1341-1348.
4. Dorfman DM, Hwang ES, Shahsafaei A, Glimcher LH. T-bet, a T-cell-associated transcription factor, is expressed in a subset of B-cell lymphoproliferative disorders. *American journal of clinical pathology* 2004;122:292-297.
5. Dorfman DM, Hwang ES, Shahsafaei A, Glimcher LH. T-bet, a T cell-associated transcription factor, is expressed in Hodgkin's lymphoma. *Human pathology* 2005;36:10-15.
6. Dorfman DM, van den Elzen P, Weng AP, Shahsafaei A, Glimcher LH. Differential expression of T-bet, a T-box transcription factor required for Th1 T-cell development, in peripheral T-cell lymphomas. *American journal of clinical pathology* 2003;120:866-873.
7. Abdelsadik A, Trad A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Human immunology* 2011.
8. Vilasco M, Larrea E, Vitour D, et al. . The protein kinase IKKepsilon can inhibit HCV expression independently of IFN and its own expression is downregulated in HCV-infected livers. *Hepatology* 2006;44:1635-1647.
9. Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, et al. . T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:15137-15142.
10. Hartenstein B, Teurich S, Hess J, Schenkel J, Schorpp-Kistner M, Angel P. Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. *The EMBO journal* 2002;21:6321-6329.
11. Van Bezooijen RL, Van Der Wee-Pals L, Papapoulos SE, Lowik CW. Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction in vitro. *Annals of the rheumatic diseases* 2002;61:870-876.
12. Chen Z, O'Shea JJ. Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine* 2008;41:71-78.
13. Fietta P, Delsante G. The effector T helper cell triade. *Rivista di biologia* 2009;102:61-74.
14. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002;295:338-342.
15. Hatton RD, Weaver CT. Immunology. T-bet or not T-bet. *Science* 2003;302:993-994.
16. Mullen AC, High FA, Hutchins AS, et al. . Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 2001;292:1907-1910.

17. Marine J, Winoto A. The human enhancer-binding protein Gata3 binds to several T-cell receptor regulatory elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88:7284-7288.
18. Liu CT, Wang G, Luo FM, Wang ZL, Liu R, Wang CL. [Imbalanced T cell-specific transcription factors T-bet and GATA-3 contributes to type 2 T helper cell polarization in asthmatic patients]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases* 2004;27:398-402.
19. Su RC, Becker AB, Kozyrskyj AL, Hayglass KT. Epigenetic regulation of established human type 1 versus type 2 cytokine responses. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008;121:57-63 e53.
20. Zhu K, Ye J, Wu M, Cheng H. Expression of Th1 and Th2 cytokine-associated transcription factors, T-bet and GATA-3, in peripheral blood mononuclear cells and skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *Archives of dermatological research* 2010;302:517-523.
21. Huang F, Tong XY, Zhang RH, Cai Y. [Primary study on the mechanism of Ma Xing Shi Gan decoction on the Th1/Th2 response in a murine model of asthma]. *Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials* 2008;31:1519-1522.
22. Tan WP, Mai XD, Wu BQ, et al. . [Expression of transcription factors T-bet/GATA-3 mRNA and its effect on Tc1/Tc2 balance in asthmatic children]. *Zhonghua er ke za zhi. Chinese journal of pediatrics* 2007;45:284-287.
23. Lazarevic V, Glimcher LH. T-bet in disease. *Nature immunology* 2011;12:597-606.
24. Zhang WX, Yang SY. Cloning and characterization of a new member of the T-box gene family. *Genomics* 2000;70:41-48.
25. Zeng WP, Chang C, Lai JJ. Immune suppressive activity and lack of T helper differentiation are differentially regulated in natural regulatory T cells. *Journal of immunology* 2009;183:3583-3590.
26. Agarwal P, Raghavan A, Nandiwada SL, et al. . Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. *Journal of immunology* 2009;183:1695-1704.
27. Cousins DJ, Lee TH, Staynov DZ. Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines. *Journal of immunology* 2002;169:2498-2506.
28. Monteleone I, Monteleone G, Del Vecchio Blanco G, et al. . Regulation of the T helper cell type 1 transcription factor T-bet in coeliac disease mucosa. *Gut* 2004;53:1090-1095.
29. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, et al. . T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nature immunology* 2002;3:549-557.
30. Takemoto N, Kamogawa Y, Jun Lee H, et al. . Cutting edge: chromatin remodeling at the IL-4/IL-13 intergenic regulatory region for Th2-specific cytokine gene cluster. *Journal of immunology* 2000;165:6687-6691.
31. Tayade C, Fang Y, Black GP, V AP, Jr., Erlebacher A, Croy BA. Differential transcription of Eomes and T-bet during maturation of mouse uterine natural killer cells. *Journal of leukocyte biology* 2005;78:1347-1355.
32. Dieterich W, Esslinger B, Schuppan D. Pathomechanisms in celiac disease. *International archives of allergy and immunology* 2003;132:98-108.
33. Oberhuber G, Caspary WF, Kirchner T, Borchard F, Stolte M. [Diagnosis of celiac disease and sprue. Recommendations of the German Society for Pathology Task Force on Gastroenterologic Pathology]. *Der Pathologe* 2001;22:72-81.

34. Sullivan PB, Marsh MN, Mirakian R, Hill SM, Milla PJ, Neale G. Chronic diarrhea and malnutrition--histology of the small intestinal lesion. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 1991;12:195-203.
35. Van Overbeke L, Ectors N, Tack J. What is the role of celiac disease in enteropathy-type intestinal lymphoma? A retrospective study of nine cases. *Acta gastro-enterologica Belgica* 2005;68:419-423.
36. Diamanti A, Colistro F, Calce A, et al. . Clinical value of immunoglobulin A antitransglutaminase assay in the diagnosis of celiac disease. *Pediatrics* 2006;118:e1696-1700.
37. Salmi TT, Collin P, Korponay-Szabo IR, et al. . Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut* 2006;55:1746-1753.
38. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, et al. . T-bet and pSTAT-1 expression in PBMC from coeliac disease patients: new markers of disease activity. *Clinical and experimental immunology* 2009;158:106-114.
39. Lazenby AJ, Yardley JH, Giardiello FM, Jessurun J, Bayless TM. Lymphocytic ("microscopic") colitis: a comparative histopathologic study with particular reference to collagenous colitis. *Human pathology* 1989;20:18-28.
40. Schiller LR. Microscopic colitis syndrome: lymphocytic colitis and collagenous colitis. *Seminars in gastrointestinal disease* 1999;10:145-155.
41. Levison DA, Lazenby AJ, Yardley JH. Microscopic colitis cases revisited. *Gastroenterology* 1993;105:1594-1596.
42. LaSala PR, Chodosh AB, Vecchio JA, Schned LM, Blaszyk H. Seasonal pattern of onset in lymphocytic colitis. *Journal of clinical gastroenterology* 2005;39:891-893.
43. Bohr J, Tysk C, Yang P, Danielsson D, Jarnerot G. Autoantibodies and immunoglobulins in collagenous colitis. *Gut* 1996;39:73-76.
44. Fine KD, Do K, Schulte K, et al. . High prevalence of celiac sprue-like HLA-DQ genes and enteropathy in patients with the microscopic colitis syndrome. *The American journal of gastroenterology* 2000;95:1974-1982.
45. McCashland TM, Donovan JP, Strobach RS, Linder J, Quigley EM. Collagenous enterocolitis: a manifestation of gluten-sensitive enteropathy. *Journal of clinical gastroenterology* 1992;15:45-51.
46. Matteoni CA, Goldblum JR, Wang N, Brzezinski A, Achkar E, Soffer EE. Celiac disease is highly prevalent in lymphocytic colitis. *Journal of clinical gastroenterology* 2001;32:225-227.
47. Mielants H, Veys EM, Cuvelier C, De Vos M, Botelberghe L. HLA-B27 related arthritis and bowel inflammation. Part 2. Ileocolonoscopy and bowel histology in patients with HLA-B27 related arthritis. *The Journal of rheumatology* 1985;12:294-298.
48. Wiedermann CJ, Zelger A. Lymphocytic colitis in a patient with psoriasis responsive to budesonide. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2007;42:538-539.
49. Platz-Baudin C, Katzenberger T, Eck M. [Microscopic colitis: histopathological review with a clinicopathological correlation]. *Der Pathologe* 2011;32:275-281.
50. Liu N, Ohnishi N, Ni L, Akira S, Bacon KB. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nature immunology* 2003;4:687-693.
51. Rifkin IR, Marshak-Rothstein A. T-bet: the Toll-bridge to class-switch recombination? *Nature immunology* 2003;4:650-652.

52. Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE. Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *Journal of immunology* 2005;175:7103-7107.
53. Peng SL, Li J, Lin L, Gerth A. The role of T-bet in B cells. *Nature immunology* 2003;4:1041; author reply 1041.
54. Gerth AJ, Lin L, Peng SL. T-bet regulates T-independent IgG2a class switching. *International immunology* 2003;15:937-944.
55. Yoshimoto T, Okada K, Morishima N, et al. . Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27. *Journal of immunology* 2004;173:2479-2485.
56. Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *Journal of immunology* 2005;174:6781-6790.
57. Piringer-Kuchinka A, Martin I, Thalhammer O. [Superior cervical nuchal lymphadenitis with small groups of epitheloid cell proliferation]. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 1958;331:522-535.
58. Suzuki Y, Israelski DM, Dannemann BR, Stepick-Biek P, Thulliez P, Remington JS. Diagnosis of toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome by using a new serologic method. *Journal of clinical microbiology* 1988;26:2541-2543.
59. Durlach RA, Kaufer F, Carral L, Hirt J. Toxoplasmic lymphadenitis--clinical and serologic profile. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2003;9:625-631.
60. Dorfman DM, van den Elzen P, Weng AP, Shahsafaei A, Glimcher LH. Differential expression of T-bet, a T-box transcription factor required for Th1 T-cell development, in peripheral T-cell lymphomas. *American journal of clinical pathology* 2003;120:866-873.
61. Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Current opinion in immunology* 2006;18:349-356.
62. Homey B. [After TH1/TH2 now comes Treg/TH17: significance of T helper cells in immune response organization]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 2006;57:730-732.
63. Kleinschek MA, Owyang AM, Joyce-Shaikh B, et al. . IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 2007;204:161-170.
64. Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, Drobyski WR. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2007;110:3804-3813.
65. Chen Y, Wood KJ. Interleukin-23 and TH17 cells in transplantation immunity: does 23+17 equal rejection? *Transplantation* 2007;84:1071-1074.
66. Jen HY, Chuang YH, Lin SC, Chiang BL, Yang YH. Increased serum interleukin-17 and peripheral Th17 cells in children with acute Henoch-Schonlein purpura. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 2011;22:862-868.
67. Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC, Lan JL. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. *Arthritis research & therapy* 2011;13:R126.

68. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical and experimental immunology* 2007;148:32-46.
69. Frizzera G, Moran EM, Rappaport H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy. Diagnosis and clinical course. *The American journal of medicine* 1975;59:803-818.
70. Lukes RJ, Tindle BH. Immunoblastic lymphadenopathy. A hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *The New England journal of medicine* 1975;292:1-8.
71. Alizadeh AA, Advani RH. Evaluation and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a review of current approaches and future strategies. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008;6:899-909.
72. Attygalle AD, Chuang SS, Diss TC, Du MQ, Isaacson PG, Dogan A. Distinguishing angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified, using morphology, immunophenotype and molecular genetics. *Histopathology* 2007;50:498-508.
73. Goodman GR, Bethel KJ, Saven A. Hairy cell leukemia: an update. *Current opinion in hematology* 2003;10:258-266.
74. Lindbjerg Andersen C, Ostergaard M, Nielsen B, Pedersen B, Koch J. Characterization of three hairy cell leukemia- derived cell lines (ESKOL, JOK-1, and hair-M) by multiplex-FISH, comparative genomic hybridization, FISH, PRINS, and dideoxyPRINS. *Cytogenetics and cell genetics* 2000;90:30-39.
75. Dierlamm J, Stefanova M, Wlodarska I, et al. . Chromosomal gains and losses are uncommon in hairy cell leukemia: a study based on comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer genetics and cytogenetics* 2001;128:164-167.
76. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, et al. . BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *The New England journal of medicine* 2011;364:2305-2315.
77. Tiacci E, Schiavoni G, Forconi F, et al. . Simple genetic diagnosis of hairy cell leukemia by sensitive detection of the BRAF-V600E mutation. *Blood* 2011.
78. Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, et al. . The BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia and other mature B-cell neoplasms. *Blood* 2011.
79. Blombery P, Wong SQ, Hewitt CA, et al. . Detection of BRAF mutations in patients with hairy cell leukemia and related lymphoproliferative disorders. *Haematologica* 2011.
80. Boyd EM, Bench AJ, van 't Veer MB, et al. . High resolution melting analysis for detection of BRAF exon 15 mutations in hairy cell leukaemia and other lymphoid malignancies. *British journal of haematology* 2011;155:609-612.
81. Lennerz JK, Klaus BM, Marienfeld RB, Moller P. Pyrosequencing of BRAF V600E in routine samples of Hairy Cell Leukaemia identifies CD5+ variant Hairy Cell Leukaemia that lacks V600E. *British journal of haematology* 2011.
82. Pardanani A, Tefferi A. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *The New England journal of medicine* 2011;365:961; author reply 961-962.
83. Takahashi Y, Mori J, Kami M. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *The New England journal of medicine* 2011;365:960-961; author reply 961-962.
84. Akkaya H, Dogan O, Agan M, Dincol G. The value of tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) immunoreactivity in diagnosis of hairy cell leukemia. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2005;113:162-166.

85. Falini B, Tiacci E, Liso A, et al. . Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet* 2004;363:1869-1870.
86. Furuhashi K, Suda T, Hasegawa H, et al. . Mouse Lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T cell responses. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011.
87. Denning TL, Norris BA, Medina-Contreras O, et al. . Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *Journal of immunology* 2011;187:733-747.
88. Patel DM, Ahmad SF, Weiss DG, Gerke V, Kuznetsov SA. Annexin A1 is a new functional linker between actin filaments and phagosomes during phagocytosis. *Journal of cell science* 2011;124:578-588.
89. Cellier C, Patey N, Mauvieux L, et al. . Abnormal intestinal intraepithelial lymphocytes in refractory sprue. *Gastroenterology* 1998;114:471-481.
90. Daum S, Weiss D, Hummel M, et al. . Frequency of clonal intraepithelial T lymphocyte proliferations in enteropathy-type intestinal T cell lymphoma, coeliac disease, and refractory sprue. *Gut* 2001;49:804-812.
91. Holtmann MH, Neurath MF. T helper cell polarisation in coeliac disease: any (T-)bet ? *Gut* 2004;53:1065-1067.
92. Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb J, Scott FW. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *Journal of immunological methods* 2003;278:157-169.
93. Pardi DS, Kelly CP. Microscopic colitis. *Gastroenterology* 2011;140:1155-1165.
94. Tagkalidis PP, Gibson PR, Bhathal PS. Microscopic colitis demonstrates a T helper cell type 1 mucosal cytokine profile. *Journal of clinical pathology* 2007;60:382-387.
95. Zippi M, Marcheggiano A, Crispino P, Occhigrossi G, Severi C. Microscopic colitis: a concise review. *La Clinica terapeutica* 2010;161:385-390.
96. Stein K, Hummel M, Korbjuhn P, et al. . [Monocytic B-cells represent a new cell population that is mainly recruited from unmutated polyconal naive B-cells]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 2000;84:151-152.
97. Fend F, Kraus-Huonder B, Muller-Hermelink HK, Feller AC. Monocytoid B-cell lymphoma: its relationship to and possible cellular origin from marginal zone cells. *Human pathology* 1993;24:336-339.
98. de Wolf-Peeters C, Pittaluga S, Dierlamm J, Wlodarska I, Van Den Berghe H. Marginal zone B-cell lymphomas including mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma (MALT), monocytoid B-cell lymphoma and splenic marginal zone cell lymphoma and their relation to the reactive marginal zone. *Leukemia & lymphoma* 1997;26:467-478.
99. Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 2002;17:341-352.
100. Zandvoort A, Timens W. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clinical and experimental immunology* 2002;130:4-11.

101. Lin L, Gerth AJ, Peng SL. CpG DNA redirects class-switching towards "Th1-like" Ig isotype production via TLR9 and MyD88. *European journal of immunology* 2004;34:1483-1487.
102. Yang Y, Weiner J, Liu Y, et al. . T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* 2009;206:1549-1564.
103. Yang Y, Xu J, Niu Y, Bromberg JS, Ding Y. T-bet and eomesodermin play critical roles in directing T cell differentiation to Th1 versus Th17. *Journal of immunology* 2008;181:8700-8710.
104. Bending D, Newland S, Krejci A, Phillips JM, Bray S, Cooke A. Epigenetic changes at Il12rb2 and Tbx21 in relation to plasticity behavior of Th17 cells. *Journal of immunology* 2011;186:3373-3382.
105. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, Freeman GJ. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *The American journal of surgical pathology* 2006;30:802-810.
106. Roncador G, Garcia Verdes-Montenegro JF, Tedoldi S, et al. . Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica* 2007;92:1059-1066.
107. Meeuwisse CM, van der Linden MP, Rullmann TA, et al. . Identification of CXCL13 as marker for outcome of rheumatoid arthritis using an in silico model of the rheumatic joint. *Arthritis Rheum* 2011.
108. Gullick NJ, Evans HG, Church LD, et al. . Linking power Doppler ultrasound to the presence of th17 cells in the rheumatoid arthritis joint. *PLoS One* 2010;5.
109. Takagi R, Higashi T, Hashimoto K, et al. . B cell chemoattractant CXCL13 is preferentially expressed by human Th17 cell clones. *Journal of immunology* 2008;181:186-189.
110. Peng SL, Li J, Lin L, Gerth A. The role of T-bet in B cells. *Nature immunology* 2003;4:1041; author reply 1041.
111. Tripodo C, Gri G, Piccaluga PP, et al. . Mast cells and Th17 cells contribute to the lymphoma-associated pro-inflammatory microenvironment of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *The American journal of pathology* 2010;177:792-802.

7. DANKSAGUNG

Besonders bedanke ich mich bei den MTA's Frau Lehmann, Frau Gocht, Frau Arnemann, Frau Cieluch und Frau Noyan des Laboratoriums für Hämatopathologie, die nicht nur hervorragende technische Arbeit geleistet haben , sondern auch durch Ihre Unkompliziertheit die schnelle Durchführung der Färbungen ermöglicht haben. Herrn Prof Anagnostopoulos danke ich für die stets fruchtbaren Gespräche, die mich immer wieder veranlasst haben, die Theorien zu überdenken und qualitativ zu untermauern. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dietel, der durch die strukturelle Organisation und Leitung des Institutes erst den Abschluss der unterschiedlichen Arbeiten ermöglicht hat.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift