

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Dermatologie und Venerologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Luger

Effektormechanismen der kutanen Graft-versus-Host Erkrankung

Immunpathologische Untersuchungen von T-Zell-Subpopulationen
und Apoptose-assoziierten Molekülen in Hautbiopsien von Patienten
mit kutaner Graft-versus-Host Erkrankung nach allogener
Stammzelltransplantation

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Anna Roberta Lawin-O'Brien
aus Hamburg

2003

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Luger

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Hartmut Bürkle

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2003

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Dermatologie und Venerologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Luger

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Luger
Koreferent: PD Dr. med. Hartmut Bürkle

Zusammenfassung

Effektormechanismen der kutanen Graft-versus-Host Erkrankung **Immunpathologische Untersuchungen von T-Zell-Subpopulationen und Apoptose-assoziierten Molekülen in Hautbiopsien von Patienten mit kutaner Graft-versus-Host Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation**

Die vorliegende Arbeit untersucht die Effektormechanismen der kutanen Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) nach allogener Stammzelltransplantation in Hautbiopsien anhand von histopathologischen und immunpathologischen Mustern in Gefrier- und Paraffinschnitten. Es handelt sich um eine retrospektive und kontrollierte Untersuchung. 27 Patienten (10 w, 17 m, Durchschnittsalter 40,4 Jahre) wurden in die Studie aufgenommen. 23/27 Patienten erhielten allogenes Knochenmark, 4/27 erhielten allogene periphere Stammzellen. 15/27 Patienten bekamen Transplantate von unverwandten Spendern, 12/27 von verwandten Spendern. Es lagen verschiedene Grunderkrankungen und unterschiedliche Konditionierungen vor Transplantation vor. Alle 27 Patienten wurden nach etablierten klinischen und histopathologischen Kriterien für die akute oder chronische Graft-versus-Host-Erkrankung beurteilt. Als Kontrollgruppe für die immunhistochemischen Untersuchungen dienten drei gesunde Personen. Die Bedeutung von immunhistochemischen Untersuchungen gegen T-Zell-Antigene (CD2, CD3, CD4, CD8) und Apoptosemoleküle (CD95/Fas, CD95L/Fas-L, Perforin, Granzyme B), sowie die Bedeutung der Histopathologie für Diagnostik, Pathogenese und Prognose der kutanen GvHD wurde untersucht. Vorherrschende histopathologische Muster kutaner GvHD waren akute und chronisch-lichenoide Formen. Eine akute kutane GvHD wurde in erster Linie bei Patienten mit akuten Leukämien (AML und ALL) festgestellt, aber nur bei knapp der Hälfte der Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML). Das zeitliche Auftreten und das morphologische Erscheinungsbild einer GvHD werden durch die Grunderkrankungen mit entsprechenden Vortherapien und unterschiedliche Konditionierungen, insbesondere durch fraktionierte Ganzkörperbestrahlung (fTBI) beeinflusst oder zumindest modifiziert. Vorläufig erscheint noch kein immunhistochemischer Parameter etabliert zu sein, der diagnostisch eindeutig mit einer kutanen Reaktion verbunden ist. Jedoch bestehen Unterschiede in der Expression zytotoxischer Marker in der akut-lichenoiden und der chronisch-lichenoiden GvHD, die möglicherweise auf Unterschieden in den Pathomechanismen der einzelnen Krankheitsformen beruhen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Graft-versus-Host Erkrankung
 - 1.1.1. Vorkommen, Häufigkeit, Prognose
 - 1.1.2. Pathophysiologische Grundlagen
 - 1.1.2.1. Die Histokompatibilitätsantigene
 - 1.1.2.2. Die Rolle der T Lymphozyten
 - 1.1.2.3. Die Zytokine und die hämatopoietischen Wachstumsfaktoren
 - 1.1.3. Klinik, Histopathologie und Immunpathologie
 - 1.1.3.1. Akute Graft-versus-Host Erkrankung
 - 1.1.3.2. Chronische Graft-versus-Host Erkrankung
 - 1.1.4. Therapie und Prophylaxe

- 1.2. Apoptose
 - 1.2.1. Biologische Bedeutung der Apoptose für den Organismus
 - 1.2.2. Apoptose und Nekrose
 - 1.2.3. Apoptose und terminale Differenzierung
 - 1.2.4. Extrazelluläre Signale und Effektoren der Apoptose
 - 1.2.5. Genetische Regulation der Apoptose
 - 1.2.6. Nachweismethoden der Apoptose
 - 1.2.7. Pathologische Bedeutung der Apoptose in der Haut

- 1.3. Fragestellungen und Ziel der Untersuchungen

2. Material und Methoden

- 2.1. Patienten und Biopsien
- 2.2. Anfertigung der Schnitte
- 2.3. Färbetechniken

- 2.3.1. Standardfärbung mit H&E
- 2.3.2. Indirekte Peroxidase-Methode
- 2.3.3. Avidin-Biotin-Methode
- 2.4. Reagenzien
- 2.5. Auswertung
- 2.5.1. Auswertung der Färbungen
- 2.5.2. Statistische Auswertung
- 2.6. Photoherstellung

3. Ergebnisse

- 3.1. Patienten
- 3.2. Histopathologische Ergebnisse
 - 3.2.1. Klinische und histopathologische Ergebnisse
 - 3.2.2. Zusammenfassung der histopathologischen Ergebnisse
- 3.3. Immunpathologische Ergebnisse
 - 3.3.1. Statistische Auswertung der immunpathologischen Ergebnisse
 - 3.3.2. Zusammenfassung der immunpathologischen Ergebnisse

4. Diskussion

5. Literaturverzeichnis

6. Abkürzungen

7. Danksagung

8. Lebenslauf

1. Einleitung

1.1. Graft-versus-Host Erkrankung

1.1.1. Vorkommen, Häufigkeit, Prognose

Die allogene Stammzelltransplantation (SZT), das heißt die Transplantation von Knochenmark (KM) oder peripheren Blutstammzellen (PBSZ) von HLA-identen (HLA=„Human Leucocyte Antigen“), verwandten Spendern ist heute bereits für maligne und nicht-maligne hämatologische Erkrankungen, Immundefekte und bestimmte Speicherkrankheiten die Therapie der Wahl [Thomas et al., 1975 (170); Schaefer et al., 1989 (146)]. Obwohl in den letzten zwei bis drei Jahrzehnten große Fortschritte auf den Gebieten der begleitenden medizinischen Maßnahmen, der molekularen Bestimmung der Histokompatibilitätsantigene, der Prophylaxe und Behandlungsmöglichkeiten der Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) erzielt wurden, sind es gerade die Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR) als zugrundeliegender Pathomechanismus und die GvHD als klinisches Syndrom, die als Hauptkomplikation bei etwa 50% der Patienten auftreten [Sullivan et al., 1981 (158); Antin, Ferrara, 1992 (2)] und so die Gesamtprognose und das Überleben nach SZT entscheidend beeinträchtigen [Schaefer et al., 1989 (146)]. Darüber hinaus hat die zunehmende Verwendung von KM und PBSZ von unverwandten oder von nicht-HLA-identen, verwandten Spendern zu erhöhten Inzidenzen der GvHD geführt [Darmstadt et al., 1992 (34)]. Auch zahlreiche andere Risikofaktoren tragen mehr oder weniger zur Entwicklung einer GvHD bei, wie Alter und Geschlecht von Spender und Empfänger (PBSZ-Spenderin+Empfänger>PBSZ-Spender+Empfängerin) und/oder die Anzahl der transplantierten T-Lymphozyten. Nicht zuletzt dürfen auch Vorbehandlungen der Grunderkrankung, zum Beispiel mit Interferon, oder Konditionierungsmaßnahmen mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Pathogenese der GvHD spielen. Letzteres ist jedoch nicht systematisch untersucht und müßte noch bewiesen werden.

Die ernstesten und lebensbedrohlichen Symptome der steroidresistenten akuten GvHD, wie zum Beispiel die toxische epidermale Nekrolyse (TEN), das Leberversagen und die schwere Darmbeteiligung einerseits, und die hochdosierte Immunsuppression andererseits erhöhen das Risiko beträchtlich, bakterielle, virale und Pilzinfektionen zu entwickeln [Sullivan et al., 1986 (159); Devine et al., 1997 (39)]. Darüber hinaus ist mit einer hochdosierten Immunsuppression auch ein signifikantes Risiko des Rückfalles der Grunderkrankung verbunden. Die mit einer chronischen GvHD *per se* verbundene Immunsuppression und die Standardimmunsuppression mit Cyclosporin A (CSA) und Kortikosteroiden (KS), die für die Prophylaxe (CSA) und die Behandlung der GvHD (CSA, KS) eingesetzt werden, bringen nicht nur ein erhöhtes Risiko für infektiöse Komplikationen mit sich [Woo et al., 1997 (199); Bertz et al., 1997 (15)], sondern auch für die Entstehung von Sekundärmalignomen [Traweek et al., 1996 (175); Marmont, 1998 (106)].

1.1.2. Pathophysiologische Grundlagen

Im Allgemeinen bedeutet „Transplantation“ die Übertragung von lebenden Zellen, Geweben oder Organen: innerhalb ein und desselben Individuums spricht man von Autotransplantation, bei der Übertragung von einem Individuum auf ein genetisch anderes Individuum gleicher Art von Allotransplantation. Um Xenotransplantate handelt es sich bei der Transplantation zwischen unterschiedlichen Spezies.

Über den Erfolg einer Transplantation und somit über das Anwachsen des Transplantates und gegebenenfalls über die Wiederaufnahme seiner spezifischen Organfunktion oder über den Mißerfolg der Transplantation, die akute oder chronische Transplantatabstoßung durch den Empfänger, entscheiden die immunologische Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger sowie die zelluläre und humorale Immunkompetenz des Empfängers [Lenhard, 1983 (99)].

Den Gesetzen der Transplantationsgenetik entsprechend werden Transplantate zwischen genetisch identischen Individuen angenommen, da sie für den Empfänger keine erkennbaren Fremdantigene besitzen. Transplantate zwischen genetisch verschiedenen Individuen werden als fremd erkannt und abgestoßen. Die F1-Hybriden von Tieren miteinander gekreuzter homozygoter Inzuchtstämme sind heterozygot. Transplantate von diesen F1-Nachkommen auf die Eltern werden abgestoßen, da der jeweilige Spender Antigene jenes Elternteiles besitzt, die der Empfänger nicht aufweist („Hybrid resistance“). Eine Transplantation der Elterngeneration auf die F1-Generation dagegen ist erfolgreich, da dieses Transplantat keine abstoßungsprovozierenden Fremdantigene für den F1-Empfänger erkennen läßt [Bach, 1974 (10); Klein, 1975 (88); Roit, 1985 (136)].

Bei der Transplantation von allogenetischem Knochenmark kommt es jedoch zur entgegengesetzten Immunreaktion: Hier greifen mit dem Knochenmark transplantierte, immunkompetente T-Lymphozyten des Spenders das fremde Empfängergewebe an.

Es gelten die drei transplantationsimmunologischen Voraussetzungen für GvHD nach Knochenmarkstransplantation, die Billingham 1966 (16) definierte: Das Vorhandensein von immunkompetenten Zellen im Transplantat, maßgebliche gravierende Unterschiede in den MHC-Antigenen des Empfängers und Spenders, sowie die immunologische Inkompetenz des Empfängers, der nicht in der Lage ist, eine adäquate Immunreaktion gegen das Transplantat zu richten.

Als Folge der immunsupprimierenden Konditionierung vor einer KMT (=Knochenmarkstransplantation), die TBI (TBI=„total body irradiation“) mittels (γ -Strahlung, Cyclophosphamid, TLI (=„total lymphoid irradiation“) und weitere chemotherapeutische Maßnahmen oder eine Kombination der Modulationen beinhalten kann, ist das Immunsystem des Empfängers ausgelöscht und wird

durch die immunkompetenten Zellen des Spenders wieder rekonstituiert. Die Transplantation selbst erfolgt in Form von etwa 10^8 kernhaltigen Zellen des KM-Spenders [Thomas et al., 1975 (170)] über einen zentralvenösen Zugang. Die Schädigung des immunsupprimierten Wirtes durch die transplantierten Knochenmarkszellen wird als Graft-versus-Host-Reaktion bezeichnet.

1.1.2.1. Die Histokompatibilitätsantigene

Jene Antigene, die für die Abstoßung allogenetischer Transplantate hauptverantwortlich sind, nennt man Histokompatibilitätsantigene. Sie finden sich in Form von Glykoproteinen in unterschiedlicher Verteilung auf der Oberfläche von Zellen. Ihre individuelle Exprimierung ist im Genom festgelegt. Von besonderer Bedeutung für die Transplantatabstoßung ist der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC=„Major histocompatibility complex“). Der MHC entspricht einer Serie von Genen, die für Proteinmoleküle kodieren, deren Verantwortlichkeit in der Wiedererkennung von Fremd-, und eigenen Zellen und in der Induktion der Immunantwort liegt. Weiterhin lassen sich anhand des MHC-Systems eine Reihe von Krankheiten klassifizieren, die mit bestimmten HLA-Allelen assoziiert sind. Als Nebenhistokompatibilitätskomplexe (miHA = „minor histocompatibility complex“) sind weitere Systeme mit geringerem Einfluß bekannt. [Click et al., 1985 (30)].

Der Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen ist das HLA-System. Es liegt auf dem p-Arm des Chromosoms 6 und umfaßt eng aneinander gekoppelte Genloci, die ein Segment von etwa 4 Millionen DNA-Nukleotiden bilden [Resch, Gemsa, 1983 (135)].

Die vom HLA-System gesteuerten Genprodukte lassen sich aufgrund verschiedener biologischer Funktionen und biochemischer Charakteristika in mindestens drei Klassen unterteilen.

Klasse-I-Antigene werden hauptsächlich durch die Genorte A, B und C (sowie durch nicht vollständig charakterisierten Genorte HLA-E, -F, -G, -H und HLA-J) des HLA-Systems kodiert und sind mit quantitativen Unterschieden auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus nachweisbar. Sie stellen Erkennungsproteine auf der Zelloberfläche dar und sind unter anderem an der Antigenerkennung durch spezifische zytotoxische T-Effektorlymphozyten (CD8-positive T-Lymphozyten) beteiligt [Klein et al., 1983 (89); Nathenson et al., 1985 (123)].

Die **Klasse-II-Region** enthält jene Gene, welche für HLA-DR-Moleküle (DRA und DRB loci) und HLA-D-Moleküle (HLA-DQ-,HLA-DP-,HLA-DNA-, HLA-DM und HLA-DOB-Moleküle) kodieren. Diese sind an der Kooperation und Interaktion von Zellen des Immunsystems beteiligt [Resch, Gemsa, 1983 (135); Roitt, 1985 (136)]. Klasse-II-Antigene werden konstitutiv auf der Zelloberfläche von B- und T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert. Verstärkt finden sich Klasse-II-Antigene auf aktivierten T-Lymphozyten, und unter bestimmten Umständen auf Epithelzellen [Germain et al., 1986 (56); Selby et al., 1983 (149)]. Weiterhin können Klasse-II-Antigene durch Keratinozyten exprimiert und synthetisiert werden [Volc-Platzer et al., 1984 (184)]. Auch die Antigenerkennung der Regulator-T-Lymphozyten, der T-Helferzellen und T-Suppressorzellen erfolgt über Antigene der Klasse II. T-Helferzellen (CD4 positive T-Lymphozyten) werden durch antigenpräsentierende Zellen (beispielsweise dendritische Zelle im Blut oder in Epithelien) aktiviert, die an ihrer Oberfläche das fremde Antigen/Hapten in Kombination mit Antigenen der Klasse II des MHC exprimieren. Die aktivierten T-Helferzellen setzen Mediatoren frei (beispielsweise Interleukine, Interferone), über die wiederum verschiedene andere immunkompetente Zellen rekrutiert und aktiviert werden. Dazu zählen Leukozyten (Granulozyten, Monozyten, Makrophagen), Endothelzellen, Fibroblasten und Mastzellen, die ihrerseits die Immunreaktion durch weitere Zytokinsekretion verstärken können [Nathenson et al., 1985 (123)].

Zwischen der Klasse I- und der Klasse II-Region befinden sich einige Gene, welche nicht zum MHC-Komplex zählen, dazu gehören unter anderem die Genloci für TNF- α (=Tumor-Nekrose-Faktor α) und für das Enzym Zytochrom P450 [Pan et al., 1997 (130)].

Klasse-III-Antigene sind die Komponenten des Komplementsystems, die vom MHC kodiert werden, und zwar die drei Komponenten C2, C4 und Bf (=Faktor B) [Klein et al., 1983 (89); Nathenson et al., 1985 (123); Resch,Gemsa, 1983 (135)].

Histokompatibilitätsantigene und ihre Bedeutung für die Transplantation

In der unverwandten Bevölkerung weist das HLA-System wegen multipler Allelie der vier Genorte einen ausgeprägten Polymorphismus auf. Diese Vielfalt ist durch Vererbung der kodierenden chromosomalen Region „en bloc“ und durch die Vererbungseinheit des HLA-Haplotypen, bestehend aus einem Allel der vier Genorte, sowie durch Alternatives Splicing entstanden. Der HLA-Phänotyp eines Individuums wird durch zwei Haplotypen festgelegt, jeweils einem von Mutter und Vater [Lenhard, 1983 (99)]. Es hat sich aber gezeigt, daß bestimmte HLA-Haplotypen häufiger auftreten, als aufgrund der Genfrequenz der beteiligten Allele zu erwarten wäre. Diese Tatsache ermöglicht eine größere Übereinstimmung im HLA-System auch nicht verwandter Personen und somit eine verbesserte Planung kompatibler Transplantationen [Bach 1970 (10); Morris 1973 (113); Lenhard 1983 (99); Rappaport 1977 (134)].

Trotz einer weitgehenden Übereinstimmung im HLA-System zwischen Spender und Empfänger („MD“=„matched donors“/„MUDS“=„matched unrelated donors“) kann es jedoch zu einer Transplantatabstoßung kommen, sogar bei Zwillingen (Syngene Transplantation). Das Vorhandensein weiterer HLA-Loci und Nebenhistokompatibilitätsloci („non-HLA-Antigens“/„minor histocompatibility antigens“=miHA), von denen nur wenige, und diese sehr aufwendig bestimmbar sind, kann zu Komplikationen führen. Die vielen miH-Antigene finden sich nicht

auf Chromosom 6 allein, sondern werden von verschiedenen Chromosomen kodiert.

Bestehen Unterschiede im Haupthistokompatibilitätslocus zwischen Spender und Empfänger ist mit einer foudroyanten Abstoßungsreaktion zu rechnen. Bei Differenzen in einem Nebenhistokompatibilitätskomplex treten leichte, bei Differenzen in mehreren Nebenhistokompatibilitätsloci schwere Abstoßungsreaktionen auf (zum Beispiel: 5 miHA=1 HLA) [Thorsby 1981 (172); Lenhard 1983 (99)]. Die Transplantatabstoßung selbst ist ein komplexes Ereignis, bei dem verschiedene Effektor- und Regulatormechanismen parallel oder sequentiell ablaufen. Prinzipiell handelt es sich um einen Prozeß von Abwehrmechanismen gegen das Spenderorgan, respektive von immunkompetenten T-Lymphozyten des Empfängers gegen fremde, inkompatible Histokompatibilitätsantigene des Spenders (Host-versus-Graft-Reaktion).

1.1.2.2. Die Rolle der T-Lymphozyten

Die für die GvHD verantwortlichen kleinen T-Lymphozyten wurden in den frühen 60er Jahren von Gowans entdeckt. Den Nachweis, daß diese immunkompetenten Zellen von Knochenmarkstammzellen abstammen, erbrachte McGregor 1968 (111). Korngold und Sprent schließlich zeigten, welche T-Lymphozytensubpopulationen für die Auslösung der GvHR unbedingt erforderlich sind, und daß der Graft-versus-Leukemia-Effekt (=GvLR) auch auf diese T-Lymphozytenfraktion zurückzuführen ist [Korngold, Sprent, 1978 (92)].

Der Einsatz hochgereinigter T-Lymphozytensubpopulationen bewies im Tiermodell die Abhängigkeit der GvHR-auslösenden T-Lymphozyten von Unterschieden in den HLA-Antigenen zwischen Knochenmarkspender und Empfänger. Insbesondere CD8+ (Lyt2+) T-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Graft-versus-Host Reaktion: Sie verursachen GvHR bei Unterschieden in HLA-Klasse-I-Antigenen. Liegen Differenzen in

miHA vor, wird die GvHR auch hauptsächlich durch zytotoxische CD8+ T-Lymphozyten hervorgerufen, dies ist ohne externe Hilfe von CD4+ T-Lymphozyten möglich [Korngold et al., 1983 (93)]. Bemerkenswert ist außerdem, daß eine Korrelation zwischen der Anwesenheit miHA-Antigen spezifischer zytotoxischer Effektorzellen (=CTL) und der Entwicklung einer chronischen GvHD vorliegt [Gomes, 1982 (62)].

Histopathologische Untersuchungen bestätigen zudem, daß CD8+ T-Lymphozyten einen Großteil des entzündlichen Infiltrates in GvHR-betroffener Epidermis und Dermis bilden. Granulaproduzierende Lymphozyten mit typischer CTL ähnlicher Polarisation wurden *in situ* in Kontakt mit apoptotischen Keratinozyten beobachtet [Haake et al., 1993 (67)]. Die Anwesenheit zytotoxischer CD8+ T-Lymphozyten und TIA-1-Marker-positiver Serinproteasen-Granula korreliert in GvHD-Läsionen der Haut, und weist auf einen Granzym-abhängigen Mechanismus bei der Zerstörung von Keratinozyten durch CTL hin. Hamilton et al. bewiesen im Mausmodell, daß CD8+ T-Lymphozyten keine ausschließliche Effektorrolle in der Pathogenese der GvHR spielen: Wirtsreaktive CTL wurden nachgewiesen in Empfängern von miHA-ungleichem Knochenmark, die keinerlei Symptome einer GvHD aufwiesen [Brochu et al., 1999 (22)].

CD4+(L3T4+) T-Lymphozyten verursachen eine GvHR, wenn Unterschiede in HLA-Klasse-II-Antigenen und/oder Unterschiede in gewissen miHA-Loci bestehen [Korngold, Sprent, 1978 (92); 1983 (93); Ferrara et al., 1991 (49)]. Suzuki et al. benutzten im Mausversuch selektives HLA-identen, miHA-ungleiches Knochenmark, welches mit Hilfe von Anti-CD8-Monoklonalen Antikörpern CD8+ T-Lymphozyten-frei war. Die transplantierten Tiere entwickelten eine GvHD milderer Form, die durch CD4+ T-Lymphozyten initial ausgelöst sein mußte. Diese Beobachtung impliziert, daß totaler CD8+ T-Lymphozyten-Entzug die Auslösung einer GvHR nicht verhindert, ihre Ausprägung jedoch reduziert [Suzuki et al., 1994 (160)]. Diese Annahme unterstützen auch Dey et al. mit Untersuchungen am GvHD-Mausmodell über das Verhalten von transgenen Donor-CD8+ T-Lymphozyten mit bekannter

Allospezifität gegen MCH-Klasse-I-Alloantigene des Empfängers. Die Schlußfolgerung lautet hier, daß die durch einen einzigen monoklonalen Donor-CD8-Klon ausgelöste GvHD eine weit weniger schwere ist, als eine durch polyklonale Donor-CD4+ T-Lymphozyten und -CD8+ T-Lymphozyten Populationen ausgelöste GvHD [Dey et al., 1999 (38)]. Auch T-Lymphozyten des Phänotyps CD3+CD4-CD8-, sogenannte doppelt-negative (DN) T-Lymphozyten werden als Auslöser der GvHD diskutiert [Sefrioui, 1999 (148)].

1.1.2.3. Die Zytokine und die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren

Darüber hinaus sind inflammatorische Zytokine als Mediatoren der GvHD bekannt. Die Bedeutung des TNF α (Tumor Nekrose Faktor alpha) wurde bewiesen, indem durch die prophylaktische Gabe eines TNF-Antiserums die Entwicklung einer GvHD an Darm und Haut verhindert werden konnte [Piguet et al., 1987 (133)].

Weiterhin wurden Interleukin-1 (IL-1), die Interleukine 2, 3, 4 und 6, sowie die Interleukine 10, 12 und Interleukin 18, neben dem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor (GMSF) als wichtige Effektormoleküle der akuten GvHD identifiziert [Antin und Ferrara, 1992 (2); Nikolic et al., 2000 (124); Nakamura et al., 2000 (122); Arpinati et al., 2000(5)]. In T-Lymphozyten konnte die Produktion von Th1-Lymphokinen, zum Beispiel: IL-2 (Interleukin 2) und IFN- γ (Interferon- γ) nachgewiesen werden, welche die Monozyten- und Makrophagenaktivierung triggern [Ferrara, 1994 (49)]. Der Nachweis von Interleukinen gewinnt darüber hinaus Bedeutung in der Diagnostik der GvHD. In akuter GvHD konnten erhöhte Konzentrationen löslicher Zytokinrezeptoren im Serum nachgewiesen werden, die von Typ-1 T-Helferzellen produziert, wesentlich beteiligt sind an der Induktion der GvHD: Nakamura et al. fanden neben signifikant erhöhten Werten von IL-12, IL-18 und IFN- γ , auch einen deutlichen Anstieg von IL-2, dessen quantitativer Nachweis gut mit dem Schweregrad der akuten GvHD korrelierte [Nakamura et al., 2000 (122)]. Die Diversität der Interleukine bezüglich ihrer immunologischen Funktion, bietet die

Möglichkeit, diese Botenstoffe zukünftig auch als Therapeutika einzusetzen. Hill et al., beispielsweise, zeigten den präventiven Effekt einer kurzen IL-11 Therapie auf die inflammatorischen Symptome der GvHD im Mausmodell [Hill et al., 1998 (74)]. Für IL-18 konnten günstige Effekte bei der Therapie der chronischen GvHD in der Maus festgestellt werden [Okamoto et al., 2000 (126)].

Antin und Ferrara beschrieben den immunopathophysiologischen Prozeß der GvHD in zwei Phasen: Die afferente Phase der GvHD unterliegt der Kontrolle von T-Zellen, einschließlich ihrer Aktivierungsfunktion und Antigenerkennung. „Non-T-Cells“ und Makrophagen dominieren die efferente Phase der GvHD, in der die Zerstörung von Zielzellen durch Zytokine und möglicherweise andere Mediatoren erfolgt [Antin, Ferrara 1992 (2); Ferrara, Deeg, 1991 (49)]. Der Prozeß der dynamischen Interaktion zwischen Vertretern verschiedener Zelllinien, zusammen mit der Amplifikation und Dysregulation der Zytokine in ihren komplexen Netzwerken erhielt die Bezeichnung Zytokinsturm („Cytokine Storm“) [Antin, Ferrara, 1992 (2); Krenger et al., 1997 (94); Holler et al., 1998 (76)].

1.1.3. Klinik, Histopathologie und Immunpathologie

Ursprünglich wurde die GvHD als „secondary disease“ bezeichnet, um sie von den Folgen der Ganzkörperbestrahlung im Rahmen der KMT abzugrenzen [Barnes, Loutit, 1955 (11)]. Im Mausmodell wurde die GvHR künstlich induziert: klinisch zeigten diese Tiere die Symptome der „runt disease“: zottiges Fell, eine Anämie, Gewichtsverlust mit profunden, teils blutigen Durchfällen, sowie Hepatosplenomegalie.

Die GvHR tritt in diversen klinischen Konstellationen auf, in denen immunkompetentes Gewebe zwischen Individuen transplantiert wird: unter anderem bei der Transfusion nicht-bestrahlter Blutprodukte, bei Transplantation solider Organe und KMT. Die GvHR läuft vornehmlich in den Organen Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt ab. Die mit GvHR assoziierten pathologischen

Veränderungen sind systemisch und betreffen insbesondere lymphatische Gewebe und Epithelien [Glucksberg et al., 1974 (58); Woodruff et al., 1969 (201); 1976 (202)].

Das klinische Bild der GvHD kann akute und chronische Symptome zeigen. Das Auftreten einer GvHD innerhalb der ersten 100 Tage post KMT wird klassischerweise als akut bezeichnet. Bemerkenswert ist dabei ein Häufigkeitsgipfel zwischen Tag +14 und +21, also parallel zum „graft take“. Als „graft take“ bezeichnet man den Zeitpunkt des ersten Auftretens peripherer Spenderleukozyten in der Peripherie des Empfängers. Die GvHD nach dem Tag +100 post KMT, wird als chronische GvHD klassifiziert. Die Entwicklung einer chronischen GvHD direkt im Anschluß an eine akute GvHD, wird als „progressive onset“ bezeichnet. Tritt die chronische Form nach einem klinisch freien Intervall auf, spricht man von einem „delayed onset“ im Gegensatz zum „de novo onset“; hier geht der chronischen GvHD keine akute GvHD voraus [Glucksberg et al., 1974 (58); Shulman et al., 1978 (153)].

1.1.3.1. Akute Graft-versus-Host Erkrankung

Die von der akuten Erkrankung am stärksten betroffenen Organe sind Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt [Sale et al., 1979 (141); Wick et al., 1983 (192)]. Diarrhöe, Erbrechen und Leberdysfunktion prägen das akute Bild, häufig findet sich eine Panzytopenie; eine Hypogammaglobulinämie birgt das Risiko diverser Infektionen. Doch die Haut ist das vornehmliche Zielorgan der GvHD. Beginnend mit Druckschmerzhaftigkeit, palmoplantaren Erythem und bisweilen Juckreiz, entwickelt sich meist ein makulopapulöses Erythem an Stamm, Abdomen und Streckseiten der Extremitäten (GvHD I-III). Eine Abschuppung, Ablösung der Epidermis und Blasenbildung der Haut findet man bei sehr heftiger Reaktion, von Glucksberg et al. als GvHD IV klassifiziert. Dieses entspricht dem klinischen Bild einer Epidermiolysis toxica [Glucksberg et al., 1974 (58)], und kann Schwierigkeiten in der Differentialdiagnose zur arzneimittelinduzierten toxischen Nekrolyse bereiten. (Klassifikation nach

Glucksberg, Lerner, Shulman siehe Material und Methoden)

Die histopathologische Untersuchung zeigt anfangs eine Vakuolisierung der Basalmembran von Epidermis und Haarfollikel­epithel. Mit zunehmendem Grad der GvHD treten vermehrt dyskeratotische [Lerner et al., 1974 (100); Sale et al., 1977 (140)] oder apoptotische [Langley et al., 1996 (96)] Keratinozyten, oft mit unmittelbar beistehenden Lymphozyten (Satellitenlymphozyten), auf. Es ist unklar, in wie fern Apoptose von Keratinozyten nach BMT aus dem Anschlag auf das Immunsystem durch die GvHD selbst resultiert, oder aber als Effekt der Konditionierung auftritt [Jerome et al., 1998 (82)]. Über basale Spaltbildung, Keratinozytennekrose und Exozytose von Lymphozyten (Grad III nach Lerner et al.), kommt es zur totalen epidermalen Nekrose (Grad IV). Insgesamt bleibt die Korbgeflechtstruktur des *Stratum corneum* weitgehend erhalten, sogar bei kompletter Aufhebung der epidermalen Schichtung. In der Dermis findet sich lediglich ein moderates perivaskuläres Lymphozyteninfiltrat [Lerner et al., 1974 (100); Sale et al., 1977 (140)]. Diese in der Lichtmikroskopie unspezifischen, oft minimal bleibenden Veränderungen bedürfen der immunpathologischen Betrachtung mit monoklonalen Antikörpern zur Unterstützung einer Diagnose und eventuellem Beginn einer Therapie: Stark positive HLA-DR Färbungen verdeutlichen eine massive Expression von Klasse-II-Alloantigenen an den Keratinozyten. Das vermehrt exprimierte interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 erleichtert die antigenunspezifische Interaktionen zwischen Epithelzellen und Leukozyten. Sowohl HLA-DR-, als auch ICAM-1-Expression werden durch die Zytokine TNF- α und IFN- α induziert [Charron et al., 1980 (27); Volc-Platzer et al., 1984 (184), 1990 (187)].

Eine geringgradige akute GvHD der Haut, das heißt, ein makulopapulöses Exanthem, welches <25% der Körperoberfläche einnimmt und histologisch als Basalzellvakuolisierung bestätigt wird, gilt nicht nur als ungefährliche Komplikation, sondern als erwünscht, und zwar als Symptom einer effektiven „Graft-versus-leukemia“ Reaktion.

1.1.3.2. Chronische Graft-versus-Host Erkrankung

Neben der Haut betrifft die chronische GvHD auch andere Organe; Darm, Leber, Augen, quergestreifte Muskulatur und das Zentralnervensystem, Milz, Pankreas und Lunge können in Mitleidenschaft gezogen werden, vergleichbar – zumindest in Teilaspekten – den Manifestationen von bisher bekannten Autoimmunerkrankungen (Sjögren-Syndrom, Autoimmunhepatitis, *Lupus erythematoses*, Dermatomyositis, Sklerodermie, etc.).

Doch auch hier dominieren die Epithelzellen der Haut und Schleimhäute als Zielzellen. Die Veränderungen umfassen *Lichen-ruber-planus*(LRP)-ähnliche Atrophie der Epidermis und inflammatorische Exantheme der Haut und Haarfollikel. Diese können bereits ab Tag +60 beobachtet werden, und zwar bei bis zu 55% der Transplantatempfänger [Klingebl et al., 1998 (90)]. Sklerose, Konsistenzvermehrung in der Dermis und Gefäßspasmen an den Akren bieten ein *Lichen-sklerosus*-, *Morphea*-, oder Sklerodermie-ähnliches Bild, das in schweren Fällen mit Gelenkkontrakturen und Induration einhergehen kann. Die chronische GvHD führt mitunter zu einer sehr therapieresistenten *Sicca*-Symptomatik mit extremer Austrocknung, Atrophie und eventuell Ulzerationen der Schleimhäute von Mund, Ösophagus, Genitale und Auge [Shulman et al., 1978 (153); Ferrara, Deeg, 1991 (49)].

Die histologische Untersuchung der chronischen GvHD läßt die Phänomene der Akanthose, Hypergranulose, Hyperkeratose, Basalzellvakuolisierung sowie Dyskeratosen und vermindertes Melanin in der Basalzellschicht [Shulman et al., 1978 (153)] erkennen. Das mononukleäre Infiltrat der Dermis ist geringer als beim idiopathischen LRP, die *Lichen-sklerosus-et-atrophicans* ähnliche GvHD zeigt ein ödematöses *Stratum paillare* und eine atrophe Epidermis.

Horn et al. (77,78) beschreiben, daß ein lichenoides Entzündungsmuster im Bereich der dermoepidermalen Junctionszone mit einer höheren Morbidität assoziiert sein dürfte. Unbelegt ist bisher allerdings, bei wie vielen Patienten

dieses GvHD Muster durch eine Reduktion/Absetzen von CSA getriggert worden ist. Ein verbreitetes Bindegewebe, hypertrophe Kollagenbündel und darin „eingemauerte“ Hautanhangsgebilde findet man bei der chronischen sklerodermiformen GvHD [Shulman et al., 1978 (153); Volc-Platzer, 1992 (188)].

Die chronische GvHD verhält sich immunhistopathologisch sehr ähnlich dem idiopathischen LRP und der Sklerodermie: HLA-DR und ICAM-1 werden deutlich exprimiert [Charron et al., 1980 (27); Volc-Platzer et al., 1985 (185)].

1.1.4 Prophylaxe und Therapie

Immunsuppressiva und Kortikosteroide bilden die Basismedikation in Prophylaxe und Therapie der GvHD. Die Konditionierung der KM-Empfänger umfaßt die Gabe von Cyclophosphamid (Cy, Endoxan) sowie im Falle einer Leukämie, die einzeitige oder fraktionierte Ganzkörperbestrahlung (TBI, γ -Strahlen) [Thomas ED, 1985 (171)].

Die effektivste Methode zur Verhütung der GvHD ist die totale Entfernung der T-Zellen aus dem Spender-KM [Poynton, 1988 (133)], zum einen durch direkte Separation mittels Lectinagglutination, zum anderen mit der Hilfe monoklonaler Antikörper gegen T-Zellen [Ferrara et al., 1991 (49)]. Die gewonnene Mortalitätssenkung von GvHD wird allerdings bezahlt mit einem erniedrigten Graft-versus-Leukämie Effekt und einer erhöhten Rate an erfolglosen KMTs und Rezidiven [Goldmann et al., 1988 (60); Truitt et al., 1990 (179)].

Die medikamentöse Therapie der akuten GvHD besteht aus Kortikosteroiden zusätzlich zur prophylaktischen Gabe von CSA, eventuell plus Antithymozytenglobulin bei Nichtansprechen [Storb et al., 1974 (157)].

Die Wirkung der Kortikosteroide beruht unter anderem auf einer Beeinträchtigung der Expression fast aller Zytokine: die Transkription und Freisetzung von Interleukin 1, 6, 8 und TNF- α wird blockiert. Die Expression von Interleukin 2 und die Proliferation von T-Lymphozyten wird gehemmt [Holler et al., 1998 (76)]. Glukokortikoide hemmen die Migration von Immunzellen zum Entzündungsherd und besitzen einen breiteren Wirkungsbereich als beispielsweise CSA. Zunehmend werden monoklonale Antikörper eingesetzt, des weiteren auch verschiedene Formen der Photochemotherapie wie Psoralen und UVA (PUVA) oder die extracorporale Photopherese [Greinix et al., 1998 (65); Wiesmann et al., 1999 (194)].

1.2. Apoptose

1.2.1. Biologische Bedeutung der Apoptose für den Organismus

Apoptose ist der selektive Tod individueller Zellen im Gewebeverband. Dieses aktive Selbstmordprogramm unter zelleigener Kontrolle ist Voraussetzung für die normale Entwicklung aller mehrzelliger Lebewesen [Kerr, Wyllie, Currie, 1972 (84)]. Der programmierte Zelltod tritt in verschiedenen Kontexten auf: Entwicklung, Gewebshomöostase, terminale Differenzierung und unter pathologischen Bedingungen. Das Apoptoseprogramm ist ein genetisch streng regulierter Mechanismus, welcher der gewebeschonenden Eliminierung beschädigter oder schädigender Zellen in nahezu allen Organen dient.

Die Embryogenese höherer Vertebraten ist unter anderem als Resultat zahlreicher apoptotischer Prozesse erkannt worden, dazu zählen Phänomene wie die Auflösung der interdigitalen Gewebsbrücken [Hammer, 1971 (69); Kerr, 1972 (84)], die Entwicklung der intestinalen Mukosa sowie der Retina [Harmon et al., 1984 (70)]. Für die homöostatischen Regulationsfunktionen in normalen Gewebe, insbesondere der Haut, spielt die Apoptose eine wichtige Rolle [Fraser, Evan, 1996 (51)]. Für die Ausbildung eines intakten Immunsystems, ganz besonders der positiven („death by neglect“) und negativen Selektion reifender T-Lymphozyten im Thymus zum Ausschluß von Autoreaktivität, sind Apoptosemechanismen von zentraler Bedeutung [Wyllie, Morris, 1982 (205); Murphy et al., 1990 (118); Nagata et al., 1997 (120); Trimble et al., 1999 (178)]. Darüberhinaus vermutet man, daß eine Vielzahl von Krankheiten, unter anderem Krebs und AIDS, auf eine Fehlsteuerung des Apoptoseprogrammes zurückzuführen sind [Kerr et al., 1994 (87); Thompson, 1995 (173); Bold et al., 1997 (18)].

Die Entdeckung der Apoptose in den siebziger Jahren revolutionierte die gängige Lehrmeinung, nach der jede Form von Zelltod das Resultat einer Verletzung oder degenerativer Natur war [Harmon et al., 1996 (71)]. Bis dahin

observierten Wissenschaftler diverse Aspekte von Zelltod unter verschiedenen Namen: als „Councilman“ Körperchen bezeichneten Kerr et al. die azidophilen Hepatozyten bei aktiver Virushepatitis [Kerr et al., 1972 (84)]. „Tingible body“-Makrophagen wurden im Keimzentrum von Lymphknoten beschrieben [Schwartzendruber et al., 1963 (145); Kerr et al., 1972 (84)]. In Darmkrypten beobachtete man karyolytische Epithelzellen nach Einwirkung von γ - und Röntgenstrahlen [Kerr et al., 1980 (85)]. „Sunburn cells“ in der Haut wurden nach UVB-Bestrahlung gesehen [Woodcock et al., 1976 (200)]. Betroffene Keratinozyten bei *Lichen ruber planus* wurden „Civatte bodies“ [Weedon et al., 1979 (190)] und bei Morbus Bowen, „dyskeratotische Zellen“ [Olson et al., 1975 (127)] genannt. Diese diversen Termini waren insgesamt rein deskriptiv, und dienten als Beschreibungen für morphologisch nicht eindeutig nekrotische Zellen. Die verwirrende Terminologie und eine fehlende allgemeingültige und biologisch signifikante Definition des programmierten Zelltodes verzögerte die klare Abgrenzung zwischen Nekrose und Apoptose für lange Zeit, eine Abgrenzung zwischen Apoptose und terminaler Differenzierung müßte noch bewiesen werden.

Tab.1 Histologische Begriffe

assoziiert mit individuellem epidermalem Zelltod:

Dyskeratotische Zelle	„Civatte Body“
„Colloid Body“	Satellitenzelle
„Sunburn Cell“	„Dark Cell“
„Eosinophilic Globule“	„Councilman Body“

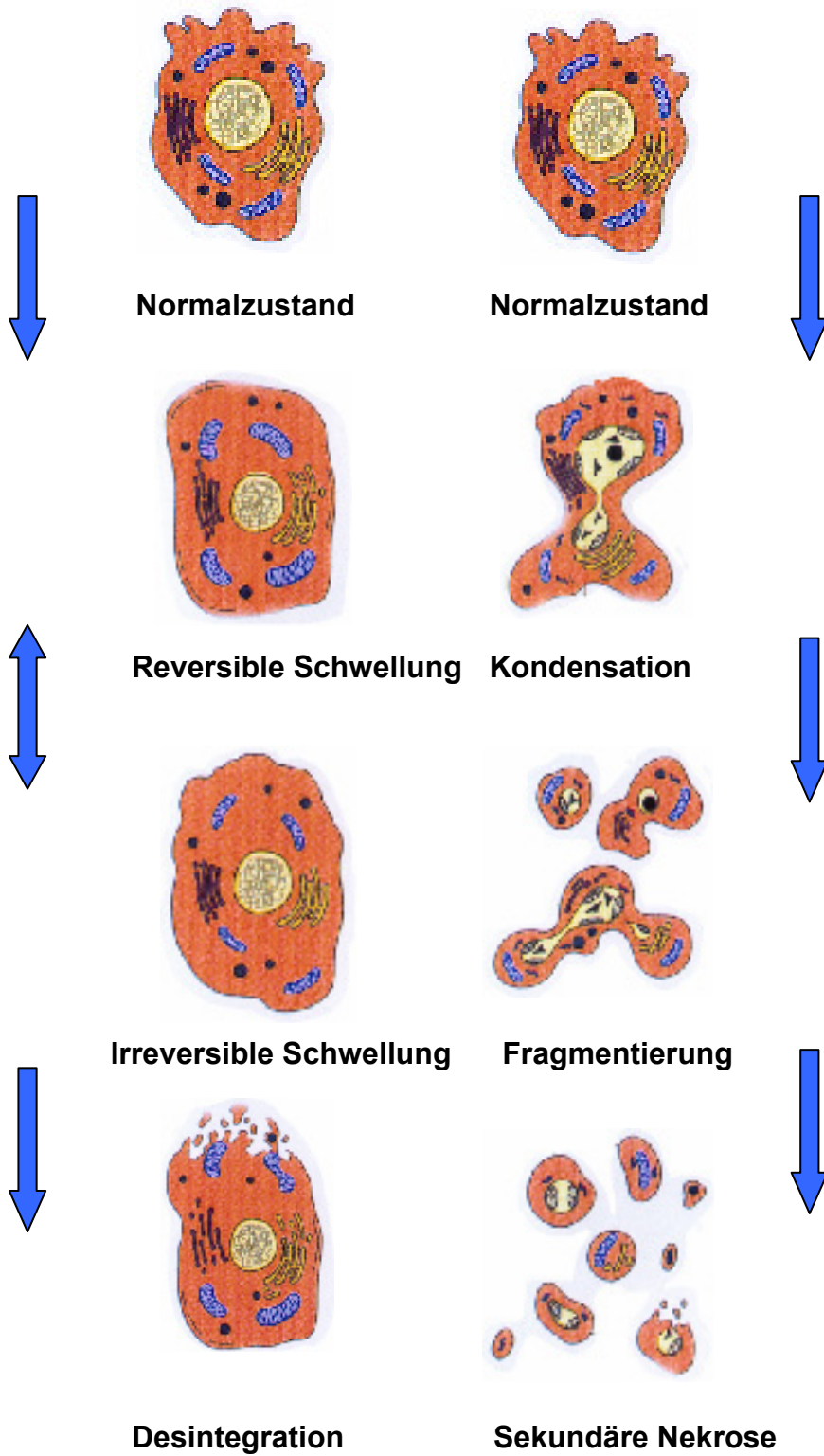
Kerr, Wyllie und Currie interpretierten die Ergebnisse ihrer verschiedenen Forschungen 1972 erstmals gemeinsam, insbesondere die Beobachtung der „shrinkage necrosis“ in pathologischem Lebergewebe. Letztendlich verdeutlichten elektronenmikroskopische Betrachtungen die morphologischen Charakteristika und führten zur Definition eines neuen Konzeptes von Zelltod,

für das der Begriff „Apoptose“ eingeführt wurde [Kerr, Wyllie, Currie, 1972 (84)]. Die Zusammensetzung von griechisch „*apo*“ (ab, weg los) und „*ptosis*“ (Senkung), die ein Abfallen wie das welker Blätter von Bäumen bezeichnet, sollte den Unterschied zur Nekrose (abgeleitet von griechisch „*nekrosis*“ für Tod, Tötung, Absterben) betonen [Duke et al., 1997 (43)].

1.2.2. Apoptose und Nekrose

Apoptose ist eine „programmierte“ Form von Zelltod im doppelten Sinn: sie tritt zu genetisch prädestinierten Zeitpunkten im Leben eines Individuums auf, und sie folgt stets einem vorprogrammierten Muster molekularer Prozesse. Dieser aktive Zelltod „from inside out“ [Wyllie, 1995 (206)] bedarf Energie, die als ATP (Adenosintriphosphat) von intakten Mitochondrien geliefert werden muß, und unterscheidet sich dadurch maßgeblich von dem passiven pathologisch bedingten Absterben von Zellen: Nekrose bezeichnet den Untergang von Gewebe infolge einer irreparablen physikalischen oder chemischen Schädigung [Harmon et al., 1996 (71)]. Das morphologische Korrelat ist die geschwollene Zelle mit sukzessiver Desintegration der Zellorganellen. Apoptose dagegen geht zunächst mit „shrinkage necrosis“, dem Schrumpfen der Zelle einher. Es zeigt sich die Kondensierung von Kernchromatin und Zytoplasma, und die Separation von den gesunden Nachbarzellen. Begleitet von einer Entzündungsreaktion sind bei Nekrose meist größere Zellgruppen betroffen, die apoptotische Zelle hingegen findet sich einzeln und zumeist ohne Zeichen von umgebender Entzündung, da bei diesem Vorgang kein intrazelluläres Material freigesetzt wird [Cohen, 1992 (31)]. Mikroskopisch sind die Zelltrümmer nekrotischer Zellen bis zur Abräumung durch Phagozytose hinreichend lang zu sehen, und werden mitunter durch Narbengewebe ersetzt [Harmon et al., 1996 (71)].

Abb.1
Nekrose **Apoptose**



Der rapide Prozess der Apoptose bis zum Zerfall der involvierten Zellen in zahlreiche membranumschlossene Teilchen, und deren Eliminierung durch Phagozytose, läßt die betroffenen Zellen nur über wenige Stunden sichtbar sein. Deshalb sind zu einem Zeitpunkt weit weniger apoptotische Zellen erkennbar, als insgesamt durch Apoptose ausgelöscht werden [Kerr et al., 1991 (86)].

1.2.3. Apoptose und terminale Differenzierung

Die Rolle der Apoptose im Prozeß der terminalen Differenzierung von Geweben mit hohem „cell turn-over“ bleibt Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion [Haake et al., 1993 (67)]: Aus dem Vorgang der terminalen Differenzierung, beispielsweise in der Haut, gehen jene, die epidermale Barriere bildenden funktionellen Zellen hervor. Diese Korneozyten exprimieren spezifische Differenzierungsproteine wie Keratine, Loricrin und Filaggrin [Gandarillas et al., 1999 (54)].

Einerseits versteht man terminale Differenzierung als eine spezielle Form von Apoptose: beiden Prozessen unterliegt eine vergleichbare genetische Regulation und gleiche biochemische „pathways“ [Fesus et al., 1991 (50)]. Beispielsweise konnte die Desintegration von Keratinozytennuklei im *Stratum granulosum* durch Endonukleasenaktivität und DNA Fragmentierung *in vitro* beobachtet werden, was vermuten läßt, daß derart differenzierte Keratinozyten unter diesen experimentellen Umständen Apoptose begehen können [Gandarillas et al., 1999 (54)].

Andererseits werden Apoptose und terminale Differenzierung als zwei distinkt verschiedene zelluläre Prozesse definiert: aufgrund wesentlicher Differenzen in der Zeitdauer beider Vorgänge, aufgrund spezifischer Stimuli und aufgrund charakteristischer teleologischer Unterschiede der konsekutiven DNA-Veränderungen in beiden Mechanismen [Gandarillas et al., 1999].

1.2.4. Extrazelluläre Signale und Effektoren der Apoptose

Unterschiedliche Ereignisse und Effektoren können Apoptose auslösen. Als Auslöser dienen neben einer Vielzahl von Chemikalien (zum Beispiel: hochreguliertes extra-/intrazelluläres Calcium), und physikalischen Agentien, wie ionisierende oder UV-Strahlung, auch der Verlust von extrazellulärem ATP [Williams et al., 1990 (195)]. Ebenso vermag die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren (TGF β =„transforming growth factor β “, GM-CSF=„granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“, NGF=„nerve growth factor“) und Zytokinentzug von beispielsweise Interleukin-6, Apoptose auszulösen [Duke et al., 1986 (42); Williams et al., 1990 (195)].

Starke UVA-/UVB- oder γ -Strahlung kann eine DNA-Schädigung auslösen, welche die betroffene Zelle zum Verharren in der G1-Phase zwingt und mitunter irreparabel für Reparaturenzyme ist. Jene DNA-Doppelstrangbrüche regen die betroffene Zelle zur Expressierung des Tumorsuppressorgens p53-Gens und zur Aktivierung der apoptotischen Signaltransduktionskaskade an [Meyn, 1996 (112); Sheikh et al., 2000 (151)].

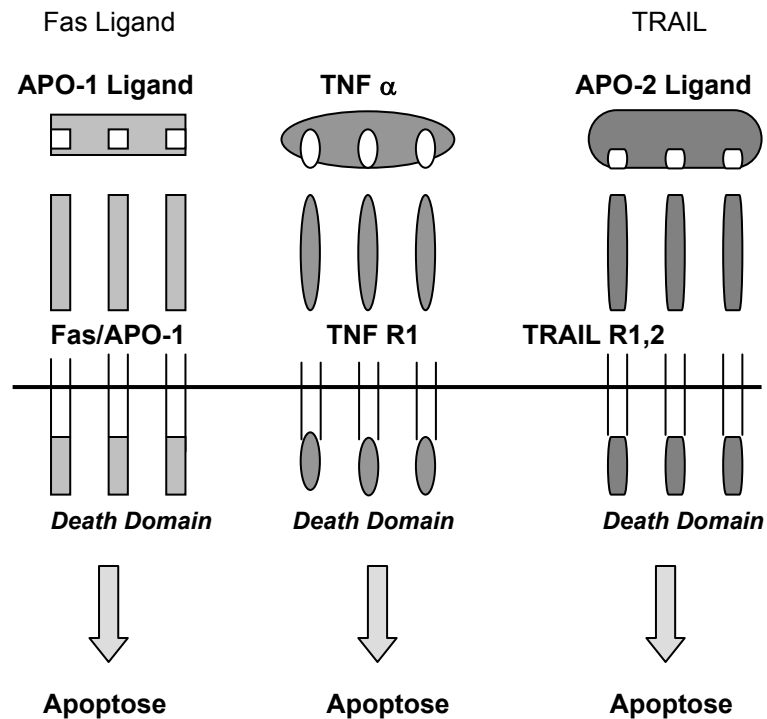
Der Verlust des p53-Gens führt dahingegen über einen Funktionsausfall des Apoptoseprogramms zur Progression verschiedener maligner Zelllinien aus Thymus T-Lymphozyten [Lowe et al., 1993 (104), Clarke et al., 1993 (28)], myeloiden Vorläuferzellen [Lotem et al., 1993 (103)], und intestinalen Epithelzellen [Clarke et al., 1994 (29)]. Die Vermittlung des Selbstmordbefehles erfolgt auch über die Stimulation von T-Lymphozyten und die Aktivierung des Perforin-Granzyme B-„pathways“ [Golstein et al., 1995 (61)]. Natürliche Killerzellen, CD8⁺ T-Lymphozyten, Cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sowie CD4⁺ T-Lymphozyten können Perforin exprimieren. Perforin ist eine porenformende Protease, die in membranständigen Granulosomen gespeichert ist. Mittels T-Zellreceptor (TCR)-Aktivierung kann eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt werden, welche die Freisetzung von zytotoxischen Mediatoren aus Speichergranula bewirkt. Diese sekretorischen Granula enthalten die apoptoseinduzierenden Serinproteasen Granzyme

(Fragmentine) und Perforin [Greenberg et al., 1995 (64)]. Perforin interagiert mit Phospholipidgruppen an der Membran der Zielzelle, welche als Kalzium-abhängige Perforin-Rezeptoren dienen. Letztendlich polymerisiert und zerstört das Perforinenzym die fremde Zellmembran über eine aktivierte hydrophobe Domäne und bohrt zunächst kleine (0,1-0,1nm) Poren, später einen größeren transmembranösen Kanal (ca.14nm). Durch diese Membranläsion können große Proteine, Granzyme, konsekutiv in die Zielzelle eindringen. Das für rapide Induktion bekannte „Granzyme B“ ist der zentrale Mediator des „granzyme-pathways“ und aktiviert proteolytisch die apoptotische Enzymkaskade der Caspasen. Auch humane Keratinozyten bilden die zytotoxischen Proteine Granzyme B und Perforin [Berthou et al., 1997 (14)].

Osmotische Verschiebungen und das Eindringen von Kalzium tragen zusätzlich zur finalen Zellzerstörung bei [Yue et al., 1987 (211); Tschopp et al., 1989 (180)]. Zusätzlich wurde ein drittes granula-ständiges Molekül, „I-cell restricted intracellular antigen 1“ (TIA-1) gefunden, dessen nahezu ausschließliche Expression in zytotoxischen T-Lymphozyten, sowie die Fähigkeit, permeabilisierte Zellen zu lysieren, vermuten läßt, daß dieses Molekül ebenfalls zur Gruppe zytotoxischer Effektor-Moleküle gehört [Sayama et al., 1994 (142)].

Extrazelluläre Signale, die eigentlich Zelldifferenzierung und Proliferation triggern, werden im Rahmen der Apoptose zu „death signals“, die den programmierten Zelltod induzieren [Williams, 1995 (197)]. Spezifische Liganden beispielsweise können durch aktivierende Bindung an korrespondierende Zelloberflächenrezeptoren (Todesrezeptoren) Signale innerhalb der Zielzelle transduzieren, welche als Todessignale identifiziert und umgesetzt werden [Itoh et al., 1991 (80)]. Zu den Todesrezeptoren, welche eine Untergruppe der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie bilden, zählen unter anderen der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNF-R1) [Hsu et al., 1995 (79)], der TRAIL-Rezeptor [Walczak et al., 1999 (189)] und der CD95-Rezeptor (Fas/APO-1) [Nagata, 1997 (120)].

Abb. 2 Todesrezeptoren und ihre Liganden



Durch Anbindung extrazellulärer Liganden an ihre Rezeptoren kommt es zur Trimerisierung des Todesrezeptors und damit zur Aktivierung der „Death Domains“. Dies führt zum Start einer Signaltransduktionskaskade, die zu Apoptose führt.

Der Typ-I-Membranproteinrezeptor Fas vermag programmierten Zelltod auszulösen, wenn er mit seinem Liganden, dem Typ-II-Membranprotein Fas-L (CD95-L) interagiert [Nagata, Golstein, 1995 (119)]. Nicht nur als membranständiges Protein, sondern auch als gelöstes Molekül [Nagata, 1997 (120)] oder intrazytoplasmatisch [Arnold et al., 1999 (4)] kommt der Fas-Ligand vor. Das Fas/Fas-L-System indiziert Apoptose über die Aktivierung von Kaspasekaskaden. Jedes Fas-L Molekül kann aufgrund seiner trimeren Kristallstruktur drei Fas-Moleküle binden, und bildet dadurch „cluster“ von „death domains“, was durch das Adapterprotein FADD (=„Fas-associated death domain“) und weitere Moleküle der apoptotischen Signaltransduktionskaskade unterstützt wird [Ashkenazi et al, 1998 (7)].

Die Interaktion von Fas/Fas-L ist kritisch involviert in die Induktion von Immuntoleranz [Castro et al., 1996 (25)] und die Vermittlung von Zytotoxizität der CTL [Lowin et al., 1994 (105)]. Darüberhinaus konnte eine erhöhte Expression des Fas-Liganden nachgewiesen werden im Zusammenhang mit viralen Infektionen [Johnson et al., 1997 (83)] und Tumorschutzmechanismen [Hahne et al., 1996 (68)]; sowie in immunprivilegierten Geweben, wie Ovarien, Uterus und Prostata, welche Fas-L konstitutionell exprimieren [Fergusson et al., 1997 (83)]. In der Haut findet man unter physiologischen Umständen funktionsloses Fas in Keratinozyten; erst die Hochregulierung des Membranproteins durch $\text{IFN-}\gamma$ vermittelt Keratinozyten die Sensibilität gegenüber Fas-vermittelter Apoptose [Matsue et al., 1995 (110)]. Epidermale Keratinozyten können über den Fas-„pathway“ Apoptose in Jurkat T-Zellen auslösen [Berthou et al., 1997 (14)]. Eine Dysregulierung des Fas/Fas-L Transduktionsweges wird mitverantwortlich gemacht für die apoptotische Pathogenese von Melanometastasierung, Kontakt-Hypersensitivität, TEN und akuter kutaner GvHD [Wehrli et al., 2000 (191)]. Van den Brink et al. (181) beschreiben die signifikant höhere Morbidität und Mortalität von Fas-defizienten B6-lpr-Mäusen mit akuter GvHD nach allogener KMT gegenüber gesunden Mäusen.

UV-Strahlung hingegen führt bei Keratinozyten über einen Anstieg der Fas- und Fas-L-Expression zu konsekutiver UV-induzierter Apoptose [Leverkus et al., 1997 (101)], und verhindert somit die Akkumulation pro-karzinogener p53-Mutationen durch Deletion [Schwarz et al., 1995 (143); Ouhtit et al., 2000 (128)]. Insbesondere pro-inflammatorische Cytokine, $\text{IL-1}\beta$, IL-15 , $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$, [Sayama et al., 1994 (142)] induzieren die Hochregulierung von intrazellulärem und membranständigem Fas-L in humanen Keratinozyten, während anti-inflammatorische Cytokine, IL-10 und $\text{TGF-}\beta 1$, diesem Effekt gegensteuern [Arnold et al., 1999 (4)]. Die Tatsache daß $\text{IFN-}\gamma$ -stimulierte Keratinozyten funktionell aktivierte Fas-L-Proteine exprimieren, weist auf die Existenz eines physiologischen Mechanismus hin, der einerseits der Prävention

unkontrollierter Keratinozytenproliferation dient, und andererseits Schutz vor unlimitierter Zytotoxizität gegen epidermale Zellen durch T-Lymphozyten bietet [Arnold et al., 1999 (4); Ouhtit et al., 2000 (128)].

1.2.5. Genetische Regulation der Apoptose

Die Signale, die das genetisch kontrollierte Selbstmordprogramm initiieren, vermitteln ihre Effekte über verschiedene Signaltransduktionswege, wobei Apoptose-assoziierte Gene entweder *de novo* exprimiert werden, oder aber Genprodukte in entsprechenden Expressionsmodulationen den apoptotischen Prozeß beeinflussen [Duke et al., 1997 (43)].

Erste Hinweise auf „death genes“ entstammen Versuchen mit der Nematode *Caenorhabditis elegans*, und den entsprechenden Genen *ced-3* und *ced-4*, die für enzymatische Apoptosemediatoren kodieren [Hengartner et al., 1994 (72)]. Die entsprechenden Gene im Menschen kodieren Caspasen und leiten sich von der als erste entdeckten ICE-Protease (= „Interleukin 1- β -converting enzyme“) ab. In der Zelle liegen die Caspasen konstitutiv als inaktive Pro-Caspasen vor [Enari et al., 1995 (45)], erst ihre erhöhte Expression sorgt für die Auslösung der Apoptosekaskade [Yuan et al., 1993 (210), Martin et al., 1995 (108)] unter Beteiligung der apoptotischen Signaltransduktion *via* extrazelluläre Liganden, Todesrezeptoren und ihren Todesdomänen („death domains“).

„Death domain“ bezeichnet eine intrazelluläre Region von ca. 80 Aminosäuren eines Todesrezeptors; Todesrezeptoren bilden eine Untergruppe der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie, die eine wesentliche Induktionsfunktion des Apoptoseprozesses besitzt. Die Anbindung extrazellulärer Liganden an den Todesrezeptor führt zu dessen Trimerisierung und Aktivierung der intrazellulären Todesdomäne, welche wiederum mit anderen Adaptorproteinen interagiert. Das erste beschriebene Adaptorprotein war FADD („FAS-associated protein with death domain“). Am C-Terminus des FADD-Proteins findet man die „death domain“ (DD), am N-Terminus die

Todeseffektor-Domäne („death effector domain“, DED) [Boldin et al., 1995 (19)]. Ein durch verschiedene „death signals“ aktivierter Todesrezeptor bindet an das FADD-Protein, welches über die Todesdomäne die Apoptosekaskade starten kann. Die „death effector domain“ schließlich vermag die Enzymkaskade der Caspasen zu aktivieren. Das Schlüsselenzym und „missing link“ zwischen „death domains“ und Proteasen ist die aktivierte Caspase-8, welche vormals als FLICE („Fas-like interleukin 1 β converting enzyme“) beschrieben worden ist [Muzio et al., 1996 (116)].

Das sogenannte FLICE-Inhibitionsprotein FLIP, welches gemeinsam mit Bcl-xL und FAIM (=„Fas apoptosis inhibitory molecule“) als Anti-Apoptose-Protein bekannt ist, schützt unter anderem Keratinozyten vor Fas-vermittelter Apoptose [Rothstein et al., 2000 (138)].

Über die Caspase-3 werden unter anderem Reparaturenzyme der DNS (PARP=„poly-ADP-ribose-polymerase“) inaktiviert und Fragmentierungsfaktoren freigesetzt, die durch proteolytische Aufspaltung der Kernmembran die Zellintegrität maßgeblich schädigen, zum Kollaps und Kondensation des Kernes führen, und damit zum apoptotischen Zelltod [Martin et al., 1995 (108)]. In der Haut spielt insbesondere das FAS-assoziierte Adapterprotein FADD eine Rolle bei der UV-induzierten Apoptose von Keratinozyten [Zhuang et al., 2000 (212)].

Die Familie der Onkogene und Onkogensuppressorgene spielt auch eine entscheidende Rolle in der genetischen Regulation der Apoptose beim Menschen [Wyllie, 1995 (206)]. Bemerkenswert ist dabei die anzunehmende Mehrfachfunktion dieser Gene, die neben Apoptose für Zellproliferation und Zelldifferenzierung kodieren [Williams and Smith, 1993 (196)]. Die Expression des *c-myc* Proto-Onkogens beispielsweise erhöht die spezifische Empfindlichkeit einer Zelle für Apoptose [Evan et al., 1992 (46)], während bestimmte Anti-Apoptose-Gene und ihre Produkte („survival factors“), wie unter anderem das *bcl-2*-Gen [Vaux et al., 1988 (182)], oder die Tyrosinkinase *abl*

[Evans et al., 1993 (47)], die Induktion des Zellselbstmordes supprimieren [Wyllie, 1995 (206)].

Das *bcl-2*-Protein ist ein intrazelluläres Protein, welches in der Kernmembran, im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien lokalisiert ist. Insbesondere die *bcl-2*-Familie miteinander konkurrierender Proteine, mit den Apoptose-blockierenden Vertretern *bcl-2*, *bcl-xL*, und den Apoptose-induzierenden Proteinen *bcl-xS*, *bax* und *bad*, scheint durch ihre variablen zellulären Mengenverhältnisse die Anfälligkeit einer Zelle gegenüber Apoptose-initiiierenden Signalen wesentlich zu beeinflussen [Williams, 1995 (197)]. In Keratinozyten und Melanozyten, zum Beispiel, verhindert die Expression von *bcl-2* Apoptose, die Hochregulierung von *bcl-2* und „Down-Regulierung“ von *bax* hingegen konnte im Zusammenhang mit Keratinozytendifferenzierung und Melanogenese beobachtet werden [Sermadiras et al., 1997 (150); Muller-Wieprecht et al., 2000 (114)].

Darüberhinaus ist das TRAIL („tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand“)-System, auch APO-2-Ligand genannt, welches in fast allen Organen exprimiert wird [Wiley et al., 1996 (203)], ein weiterer spezialisierter Vertreter der TNF-Familie. Das TRAIL-System vermag insbesondere in transformierten Zelllinien bereits in sehr geringen Dosen Apoptose auszulösen, während Primärzellen weitgehend resistent gegenüber TRAIL sind [Gure, 1997 (66), Pan et al., 1997 (130)]. Die hohe Selektivität des TRAIL-Systems, einerseits in der Eliminierung von Tumorzellen, und andererseits durch maximale Schonung gesunder Zellen, gibt TRAIL einen besonderen Stellenwert als eventuelles Krebstherapeutikum [French, Tschopp, 1999 (52)]

1.2.6. Nachweismethoden der Apoptose

Der erste Nachweis von Apoptose wurde mit Hilfe des Elektronenmikroskopes morphologisch erbracht [Kerr, Wyllie, Currie, 1972 (84); Gilliam et al., 1996 (57)]. Auf der Grundlage progressiver Forschung an apoptotischen Prozessen

entstanden neue, auch in der Haut angewendete, Verfahren: In Zellpopulationen kann programmierter Zelltod beispielsweise durch Zytotoxizitäts-Tests dargestellt werden, welche die zunehmende Permeabilität der Zellmembranen oder die Reduktion der mitochondrialen Aktivität bei Apoptose messen [Dive et al., 1992 (40)]. Immunhistochemische Verfahren unter Verwendung monoklonaler oder polyklonaler Antikörpern bieten die Möglichkeit *in vivo* und *in vitro*, jene apoptose-assoziierten Proteine zu markieren, die als Produkte der verschiedenen „Death Genes“ maßgeblich am Prozeß der Apoptose beteiligt sind. Insbesondere Antikörper gegen das Protoonkogen bcl-2 [Williams et al., 1993 (196); Yang et al., 1995 (208)], gegen den Zelloberflächenrezeptor CD95/Fas und gegen seinen Liganden Fas-L [Nagata, Goldstein 1995 (119)] sowie Antikörper gegen Granzyme B [Peitsch et al., 1994 (131); Darmon et al., 1995 (35)] und seinen funktionellen Partner Perforin [Nakajima et al., 1995 (121); Lowin et al., 1994 (105)] ermöglichten den Nachweis apoptotischer Zellen *in situ*; diese Verfahren bieten sich auch zur Darstellung von Apoptose in der Haut an. Kontroversen bei der Interpretation der Färbungen ergeben sich einerseits durch die Anwendung verschiedener Arbeitsprotokolle und unterschiedlicher Vorbereitungen der Zellen oder Schnitte, andererseits durch differierende Auswertungsverfahren.

Darüberhinaus gilt auch der Nachweis apoptose-spezifischer DNA-Strangbrüche am 3'-OH-Ende durch die TUNEL-Methode (TUNEL= „terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end labeling method“) [Gavrieli et al., 1992 (55); Ansari et al., 1993 (1)] als anerkannte Methode der Detektion von Apoptose. Verschiedene Enzymgekoppelte „detection kits“ für Apoptose und Nekrose werden angeboten.

1.2.7. Pathologische Bedeutung der Apoptose in der Haut

Während in normalen Geweben mit hohem Zellumsatz, wie den Epithelien des Gastrointestinaltraktes, der Leber und insbesondere in der Haut nur selten

einzelne apoptotische Zellen inmitten intakter Zellverbände gefunden werden, zeigen sich viele apoptotische Keratinozyten bei pathologischen Befunden.

Apoptotischer Zelltod von Keratinozyten ließ sich bei *Morbus Bowen*, Spinaliom, malignem Melanom und dem Basaliom nachweisen. Eine dramatische Zunahme apoptotischer Zellen beobachtet man in inflammatorischen Hauterkrankungen [Arnold et al., 1999 (4)], lichenoiden Eruptionen, Arzneimittelexanthemen und, physiologischer Weise in Haarfollikeln während der katagenen Phase [Haake et al., 1993 (67)]. Als Resultat UVB-mediierter DNS-Schäden und konsekutiver ausgelöster Apoptose basaler und subbasaler Keratinozyten bleiben die „sunburn cells“ übrig [Woodcock et al., 1976 (200); Leverkus et al., 1997 (101)], diese UVB-bedingte Keratinozytenapoptose unter Beteiligung von $\text{TNF-}\alpha$ und dem Fas/Fas-L-System stellt einen Schutzmechanismus vor maligner Entartung dar [Schwarz et al., 1995 (143); Ouhtit et al., 2000 (128); Zhuang et al., 2000 (212)].

Die Maximalvariante des Arzneimittelexanthems, die toxische epidermale Nekrolyse (TEN) oder das Lyell-Syndrom werden durch eine massive Schädigung von Keratinozyten durch zytotoxische T-Zellen über Apoptosemechanismen, insbesondere dem Fas/Fas-L-„pathway“, verursacht [Suzuki et al., 1994 (160); Viard et al., 1998 (183)]. Ebenso erfolgt die Zerstörung der Epithelzellen bei der Graft-versus-Host Reaktion durch - unter anderem Fas/Fas-L-vermittelter - Apoptose [Gilliam et al., 1996 (57); Wehrli et al., 2000 (191)], darüberhinaus finden sich deutliche Übereinstimmungen von Klinik und Histomorphologie der Krankheitsbilder akute GvHD Grad IV und TEN.

Apoptose ist maßgeblich involviert in die Pathogenese und Regression von Neoplasien, insbesondere der Melanommetastasierung, und AIDS, der Kontakthypersensitivität und diversen Autoimmunerkrankungen - wie zum Beispiel bei den kutanen Veränderungen des Lupus erythematoses - und von chronisch neurodegenerativen Erkrankungen. Last but not least spielen

Apoptosemechanismen eine wichtige, wenn nicht die wesentliche Rolle bei dem Prozeß der Alterung [Wehrli et al., 2000 (191)].

Tab.2 Beispiele für Apoptose bei Hauterkrankungen

pathophysiologischer Prozeß

Krankheitsbild

Immunologische Reaktion

Lichen ruber planus

fixes Arzneimittelexanthem

toxische epidermale Nekrolyse (TEN)

kutaner *Lupus erythematoses*

tuberkuloide Lepra, *Alopecia areata*

Graft-versus-Host-Disease

Involution und Regression

Verrucae vulgares

Morbus Bowen/Erythroplasie Queyrat

Keratoakanthom, Melanom, Basaliom

Vernarbende Alopezie, Mastrozytom

Physikalische Noxen

akute UV-induzierte Dermatitis

Chemische Noxen

irritative Dermatitis nach Dithranol,

Dichromat, systemischer zytotoxischer

Therapie

1.3. Fragestellungen und Ziel der Untersuchungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Effektormechanismen der akuten und chronischen kutanen Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) nach allogener Stammzelltransplantation in Hautbiopsien anhand von histopathologischen und immunpathologischen Mustern in Gefrier- und Paraffinschnitten zu untersuchen. Folgende Fragen sollten beantwortet werden: Welche histopathologischen Muster der kutanen GvHD dominieren in den untersuchten Patientenkollektiven? Bestehen Zusammenhänge mit Grunderkrankung, Konditionierung oder anderen klinischen Parametern? Dominieren bestimmte T-Zellpopulationen bei bestimmten histopathologischen Veränderungen? Läßt sich anhand immunhistochemischer Färbungen eine Korrelation zwischen bestimmten Apoptosemechanismen und histopathologischen GvHD-Mustern herstellen? Spielen immunhistochemische Untersuchungen mittels gegen T-Zell-Antigene (CD2, CD3, CD4, CD8) und Apoptosemoleküle (CD95/Fas, CD95L/FasL, Perforin, Granzym B) gerichteter Antikörper für die Diagnostik, die Pathogenese und/oder die Prognose eine Rolle?

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Biopsien

Alle Patienten wurden in der Abteilung für Knochenmarkstransplantation, Klinik für Innere Medizin I der Universität Wien behandelt. Siebenundzwanzig Patienten (10 weibliche und 17 männliche, im Alter von 28 bis 56 Jahren, Durchschnittsalter 40,40 Jahre) wurden in die Studie aufgenommen. 23 von 27 Patienten erhielten allogenes Knochenmark, 4 von 27 erhielten allogene periphere Stammzellen. 15 von 27 Patienten bekamen Transplantate von unverwandten Spendern (DU=„unrelated donors“), 12 von 27 von verwandten Spendern (RD=„related donors“). 12 von 27 wurden als Standardrisiko-Patienten (SR=„standard risk“) eingestuft, 15 von 27 wurden als Patienten mit erhöhtem Risiko (AD=„advanced risk“) eingestuft. Als Grunderkrankung bestand bei 13 von 27 Patienten eine Chronische Myeloische Leukämie (CML), bei 5 von 27 eine Akute Myeloische Leukämie (AML), und bei 3 von 27 eine Akute Lymphatische Leukämie (ALL). 2 von 27 Patienten hatte ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), 2 von 27 Patienten eine schwere Aplastische Anämie (SAA=„severe aplastic anemia“), 1 von 27 Patienten ein Myelodysplastisches Syndrom (MDS) und 1 von 27 Patienten hatte ein Multiples Myelom (MM).

Die Konditionierung vor TX (=Transplantation) bestand aus fraktionierter TBI (=„total body irradiation“, Ganzkörperbestrahlung) mit 12 Gy für Standardrisiko-, oder 13,2 Gy für Hochrisikopatienten. Die TBI wurde in 8 Fraktionen (2 Fraktionen pro Tag) an 4 aufeinander folgenden Tagen (Tag -7 bis Tag -4 vor KMT) unter Abschirmung der Lunge verabreicht. Dazu erhielten die Patienten Cyclophosphamid (60mg/kg KG/d) an 2 aufeinander folgenden Tagen (Tag -3 bis Tag -2 vor KMT).

Allen 27 Patienten wurden nach etablierten klinischen und histopathologischen Kriterien für die akute oder chronische Graft-versus-Host-Erkrankung beurteilt .

Als Kontrollgruppe für die immunhistochemische Untersuchungen dienten drei gesunde Personen. Die Kontrollbiopsien wurden aus unauffälligen Hautstellen entnommen.

Pat	Nr.	Alter Geschlecht	Grund- er- krankung	Risiko	Spender Geschlecht	Konditionierung	Bx	Prophylaxe Therapie	KLINIK (Glucksberg/ Shulman)	Histologie (Lerner/ Shulman)	Ergeb- nis
AM	1	36,m	CML	AR	UD/m	FTBI (4x) 13.2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	01 10 96	CSA, DLI	Haut 1, GB I	unspez. Dermatitis	KR
BR	2	45,m	CML	SR	UD/m	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	14 01 97	CSA	Haut 2-3 +lich.	aGvHD II-III +lich.	KR
HS	3	40,w	CML	AR	RD/m	FTBI (4x) 13.2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	11 09 96	CSA C 5mg/kg KG	Haut 2, GB I	aGvHD I +lich.	+
KA	4	40,w	CML	SR	UD/m	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	12 01 96	CSA, C 2mg/kg KG	Haut 4, Leber 2, GB IV	aGvHD II +lich.	
							13 06 96	CSA, ECP	lich. GvHD	lich. GvHD	
							19 12 96	CSA,ECP	Poikilodermie	lich.GvHD	
							16 10 97	CSA,ECP	skleroderm. GvHD, Hyperpig- mentierung	lich.GvHD	KR
LA	5	46,w	CML	SR	UD/f	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	13 05 97	CSA, C 1mg/kg KG	Haut 1, GB I	aGvHD II	
							22 05 97	CSA, C 3mg/kg KG,	Haut 3-4, GB II	aGvHD IV +lich.	
							16 12 97	CSA, ECP	normal	postinflammat or. Hyperpigmenti erung	KR

Pat	Nr.	Alter Geschlecht	Grund- er- krankung	Risiko	Spender Geschlecht	Konditionierung	Bx	Prophylaxe Therapie	KLINIK (Glucksberg/ Shulman)	Histologie (Lerner/ Shulman)	Ergeb- nis
Ma Mo	6	50,m	CML	SR	RD/m	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	09 12 97	CSA	MSH- Erosionen	lich.GvHD	
							15 12 97	CSA	lich.GvHD	lich.GvHD	KR
Mo Ka	7	49,m	CML	SR	UD/m	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	09 09 97	CSA	Haut 3, GB II	aGvHD III	
							24 10 97	CSA, ECP C 1mg/kg KG	post- inflammator. Hyper- pigmentierung	post- inflammator. Hyper- pigmentierung	+
Mü Re	8	45,w	CML	SR	UD/m	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	17 07 96	CSA, C 1mg/kg KG	lich.GvHD	aGvHD II-III	
							12 02 97	CSA, ECP	sklero- dermiforme GvHD	sklero- dermiforme GvHD	
							20 11 97	ECP	diskrete cGvHD	interface Dermatitis	limited cGvHD
OG	9	39,m	CML	SR	UD/m	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	22 04 97	CSA	Haut 3, Leber 2, GB III	aGvHD I	
							22 05 97	CSA, C 1mg/kg KG	Haut 2, GB I	aGvHD III-IV	
							28 10 97	CSA ex		lich GvHD	cGvHD

Pat	Nr.	Alter Geschlecht	Grund- er- krankung	Risiko	Spender Geschlecht	Konditionierung	Bx	Prophylaxe Therapie	KLINIK (Glucksberg/ Shulman)	Histologie (Lerner/ Shulman)	Ergeb- nis
PD	10	30,m	CML	SR	UD/f	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	18 12 96	CSA, C 2mg/kg KG	Haut 3, Leber 1, GB II	akute GvHD II-III	
							08 10 97	keine Therapie	Prurigo nodularis- artiges Bild	post- inflammator. Hyper- pigmentierung	KR
PH	11	28,w	CML	SR	UD/m, PBSC	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	04 09 97	CSA, C 2-3mg/kg KG	Haut 3 +lich. Exanthem, GB II	aGvHD III-IV +lich.	
						(klass.Bsp)	13 01 98	CSA, ECP	lichenoides Exanthem, MSH- Erosionen	post- inflammator. Hyper- pigmentierung	ext cGvHD
PI	12	37,w	CML	SR	RD/f PBSC	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	24 02 97	CSA	Haut 2, GB I	aGvHD I-II	
							15 10 97	CSA, ECP	lichenoides Exanthem	lich. GvHD	ext cGvHD
SW	13	43,m	CML	SR	RD/m	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	08 10 97	keine Therapie	lichenoides Exanthem	lich. GvHD	Sicca Syndrom

Pat	Nr.	Alter Geschlecht	Grund- er- krankung	Risiko	Spender Geschlecht	Konditionierung	Bx	Tage post KMT	Prophylaxe Therapie	KLINIK (Glucksberg/ Shulman)	Histologie (Lerner/ Shulman)	Ergeb- nis
EH	14	47,w	AML	AR	UD/f	FTBI (4x) 13,2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	16 10 97	18	CSA, C 2mg/kg KG	Haut 2, GB I	aGvHD II	+
ES	15	30,w	AML	AR	MMUD/m	FTBI (4x) 13,2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	14 03 97	104	C 1mg/kg KG	lichenoides Exanthem	lich. GvHD	
							24 10 97		ECP	lichenoides Exanthem, Hyper- pigmentierung	post- inflammator. Hyper- pigmentierung	
							16 02 98		C 1mg/kg KG	skleroderm. Zeichnung, morphhea- artige cGvHd	sklero- dermiforme cGvHD	KR
RS	16	49,w	AML	SR	RD/m	FTBI (4x) 12Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	26 04 96		CSA	Haut 1, GB I	aGvHD II	
							28 05 96		CSA, C 0,5-0,25 mg/kg KG	lichenoides Exanthem	post- inflammator. Hyper- pigmentierung	+
SK	17	41,m	AML	AR	RD/f PBSC	FTBI (4x) 13,2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	25 02 97	29	CSA, C 2mg/kg KG	Haut 3, GI 3, GB IV	aGvHD II-III	
							18 06 97		CSA, C 6mg/kg KG	lichenoides Exanthem, cGvHD des GI	fokal lich. GvHD	+
UL	18	36,m	AML	AR	UD/m	FTBI (4x) 13,2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	16 01 97		CSA, C 4mg/kg KG	Haut 4 (TEN), GB IV	aGvHD IV	Rezidiv

Pat	Nr.	Alter Geschlecht	Grund- er- krankung	Risiko	Spender Geschlecht	Konditionierung	Bx	Tage post KMT	Prophylaxe Therapie	KLINIK (Glucksberg/ Shulman)	Histologie (Lerner/ Shulman)	Ergeb- nis
PF	19	28,m	ALL	AR	DU/F	FTBI (4x) 13.2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	27 03 96		CSA, C 2mg/kg KG	lichenoides Exanthem	aGvHD III	+
RF	20	56,m	ALL	AR	RD/f	FTBI (4x) 13.2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	14 06 96	38	CSA, C 1mg/kg KG	Haut 2, GB I	aGvHD II	
							30 09 96	145	keine Therapie	Haut 2	aGvHD II-III	Rezidiv
							25 11 96	201	PUVA >I, C <1mg/kg KG	lichen-planus- artige Zeichnung	aGvHD III	
							12 01 98	614	ECP >I, C <1mg/kg KG	Poikilodermie	sklerodermifor- me cGvHD	+ (Rezidiv)
SD	21	35,m	ALL	AR	DU/m	FTBI (4x) 13.2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	13 08 97		CSA, C 2mg/kg KG	Haut 2, Leber 2, GB III	aGvHD I	
							13 01 98		St.p. ECP	normal	post- inflammator. Hyper- pigmentierung	KR

Pat	Nr.	Alter Geschlecht	Grund- er- krankung	Risiko	Spender Geschlecht	Konditionierung	Bx	Tage post KMT	Prophylaxe Therapie	KLINIK (Glucksberg/ Shulman)	Histologie (Lerner/ Shulman)	Ergeb- nis
KM	22	30,m	SAA	AR	RD/m PBSC	ATG Cy (2x) 60mg/kg KG	02 06 97		CSA	aGvHD II +lich.	aGvHD I	
							17 06 97		CSA, C 1mg/kg KG Thalidomid	aGvHD II +lich.	aGvHD II +lich.	cGvHD
OC	23	33,m	SAA	AR	UD/m	flTBI (4x) 13.2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	15 01 97		CSA, St.p. ECP	aGvHD I +lich.	aGvHD I	
							12 01 98		CSA, AZA	Poikilodermie	sklero- dermiforme GvHD	cGvHD
MM	24	47,m	NHL	AR	RD/f	flTBI (4x) 13.2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	03 07 96		C 1mg/kg KG	Haut 2, Leber 1, MSH 1, GB II	aGvHD II-III	
							05 11 96		ECP, C <1mg/kg KG	poikilo- dermiforme Zeichnung	post- inflammator. Hyper- pigmentierung	
							12 11 97		ECP, AZA C <1mg/kg KG	sklero- dermiforme Zeichnung	post- inflammator. Hyper- pigmentierung	cGvHD
RA	25	30,m	NHL	AR	RD/m PBSC	flTBI (4x) 13.2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	04 11 96		CSA	Haut 2 Leber 1, GB II	aGvHD I-II	
							09 12 96		CSA, C 2mg/kg KG	Haut 1 (Desquamation) GB I	sklero- dermiforme cGvHD	+

Pat	Nr.	Alter Geschlecht	Grund- er- krankung	Risiko	Spender Geschlecht	Konditionierung	Bx	Tage post KMT	Prophylaxe Therapie	KLINIK (Glucksberg/ Shulman)	Histologie (Lerner/ Shulman)	Ergeb- nis
TC	26	45,w	MM	AR	RD/m	fTBI (4x) 13.2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	28 10 96		CSA	Haut 1, GB I	aGvHD I	
							12 12 96		CSA	lichenoides Exanthem	lichenoides cGvHD	KR
BF	27	56,m	MDS	AR	RD/m	fTBI (4x) 13.2Gy Cy (2x) 60mg/kg KG	17 04 97		CSA	Haut 2, Leber 1 GB II	aGvHD II-III	
							25 06 97		CSA	psoriasi- formes Exanthem	aGvHD I	
							08 10 97		CSA, C 1mg/kg KG	Haut 2 +lich.	aGvHD II	
							27 11 97		CSA, Thalidomid C 1mg/kg KG	lichenoides Exanthem	lichenoides cGvHD	cGvHD

Pat	Nr.	Kontrollen (Normale Haut)
NH1	111	normale Haut
NH2	222	normale Haut
NH3	333	normale Haut

Biopsien

Mit deren Einverständnis wurden den 27 Patienten zu verschiedenen Zeiten nach Transplantation und den Kontrollpersonen 4-6 mm große Stanzbiopsien in Lokalanästhesie (Xylocain oder Scandicain, 1-2%) entnommen. Einige Patienten mit langer Krankengeschichte wurden mehrmals biopsiert, daher beläuft sich die Gesamtzahl der Biopsien auf 58. Alle Hautstanzen entstammen GvHD-verdächtigen Arealen.

Jeweils eine 4mm große Stanzbiopsie wurde in ein 10ml-Zentrifugenröhrchen mit RPMI-Medium (Nr.1640/21875-034, Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland) überführt, anschließend in OCT-Einbettmedium für Gefrierschnitte (Nr.4583, Tissue-Tek, Elkhart, USA) in Vinylschälchen (Nr.4557, Cryomold Standard, Tissue-Tek, Elkhart, USA) eingebettet, in flüssigem Stickstoff (-196 °C) eingefroren, und kurzfristig bei -20 °C gelagert. Die andere, parallel entnommene Stanzbiopsie wurde in neutral-gepuffertem 7,5%-igem Formaldehyd (Nr.177109, Neuber, Wien, Österreich) fixiert und anschliessend mittels standardisiertem Verfahren in Paraffin eingebettet. 6mm große Stanzbiopsien wurden geteilt, die eine Hälfte wurde zu Gefrier-, und die andere Hälfte zu Paraffinmaterial verarbeitet.

2. 2. Anfertigung der Schnitte

Vorbehandlung der Objektträger für Gefrierschnitte

Die Objektträger (76x26mm, Menzel, Deutschland) wurden mit einer Mischung aus 70%-igem vergällten Alkohol (Anstaltsapotheke des Allgemeinen Krankenhauses Wien (AKH), Österreich) und 32%-iger Salzsäure (Nr.100319, Merck, Darmstadt, Deutschland) gereinigt. Danach wurden sie mit Poly-L-Lysin-Lösung (Nr.P8920, Sigma, St.Louis, USA) überschichtet und über Nacht getrocknet.

Vorbehandlung der Objektträger für Paraffinschnitte

Nach dem Waschen in absolutem Alkohol (Nr.414608/002, Carlo Erba, Mailand, Italien) für 5 Minuten und angemessener Verdampfungszeit, wurden die Objektträger etwa 5 Minuten in 2%-igem 3-Amino-Propyl-Thrie-Thoxysilan (Nr.09324, Fluka, Neu-Ulm, Deutschland) in Aceton (Nr.00585, Fluka, Neu-Ulm, Deutschland) gespült. Anschließend wurden die Objektträger in 2x Azeton und 1x Aqua dest. (Nr.CE0123, Ecotainer Aqua B Braun, Melsungen, Deutschland) geschwenkt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C getrocknet.

Anfertigung und Vorbehandlung der Gefrierschnitte

Die Gefrierblöcke wurden bei -20 °C mit dem Mikrotom (Nr.1720, Kryostat Digital, Leitz, Österreich) in 5µm dünne Vertikalschnitte aufgeschnitten. Nach dem Antrocknen der Schnitte bei Raumtemperatur (RT) für 30 Minuten, wurden diese in Azeton und Chloroform (Nr.102445, Merck, Darmstadt, Deutschland) für je 10 Minuten fixiert und anschließend für 20 Minuten bei RT getrocknet. Die Cryostatschnitte wurden dann kurzfristig bei -20 °C gelagert und vor der immunhistochemischen Färbung, abgedunkelt für 30 Minuten bei RT, aufgetaut. Frische Gewebeschnitte wurden nach Fixierung und Trocknen direkt in PBS (=„Phosphate Buffered Saline“, Phosphat-Puffer-Lösung, PBS-Dulbecco's ohne

Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland) gespült. Anschließend konnte der primäre Antikörper aufgetragen werden.

Anfertigung und Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Die in Formaldehyd fixierten Biopsien wurden im Entwässerungsautomaten weiterverarbeitet, und abschließend in Paraffin (Paraplast, Nr.028-1096, Oxford Labware, St.Louis, USA) eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden 3-4µm dünne Schnitte gefertigt, mittels feuchtem Pinsel vom Messer abgenommen und zur Entspannung in ein 48 °C warmes Wasserbad gegeben. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und mindestens 12 Stunden bei RT getrocknet. Für die immunhistochemische Färbung wurden die Paraffinschnitte mit dem Heißluftfön angeschmolzen und nach dem Trocknen nochmals angefönt. Die heißen Schnitte wurden dann in Xylol und absteigender Alkoholreihe deparaffiniert (3x 10 Min Xylol, dann für je 5 Min: 3x Ethanol 100%, 1x Ethanol 96%, 1x Ethanol 80%, 1x Ethanol 70%, Aqua dest.) und anschließend 3x in Tris-Puffer gewaschen. Die Antigen-Demaskierung erfolgte in Färbeküvetten in der Mikrowelle für 2 x 6 Minuten bei 600 Watt (Miele Electronic M724). Die Schnitte befanden sich in Citratpuffer, Volumenverluste durch Hitze wurden mit warmem Aqua dest. ausgeglichen. Nach einer Abkühlungszeit von 20 Minuten wurden die Schnitte 3 x mit Tris-Puffer gespült. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte für 10 Minuten in einem kalten 1,5%-igen Wasserstoffperoxid-Methanol Gemisch im Verhältnis 1 : 20 inkubiert, und anschließend gründlich mit Waschpuffer gespült.

Bei der Färbung mit monoklonalen Antikörpern wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation mit 100µl normalem hitzeinaktivierten Pferdeserum (Nr.S-200, Vector, Burlingame, USA) in 5ml Dulbecco's PBS blockiert. Dieser Inkubationsschritt dauerte 20 Minuten, danach wurde das überschichtete Serum abgekippt.

Tab.3 Verwendete Antikörper

CD	Monoklonale Antikörper	ISOTYP	VER-DÜNNUNG	SPEZIFITÄT	HERSTELLER
----	------------------------	--------	-------------	------------	------------

CD 2	Anti-Leu 5b Kat.Nr.(34)75 90	Maus IgG2a	1:200	Pan T Lymphozyten, E-R assoziiertes Antigen	Becton&Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA
CD 3	Anti-Leu 4 Kat.Nr.(34)73 40	Maus IgG1	1:200	Pan T Lymphozyten, Epsilon-Kette / CD 3- Komplex	Becton&Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA
CD 4	Anti-Leu 3a Kat.Nr.(34)63 20	Maus IgG1	1:100	T Helferzell Antigen (humanes CD 4 TH/I Antigen)	Becton&Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA
CD 8	Anti-Leu 2a Kat.Nr.(34)63 10	Maus IgG1	1:100	T Suppressorzell-/ Zytotoxisches T-Zell- Antigen (alpha-Kette des humanen CD 8 Antigens)	Becton&Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA
CD 95	Fas / Apo-1 Clone UB2 Kat.Nr.1505	Maus IgG1k	1:10	Apo-1 / Fas Rezeptor- Molekül, MW 48 kD	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD 95-L	Fas-L/Apo-1 Clone 33 Kat.Nr.F3772 0	Maus IgG1	1:10	Apo-1L / Fas-Ligand, Fragment von aa 116- 277der extrazellulären Domäne	Transduction Laboratories, Lexington, USA
GRANZY ME B	Gr B-7 Clone B-7 Kat.Nr.MON 7029	Maus IgG2a	1:20	Humane Serin Protease GR-B (33kD)	Monosan, Sanbio, Uden, Niederlande
PERFORI N	Anti-Perforin Clone Delta G9 Kat.Nr. PR 00	Maus IgG2b	1:40	Humane Perforin Protease	Endogen, Woburn, USA

2.3. Färbetechniken

2.3.1. Standardfärbung mit H&E

Die H&E-Färbung (Hämatoxylin Papanicolaou 1a, Nr.109253, Merck, Darmstadt, Deutschland und Eosin, Anstaltsapotheke, AKH, Wien) der Paraffinschnitte für die histologische Auswertung wurde im Färbeautomaten (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefertigt

2.3.2. Indirekte Peroxidasemethode

Bei dieser Technik wird „Horseradish“-(=Meerrettich)Peroxidase, gekoppelt an primäre Antikörper oder Immunglobuline als Verstärker der Farbreaktion genutzt. Bei dieser Methode bindet ein unkonjugierter primärer Anti-human-Antikörper, meist aus der Maus, gelegentlich aus der Ratte oder der Ziege, an das gesuchte Antigen. Der so gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird in einem zweiten Schritt durch ein peroxidasekonjugiertes Maus-Immunglobulin sichtbar gemacht. Die Sensitivität der Technik kann durch Inkubation mit weiteren konjugierten Antikörpern verstärkt werden. Die Farbreaktion der „Horseradish“-Peroxidase mit dem Chromogen AEC (=3-Amino-9-Ethyl-Carbazol) ergibt ein alkohol-lösliches Reaktionsprodukt. Das rote Chromogen AEC ist dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB) mit braunem Reaktionsprodukt vorzuziehen, vor allem bei der Beurteilung von entzündlichen Infiltraten in der Haut und insbesondere in der Epidermis. Die indirekte Immunperoxidasetechnik wurde auf Gefrierschnitten zur Färbung mit den monoklonalen Antikörper CD2, CD3, CD4, CD8 eingesetzt. (Tabelle III.2, Liste der verwendeten Antikörper)

Die Schnitte wurden mit dem primären Antikörper in etablierter Verdünnung in 2% BSA-PBS (2% Bovines Albumin in PBS , Nr.A-9647, Sigma, Steinheim, Deutschland) für 1 Stunde bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Entsprechend dem Isotyp des jeweiligen primären Antikörpers inkubierten wir

die Negativkontrollen mit dem passenden Maus-IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b) in 2% BSA–PBS in der Konzentration, die dem Proteingehalt des primären Antikörpers entsprach. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 10 Minuten mit PBS gespült.

Der zweite Inkubationsschritt wurde mit Kaninchen-Anti-Maus-Peroxidase-konjugiertem IgG (Dako-Hrp, Nr. PO161, Dako, Glostrup, Dänemark), welches 1:50 in einer 1:4 Mischung von PBS und inaktiviertem normalem Humanserum (Nr.14-402-E, Bio Whittaker, Walkersville, USA) verdünnt wurde, durchgeführt. Die Schnitte wurden für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS für 2 x 5 Minuten gespült.

Im dritten Inkubationsschritt (30 Minuten) benutzten wir Schwein-Anti-Kaninchen- Peroxidase-konjugiertes IgG (Dako-Hrp, Nr. PO217, Dako, Glostrup, Dänemark) in gleicher Verdünnung wie den 2. Antikörper. Danach wurden die Schnitte mit PBS für mindestens 15 Minuten gründlich gespült.

Zur Enzymmarkierung wurden die Präparate in einer AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, Nr.A-6926, Sigma, St.Louis, USA) - Lösung unter ständiger Mikroskopkontrolle für 6-10 Minuten inkubiert. Der Färbevorgang wurde dann durch Spülen mit PBS unterbrochen, anschließend wurden die Präparate gegengefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit frisch gefiltertem Hämatoxylin (Nr.109204, Merck, Darmstadt, Deutschland) für etwa 1 Minute. Nach reichlichem Spülen mit Aqua dest. und Leitungswasser zum Bläuen der Färbung, wurden die Präparate mit wasserlöslicher Eindecksubstanz (Aquamount improved, Nr.362262H, BDH Laboratory Supplies, Poole, BH15, GB) überschichtet und mit Deckgläschen (Micro Cover Glass, Superior, Marienfeld, Deutschland) versehen.

2.3.3. Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode)

Es handelt sich bei dieser Methode ebenfalls um eine indirekte Färbetechnik. Avidin, ein Glykoprotein, und Biotin, ein gewebständiges Vitamin B, besitzen eine besonders starke Affinität zueinander: Avidin weist vier freie Bindungsstelle für Biotin auf, Biotin für Avidin eine. Der unkonjugierte primäre Antikörper wird zunächst mit Hilfe eines Biotin-konjugierten sekundären Antikörpers detektiert. An diesen Antigen-Antikörper-Komplex bindet im dritten Inkubationsschritt ein vorpräparierter Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Der Vorteil der ABC-Methode gegenüber anderen indirekten Verfahren liegt in den noch intensiveren Färberesultaten, allerdings mit dem möglichen unerwünschten Nebeneffekt zusätzlicher unspezifischer Bindungen. Diese Methode diente der Färbung mit den Antikörpern gegen Granzyme B-7, CD 95 (FAS) und CD 95-L (FAS-L), sowie den Färbungen mit dem Antikörper gegen Perforin am Paraffinschnitt. (Tabelle III.2, Liste der verwendeten Antikörper)

Der primäre Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung in 1 %-igem Tris-Puffer aufgetragen, für 60 Minuten inkubiert und anschließend 3 x 10 Minuten in Tris-Waschpuffer gespült. Der sekundäre Biotin-konjugierte Antikörper (Pferd-Anti-Maus IgG, Nr.BA-2000, Vektor, Burlingame, USA) plus Pferdeserum wurde im Verhältnis 1:200 in 1%-igem Tris-Puffer zubereitet, 30 Minuten inkubiert, und sorgfältig abgespült. Im dritten Inkubationsschritt verwendeten wir den Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Kit Vectastain, Nr.PK 6100, Vektor, Burlingame, USA) für 30 Minuten. Die Chromogene wurden wie bei der indirekten Peroxidase-Methode verwendet (AEC zur Enzymmarkierung und Hämatoxylin zur Gegenfärbung).

2.4. Reagenzien

Tris- Waschpuffer:

Lösung I (Stammlösung) bestand aus 60,57g Tris (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan, Nr.108382, Merck, Darmstadt, Deutschland), 500 ml Aqua dest. und 400 ml 1M Salzsäure (Nr.100319, Merck, Darmstadt, Deutschland). Als Lösung II (Arbeitslösung) dienten 100 ml Stammlösung auf 1000 ml Natriumchlorid (Nr.106404, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit pH 7,5.

0,01M Citratpuffer pH 6,0 für die Mikrowellenbehandlung:

Lösung: 0,1M Zitronensäure (Nr.100416, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua dest. Lösung II: 0,1M Natriumzitat (Nr.106448, Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml Aqua dest. Die Lösung III (Arbeitslösung) setzte sich zusammen aus 4,5ml Lösung I und 20,5ml Lösung II ad 250ml Aqua dest.

Enzymmarkierung:

Lösung I (Stammlösung): 200mg AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol, Nr.A-6926, Sigma, St.Louis, USA) wurden unter Lichtschutz in 50ml NN-DMFD (N,N-Dimethyl-Formamid, Nr.56H1072, Sigma, St.Louis, USA) gelöst. Lösung II (Acetatpuffer): aus 6,8g Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat (Nr.106448, Merck, Darmstadt, Deutschland), 900 ml Aqua dest. und 100%-iger Essigsäure (Nr.818755, Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde ein 0,05M Acetatpuffer (pH 4,9) hergestellt, und der pH mittels eines pH-Meters auf 4,9 eingestellt. Als Lösung III (Arbeitslösung) diente die Mischung aus 2,5ml ACE-Stammlösung und 50ml Acetatpuffer, welche vor Gebrauch filtriert und mit 100µl Wasserstoffperoxid (Anstaltsapotheke des AKH, Wien, Österreich) aktiviert wurde.

2.5. Auswertung

2.5.1. Auswertung der Färbungen

Die mit H&E gefärbten Schnitte wurden anhand der diagnostischen Kriterien von *Lerner, Shulman, Glucksberg* beurteilt (siehe Tabelle). Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit Vier-Felder-Auszählung der positiven Zellen in standardisiertem Photorahmen ausgewertet. Die Größe des Photorahmens in der Zwischenebene betrug 14,4mm x 9,6mm, bei einer 40x Vergrößerung entspricht dies einer Feldgröße von 0,0864mm². Jede Antikörperfärbung und die Kontrollbiopsien wurden auf Verteilung, Markierungsintensität und Charakteristik der Färbung hin betrachtet. Die Intensität der Färbung wurde einer Skala von (+) bis (++++) zugeordnet, beziehungsweise genau ausgezählt. Eine negative Färbung wurde durch (-) gekennzeichnet.

Tab.4 Kriterien von Glucksberg, Shulman, Lerner

Zielorgane bei akuter GvHR (nach Glucksberg et al., 1974)				
	Stadium +1	Stadium +2	Stadium +3	Stadium +4
Haut	Makulopapulöses Exanthem auf < 25% der Körperoberfläche	Makulopapulöses Exanthem auf 25% - 50% der Körperoberfläche	Erythrodermie	Erythrodermie, Blasenbildung, Desquamation
Leber	Anstieg von Bilirubin (2,0-3,0mg/100ml) + SGOT (150-750 IU)	Anstieg von Bilirubin (3-5,9mg/100ml) +/- Anstieg von SGOT	Anstieg von Bilirubin (6-14,9mg/100ml) +/- Anstieg von SGOT	Anstieg von Bilirubin (>15mg/100ml) +/- Anstieg von SGOT
Darm (Diarrhöe)	> 500ml Stuhl/Tag	> 1000ml Stuhl/Tag	> 1500ml Stuhl/Tag	> 2000ml Stuhl/Tag

Tab.5 Kriterien von Glucksberg, Shulman, Lerner

Klinisches Staging der akuten GvHD (nach Glucksberg et al., 1974)				
	Stadium 1 (betrifft Haut+Leber)	Stadium 2 (betrifft Haut+Leber oder Haut+Darm oder Haut+Leber+Darm)	Stadium 3 (betrifft Haut +Darm mit oder ohne Leber)	Stadium 4 (betrifft Haut+Leber +Darm)
Haut	+1 bis +2	+ 1 bis + 3	+ 2 bis + 4	vergleichbar Grad 3, mit schwerer Allgemein-symptomatik
Leber	bis 1	+ 1 bis + 2	+ 2 bis + 4	
Darm (Diarrhöe)	keine Darm-beteiligung	+ 1 bis + 2	+ 2 bis + 4	
Tab.6 Kriterien von Glucksberg, Shulman, Lerner				
Histologisches Grading der aGvHD in der Haut (nach Lerner et al., 1974)				
Grad 1	Fokale oder diffuse Vakuolisierung basaler Keratinozyten			
Grad 2	Basale oder diffuse Vakuolisierung + fokale Spongiose + Satellitenzellen			
Grad 3	Grad 2 + subepidermale Spaltbildung + Akantholyse + Basalzellnekrosen			
Grad 4	Grad 2 + Nekrose der Epidermis			
Tab.7 Kriterien von Glucksberg, Shulman, Lerner				
Klinisches Staging der chronischen GvHD (nach Shulman, 1980)				
„limited chronic“ GvHD		„extensive chronic“ GvHD		
lokalisierte Hautbeteiligung mit oder ohne Leberdysfunktion		entweder general. Hautbeteiligung oder lokal. Hautbeteiligung +/- Leberdysfunktion + chron. aggressive Hepatitis + Augenbeteiligung + Beteiligung von Speicheldrüsen und MSH + / - Beteiligung anderer Organe		
Tab.8 Kriterien von Glucksberg, Shulman, Lerner				

Klin. / histol. Klassifikation der chron. GvHD (nach Shulman et al., 1978)		
Haut	lokalisierter Typ	generalisierter Typ
klinisch	lokalisierte lichenoid oder zirkumskript sklerodermiforme Hautveränderungen	general. exanthematöser Lichen planus oder Poikilodermie oder dissem. zirkumskripte Skerodermie +/- Hyper-, Hypopigmentierung +/- Atrophie +/- Teleangiektasien +/- fein bis groblammellöse Schuppung
histologisch	ED: milde Basalzellvakuolisierung, +/- wenige bis fehlende Dyskeratosen, mildes lymphozytäres Infiltrat D: fokale Fibrose, mildes lymphozytäres Infiltrat	ED: Parakeratose, Hypergranulose, Akanthose, +/- moderates lymphozytäres Infiltrat D: Fibrose des Papillarkörpers, +/- moderates lymphozytäres Infiltrat

2.5.2 Statistische Auswertung

Wir verwendeten den H-Test nach Kruskal und Wallis („*oneway analysis of variance by ranks*“). Dieses nichtparametrische Testverfahren wird angewandt, wenn bei kleineren Stichproben ($N < 30$) die Annahme normalverteilter Meßwerte nicht aufrecht erhalten werden kann [Bortz et al., 1990 (21)]. Beim H-Test werden nicht die Meßwerte selbst, sondern deren Rangplätze verarbeitet. Es gelten folgende Annahmen [Daniel, 1990 (33)]:

- 1) Die Daten bestehen aus κ Zufallsstichproben der Größe $n_1, n_2, \dots, n_\kappa$.
- 2) Die beobachteten Meßwerte sind voneinander unabhängig.
- 3) Die abhängige Variable ist kontinuierlich.
- 4) Es liegt mindestens ordinales Meßniveau vor.

Die *Nullhypothese* (H_0) des H-Testes postuliert, daß die κ Stichproben aus Populationen mit derselben Verteilungsfunktion und zentraler Tendenz stammen. Die *Alternativhypothese* (H_1) hingegen behauptet, daß sich die κ Stichproben hinsichtlich ihres Medians unterscheiden. Die Prüfgröße H ist asymptotisch χ^2 -verteilt (mit Freiheitsgraden $Fg=k-1$). In allen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0.05$ verwendet [Bortz et al., 1990 (21)].

Interessieren nicht nur globale Unterschiede in der zentralen Differenz, sondern Unterschiede zwischen den einzelnen Stichproben, müssen differentielle Tests in Form von Einzelvergleichen (Kontraste) durchgeführt werden. Hierbei werden alle κ Stichproben *paarweise* miteinander verglichen. In der Analyse wurden die Einzelvergleichstests nach Conover und alle anderen Tests bei einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ berechnet [Bortz et al., 1990 (21)].

2.6. Photoherstellung

Die Präparate wurden mit einem Kodak Gold (ASA 100) Film photographiert. Die Abzüge wurden auf Kodak Royal Photopapier gemacht.

3. Ergebnisse und statistische Auswertungen

3.1. Patienten

Siebenundzwanzig Patienten (10 weibliche und 17 männliche) mit histopathologisch gesicherter Diagnose einer kutanen Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR) wurden untersucht. Einige Patienten wurden mehrmals biopsiert, so daß sich die Gesamtzahl der Biopsien auf 58 beläuft. Bezüglich ihrer Grunderkrankung wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe I) CML: 13 von 27 Patienten (48,15%), Gruppe II) Patienten mit einer akuten Leukämie 8 von 27 Patienten (29,63%), das heißt ALL: 3 von 27 Patienten (11,11 %) und AML: 5 von 27 Patienten (18,52 %), Gruppe III) Patienten mit anderen Grunderkrankungen: 6 von 27 Patienten (22,22%). In Gruppe III befanden sich 2 Patienten mit hochmalignem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), 2 Patienten mit schwerer aplastischer Anämie (SAA=„severe aplastic anemia“), 1 Patient mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) und 1 Patient mit multiplen Myelom (MM).

3.2. Histopathologische Ergebnisse

Begriffserklärung

Die Patienten der einzelnen Gruppen wurden anhand der klinischen Diagnose nach *Glucksberg* GB I-IV; (Glucksberg et al., 1974 (58)) und *Shulman* [Shulman et al., 1980 (154)] sowie anhand der zeitgleich gestellten histopathologischen Diagnose nach *Lerner* Lerner I-IV [Lerner et al., 1974 (100)] und *Shulman* [Shulman et al., 1980 (154)] (Tabellen siehe Material und Methoden) beurteilt. Der Begriff „akute GvHD“ ist in der Einleitung hinreichend klinisch und histopathologisch erklärt. Die „akute GvHD mit lichenoiden Zügen“ läßt zusätzlich zum makulopapulösen Exanthem bereits silbrig-weiße lichenoid

Papeln erkennen; histologisch findet sich zusätzlich zu den epidermalen Veränderungen ein bandförmiges Infiltrat von lymphohistiozytären Entzündungszellen an der dermoepidermalen Junctionszone (DEJ) sowie eine Akanthose; letztere Merkmale stehen bei der „chronischen lichenoiden GvHD“, die klinisch einem idiopathischen Lichen ruber planus ähnlich ist, im Vordergrund [Horn et al., 1999 (78)]. Histopathologisch finden sich in der Dermis perivaskuläre Rundzellinfiltrate. Die „sklerodermiforme GvHD“ ähnelt klinisch den umschriebenen Formen der Sklerodermie, einer Autoimmunerkrankung des Bindegewebs- und Gefäßsystems, mit Fibrosierung und Sklerosierung der befallenen Organe. Die „Poikilodermie“ bezeichnet Hautveränderungen mit diffuser Atrophie, kleinfleckigen De- und Hyperpigmentierungen, disseminierten Teleangiectasien, kleinfleckigen bis konfluierenden Erythemen und zum Teil feiner bis grober Schuppung. Die Poikilodermie tritt auch bei Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel der Dermatomyositis oder bei kutanen T-Zelllymphomen auf. Die Bezeichnung „postinflammatorische Hyperpigmentierung“ bedeutet eine lokalisiert oder generalisiert auftretende, verstärkte Hautfarbe durch vermehrte Bildung oder Ablagerung von Pigment im Anschluss an ein entzündliches Geschehen. Im H&E-Schnitt findet sich eine Hyperpigmentierung der basalen Epidermis sowie reichlich Melanophagen in der papillären Dermis.

3.2.1. Klinische und histopathologische Ergebnisse

Gruppe I) CML:

Bei 8/13 Patienten mit CML wurde die klinische Diagnose einer „akuten kutanen GvHD“ (GB I-IV) gestellt: dem klinischen Erscheinungsbild, das insgesamt zehnmal beschrieben wurde, entsprach in 6 Fällen die histologische Diagnose nach *Lerner*. 5 Patienten waren zwischen Tag 0 und 30 betroffen: bei 4 Patienten (GB I, II, 3xIII), entsprach die klinische der histologischen Diagnose, bei einem

Patienten bestand eine deutliche Diskrepanz (OG: klinisch III, histologisch I). Bei 4 Patienten wurde klinisch eine akute GvHD zwischen dem Tag 30 und 60 diagnostiziert (bei zwei Patienten persistierte die GvHD, bei zwei Patienten war sie erst nach Tag +30 aufgetreten. Zwischen Tag +30 und +60 war die Diskrepanz zwischen klinischem Ausmaß und histologischem Schweregrad deutlicher: bei 3 Patienten war zusätzlich ein lichenoides, das heißt, ein bandförmiges entzündliches Infiltrat an der DEJ festzustellen. Bei einem Patienten war ein makulöses Exanthem (GB I) zwischen Tag 60 und 100 aufgetreten, dieses konnte jedoch histologisch nicht bestätigt werden (AM: GB I; unspezifische Dermatitis). Eine „akute GvHD mit lichenoidem Muster“ wurde bei einem Patienten (PH: GB III +lichenoid) am Tag +28 und bei einem weiteren Patienten am Tag +62 klinisch diagnostiziert und histologisch bestätigt. Die histologische Diagnose einer „akuten GvHD mit lichenoidem Muster“ wurde drei mal bei Patienten mit akuter GvHD gestellt (siehe oben, also insgesamt fünf mal).

Die klinische Diagnose einer „chronisch lichenoiden GvHD“ wurde nach dem Tag +100 und insgesamt neun mal (7 Patienten) gestellt. Die Diagnose bestätigte sich sieben mal, bei einer Patientin (MüRe) waren histologisch nur Zeichen einer akuten GvHD und bei einer Patientin lediglich Zeichen einer postinflammatorischen Hyperpigmentierung festzustellen. Die histologische Diagnose einer lichenoiden GvHD wurde einmal bei einer klinisch sklerodermiform und hyperpigmentiert imponierenden chronischen GvHD gestellt. Eine „sklerodermiforme GvHD“ wurde klinisch zwei mal diagnostiziert, aber nur einmal histologisch bestätigt. „Postinflammatorische Hyperpigmentierungen“ wurden klinisch bei einem Patienten am Tag +59 festgestellt und histologisch bestätigt. Die histologische Diagnose wurde zusätzlich noch drei mal gestellt: einmal bei klinisch normaler Haut (LA, Tag +245), im Anschluß an eine akute bzw. akute GvHD mit lichenoidem Muster (LA, Tag +28 und +37), einmal bei einer Prurigo nodularis-ähnlichen Klinik (PD, TAG +281) im Anschluß an eine akute GvHD (PD, Tag +25) und einmal bei lichenoiden Veränderungen (PH, Tag +158) im Anschluß an eine „akute GvHD

mit lichenoidem Muster“ (PH, Tag +28). Einer „Poikilodermie“ bei einer Patientin (KA, Tag +376) entsprach histologisch eine lichenoides GvHD (siehe oben).

Gruppe II) AML/ALL:

Bei 6/8 Patienten mit AML/ALL wurde klinisch eine „akute GvHD“ diagnostiziert und auch histologisch bestätigt. Bei 4 der 6 Patienten wurde die Diagnose zwischen Tag 0 und Tag +30 gestellt, bei einem Patienten (RF) zwischen Tag 30 und Tag 60 und - persistierend – nach dem Tag 100, und bei einem weiteren Patienten zwischen Tag 60 und 100. Im Unterschied zu den Patienten mit CML ließ sich bei keinem dieser Patienten klinisch oder histopathologisch „eine akute GvHD mit lichenoidem Muster“ feststellen. Klinische und histologische Schweregrade waren weitgehend identisch.

Die klinische Diagnose einer „lichenoiden GvHD“ wurde sechs mal gestellt. Diese Form der chronischen GvHD konnte jedoch nur zwei mal und erst bei Auftreten der Veränderungen nach Tag +100 histopathologisch bestätigt werden, konnten lediglich die epidermalen Veränderungen einer „akuten GvHD“ festgestellt werden, zwei mal waren nur Zeichen einer „postinflammatorischen Hyperpigmentierung“ festzustellen. Auch bei klinisch unauffälliger Haut (nach Tag +100) wurden histologisch Zeichen der „postinflammatorischen Hyperpigmentierung“ beschrieben. Die klinische Diagnose einer „sklerodermiformen GvHD“ wurde einmal nach dem Tag +100 gestellt und histopathologisch bestätigt. Bei einem Patienten wurden poikilodermatische Hautveränderungen nach dem Tag+100 beschrieben, histologisch handelte es sich um eine „sklerodermifome GvHD“.

Gruppe III) andere Grunderkrankungen:

Bei 4/6 Patienten wurde die klinische Diagnose einer akuten kutanen GvHD nach *Glucksberg*-Kriterien (GB I-II) gestellt: bei 3 /4 Patienten zwischen Tag 0-30 (Tag 14-20), bei 1/4 persistierend bis Tag 49 und bei 1/4 Patienten zwischen Tag 60–100. Histologisch entsprach die klinische Diagnose auch bei 4 Patienten den *Lerner*-Kriterien, *Lerner* I-III, bei einem Patienten (RA) mit klinisch persistierender „akuter GvHD“ wurden histologische Zeichen einer „sklerodermiformen GvHD“ identifiziert.

Bei drei Patienten wurde eine „akute GvHD mit lichenoidem Muster“ klinisch beschrieben (KM: Tag +28, OC: Tag +490, BF, +177), in allen Fällen handelte es sich histologisch um eine akute GvHD. Bei einem Patienten (KM, Tag +43) persistierten die klinischen Veränderungen und wurden letztlich histologisch als „akute GvHD mit lichenoidem Muster“ bestätigt.

Die Diagnose der „lichenoiden GvHD“ wurde zweimal gestellt (TC, Tag +65, BF, Tag +227) und histologisch bestätigt. Als weitere klinische Erscheinungsbilder wurden einmal psoriasiforme Hautveränderungen beschrieben (BF, Tag +69), histologisch handelte es sich eine akute GvHD, einmal sklerodermiforme Veränderungen (MM, +568; histologisch handelte es sich um eine postinflammatorische Hyperpigmentierung) und zweimal poikilodermatische Veränderungen (OC, TAG +852, MM, Tag +196). Einmal waren die histologischen Veränderungen einer sklerodermiformen GvHD zu beobachten (OC), einmal waren Zeichen der postinflammatorischen Hyperpigmentierung festzustellen (MM).

3.2.2. Zusammenfassung der histopathologischen Ergebnisse

Akute GvHD (epidermale Veränderungen wie Basalzellvakuolisierung bis zur Spaltbildung im Bereich der DEJ, dyskeratotische / apoptotische Keratinozyten und Satellitenzellen): die histopathologische Diagnose wurde bei 19/27

Patienten (70,3%) gestellt. Eine akute kutane GvHD fand sich bei fast allen Patienten mit akuten Leukämien (7/8 Patienten; 87,5%) und bei allen Patienten der Gruppe III) mit anderen Grunderkrankungen (6/6 Patienten; 100%). Im Unterschied dazu wurde lediglich bei 6/13 Patienten (45%) mit CML die histologische Diagnose einer akuten kutanen GvHD bestätigt. Protrahierte Verläufe wie das Fortbestehen der akuten kutanen GvHD nach dem Tag 30-60 fanden sich bei zwei Patienten der Gruppe III) (ein Patient mit MDS, ein Patient mit SAA), bei einer Patientin mit CML wurde histologisch eine akute GvHD nach dem Tag +100 diagnostiziert.

Akute GvHD mit lichenoidem Muster (zusätzlich zu den epidermalen Veränderungen der akuten GvHD Akanthose und bandförmiges Infiltrat von lymphohistiozytären Entzündungszellen an der dermoepidermalen Junctionszone (DEJ): die histopathologische Diagnose wurde bei 6/27 Patienten gestellt. 5/13 Patienten (38,5%) mit CML sowie 1 Patient (16,6%) mit einer anderen Grunderkrankung (SAA) wiesen die entsprechenden Veränderungen auf, jedoch keine Patienten mit AML oder ALL. Eine chronisch-lichenoide GvHD (Basalzellvakuolisierung, dyskeratotische bzw. apoptotische Zellen in der Epidermis, Akanthose, Hypergranulose, Hyperkeratose, mäßig dichtes bandförmiges Infiltrat aus lymphohistiozytären Zellen an der DEJ) wurde bei insgesamt 10 Patienten von 27 festgestellt (37%), bei 6/13 Patienten mit CML (46,2%), bei 2/8 Patienten mit akuten Leukämien (AML; 25%) und bei einem Patienten mit anderer Grunderkrankung (MDS; 16,6%).

Sklerodermiforme Charakteristika wurden bei 1/13 Patienten mit CML (7,7%) nach vorangegangener akuter GvHD gefunden, bei 2/8 Patienten mit AML/ALL (25%) – einmal nach vorbestehender akuter und einmal nach vorbestehender lichenoider GvHD - und bei 2/6 Patienten mit anderen Grunderkrankungen (33,3%), beide Male nach vorangegangener akuter GvHD. Zeichen der postinflammatorischen Hyperpigmentierung mit reichlich Melanophagen im Papillarkörper fanden sich bei insgesamt 9/27 Patienten (33,3%), bei denen

Episoden einer akuten GvHD, einer akuten GvHD mit lichenoidem Muster oder einer lichenoiden GvHD beobachtet worden waren (Tabelle 3): bei 4/13 Patienten mit CML (30,8%), bei 2/8 Patienten mit AML/ALL (25%) und bei 2/6 Patienten mit anderen Grunderkrankungen (33,3%).

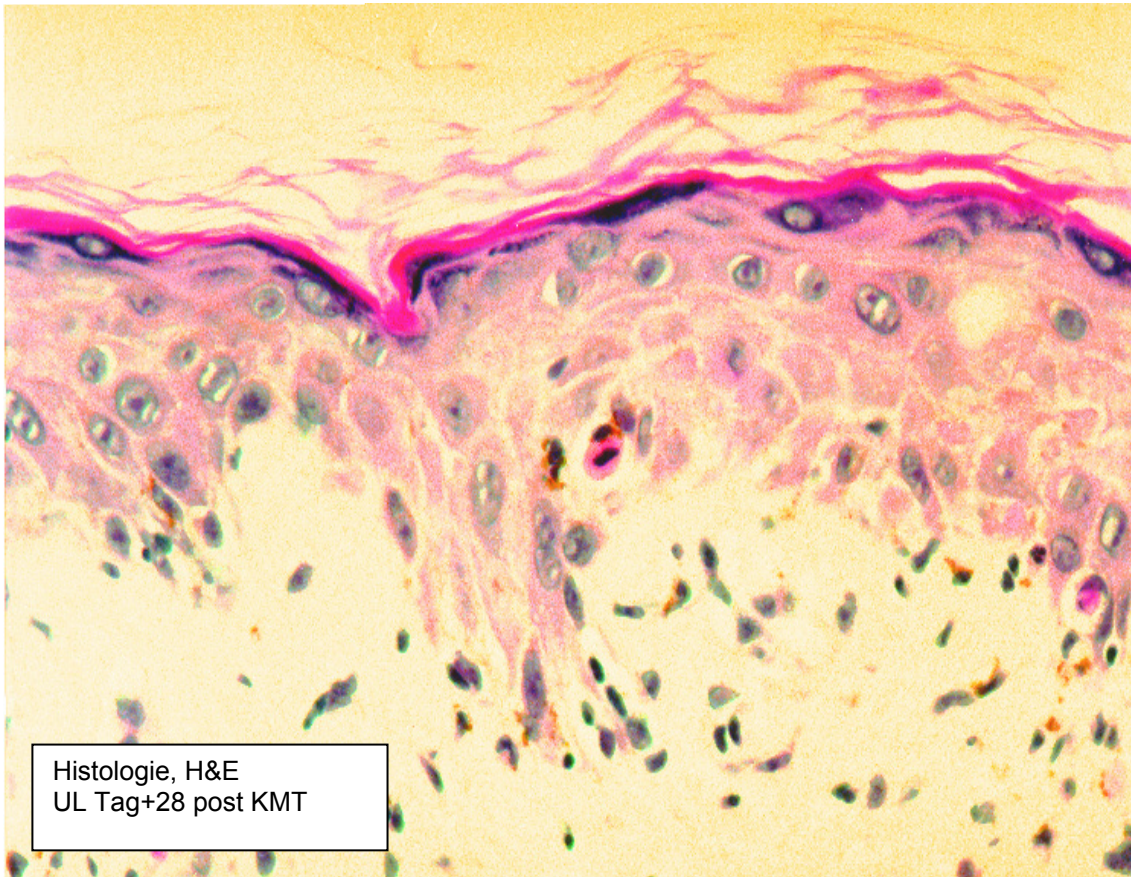
Interessant erscheint auch, daß sich unter dem klinischen Bild einer Poikilodermie sowohl lichenoid als auch sklerodermiforme Veränderungen manifestieren können, wobei das lichenoid Muster bei einem Patienten der Gruppe I) mit poikilodermatischen Veränderungen festgestellt wurde.

Tab. 9 Die häufigsten histologischen Diagnosen

adaptiert nach *Lerner, Horn* und *Shulman*; einige Patienten wurden mehrmals biopsiert unter verschiedenen Diagnosen, diese Patienten werden daher nicht nur einmal, sondern mehrmals, in unterschiedlichen Gruppen berücksichtigt.

Gruppe	Akut	Akut + Lichenoid	Chronisch lichenoid	Sklerodermiform	Postinflammator. Hyperpigmentierung	Andere
I) CML (13 Pat., 27 Bx.)	7x (6 Pat.)	5x	9x (7Pat)	1x	4x	1x
	1x Lerner I	1x Lerner I	2x vorher akut	vorher akut	2x vorher akut	
	6x Lerner II-IV	4x Lerner II-IV	1x akut +lich.		2 akut lichenoid	
		2x vorher akut				
II) AML (4) ALL (3) (8Pat., 16 Bx.)	9x (7Pat)	keine	2x (AML)	2x	3x	keine
	1x Lerner I		1x vorher akut	1x vorher akut	1x vorher akut	
	6x Lerner II-IV			1x vorher lich.	2x vorher lich.	
III) Andere (6 Pat., 15 Bx.)	8x (6Pat)	1x	2x	2x	2x	keine
	3x Lerner I	1x Lerner II	2x vorher akut	2x vorher akut	1x vorher akut	
	3x Lerner II-IV	vorher aGvHD I				

Abb.3 Histologie H&E



3.3. Immunpathologische Ergebnisse

Die entnommenen Biopsien, die immunhistochemisch mit Antikörpern gegen CD2, CD3, CD4, CD8, Granzyme B und Perforin, sowie mit Fas und Fas-L bearbeitet worden waren, wurden mittels Meßokularen numerischen Analysen unterzogen. Unter Anwendung I) des Kruskal-Wallis-Testes, II) des Boxplots und III) der Einzelvergleiche nach Conover wurde untersucht, ob zwischen den histologischen Diagnosen und der Anzahl positiver Zellen in den immunhistochemischen Färbungen Korrelationen vorlagen, beziehungsweise ob sich die jeweilige Anzahl immunhistochemisch markierter Zellen in Schnitten mit verschiedenen histologischen Diagnosen signifikant unterschieden. Insbesondere galt es, Trends bei den Färbungen mit den Apoptosemarkern Granzyme B und Perforin, sowie Fas und Fas-L nachzuprüfen. Die Epidermis (in den Tabellen mit „vp“ bezeichnet) und die Dermis (in den Tabellen mit „vpp“ bezeichnet) wurden jeweils separat betrachtet.

Abb.4 CD4

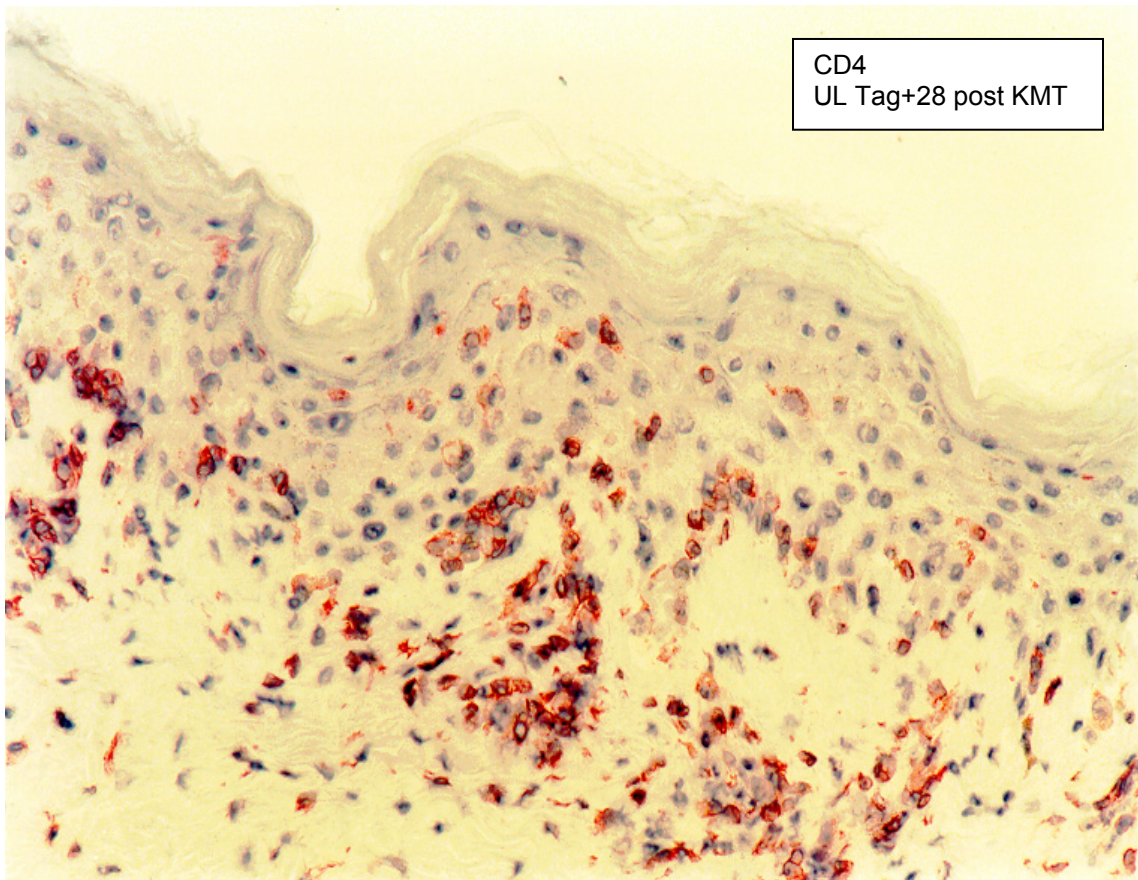


Abb.5 CD8

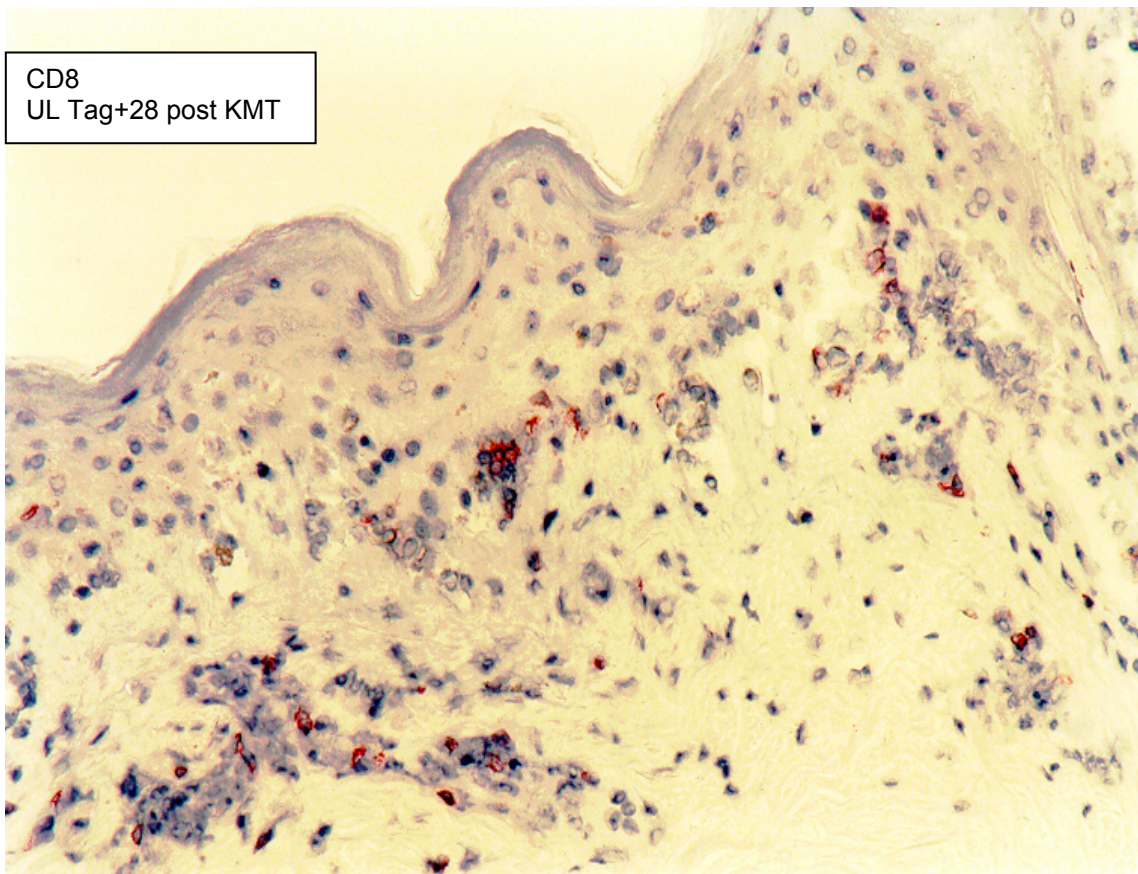


Abb.6 Perforin

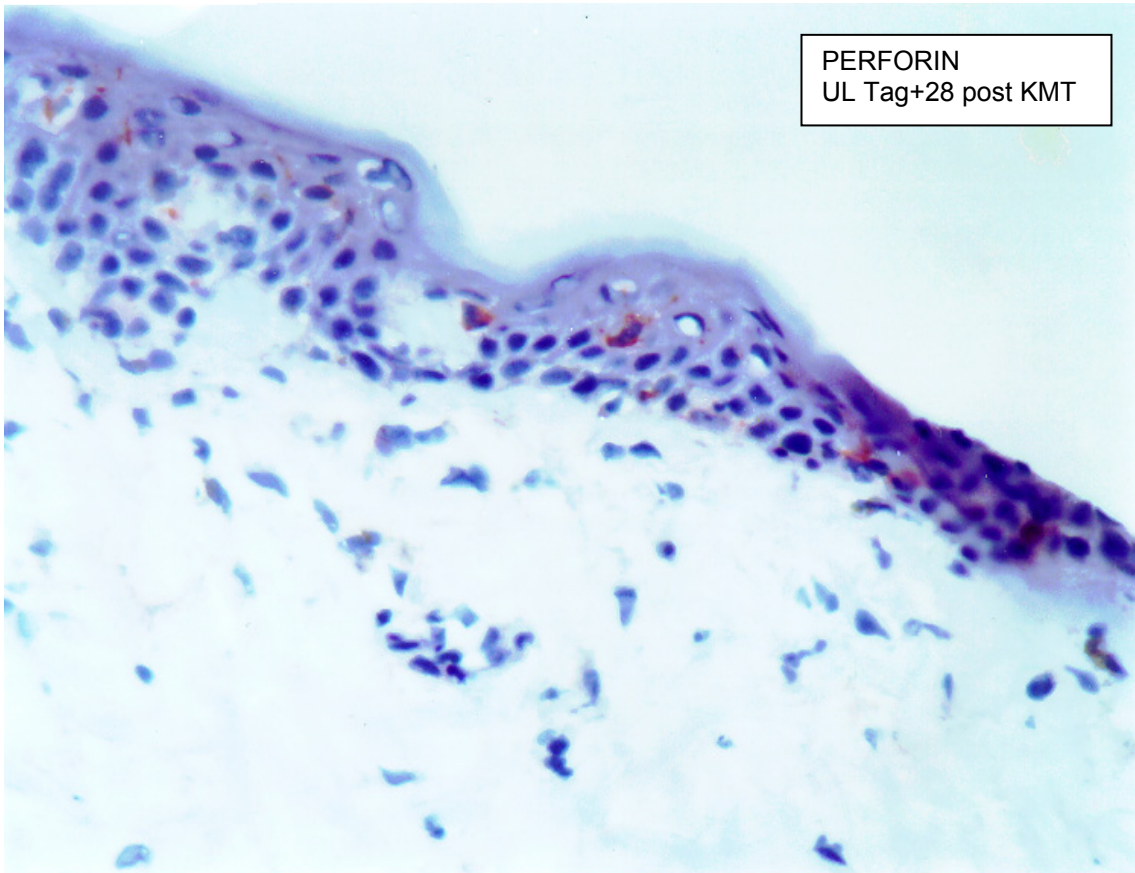


Abb.7 Granzyme B

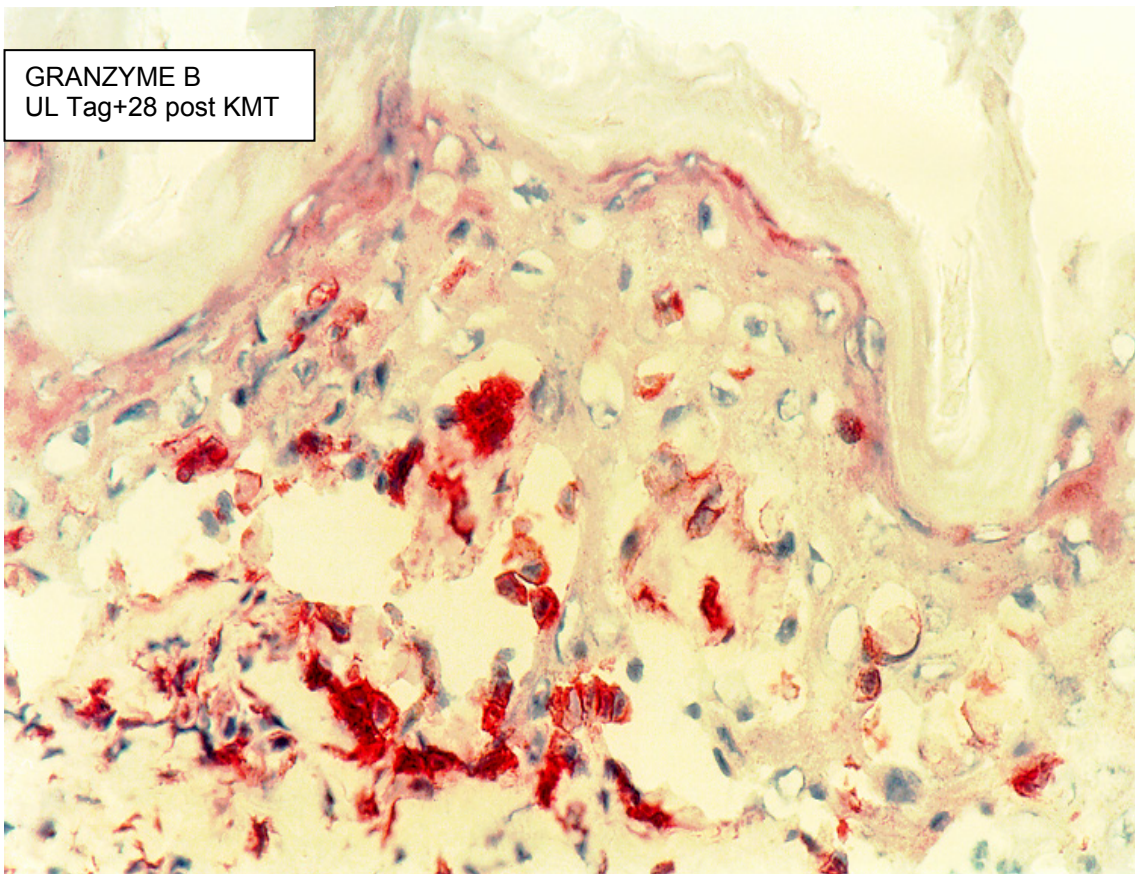


Abb. 8 Fas

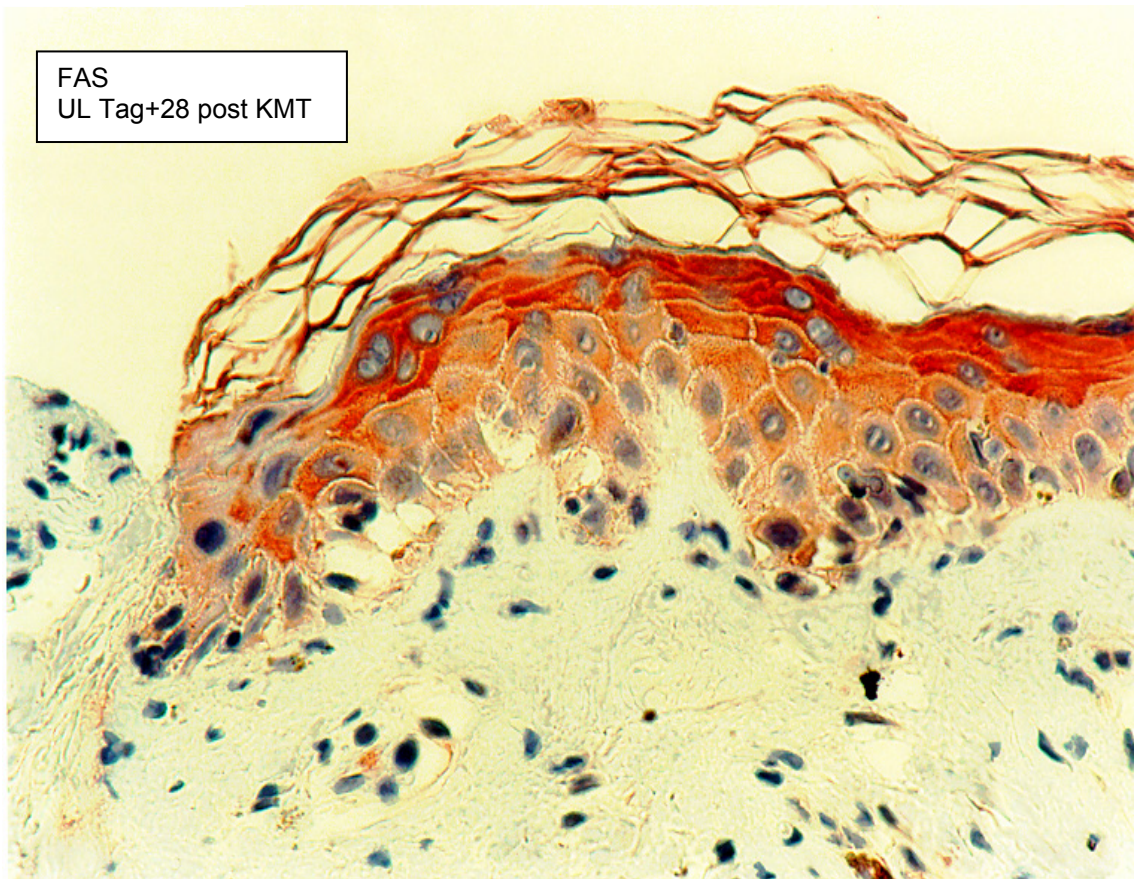


Abb.9 Fas-L



Es wurde der immunhistochemischen Auswertung demnach nicht die Gruppeneinteilung zugrunde gelegt, welche bei der histopathologischen Auswertung gewählt worden ist, da die Anzahl der auszuwertenden Schnitte eine verlässliche statistische Auswertung nicht zuließ.

Folgende GvHD-assoziierte histologische Diagnosen (Variable „vh“) wurden mit fortlaufenden Nummern kodiert: 1)=Postinflammatorische Hyperpigmentierung, 2)=„Interface Dermatitis“, 3)=akute GvHD, 4)=akute GvHD mit lichenoider Zeichnung, 5)=chronische lichenoider GvHD, 6)=sklerodermiforme GvHD. Die Definitionen der hier verwendeten Begriffe entsprechen den Definitionen in Teil 1) histopathologische Ergebnisse. Zusätzlich eingesetzt wurde hier der Begriff „Interface Dermatitis“, der eine unspezifische Dermatitis beschreibt, wie man sie unter anderem bei Autoimmunerkrankungen wie *Lupus erythematoses* oder Dermatomyositis finden kann. Bei der Diagnose akute GvHD wurde bei der Auswertung, entgegen der histopathologischen Betrachtung, die verschiedenen Ausprägungsgrade nicht unterschieden, um bei der geringen Fallzahl statistisch signifikante Zahlen zu gewinnen.

3.3.1 Statistische Auswertung

CD 2

I) Kruskal-Wallis-Test

Insgesamt konnten 51 Biopsien für CD2 ausgewertet werden. Die durchschnittliche Anzahl der CD2-positiven Zellen in der Epidermis und Dermis ist bei den verschiedenen histologischen Diagnose signifikant unterschiedlich. (Kruskal-Wallis-Test: Epidermis $p=0,029$ Dermis $p=0,019$), daraus folgt, daß CD2 sehr wohl als diagnostischer Marker für die Differenzierung der verschiedenen histologisch befundeten GvHD-assoziierten Diagnosen dienen kann. (Tabellen 10 a+b).

Tabelle 10a

Frequenzen CD 2

Kruskal-Wallis Test

	VH	N	Mean Rank
VP	1.00	9	16.50
	3.00	21	32.50
	4.00	5	23.10
	5.00	11	27.50
	6.00	5	15.40
	Total	51	
VPP	1.00	9	17.17
	3.00	21	29.83
	4.00	5	28.80
	5.00	11	32.45
	6.00	5	11.00
	Total	51	

Test Statistik: a) Kruskal-Wallis Test b) Gruppierungsvariable: VH

Tabelle 10b

Variabele VP: Epidermis, VPP: Dermis

	VP	VPP
Chi-Square	10.779	11.844
df	4	4
Asymp. sig	0.029	0.019

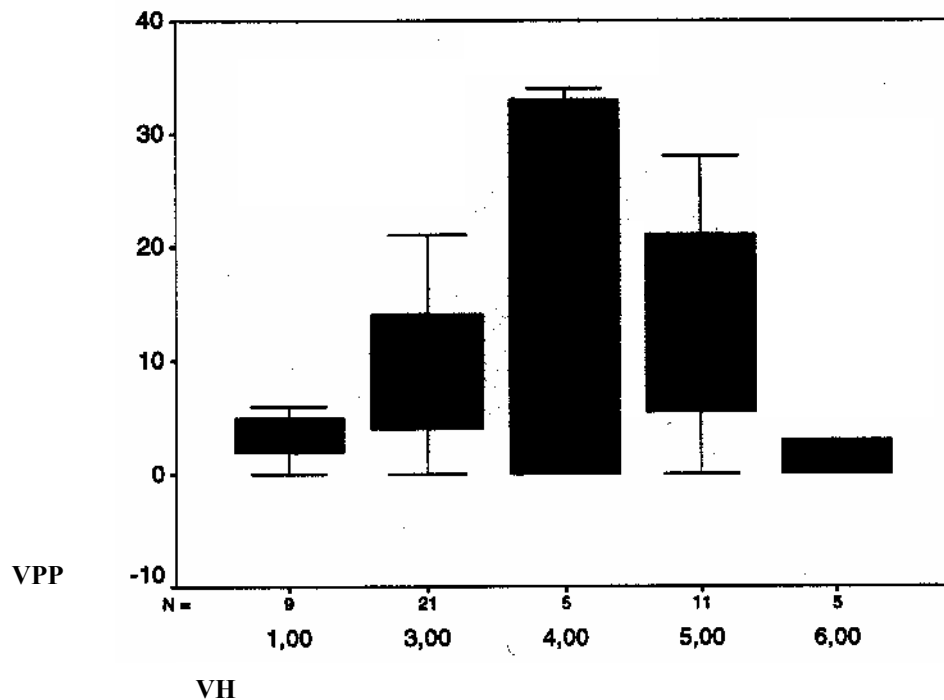
CD 2

II) Boxplot-Test

Der Boxplot stellt zusammenfassende Statistiken der Verteilung grafisch dar und zeigt augenscheinliche Schwankungen der Gruppenmediane. Dermis: In 4 von 5 Gruppen: postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), aGvHD mit lichenoider Zeichnung (4), chronische lichenoider GvHD (5) und sklerodermiforme GvHD (6) befindet sich der Median nicht im Zentrum des Kastens, die beobachteten Werte sind also asymmetrisch verteilt. In der Gruppe (3) akute GvHD sind die beobachteten Werte symmetrisch verteilt. (Tabelle 11)

Tabelle 11

CD 2

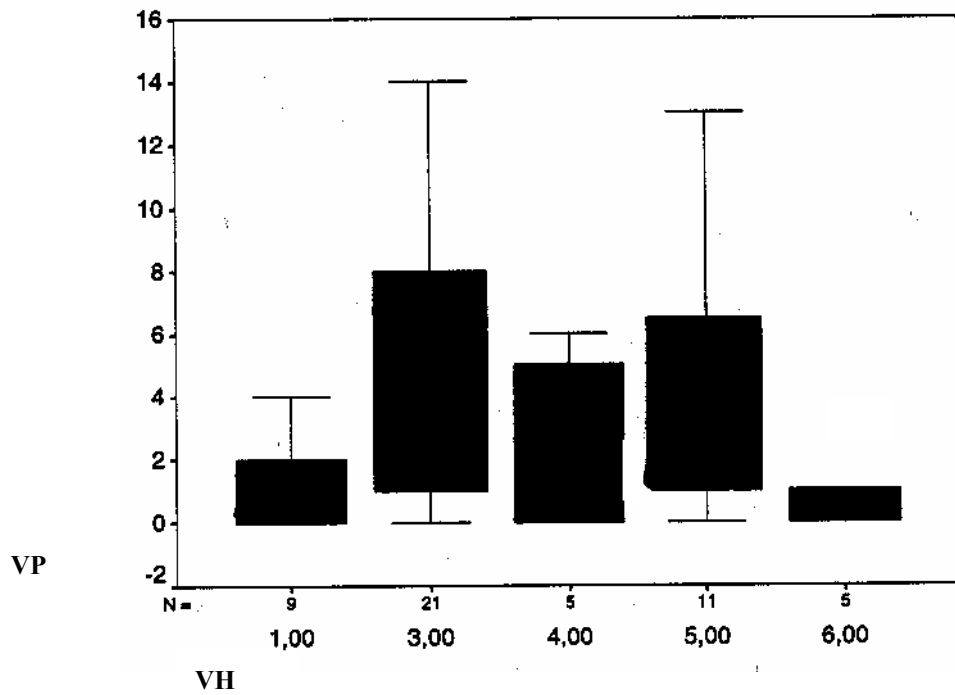


Epidermis: In 4 von 5 Gruppen: postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), aGvHD mit lichenoider Zeichnung (4), lichenoider GvHD (5) und

sklerodermiforme GvHD (6) befindet sich der Median nicht im Zentrum des Kastens, die beobachteten Werte sind also asymmetrisch verteilt. In der Gruppe (3) akute GvHD sind die beobachteten Werte symmetrisch verteilt (Figur 2). Die Gruppe (2) *Interface Dermatitis* wurde aufgrund von Datenmangel nicht bearbeitet. (Tabelle 12)

Tabelle 12

CD 2



CD 2, Einzelvergleichstests

Welche augenscheinlichen Gruppenunterschiede statistisch signifikant sind, belegen die Einzelvergleiche. Der paarweise Vergleich von zwei verschiedenen histologischen Diagnosen bezüglich Ihrer jeweiligen Anzahl CD 2-positiv gefärbter Zellen wurde im Einzelvergleichstest berechnet. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl intradermaler (emp -12,67 < krit 13,05) CD2-positiver T-Lymphozyten bei postinflammatorischer Hyperpigmentierung (1) und akuter GvHD (3), signifikante Unterschiede zeigten sich hingegen intradermal beim Vergleich akuter GvHD (3) mit sklerodermiformer GvHD (6) (emp 18,833 > krit 16,31) und postinflammatorischer Hyperpigmentierung (1) mit lichenoider GvHD (5) (emp -15,29 > krit 14,732). Die höchsten Zahlen intradermaler CD 2-positiv gefärbter T-Lymphozyten fanden sich bei den Diagnosen chronische lichenoider GvHD (5) und akute GvHD mit lichenoidem Muster (4). Wenige positive Zellen waren bei postinflammatorischer Hyperpigmentierung (1) und sklerodermiformer GvHD (6) zu finden. Signifikante Unterschiede zwischen der Anzahl CD2-positiv gefärbter Zellen in der Epidermis fanden sich insbesondere beim Vergleich postinflammatorische Hyperpigmentierung (1) mit akuter GvHD (3) (emp -16 > krit 13,06), während bei der postinflammatorischen Hyperpigmentierung (1) wenig Zellen positiv gefärbt waren, färbten sich bei akuter GvHD (3) deutlich mehr T-Lymphozyten an. (Tabelle 13: Epidermis, Tabelle 14: Dermis)

Tabelle 13 Einzelvergleiche vp-cd2

	emp	krit	
R1-R3	-16	13.06381008	<i>signifikant</i>
R1-R4	-6.6	18.28933411	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	-11	14.73796542	<i>nicht signifikant</i>
R1-R6	1.1	18.28933411	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	9.4	16.31669356	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	5	12.20419482	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	17.1	16.31669356	<i>signifikant</i>
R4-R5	-4.4	17.68555851	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	7.7	20.73815558	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	12.1	17.68555851	<i>nicht signifikant</i>

Tabelle 14 **Einzelvergleiche vpp-cd2**

	emp	krit	
R1-R3	-12.67	13.05875406	<i>nicht signifikant</i>
R1-R4	-9.433	18.28225569	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	-15.29	14.73226147	<i>signifikant</i>
R1-R6	6.167	18.28225569	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	3.233	16.3103786	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-2.622	12.1994715	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	18.833	16.3103786	<i>signifikant</i>
R4-R5	-5.855	17.67871376	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	15.6	20.73012941	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	21.455	17.67871376	<i>signifikant</i>

CD 3

I) Kruskal-Wallis-Test

Insgesamt konnten 52 Biopsien für CD3 ausgewertet werden. Die durchschnittliche Anzahl der CD3-positiven Zellen in der Epidermis und Dermis ist bei den verschiedenen histologischen Diagnosen signifikant unterschiedlich. (Kruskal-Wallis-Test: Epidermis $p=0,008$, Dermis $p=0,001$). (Tabellen 15 a+b)

Tabelle 15a

Frequenzen CD 3

Kruskal-Wallis Test

	VH	N	Mean Rank
VP	1.00	9	13.89
	3.00	22	30.80
	4.00	5	36.50
	5.00	11	29.18
	6.00	5	14.40
	Total	52	
VPP	1.00	9	14.78
	3.00	22	27.68
	4.00	5	40.30
	5.00	11	35.00
	6.00	5	9.90
	Total	52	

Test Statistik: a) Kruskal-Wallis Test

b) Gruppierungsvariable: VH

Tabelle 15b

Variabele VP: Epidermis, VPP: Dermis

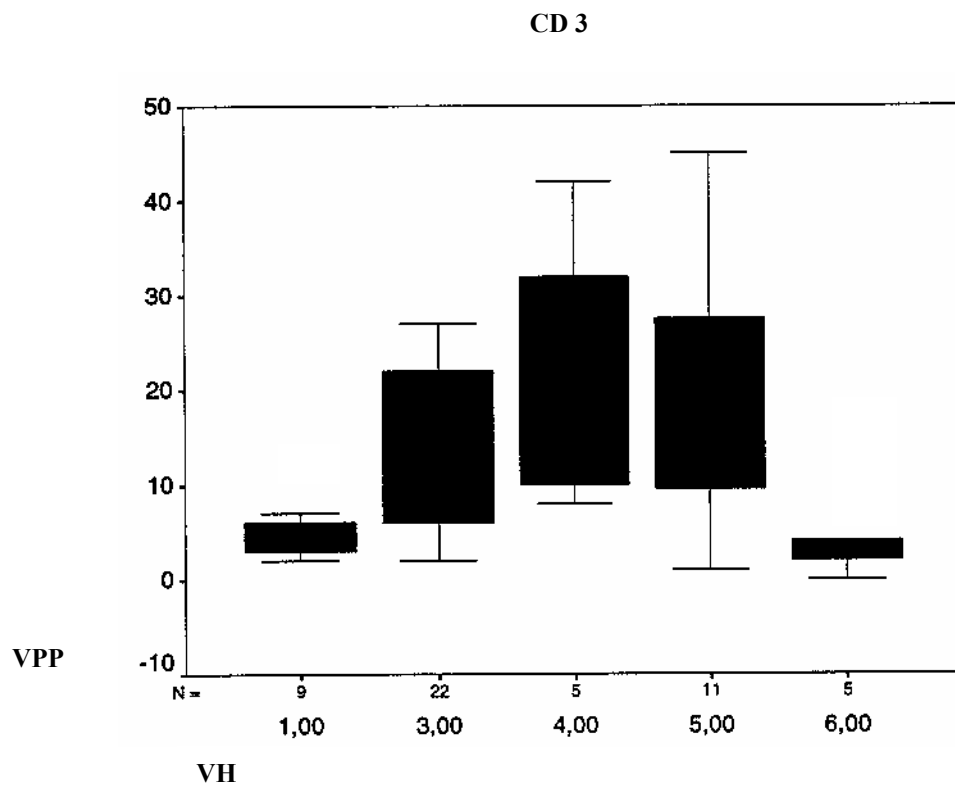
	VP	VPP
Chi-Square	13.666	19.203
df	4	4
Asymp. sig	0.008	0.001

CD 3

II) Boxplot-Test

Dermis: In 3 von 5 Gruppen: postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), akute GvHD mit lichenoider Zeichnung (4) und sklerodermiforme GvHD (6) befindet sich der Median nicht im Zentrum des Kastens, die beobachteten Werte sind also asymmetrisch verteilt. In der Gruppe (3) akute GvHD und Gruppe (5) lichenoider GvHD sind die beobachteten Werte annähernd symmetrisch verteilt (**Tabelle 16**)

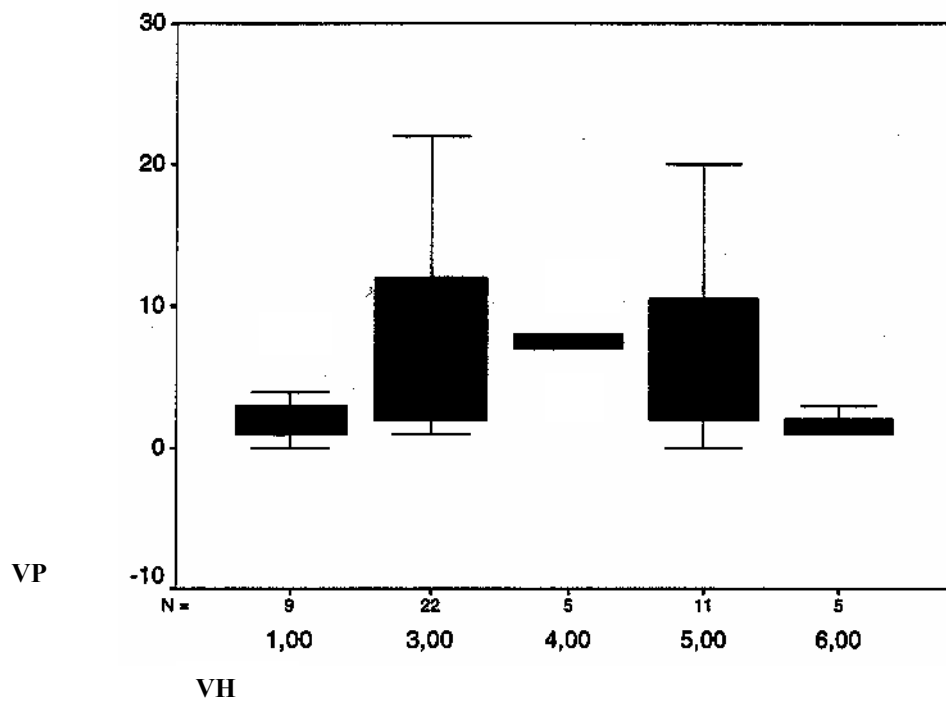
Tabelle 16



Epidermis: In 4 von 5 Gruppen: postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), akute GvHD (3), akute GvHD mit lichenoider Zeichnung (4) und lichenoider GvHD (5) sind die beobachteten Werte asymmetrisch verteilt. In der Gruppe (6) sklerodermiforme GvHD liegt der Median mittig im Kasten, die Daten sind symmetrisch verteilt (Figur 2). Die Gruppe (2) „Interface Dermatitis“ wurde aufgrund von Datenmangel nicht bearbeitet. (Tabelle 17)

Tabelle 17

CD 3



III) Einzelvergleichstest

Welche augenscheinlichen Gruppenunterschiede statistisch signifikant sind, belegen die Einzelvergleiche. Die Anzahl der CD3-positiven Zellen in der Dermis war signifikant unterschiedlich zwischen postinflammatorischer Hyperpigmentierung (1) und der akuten GvHD mit lichenoidem Muster (4), sowie der lichenoiden GvHD (5) (emp 25,52>krit 18,20), (emp 20,22>krit 14,67). Ein ähnliches Verhältnis der Anzahl CD 3-positiver Zellen von niedriger zu hoher Anzahl fand sich in der Epidermis (emp -22,61>krit 18,22), (emp -15,29>krit 14,68). Ebenfalls signifikant hohe Anteile epidermaler CD3-positiver Zellen zeigten sich bei der akuten GvHD (3) (emp -6,906>krit 13,02) und der akuten GvHD mit lichenoidem Muster (4) (emp 22,1>krit 20,67). Intradermale CD3-positive T-Lymphozyten fanden sich mit signifikant hohen Anteilen zudem bei akuter GvHD (3) (emp 17,78>krit 16,24), akuter GvHD mit lichenoidem Muster (4) (emp 30,4>krit 20,64) und chronisch lichenoider GvHD (5) (emp 25,1>krit 17,60) im Vergleich mit sklerodermiformer GvHD. Die anderen Einzelvergleiche waren nicht signifikant.

(Tabelle 18 Epidermis, Tabelle 19 Dermis)

Tabelle 18 Einzelvergleiche vp-cd3

	emp	krit	
R1-R3	-16.906	13.0210892	<i>signifikant</i>
R1-R4	-22.611	18.2295249	<i>signifikant</i>
R1-R5	-15.293	14.6897698	<i>signifikant</i>
R1-R6	-0.511	18.2295249	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	-5.705	16.2633352	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	1.613	12.1642851	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	16.395	16.2633352	<i>signifikant</i>
R4-R5	7.318	17.6277238	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	22.1	20.6703383	<i>signifikant</i>
R5-R6	14.782	17.6277238	<i>nicht signifikant</i>

Tabelle 19

Einzelvergleiche vpp-cd3

	emp	krit	
R1-R3	-12.904	13.0037147	<i>nicht signifikant</i>
R1-R4	-25.522	18.2052006	<i>signifikant</i>
R1-R5	-20.222	14.6701687	<i>signifikant</i>
R1-R6	4.878	18.2052006	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	-12.618	16.2416345	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-7.318	12.1480538	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	17.782	16.2416345	<i>signifikant</i>
R4-R5	5.3	17.6042025	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	30.4	20.6427572	<i>signifikant</i>
R5-R6	25.1	17.6042025	<i>signifikant</i>

CD 4

I) Kruskal-Wallis-Test

Insgesamt konnten 54 Biopsien für CD4 ausgewertet werden. In der Dermis ist die Anzahl der CD4-positiven Zellen bei verschiedenen histologischen Diagnosen signifikant unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test: Dermis $p=0,012$). Die Anzahl der CD4-positiven Zellen ist in der Epidermis dagegen bei den verschiedenen histologischen Diagnosen nicht signifikant unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test: Epidermis $p=0,294$). (Tabellen 20 a+b)

Tabelle 20a

Frequenzen CD 4

Kruskal-Wallis Test

	VH	N	Mean Rank
VP	1.00	9	21.50
	3.00	23	26.20
	4.00	6	27.08
	5.00	11	36.14
	6.00	5	25.80
	Total	54	
VPP	1.00	9	14.94
	3.00	23	28.52
	4.00	6	35.17
	5.00	11	36.23
	6.00	5	17.00
	Total	54	

Test Statistik: a) Kruskal-Wallis Test

b) Gruppierungsvariable: VH

Tabelle 20b

Variabele VP: Epidermis, VPP: Dermis

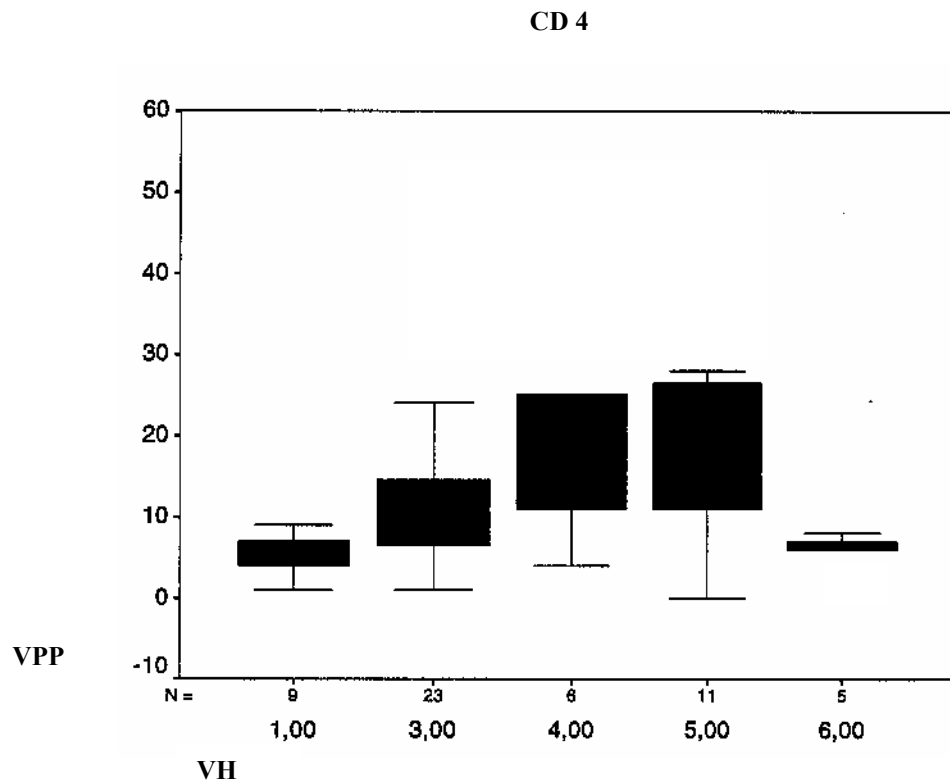
	VP	VPP
Chi-Square	4.937	12.910
df	4	4
Asymp. sig	0.294	0.012

CD 4

II) Boxplot

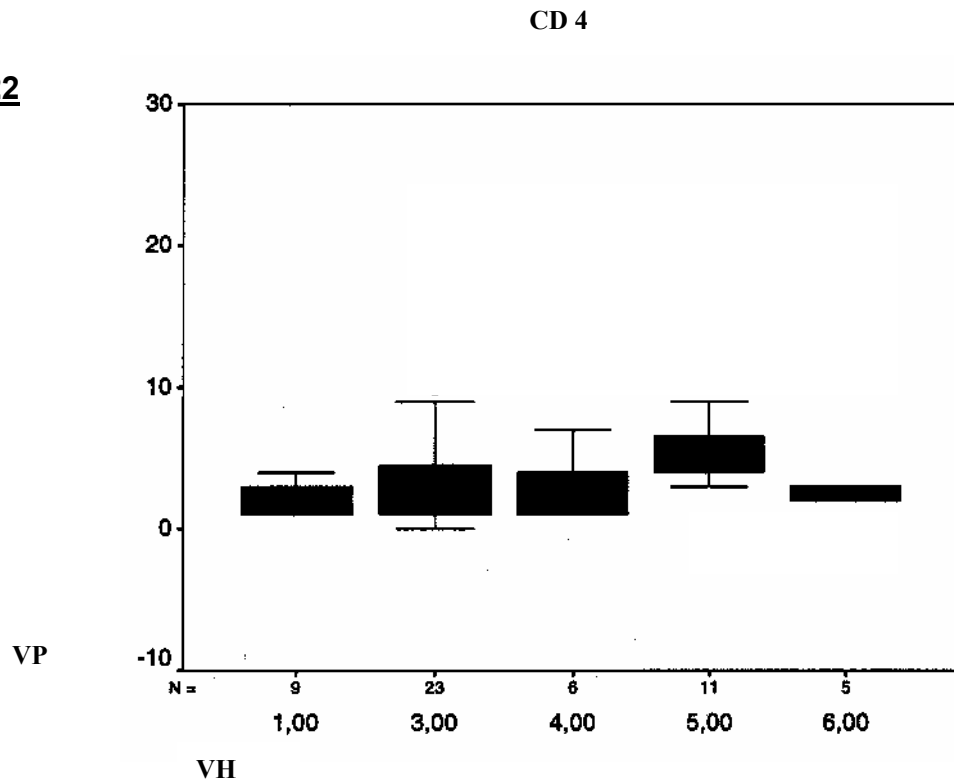
Dermis: In 3 von 5 Gruppen: akute GvHD (3), akute GvHD mit lichenoider Zeichnung (4) und sklerodermiforme GvHD (6) befindet sich der Median nicht im Zentrum des Kastens, die beobachteten Werte sind asymmetrisch verteilt. In der Gruppe (1) postinflammatorische Hyperpigmentierung, und Gruppe (5) chronisch lichenoider GvHD sind die beobachteten Werte annähernd symmetrisch verteilt. (Tabelle 21)

Tabelle 21



Epidermis: In allen Gruppen: postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), akute GvHD (3), akute GvHD mit lichenoider Zeichnung (4), lichenoider GvHD (5) und sklerodermiforme GvHD (6), sind die beobachteten Werte asymmetrisch verteilt. Die Gruppe (2) „Interface Dermatitis“ wurde aufgrund von Datenmangel nicht bearbeitet. (Tabelle 22)

Tabelle 22



III) Einzelvergleichstest

In der Dermis bestanden signifikante Unterschiede in der Anzahl CD4-positiv gefärbter Zellen im Vergleich von wenig positiven Zellen bei postinflammatorischer Hyperpigmentierung (1) und vielen Zellen bei akuter GvHD (3) (emp -13,57>krit 12,95), bei akuter GvHD mit lichenoider Symptomatik (4) (emp -20,22>krit 18,13) und bei chronisch lichenoider GvHD (5) (emp -21,28>krit 14,61). Ausserdem zeigten sich signifikante quantitative Unterschiede beim Vergleich von chronisch lichenoider GvHD (5) mit sklerodermiformer GvHD (6) (emp 19,22 > krit 17,53). In der Epidermis gab es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl CD4-positiv gefärbter Zellen in Schnitten mit verschiedenen histologischen Diagnosen.

(Tabelle 23 Epidermis, Tabelle 24 Dermis)

Tabelle 23

Einzelvergleiche vp-cd4

	emp	krit	
R1-R3	-4.696	12.9755543	<i>nicht signifikant</i>
R1-R4	-5.583	18.165776	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	-14.636	14.6383994	<i>nicht signifikant</i>
R1-R6	-4.3	18.165776	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	-0.687	16.2064621	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-9.94	12.1217464	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	0.396	16.2064621	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	-9.053	17.5680793	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	1.283	20.5980538	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	10.336	17.5660793	<i>nicht signifikant</i>

Tabelle 24

Einzelvergleiche vpp-cd4

	emp	krit	
R1-R3	-13.578	12.9561665	<i>signifikant</i>
R1-R4	-20.223	18.1386331	<i>signifikant</i>
R1-R5	-21.283	14.6165271	<i>signifikant</i>
R1-R6	-2.056	18.1386331	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	-6.645	16.1822468	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-7.705	12.1036343	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	11.522	16.1822468	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	-1.06	17.5398325	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	18.167	20.5672767	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	19.227	17.5398325	<i>signifikant</i>

CD 8

I) Kruskal-Wallis-Test

Insgesamt konnten 53 Biopsien für CD8 ausgewertet werden. Die durchschnittliche Anzahl der CD8-positiven Zellen in der Dermis und Epidermis ist bei den verschiedenen histologischen Diagnose nicht signifikant unterschiedlich. (Kruskal-Wallis-Test: Dermis $p=0,292$, Epidermis $p=0,149$).
(Tabellen 25 a+b)

Tabelle 25a

Frequenzen CD 8

Kruskal-Wallis Test

	VH	N	Mean Rank
VP	1.00	9	18.22
	3.00	22	28.30
	4.00	6	25.33
	5.00	11	34.86
	6.00	5	21.60
	Total	53	
VPP	1.00	9	21.17
	3.00	22	28.18
	4.00	6	28.17
	5.00	11	33.00
	6.00	5	17.70
	Total	53	

Test Statistik: a) Kruskal-Wallis Test

b) Gruppierungsvariable: VH

Tabelle 25b

Variabele VP: Epidermis, VPP: Dermis

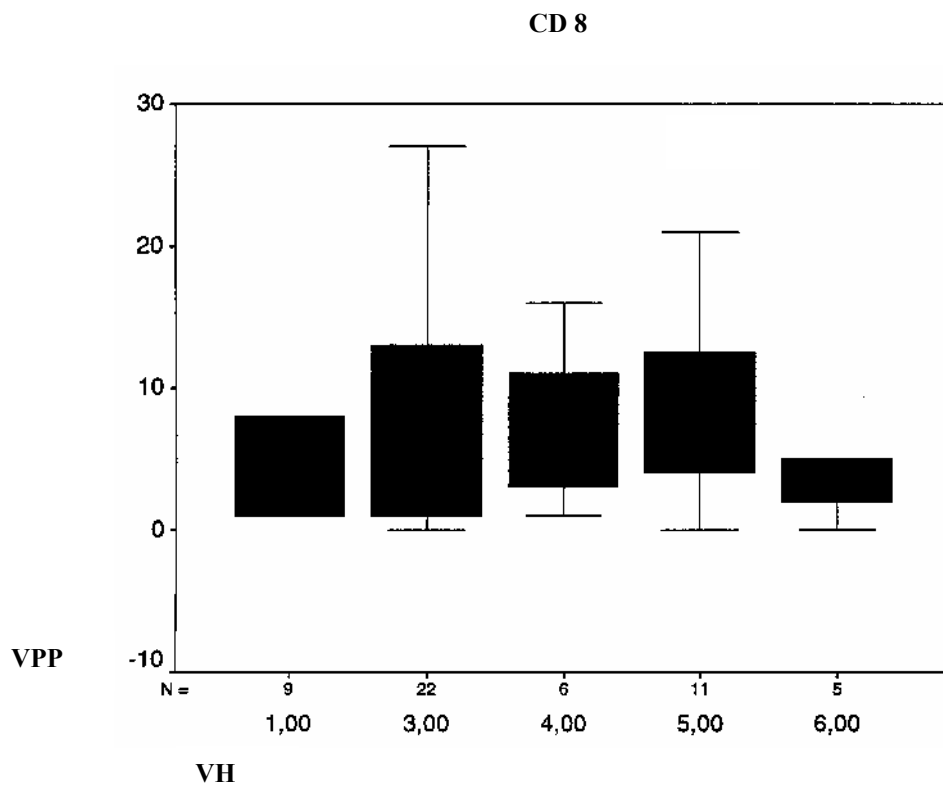
	VP	VPP
Chi-Square	6.756	4.958
df	4	4
Asymp. sig	0.149	0.292

CD 8

II) Boxplot-Test

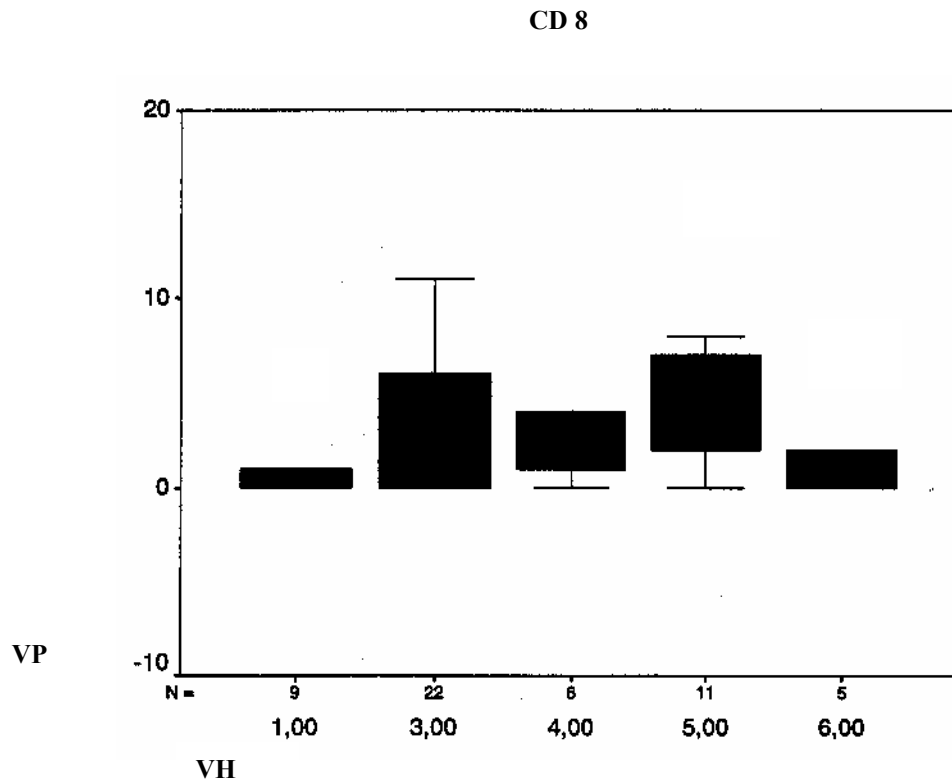
Dermis: In 4 von 5 Gruppen: postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), akuter GvHD mit lichenoider Zeichnung (4), lichenoider GvHD (5) und sklerodermiformer GvHD (6) befindet sich der Median nicht im Zentrum des Kastens, die beobachteten Werte sind asymmetrisch verteilt. In der Gruppe (3) aGvHD sind die beobachteten Werte annähernd symmetrisch verteilt. (Tabelle 26)

Tabelle 26



Epidermis: In 4 von 5 Gruppen: postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), akute GvHD (3), akute GvHD mit lichenoider Zeichnung (4) und sklerodermiforme GvHD (6) sind die beobachteten Werte asymmetrisch verteilt. Die beobachteten Werte der Gruppe (5) lichenoider GvHD sind annähernd symmetrisch verteilt. Die Gruppe (2) „Interface Dermatitis“ wurde aufgrund von Datenmangel nicht bearbeitet. (Tabelle 27)

Tabelle 27



CD 8

III) Einzelvergleichstest

In der Dermis bestanden keine signifikante Unterschiede in der Anzahl CD8-positiv gefärbter Zellen im Paarvergleich der verschiedenen Diagnosen. In der Epidermis gab es signifikante Unterschiede in der Anzahl CD8-positiv gefärbter Zellen beim Vergleich von postinflammatorischer Hyperpigmentierung (1) mit akuter GvHD (3) ($emp -16,64 > krit 14,67$). Alle anderen Paarvergleiche waren nicht signifikant verschieden. (**Tabelle 28 Epidermis, Tabelle 29 Dermis**)

Tabelle 28 Einzelvergleiche vp-cd8

	emp	krit	
R1-R3	-10.073	13.0051688	<i>nicht signifikant</i>
R1-R4	-7.111	18.2072364	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	-16.642	14.6718092	<i>signifikant</i>
R1-R6	-3.578	18.2072364	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	2.962	16.2434507	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-6.569	12.1494122	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	6.495	16.2434507	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	-9.531	17.606171	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	3.533	20.6450656	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	13.064	17.606171	<i>nicht signifikant</i>

Tabelle 29 Einzelvergleiche vpp-cd8

	emp	krit	
R1-R3	-7.015	13.0065285	<i>nicht signifikant</i>
R1-R4	-7	18.20914	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	-11.833	14.6733431	<i>nicht signifikant</i>
R1-R6	-3.467	18.20914	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	0.015	16.2451489	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-4.818	12.1506825	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	10.482	16.2451489	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	-4.833	17.6080118	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	10.467	20.647224	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	15.3	17.6080118	<i>nicht signifikant</i>

Granzyme B

I) Kruskal-Wallis-Test

Insgesamt konnten 49 Biopsien für Granzyme B ausgewertet werden. Die durchschnittliche Anzahl der Granzyme B-positiven Zellen in der Dermis und Epidermis ist bei den verschiedenen histologischen Diagnosen nicht signifikant unterschiedlich. (Kruskal-Wallis-Test: Dermis $p=0,071$, Epidermis $p=0,082$).

(Tabellen 30 a+b)

Tabelle 30a

Frequenzen Granzyme B

Kruskal-Wallis Test

	VH	N	Mean Rank
VP	1.00	9	14.06
	3.00	21	27.93
	4.00	4	32.38
	5.00	10	26.60
	6.00	5	23.30
	Total	49	
VPP	1.00	9	13.33
	3.00	21	26.88
	4.00	4	31.00
	5.00	10	30.15
	6.00	5	23.00
	Total	49	

Test Statistik: a) Kruskal-Wallis Test

b) Gruppierungsvariable: VH

Tabelle 30

Variabele VP: Epidermis, VPP: Dermis

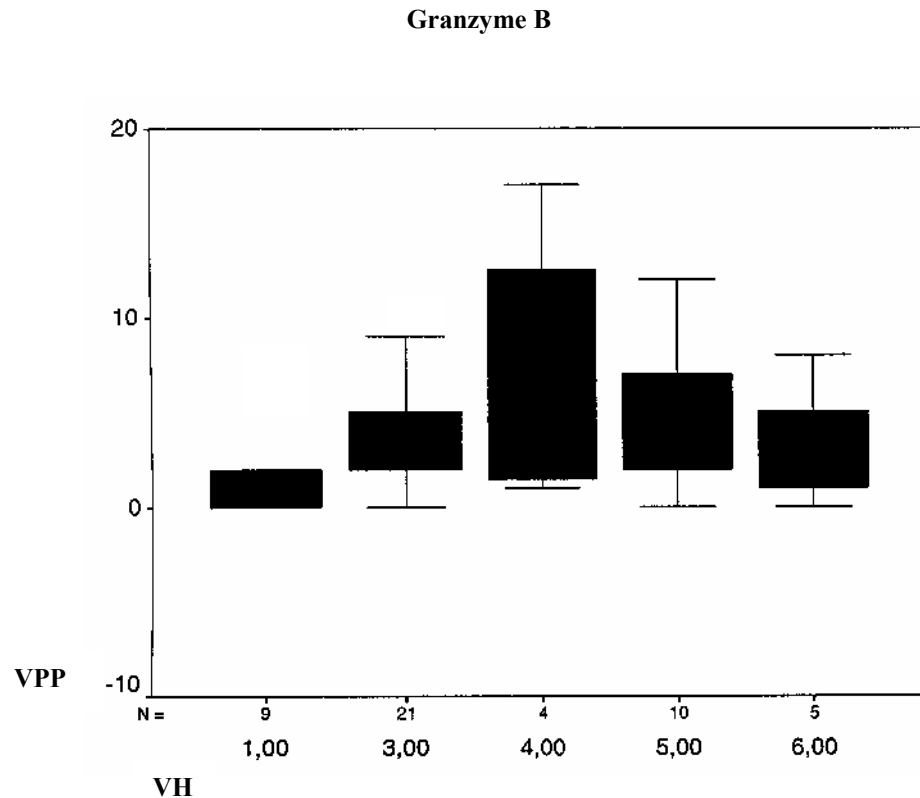
	VP	VPP
Chi-Square	8.263	8.645
df	4	4
Asymp. sig	0.082	0.071

Granzyme B

II) Boxplot-Test

Dermis: In 2 von 5 Gruppen: akute GvHD mit lichenoider Zeichnung (4) und sklerodermiforme GvHD (6) befindet sich der Median nicht im Zentrum des Kastens, die beobachteten Werte sind asymmetrisch verteilt. In den Gruppen (1) Postinflammatorische Hyperpigmentierung, (3) akute GvHD und (5) chronisch lichenoider GvHD sind die beobachteten Werte annähernd symmetrisch verteilt. (Tabelle 31)

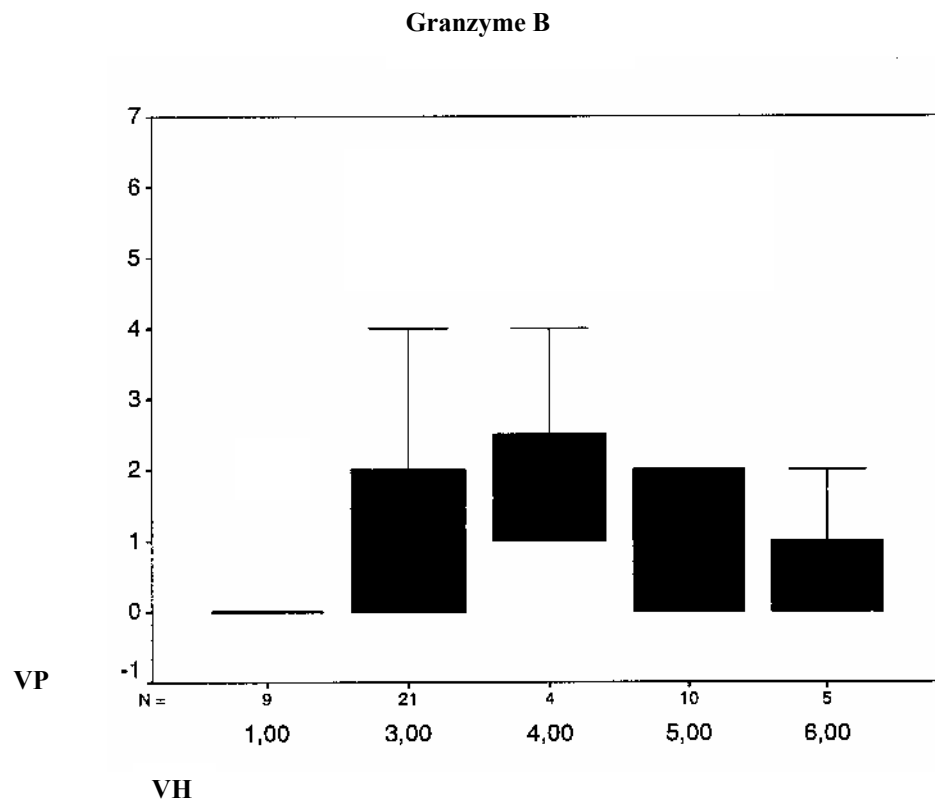
Tabelle 31



Epidermis: In 4 von 5 Gruppen: akute GvHD (3), aGvHD mit lichenoider Zeichnung (4), lichenoider GvHD (5) und sklerodermiforme GvHD (6) sind die beobachteten Werte asymmetrisch verteilt. Die beobachteten Werte der Gruppe (1) Postinflammatorische Hyperpigmentierung sind annähernd symmetrisch

verteilt. Die Gruppe (2) „Interface Dermatitis“ wurde aufgrund von Datenmangel nicht bearbeitet. (Tabelle 32)

Tabelle 32



Granzyme B

III) Einzelvergleichstest

In der Dermis fand sich eine signifikant höhere Anzahl Granzyme B-positiv gefärbter Zellen bei akuter GvHD (3) (emp $-13,54 > \text{krit } 13,14$) und chronischer lichenoider GvHD (5) (emp $-16,81 > \text{krit } 14,83$) im Vergleich mit postinflammatorischer Hyperpigmentierung (1). Alle anderen intradermalen Paarvergleiche waren nicht signifikant. In der Epidermis gab es ebenfalls signifikante Unterschiede in der Anzahl Granzyme B-positiv gefärbter Zellen beim Vergleich akute GvHD (3) (emp $-13,87 > \text{krit } 13,14$) mit postinflammatorischer Hyperpigmentierung (1). Alle anderen Paarvergleiche waren nicht signifikant verschieden.

(Tabelle 33 Epidermis, Tabelle 34 Dermis)

Tabelle 33

Einzelvergleiche Granzyme B

	emp	krit	
R1-R3	-13.873	13.1492827	<i>signifikant</i>
R1-R4	-16.319	18.4089957	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	-12.544	14.8343915	<i>nicht signifikant</i>
R1-R6	-9.244	18.4089957	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	-4.446	16.4234488	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	1.329	12.2840432	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	4.629	16.4234488	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	5.775	17.8012698	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	9.075	20.8738391	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	3.3	17.8012698	<i>nicht signifikant</i>

Tabelle 34

Einzelvergleiche vpp-Granzyme B

	emp	krit	
R1-R3	-13.548	13.1489224	<i>signifikant</i>
R1-R4	-17.667	18.4084914	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	-16.817	14.8339851	<i>signifikant</i>
R1-R6	-9.667	18.4084914	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	-4.119	16.4229988	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-3.269	12.2837067	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	3.881	16.4229988	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	0.85	17.8007821	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	8	20.8732672	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	7.15	17.8007821	<i>nicht signifikant</i>

Perforin

I) Kruskal-Wallis-Test

50 Biopsien für Perforin konnten ausgewertet werden. Die durchschnittliche Anzahl der Perforin-positiven Zellen in der Dermis und Epidermis ist bei den verschiedenen histologischen Diagnosen nicht signifikant unterschiedlich. (Kruskal-Wallis-Test: Dermis $p=0,570$, Epidermis $p=0,129$). (Tabellen 35 a+b)

Tabelle 35a

Frequenzen Perforin

Kruskal-Wallis Test

	VH	N	Mean Rank
VP	1.00	9	22.78
	3.00	20	21.35
	4.00	5	23.90
	5.00	11	34.64
	6.00	5	28.50
	Total	50	
VPP	1.00	9	20.17
	3.00	20	24.75
	4.00	5	27.00
	5.00	11	29.73
	6.00	5	27.30
	Total	50	

Test Statistik: a) Kruskal-Wallis Test

b) Gruppierungsvariable: VH

Tabelle 35b

Variabele VP: Epidermis, VPP: Dermis

	VP	VPP
Chi-Square	7.134	2.926
df	4	4
Asymp. sig	0.129	0.570

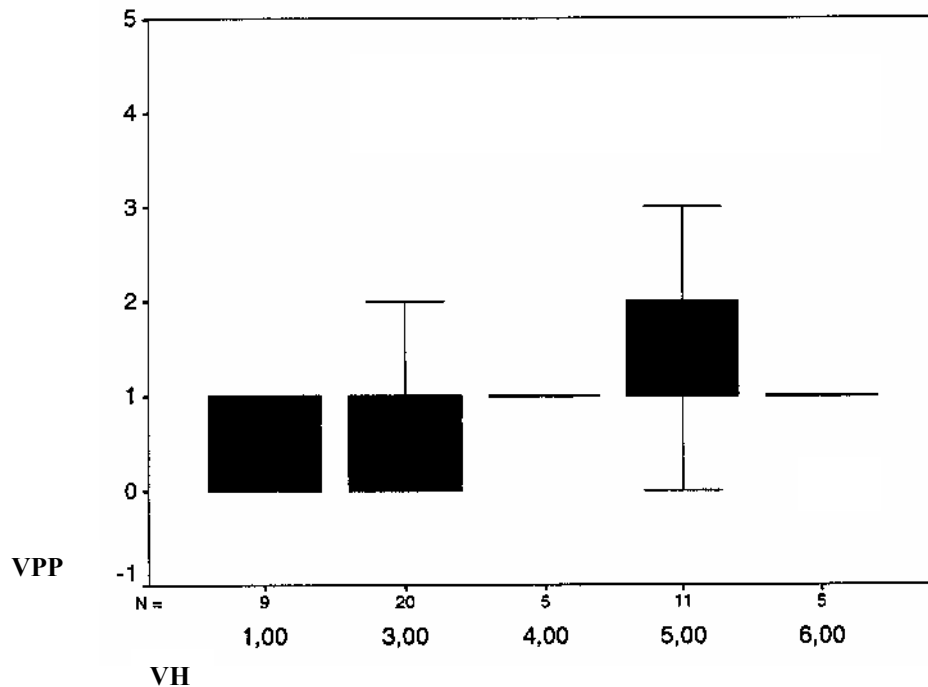
Perforin

II) Boxplot-Test

Dermis: In 4 von 5 Gruppen Postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), aGvHD (3), lichenoid GvHD (5) und sklerodermiforme GvHD (6) befindet sich der Median nicht im Zentrum des Kastens, die beobachteten Werte sind asymmetrisch verteilt. Die Werte der Gruppe aGvHD mit lichenoider Zeichnung (4) sind annähernd symmetrisch verteilt. (Tabelle 36)

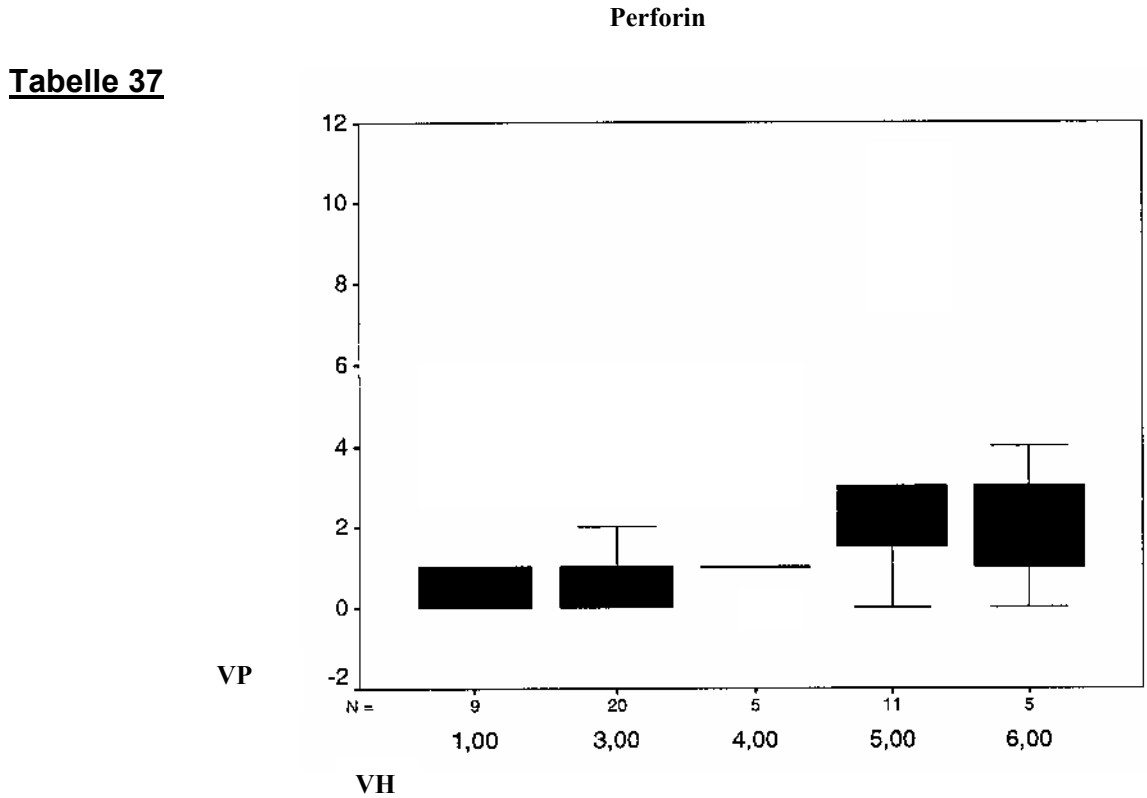
Perforin

Tabelle 36



Epidermis: In 3 von 5 Gruppen Postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), akute GvHD (3) und lichenoid GvHD (5) sind die beobachteten Werte asymmetrisch verteilt. Die beobachteten Werte der Gruppe (4) aGvHD mit lichenoider Symptomatik und der Gruppe (6) sklerodermiforme GvHD sind symmetrisch verteilt. Die Gruppe (2) „Interface Dermatitis“ wurde aufgrund von Datenmangel nicht bearbeitet.

(Tabelle 37)



Perforin

III) Einzelvergleichs-Test

Die Anzahl intradermaler Perforin-positiver Zellen unterschied sich nicht signifikant im Vergleich der verschiedenen Gruppen. Demzufolge gab es keine signifikanten quantitativen Unterschiede in der Perforin Ausprägung zwischen den verschiedenen histologischen Diagnosen. In der Epidermis gab es hingegen signifikante Unterschiede in der Anzahl Perforin-positiv gefärbter Zellen beim Vergleich von akuter GvHD (3) mit lichenoider GvHD (5) ($emp - 13,28 > krit 12,24$). Alle anderen Paarvergleiche waren nicht signifikant verschieden.

(Tabelle 38 Epidermis, Tabelle 39 Dermis)

Tabelle 38

Einzelvergleiche vp-Perforin

	emp	krit	
R1-R3	1.428	13.1087303	<i>nicht signifikant</i>
R1-R4	-1.122	18.3522224	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	-11.858	14.7886423	<i>nicht signifikant</i>
R1-R6	-5.722	18.3522224	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	-2.55	16.3727989	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-13.286	12.2461592	<i>signifikant</i>
R3-R6	-7.15	16.3727989	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	-10.736	17.7463707	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	-4.6	20.8094642	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	6.138	17.7463707	<i>nicht signifikant</i>

Tabelle 39

Einzelvergleiche vpp-Perforin

	emp	krit	
R1-R3	-4.583	13.1255453	<i>nicht signifikant</i>
R1-R4	-6.833	18.3757634	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	-9.56	14.8076121	<i>nicht signifikant</i>
R1-R6	-7.133	18.3757634	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	-2.25	16.3938008	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-4.977	12.2618678	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	-2.55	16.3938008	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	-2.727	17.7691345	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	-0.3	20.8361572	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	2.427	17.7691345	<i>nicht signifikant</i>

Fas

I) Kruskal-Wallis-Test

Insgesamt konnten 48 Biopsien für Fas ausgewertet werden. Die durchschnittliche Anzahl der Fas-positiven Zellen in der Dermis und Epidermis ist bei den verschiedenen histologischen Diagnosen nicht signifikant unterschiedlich. (Kruskal-Wallis-Test: Dermis $p=0,771$, Epidermis $p=0,771$). (Tabellen 40 a+b)

Tabelle 40a

Kruskal-Wallis Test **Frequenzen Fas**

	VH	N	Mean Rank
VP	1.00	9	27.83
	3.00	21	23.79
	4.00	3	22.17
	5.00	10	26.35
	6.00	5	19.20
	Total	48	
VPP	1.00	9	26.56
	3.00	21	24.31
	4.00	3	16.83
	5.00	10	26.35
	6.00	5	22.50
	Total	48	

Test Statistik: a) Kruskal-Wallis Test

b) Gruppierungsvariable: VH

Tabelle 40b

Variabele VP: Epidermis, VPP: Dermis

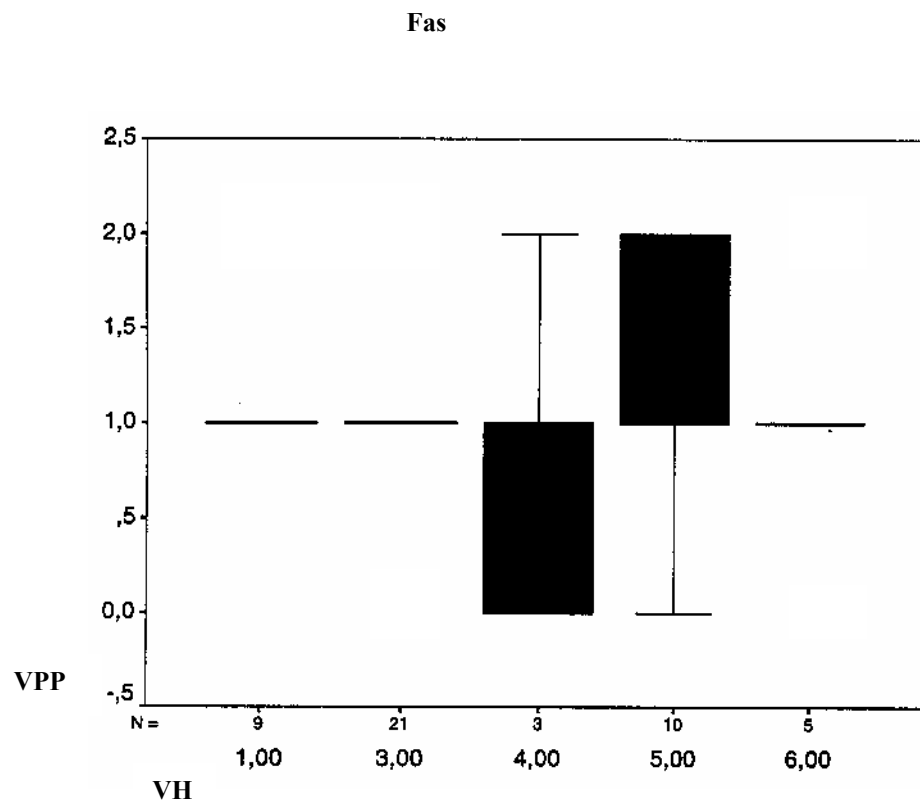
	VP	VPP
Chi-Square	1.808	1.806
df	4	4
Asymp. sig	0.771	0.771

Fas

II) Boxplot-Test

Dermis: In 3 von 5 Gruppen: Postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), aGvHD (3) und aGvHD mit lichenoider Symptomatik (4) befindet sich der Median nicht im Zentrum des Kastens, die beobachteten Werte sind asymmetrisch verteilt. Die Werte der Gruppen (5) lichenoider GvHD und (6) sklerodermiforme GvHD sind annähernd symmetrisch verteilt. (Tabelle 41)

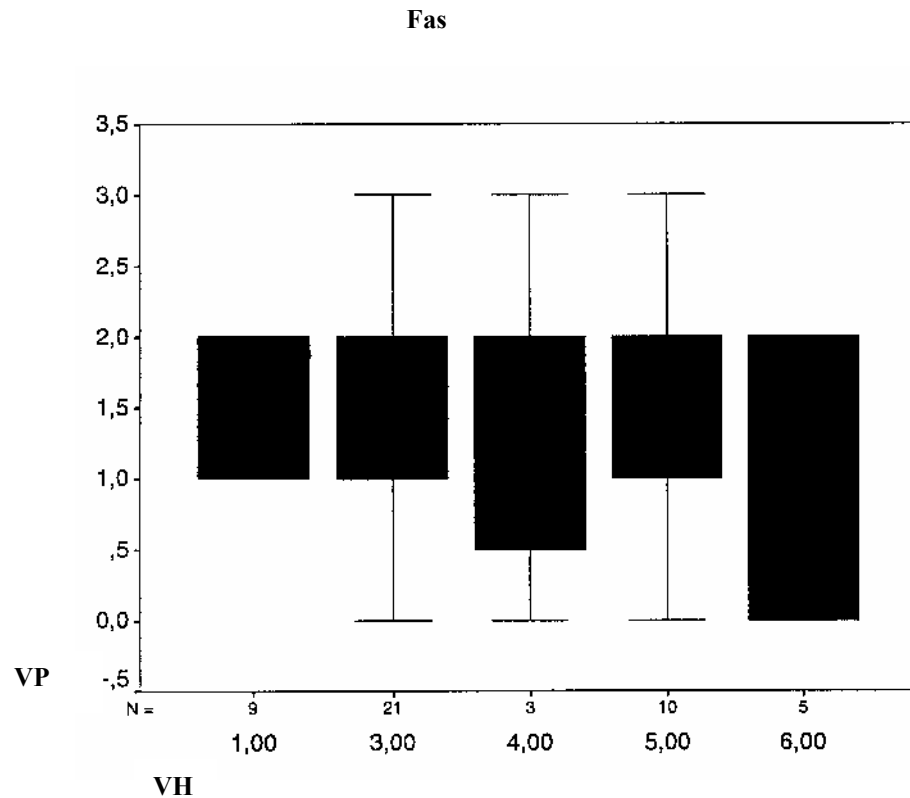
Tabelle 41



Epidermis: In 2 von 5 Gruppen akute GvHD mit lichenoider Symptomatik (4) und chronisch lichenoider GvHD (5) sind die beobachteten Werte asymmetrisch verteilt. Die beobachteten Werte der Gruppe (1) Postinflammatorische Hyperpigmentierung, (3) aGvHD und (6) sklerodermiforme GvHD sind symmetrisch verteilt. Die Gruppe (2) „Interface Dermatitis“ wurde aufgrund von Datenmangel nicht bearbeitet.

(Tabelle 42)

Tabelle 42



Fas

III) Einzelvergleichstest

Weder in der Dermis noch in der Epidermis gab es signifikante Unterschiede in der Anzahl Fas-positiv gefärbter Zellen beim Vergleich der verschiedenen histologischen Diagnosen. (**Tabelle 43 Epidermis, Tabelle 44 Dermis**)

Tabelle 43 Einzelvergleiche vp-fas

	emp	krit	
R1-R3	4.047	13.2097213	<i>nicht signifikant</i>
R1-R4	5.666	18.4936098	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	1.483	14.9025755	<i>nicht signifikant</i>
R1-R6	8.633	18.4936098	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	1.619	16.4989366	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-2.564	12.3405049	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	4.586	16.4989366	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	-4.183	17.8830906	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	2.967	20.9697825	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	7.15	17.8830906	<i>nicht signifikant</i>

Tabelle 44 Einzelvergleiche vpp-fas

	emp	krit	
R1-R3	2.246	13.2036225	<i>nicht signifikant</i>
R1-R4	9.723	18.4850715	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	0.206	14.8956951	<i>nicht signifikant</i>
R1-R6	4.056	18.4850715	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	7.477	16.4913192	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	-2.04	12.3348074	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	1.81	16.4913192	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	-9.517	17.8748341	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	-5.667	20.9601009	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	3.85	17.8748341	<i>nicht signifikant</i>

Fas-L

I) Kruskal-Wallis-Test

Insgesamt konnten 48 Biopsien für Fas-L ausgewertet werden. Die durchschnittliche Anzahl der Fas-L-positiven Zellen in der Dermis und Epidermis ist bei den verschiedenen histologischen Diagnose signifikant unterschiedlich. (Kruskal-Wallis-Test: Dermis $p=0,016$, Epidermis $p=0,008$). (Tabellen 45 a+b)

Tabelle 45a

Frequenzen Fas-L

Kruskal-Wallis Test

	VH	N	Mean Rank
VP	1.00	9	14.50
	3.00	21	30.98
	4.00	3	34.00
	5.00	10	21.65
	6.00	5	15.30
	Total	48	
VPP	1.00	9	13.39
	3.00	21	28.19
	4.00	3	31.00
	5.00	10	26.80
	6.00	5	20.50
	Total	48	

Test Statistik: a) Kruskal-Wallis Test

b) Gruppierungsvariable: VH

Tabelle 45b)

Variabele VP: Epidermis, VPP: Dermis

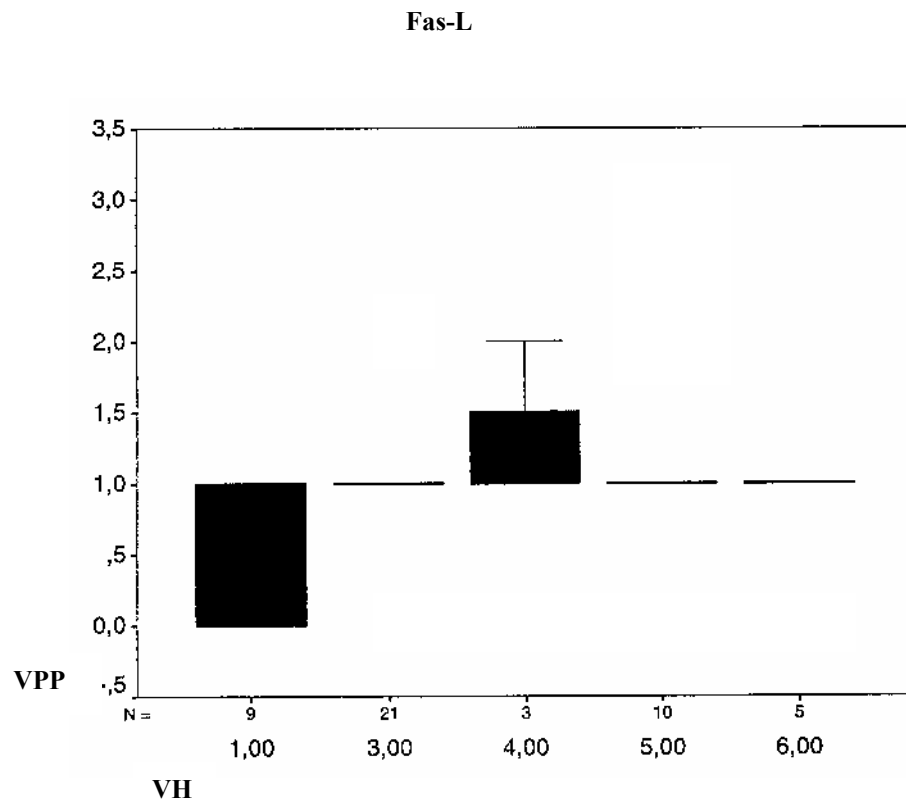
	VP	VPP
Chi-Square	13.800	12.140
df	4	4
Asymp. sig	0.008	0.016

Fas-L

II) Boxplot-Test

Dermis: In 3 von 5 Gruppen: Postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), akute GvHD mit lichenoider Symptomatik (4) und sklerodermiforme GvHD (6) befindet sich der Median nicht im Zentrum des Kastens, die beobachteten Werte sind asymmetrisch verteilt. Die Werte der Gruppe akute GvHD (3) und lichenoider GvHD (5) sind annähernd symmetrisch verteilt. (Tabelle 46)

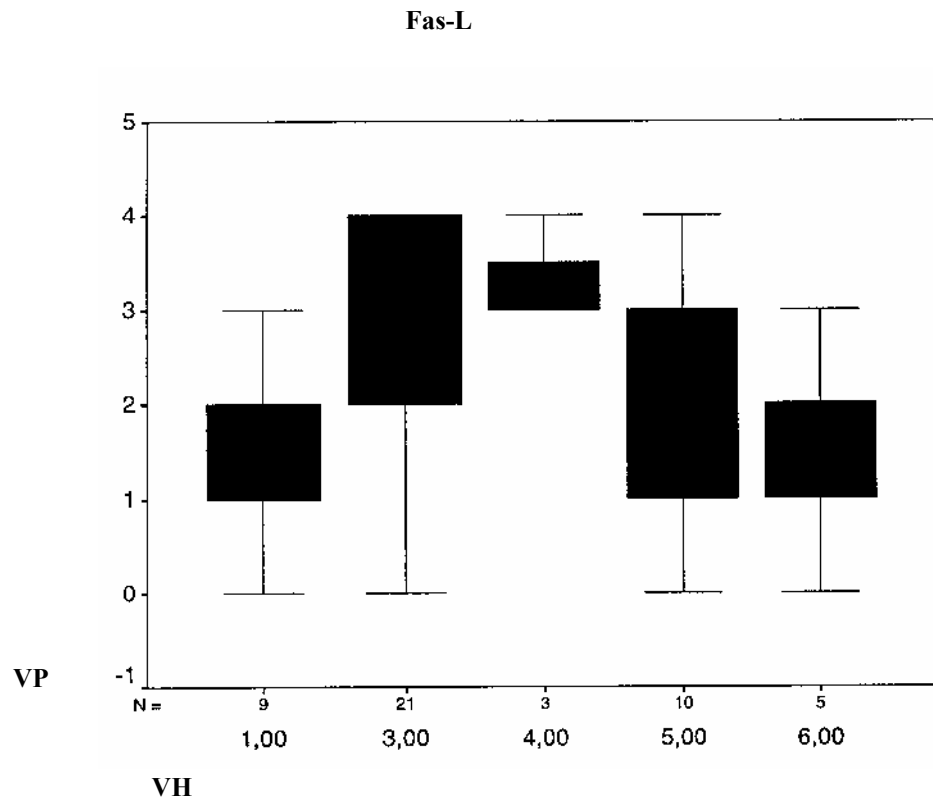
Tabelle 46



Epidermis: In 2 von 5 Gruppen Postinflammatorische Hyperpigmentierung (1), akute GvHD mit lichenoider Symptomatik (4) sind die beobachteten Werte asymmetrisch verteilt. Die beobachteten Werte der Gruppe (3) akute GvHD, (5) lichenoider GvHD und der Gruppe (6) sklerodermiforme GvHD sind symmetrisch verteilt. Die Gruppe (2) „Interface Dermatitis“ wurde aufgrund von Datenmangel nicht bearbeitet.

(Tabelle 47)

Tabelle 47



Fas-L

III) Einzelpaarvergleichstest

In der Dermis bestanden signifikanten Unterschiede in der Anzahl Fas-L-positiv gefärbter Zellen im Vergleich akute GvHD (3) mit Postinflammatorischer Hyperpigmentierung (emp -14,80>krit 13,18). Ebenso fanden sich in der Epidermis signifikante Unterschiede in der Anzahl Fas-L-positiv gefärbter Zellen bei Vergleich von akuter GvHD (3) (emp -16,46>krit 13,15) und akuter GvHD mit lichenoider Symptomatik (4) (emp -19,5>krit 18,42) mit Postinflammatorischer Hyperpigmentierung (1). Alle anderen Paarvergleiche waren nicht signifikant verschieden. (**Tabelle 48 Epidermis, Tabelle 49 Dermis**)

Tabelle 48 Einzelvergleiche vp-fas-L

	emp	krit	
R1-R3	-16.476	13.1593773	<i>signifikant</i>
R1-R4	-19.5	18.4231282	<i>signifikant</i>
R1-R5	-7.15	14.8457798	<i>nicht signifikant</i>
R1-R6	-0.8	18.4231282	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	-3.024	16.436057	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	9.326	12.2934736	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	15.676	16.436057	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	12.35	17.8149358	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	18.7	20.8898639	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	6.35	17.8149358	<i>nicht signifikant</i>

Tabelle 49 Einzelvergleiche vpp-fas-L

	emp	krit	
R1-R3	-14.801	13.1808176	<i>signifikant</i>
R1-R4	-17.611	18.4531446	<i>nicht signifikant</i>
R1-R5	-13.411	14.8699677	<i>nicht signifikant</i>
R1-R6	-7.111	18.4531446	<i>nicht signifikant</i>
R3-R4	-2.81	16.4628359	<i>nicht signifikant</i>
R3-R5	1.39	12.3135031	<i>nicht signifikant</i>
R3-R6	7.69	16.4628359	<i>nicht signifikant</i>
R4-R5	4.2	17.8439612	<i>nicht signifikant</i>
R4-R6	10.5	20.9238992	<i>nicht signifikant</i>
R5-R6	6.3	17.8439612	<i>nicht signifikant</i>

3.3.2. Zusammenfassung der immunpathologischen Ergebnisse

Die geringste Anzahl CD2-positiver, CD3-positiver, CD4-positiver, CD8-positiver, Perforin-positiver, Granzyme B-positiver oder Fas-L-positiver epidermaler oder dermaler Zellen war ausnahmslos bei den Diagnosen der postinflammatorischen Hyperpigmentierung sowie der sklerodermiformen GvHD festzustellen. Ausnahmen stellen die akute GvHD mit der geringsten Anzahl Perforin-positiver dermaler Zellen sowie die akute GvHD mit lichenoidem Muster mit der geringsten Anzahl epidermaler Fas-positiver Zellen dar.

Umgekehrt waren die höchsten Zahlen CD2-positiver, CD3-positiver, CD4-positiver, CD8-positiver, Perforin-positiver, Granzyme B-positiver oder Fas-L-positiver epidermaler oder dermaler Zellen bei den Diagnosen lichenoider und akuter GvHD mit lichenoidem Muster sowie - in etwas geringerem Ausmass - bei der akuten GvHD festzustellen. Die Unterschiede waren jedoch für keinen immunhistochemischen Marker signifikant. Die signifikanten Unterschiede ergaben sich lediglich beim Vergleich der einzelnen Diagnosen mit den Diagnosen der postinflammatorischen Hyperpigmentierung und der sklerodermiformen GvHD. Interessanterweise gab es für die Anzahl Fas-positiver Zellen weder in der Epidermis noch in der Dermis bei keiner der fünf definierten Diagnosen signifikante Unterschiede. Auch für CD8-positiv und für Perforin-positiv intraepidermale Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede.

Die höchste Anzahl CD2-positiver intraepidermaler T-Lymphozyten fand sich bei der lichenoiden GvHD, in etwas geringerem Ausmass bei der akuten und bei der akuten GvHD mit lichenoidem Muster. Die höchste Anzahl dermaler CD2-positiver Zellen fand sich bei der akuten GvHD, etwas weniger bei der lichenoiden und der akuten GvHD mit lichenoidem Muster.

Die höchste Anzahl CD3-positiver intraepidermaler und dermaler T-Lymphozyten fand sich bei der akuten GvHD mit lichenoidem Muster, etwas geringere Zahlen wiesen die CD3-positiven T-Lymphozyten bei der akuten und

bei der lichenoiden GvHD auf. Die höchste Anzahl CD4-positiver intraepidermaler T-Lymphozyten fand sich bei der lichenoiden und bei der akuten GvHD mit lichenoidem Muster. Etwas weniger CD4-positive Zellen in der Epidermis bei der akuten GvHD. Die höchste Anzahl dermalen CD4-positiver Zellen fand sich ebenfalls bei der lichenoiden GvHD, und etwas weniger CD4-positive Zellen waren im dermalen Infiltrat der akuten GvHD mit lichenoidem Muster, der akuten, aber auch der sklerodermiformen GvHD zu beobachten.

Die höchste Anzahl CD8-positiver intraepidermaler aber auch dermalen Zellen fand sich bei der lichenoiden GvHD, etwas weniger bei der akuten und bei der akuten GvHD mit lichenoidem Muster.

Die höchste Anzahl Granzyme B-positiver intraepidermaler und auch dermalen Zellen fand sich bei der akuten GvHD mit lichenoidem Muster. Latent weniger Granzyme B-positive Zellen waren in der Epidermis und Dermis der akuten und der lichenoiden GvHD festzustellen.

Die höchste Anzahl Perforin-positiver intraepidermaler aber auch dermalen Zellen fand sich wiederum bei der lichenoiden GvHD, ähnlich wie bei der Verteilung der intraepidermalen CD2-positiven und der CD8-positiven T-Lymphozyten. Etwas weniger Perforin-positive Zellen - allerdings statistisch nicht wesentlich weniger - waren sowohl in der Epidermis als auch Dermis der sklerodermiformen und der akuten GvHD mit lichenoidem Muster festzustellen.

Die höchste Anzahl Fas-positiver Zellen in der Epidermis war sowohl bei der postinflammatorischen Hyperpigmentierung als auch bei der lichenoiden GvHD zu beobachten. Die Anzahl Fas-positiver Zellen war geringer in der akuten GvHD, etwas weniger bei der sklerodermiformen GvHD und am geringsten bei der akuten GvHD mit lichenoidem Muster. Die Zahlen der Fas-positiven Zellen verhielten sich in der Dermis zu den Diagnosen ähnlich wie die der epidermalen Zellen. Die zahlenmässigen Unterschiede waren jedoch statistisch für keine der definierten Diagnosen signifikant.

Die höchste Anzahl Fas-L-positiver Zellen fand sich sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis bei der akuten GvHD mit lichenoidem Muster. Die Anzahl Fas-L-positiver Zellen war geringer in der akuten GvHD, und etwas weniger bei der lichenoiden GvHD.

4. Diskussion

Die GvHD ist eine Hauptkomplikation nach allogener Stammzelltransplantation, die den Behandlungserfolg erheblich beeinträchtigen kann. Um rasch eine Entscheidung treffen zu können, ob eine immunsuppressive Therapie notwendig ist, sind die Veränderungen in den Zielorganen klinisch und histopathologisch zu beurteilen. Da die Hautveränderungen im Rahmen der GvHD leicht für eine Biopsie zugänglich sind, werden seit Jahren die Wertigkeiten histologischer Parameter zur Sicherung der Diagnose vor allem der akuten GvHD diskutiert [Lerner et al., 1974 (100); Sale et al., 1977(140); Horn et al., 1997 (77)]. Darüber hinaus wird versucht, immunpathologische Kriterien zu etablieren um die Diagnostik zu untermauern.

Im untersuchten Patientenkollektiv waren die am häufigsten beobachteten histopathologischen Muster kutaner GvHD akute und chronisch-lichenoide Formen. Eine akute kutane GvHD wurde bei fast allen Patienten mit akuten Leukämien (AML und ALL) und allen Patienten mit anderen Grunderkrankungen (SAA, NHL, MDS, MM) festgestellt, aber nur bei knapp der Hälfte der Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß das zeitliche Auftreten und das morphologische Erscheinungsbild einer GvHD durch die Grunderkrankungen mit entsprechenden Vortherapien und unterschiedliche Konditionierungen beeinflusst oder zumindest modifiziert wird. Dabei dürfte die fraktionierte Ganzkörperbestrahlung (fTBI) eine wesentliche Rolle spielen.

7/8 Patienten mit akuten Leukämien und 5/6 Patienten mit anderen Grunderkrankungen, aber nur 2/13 Patienten mit CML hatten 13.2 Gy fTBI erhalten, während die meisten Patienten mit CML mit 12.0 Gy bestrahlt worden waren. Es ist bekannt, daß hochdosierte Gammastrahlung im Rahmen der Konditionierung Epithelzelldyskeratosen induziert und bis etwa zum Tag +20 das Bild einer akuten GvHD imitieren kann [Darmstadt et al., 1992 (34)]. In vitro konnte aber auch gezeigt werden, daß durch die Konditionierungsmaßnahmen wie ionisierende Strahlung, verstärkt durch bakterielles Endotoxin (LPS),

zytopathische Effekte wie Induktion von Apoptose über den Rezeptor für Tumornekrosefaktor alpha (TNF alpha, TNF-RI) initiiert werden [Eissner et al., 1995 (44)]. Darüber hinaus gibt es Hinweise in vivo, daß durch fTBI Effekte vorangegangener zytotoxischer Therapien verstärkt und damit die Suszeptibilität für Apoptoseinduktion erhöht wird [Delic et al., 1995 (37)]. In diesem „Circulus vitiosus“ von toxischen, zytopathischen Konditionierungseffekten und zytokinvermittelten Schäden werden weiterhin Aktivierungsmoleküle wie das „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) induziert [Behrends et al., 1994 (13)], welches für die antigenunspezifische Interaktion mit Leukozyten verantwortlich ist. Es erscheint daher verständlich, daß bei stärkeren toxischen Einflüssen, wie bei höher dosierter fTBI und damit bei akuten Leukämien, aber beispielsweise auch bei NHL und SAA, eine höhere Inzidenz von akuter GvHD zu beobachten ist.

Bei 5/13 Patienten mit CML und bei einem Patienten mit SAA, aber bei keinem Patienten mit akuter Leukämie fand sich zusätzlich zu den epidermalen Veränderungen der akuten GvHD ein lymphohistiozytäres Infiltrat an der DEJ (lichenoides Muster), und damit eine „frühe“ chronisch-lichenoide GvHD [Horn et al., 1997 (77)]. Auch die chronisch-lichenoide GvHD, welche um den Tag +100 sowohl im Anschluß an eine akute GvHD („progressive onset“) als auch in Form eines „quiescent onset“ oder „de novo“ auftreten kann, war bei Patienten mit CML auffallend gehäuft. Diese Beobachtung könnte damit zu erklären sein, daß einerseits eine geringere Toxizität der Vorbehandlung bzw. der Konditionierungsmaßnahmen bei diesen Patienten die Ausprägung einer durch CD3+, CD4+ und/oder CD8+T Lymphozyten Entzündungsreaktion in situ begünstigt hat. Andererseits haben alle Patienten mit AML oder ALL, die in unserer Studie untersucht worden waren, Kortikosteroide bis zu 6mg/kg KG erhalten, wodurch möglicherweise die Entwicklung einer akut-lichenoiden und einer chronisch-lichenoiden GvHD gerade bei diesen Patienten hinausgezögert wurde. Es erscheint auch denkbar, daß unterschiedliche miHA in einem weniger toxisch geschädigten „Mikroenvironment“ besser präsentiert und/oder von Effektorzellen erkannt werden können. Obwohl die hämatopoetischen Stammzellen der Spender phänotypisch und funktionell als normal einzustufen

sind, ist es vorstellbar, daß im Gewebe verbliebene Abkömmlinge der Stammzellen der Empfänger („resident cells“) an der Induktion oder der Auslösung einer GvHR beteiligt sind [Shlomchik et al., 1999 (152)].

Horn et al. (77) konnten in ihrer Studie zeigen, daß Morbidiät und Mortalität bei den Patienten mit akuter GvHD und lichenoidem Muster signifikant höher war, als bei den anderen Patienten. Bedingt durch die geringe Fallzahl, kann darüber in der von uns durchgeführten Studie derzeit keine Aussage gemacht werden. Die Auswertung eines größeren Patientenkollektivs nach den Parametern Grunderkrankung bzw. Konditionierung und Langzeitverlauf ist derzeit im Gang. Möglicherweise spielen auch höhere Zellzahlen in der Knochenmark- bzw. Stammzellspende eine Rolle, eventuell auch der Zeitpunkt des Auftretens des hämatologischen „Engraftments“. Diese klinischen Informationen werden bei den Analysen eines größeren Patientenkollektivs berücksichtigt werden.

Eine sklerodermiforme GvHD wurde bei insgesamt 5 von 27 Patienten beobachtet, bei 1/13 Patienten mit CML, bei 2/8 Patienten mit AML/ALL und bei 2/6 Patienten mit anderen Grunderkrankungen. 4 Patienten hatten vorher eine akute GvHD, 1 Patient eine lichenoider GvHD. Im Rahmen einer akuten und einer chronisch-lichenoiden GvHD werden T-Lymphozyten des Spenders als Effektorzellen in die Haut als eines der Zielorgane rekrutiert. Dadurch wird auch im Zielorgan Haut der Zustand des gemischten (Mikro-)Chimärismus etabliert, der bereits mehrfach auch für die Entstehung der idiopathischen Sklerodermie verantwortlich gemacht wurde [Artlett et al., 1998 (7)]. Ungeklärt bleibt allerdings, warum nicht alle Patienten mit akuter oder lichenoider GvHD eine sklerodermiforme GvHD entwickeln. Es ist jedoch zu bedenken, daß vermutlich ähnlich wie bei den idiopathischen Formen ein bestimmter immungenetischer Hintergrund vorhanden sein muß, um die Ausprägung des Krankheitsbildes zu ermöglichen. So ist es denkbar, daß Polymorphismen in Zytokin- oder Chemokinallelen, beispielsweise für „transforming growth factor beta“ (TGF- β), die Freisetzung des Proteins und damit die Entstehung sklerodermiformer Veränderungen, beispielsweise analog zur Entstehung fibrotischer Lungenerkrankungen, begünstigen [Awad et al., 1998 (8)].

Die geringsten Zahlen immunhistochemisch reaktiver Entzündungszellen in Epidermis und Dermis waren bei den Diagnosen postinflammatorische Hyperpigmentierung und sklerodermiforme GvHD festzustellen. Dies überrascht insofern nicht, als beide histopathologischen Reaktionsmuster als zellarm einzustufen sind. Interessant ist hingegen, daß sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Zahlen CD2-negativer, CD3-negativer, CD4-negativer, CD8-negativer, Perforin-negativer, Granzyme B-negativer oder FasL-positiver epidermaler und dermaler Zellen bei Vergleich der Diagnosen akute GvHD, akute GvHD mit lichenoidem Muster und lichenoider GvHD finden. Lediglich Fas-positive Zellen sind bei postinflammatorischer Hyperpigmentierung zahlenmäßig am reichlichsten vorhanden, sowohl intraepidermal als auch dermal.

Es fallen jedoch phänotypische Unterschiede bei den T-Zellpopulationen auf. So finden sich die höchsten Zahlen CD3-positiver und Granzyme B-positiver Zellen bei der akuten GvHD mit lichenoidem Entzündungsmuster (die zeitlich früher beobachtet wird als die chronisch-lichenoider GvHD). Da neben dem lichenoiden Infiltrat an der DEJ doch deutliche epidermale Veränderungen wie Basalzellvakuolisierung und Einzelzelldyskeratosen / Apoptosen zu beobachten sind, könnte dies für eine ausgeprägte Zytotoxizität dieser T-Lymphozytenpopulation sprechen. So wurden beispielsweise bei einem Neugeborenen mit Immunmangelsyndrom CD3-positiv / CD4-negativ / CD8-negativ T-Zellen („double negative T cells“) sowohl im peripheren Blut als auch in kutanen Läsionen einer GvHD nach maternofetalem Transfer immunkompetenter T Lymphozyten beobachtet [Wirt et al., 1989 (198)]. Es ist vorstellbar, daß die in unmittelbarer Nachbarschaft mit dyskeratotischen Keratinozyten benachbarten Satellitenzellen zum Beispiel diesen Phänotyp aufweisen. Bei der chronisch-lichenoiden GvHD finden sich mehr CD2-positiv, CD4-positiv, CD8-positiv und Perforin-positiv Zellen. Ob diese T-Lymphozyten tatsächlich ein geringeres zytotoxisches Potential aufweisen wird nur in funktionellen Untersuchungen zu klären sein. Bisher wurden sowohl CD4-positiv als auch CD8-positiv T-Lymphozyten in den kutanen Infiltraten

beschrieben [Lampert et al., 1982 (95); Gomes et al., 1982 (62); Sloane et al., 1984 (156); Volc-Platzer et al., 1988 (186); Paller et al., 1988 (129)]. Möglicherweise sind die im Gewebe nachweisbaren CD8-positiven Effektorzellen jene, die spezifisch miHA-Unterschiede erkennen, die über Klasse-I-Alloantigene präsentiert werden [Mutis et al., 1999 (115)]. Für den tatsächlichen Nachweis spezifischer Zellen in situ könnten heute bereits Tetramere eingesetzt werden [Skinner et al., 2000 (155)].

Schwieriger gestaltet sich die Zuordnung der CD4-positiven Zellen. Einerseits dürfte es sich um T-Helfer Lymphozyten handeln, vermutlich Th1-Zellen [Romagnani et al., 1997 (137)]. So konnten im Tiermodell CD4-positive / CD8-negative / CD3-negative Lymphozyten als Effektorzellen identifiziert werden [Sakamoto et al., 1991 (139)]. Andererseits ist die Möglichkeit nicht vollständig auszuschließen, daß es sich zumindest teilweise um Zellen der myelomonozytären Reihe handelt, wie dermale monozytäre Zellen, welche die zugrundegegangenen epidermalen Langerhanszellen ersetzen [Volc-Platzer et al., 1984 (184); Perreault et al., 1984 (132); Murphy et al., 1985 (117)]. Auch in diesem Fall wären Doppelfärbungen mit linienspezifischen Markern erforderlich, um die Zuordnung exakt zu klären. Interessant im Hinblick auf die Pathogenese der sklerodermiformen GvHD ist die Beobachtung, daß bei dieser Verlaufsform der GvHD statistisch nicht weniger Perforin-positive Zellen in Epidermis und Dermis festzustellen waren als bei den anderen histopathologischen Varianten. Durch die Färbung mit dem monoklonalen Antikörper Fas/Apo-1 (Klon UB2; Immunotech, Marseille) wird die ubiquitäre Expression des Todesrezeptors erfasst. Fas wird, ebenso wie TNF-RI und TRAIL-Rezeptoren, von Keratinozyten exprimiert. Immunhistochemisch wurde Fas bisher an der Membran basaler und suprabasaler Keratinozyten in normaler Epidermis lokalisiert [Leithauser et al., 1993 (98); Oishi et al., 1994 (125); Sayama et al., 1994 (142); Matsue et al., 1995 (110)]. Dies bedeutet, daß nicht nur lymphomonozytäre Zellen im Rahmen von Entzündungsreaktionen, sondern daß vor allem „resident cells“ wie Keratinozyten oder Endothelzellen dargestellt werden. Die differenzierte Interpretation der Färbeergebnisse ist daher fallweise schwierig.

Die höchste Anzahl Fas-positiver Zellen in der Epidermis war bei der postinflammatorischen Hyperpigmentierung zu beobachten. In normaler Haut exprimieren basale und suprabasale Keratinozyten Fas Moleküle an der Zelloberfläche [Matsue et al., 1995 (110); Berthou et al., 1997 (14)]. Dies steht jedoch nicht im Widerspruch zu der Beobachtung, daß die geringsten Zahlen Fas-positiver Zellen bei „akuter GvHD“, bei „sklerodermiformer GvHD“ und bei „akuter GvHD mit lichenoidem Muster“ beobachtet wurden. Durch die Vakuolisierung der Basalzellen der Epidermis nimmt offenbar die Dichte der an der Zelloberfläche exprimierten Fas-Moleküle ab, möglicherweise auch durch negative Regulationsmechanismen. Dies könnte die geringe Anzahl Fas-positiver Zellen bei akuter GvHD erklären. Allerdings gibt es neuerdings auch experimentelle Hinweise, daß eine defiziente Fas-Expression mit einem höheren Risiko bzw. einem höheren Schweregrad einer akuten GvHD, insbesondere in der Haut, assoziiert ist [van den Brink et al., 2000 (181)]. In vitro Untersuchungen, die dieses Phänomen erklären könnten, fehlen derzeit. Bei der sklerodermiformen GvHD ist die Epidermis atroph, wodurch die Zahl der Fas-exprimierenden Epidermalzellen deutlich geringer ist als in normaler Haut oder in lichenoiden Infiltraten mit einer akanthotisch verbreiterten Epidermis. Die Zahlen der Fas-positiven Zellen verhielten sich in der Dermis zu den Diagnosen ähnlich wie die der epidermalen Zellen. Auch in diesem Fall spielt sicherlich eine Rolle, daß die zellarmen Veränderungen, d.h. bei akuter GvHD ebenso wie bei sklerodermiformer GvHD oder bei postinflammatorischer Hyperpigmentierung, auch deutlich weniger Fas-positive „Passenger“ Zellen enthalten. Bei den lichenoiden Formen, insbesondere der chronisch lichenoiden GvHD, ist einerseits die Epidermis akanthotisch verbreitert und enthält andererseits basal und suprabasal sowie im Papillarkörper deutlich zellreichere lymphohistiozytäre Infiltrate, so daß sich daraus die relativ größere Anzahl Fas-positiver Zellen erklären läßt [Trautmann et al., 2000 (176); Schwarz et al., 2000 (144)]. Es ist jedoch bei der Interpretation der Daten immer wieder zu berücksichtigen, dass die zahlenmäßigen Unterschiede für keine der definierten Diagnosen statistisch signifikant waren.

Die Expression von Fas-L ist im Gegensatz zur Expression von Fas restriktiv. Allerdings konnte gezeigt werden, daß basale Keratinozyten sehr wohl auch Fas-L enthalten [Viard et al., 1998 (183)], wobei es sich jedoch um ein in Bezug auf Apoptoseinduktion inaktives Molekül halten dürfte [Viard et al., 1998 183]. Einerseits fällt auf, daß die höchste Anzahl Fas-L-positiver Zellen in der Epidermis und in der Dermis bei „akuter GvHD mit lichenoidem Muster“ gesehen wurde, andererseits handelt es sich dabei meist schon um eine akanthotisch verbreiterte Epidermis.

Eines der Hauptprobleme der histologischen und der immunpathologischen Diagnostik der kutanen GvHD besteht in der Differenzierung zwischen akuter bzw. früher kutaner GvHD und Arzneimittelexanthemen bzw. toxischen Reaktionen. Obwohl gezeigt werden konnte, daß es trotz eines gering ausgeprägten T-Zell-Infiltrates bzw. noch vor histologisch erkennbaren Epithelzellschäden zu einer massiven, aberranten Expression von Klasse-II-Alloantigenen an Epithelzellen des Darms und an Keratinozyten der Haut bei der kutanen GvHD kommen kann [Lampert et al., 1982 (95); Volc-Platzer et al., 1984 (184)], findet sich gelegentlich vor allem eine HLA-DR Expression auch bei kutanen Arzneimittelreaktionen. Mit den bisher eingesetzten immunpathologischen Methoden erscheint daher vorläufig noch kein Parameter etabliert zu sein, der eindeutig und ausschließlich mit der einen oder der anderen kutanen Reaktion verbunden ist. Weiterhin läßt sich aufgrund der geringen Fallzahl (27 Patienten) auch keine eindeutige Aussage bezüglich Prognose und dem Vorherrschen des einen oder anderen Immunmarkers in situ treffen. Während die Expression von Fas und Fas-L momentan mit den verwendeten Markern nicht eindeutig zur Differenzierung der einzelnen Formen der GvHD dienen kann, könnte jedoch ein Unterschied in der Expression zytotoxischer Marker in der akut-lichenoiden und der chronisch-lichenoiden GvHD bestehen, so daß möglicherweise ein Unterschied in den Pathomechanismen früher und später auftretender Formen herausgearbeitet werden kann. Es werden jedoch noch weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv erforderlich sein, ebenso wie der Einsatz von Doppelfärbungen oder in situ- Bestimmungen von Zytokinen oder Chemokinen

und ihrer Rezeptoren, um weitere Aussagen machen zu können.

5. Literatur

1. Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA (1993) In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 170:1-8
2. Antin JH, Ferrara JLM, (1992) Cytokine dysregulation and acute graft versus-host disease. *Blood* 80:2964-68
3. Aragane Y, Kulms D, Metze D (1998) Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* 140(1):171-82
4. Arnold R, Seifert M, Asadullah K, Volk HD (1999) Crosstalk between keratinocytes and T lymphocytes via Fas/Fas-L interaction: modulation by cytokines. *J Immunol* 162: 7140-47
5. Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C (2000) Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 95 (8): 2484-90
6. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA (1998) Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 338(17): 1186-91
7. Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: Signaling and Modulation. *Science* 281: 1305-08
8. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P (1998) Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease,

and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* 66(8):1014-20

9. Bach FH, (1970) Transplantation: Pairing of donor and recipient. *Science* 168:1170-74
10. Bach FH (ed) (1974) *Immunobiology of Transplantation*. New York, Verlag Grune & Stratton, 156-62
11. Barnes DWH, Loutit JF (1955) Spleen protection: The cellular hypothesis. *Bacq ZM Radiobiology Symposium Liege*. London, Verlag Butterworths. 134-41
12. Bellgrau D, Gold D, Duke RC (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377:630-32
13. Behrends U, Peter RU, Hintermeier-Knabe R (1994) Ionizing radiation induces human intercellular adhesion molecule-1 in vitro. *J Invest Dermatol* 103(5):726-30
14. Berthou C, Michel L, Soulie A, Jean-Louis F, Flageul B (1997) Acquisition of Granzyme B and Fas Ligand Proteins by Human Keratinocytes Contributes to Epidermal Cell Defence. *J Immunol* 159: 5293-5300
15. Bertz H, Potthoff K, Mertelsmann R, Finke J (1997) Busulfan/cyclophosphamide in volunteer unrelated donor (VUD) BMT: excellent feasibility and low incidence of treatment-related toxicity. *Bone Marrow Transplant*. 19(12):1169-73

16. Billingham RE (1966) The biology of graft-versus-host-reactions. Harvey Lecture 62:21-78
17. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L (1991) *bcl-x*, a *bcl-2* related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell 74: 597-08
18. Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ (1997) Apoptosis, cancer and cancer therapy. Surg Oncol 6(3):133-42
19. Boldin MP, Mett IL, Wallach D (1995) A protein related to a proteasomal subunit binds to the intracellular domain of the p55 TNF receptor upstream to its 'death domain'. FEBS Lett 367(1):39-44
20. Borson ND, Strausbauch MA, Kennedy RB, Wettstein PJ (1999) Temporal sequence of transcription of perforin, Fas ligand, and tumor necrosis factor-alpha genes in rejecting skin allografts. Transplantation 67: 672-80
21. Bortz J, Lienert G, Boehnke K (1990) Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Berlin, Verlag Springer, 85-231
22. Brochu S, Rioux-Massé B, Roy J, Perreault C (1999) Massive activation-induced cell death of alloreactive T cells with apoptosis of bystander postthymic T cells prevents immune reconstitution in mice with graft-versus-host-disease. Blood 94: 390-400
23. Burnet FM (1959) The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. London, Verlag Cambridge University Press

24. Burnet FM (1973) Multiple polymorphism in relation to histocompatibility antigens. *Nature* 245:359-364
25. Castro JE, Listman JA, Jacobson A, Perkins DL (1996) Fas modulation of apoptosis during negative selection of thymocytes. *Immunity* 5:617-20
26. Casciola-Rosen L, Miller DK, Anhalt GJ, Rosen A (1994) Specific cleavage of the 70-kDA protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem* 269: 30757-60
27. Charron DJ, Engelman EG, Benike CJ (1980) Ia antigens on alloreactive T cells in man detected by monoclonal antibodies. Evidence for synthesis of HLA-D/DR molecules of the responder type. *J Exp Med* 152(2):127-36
28. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG (1993) Thymocyte apoptosis induced by *p53*-dependent and independent pathways. *Nature* 362: 849-52
29. Clarke AR, Gledkull S, Hooper ML, Bird CC (1994) *p53* dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following γ -irradiation. *Oncogene* 9: 1767-73
30. Click RE (1985) Complexity of minor Histocompatibility loci. *Human Immunol* 14: 220-33

31. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS (1992) Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann Rev Immunol* 10: 267-93
32. Cohen PL, Eisenberg RA (1995) Fas/APO-1: a cell surface receptor that signals apoptosis. *Apoptosis and the immune response*, Gregory CD, Verlag: Wiley-Liss, New York, 143-68
33. Daniel WW (1990) *Applied Nonparametric Statistics*. Boston, Verlag PWS-Kent 226-30
34. Darmstadt GL, Donnenberg AD, Vogelsang GB, Horn TD (1992) Clinical, laboratory, and histopathologic indicators of the development of progressive acute graft-versus-host disease. *J Invest Dermatol* 99(4):397-02
35. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC (1995) Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic-cell-derived granzyme B. *Nature* 377(6548) :446-48
36. Deeg HJ, Loughran TP Jr, Storb R, Kennedy MS, Sullivan KM, Doney K, Thomas ED (1985) Treatment of human acute graft-versus-host disease with antithymocyte globulin and cyclosporine with or without methylprednisolone. *Transplantation* 40(2):162-6
37. Delic J, Magdelenat H, Barbaroux C, Chaillet MP, Dubray B, Gluckman E, Cosset JM (1995) In vivo induction of apoptosis in human lymphocytes by therapeutic fractionated total body irradiation *Br J Radiol* 68(813):997-1003

38. Dey B, Yang YG, Preffer F, Dombkowski D, Sykes M (1999) The fate of donor T-cell receptor transgeneic T cells with known host antigen specificity in a GvHD-model. *Transplantation* 68: 141-49
39. Devine SM, Geller RB, Lin LB, Maurer D, Connaghan DG (1997) The outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in patients with hematologic malignancies using tacrolimus (FK506) and low dose methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis. *Biol Blood Marrow Transplant* 3(1):25-33
40. Dive C (1992) Analasys and discrimination of necrosis and apoptosis by multiparameter flow cytometry. *Biochem Biophys Acta* 1133:275-77
41. Dorf ME (1985) The Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology. New York, Verlag Garland/STM Press. 334-57
42. Duke RC, Cohen JJ (1986) II-2 addiction: withdrawal of groth factor activates a suicide program in dependent cells. *Lymphokine Res* 5:289-95
43. Duke RC, Ojcius DM, Young JD (1997) Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaften* 2: 26-35
44. Eissner G, Kohlhuber F, Grell M, Ueffing M, Scheurich P, Hieke A, Holler E (1995) Critical involvement of transmembrane tumor necrosis factor-alpha in endothelial programmed cell death mediated by ionizing radiation and bacterial endotoxin. *Blood* 1, 86(11):4184-93

45. Enari M, Hase A, Nagata S (1995) Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. *EMBO J* 14(21):5201-08
46. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein. *Cell* 69: 119-29
47. Evans CA, Owen-Lynch J, Whetton AD, Dive C (1993) Activation of the abelson tyrosin kinase activity is associated with suppression of apoptosis in the: purifications and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. *Am J Pathol* 109:78-87
48. Fergusson TA, Griffith TS (1997) A vision of cell death: insights into immune privilege. *Immunol Rev* 156:167-70
49. Ferrara JL, Deeg HJ (1991) Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 324(10):667-74
50. Fesus L, Davies PJA, Piacentini M (1991) Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur. J. Cell Biol.* 56:170-77
51. Fraser A, McCarthy N, Evan GI (1996) Biochemistry of cell death. *Curr Opin Neurobiol* 6(1) 71-80
52. French LE, Tschopp J (1999) The TRAIL to selective tumor death. *Nat Med* 5(2):146-47
53. Fukuda Y, Ohdan H, Shintaku S, Dohi K (1998) Effect of FTY 720 on immunoregulation in concordant xenotransplantation. *Transpl Int* 11 Suppl 1:461-66

54. Gandarillas A, Goldsmith LA, Gschmeissner S, Leigh IM, Watt FM (1999) Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Exp Dermatol*, 8 (1):71-79
55. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J Biol Chem* 266:18580-85
56. Germain RN, Malissen B (1986) Analysis of the expression and function of class-II major histocompatibility complex molecules by DNA mediated transfer. *Annu Rev Immunol* 4:28
57. Gilliam AC, Whitaker-Menezes D, Korngold R, Murphy GF (1996) Apoptosis is the Predominant Form of Epithelial Target Cell Injury in Acute Experimental Graft-Versus-Host-Disease. *J Invest Dermatol* 107:377-83
58. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED (1974) Clinical manifestations of graft-vs.-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 18:295-04
59. Glücksmann A (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26:59-86
60. Goldman JM, Gale RPHorowitz MM et al (1988) Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 108: 806-14

61. Golstein P, Luciani MF, Mattei MG, Foa C (1995) Molecular mechanisms of T-lymphocyte cytotoxicity, with emphasis on the fas pathway. Apoptosis and the immune response, Gregory CD, Verlag Wiley-Liss, New York, 143-168
62. Gomes MA, Schmitt DS, Souteyrand P (1982) Lichen planus and chronic graft-versus-host reaction. In situ identification of immunocompetent cell phenotypes. J Cutan Pathol 9(4):249-57
63. Gowans JL (1962) The fate of parental strain small lymphocytes in F1-hybrid rats. Ann N Y Acad Sci 99:432-55
64. Greenberg AH, Litchfield DW (1995) Gernzymes and Apoptosis: Targeting the cell cycle. Pathways for cytolysis, Griffiths (GM), Tschopp (J), Current Topics in Microbiology and Immunology 198:95
65. Greinix HT, Volc-Platzer B, Rabitsch W, Gmeinhard B (1998) Successful use extracorporal photochemotherapy in the treatment of severe acute and chronic graft-versus-host disease. Blood 92 (9):3098-04
66. Gure AO, Stockert E, Scanlan MJ (2000) Serological identification of embryonic neural proteins as highly immunogenic tumor antigens in small cell lung cancer. Proc Natl Acad Sci 97(8):4198-03
67. Haake AR, Polakowska RR (1993) Cell death by Apoptosis in Epidermal Biology. J Invest Dermatol 101:107-12

68. Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, French LE, Lienard D (1996) Melanoma cell expression of Fas-Ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274:1363-67
69. Hammar SP, Mottet NK (1971) Tetrazolium salt and electromicroscop studies of cellular degeneration and necrosis in the digital areas of the developing chick limb. *J Cell Sci* 8: 229-33
70. Harmon BV, Bell L, Williams L (1984) An ultrastructural study on the „meconium corpuscles in rat foetal intestinal epithelium with particular reference to apoptosis. *Anat Embryol* 169: 119-21
71. Harmon BV, Allan DJ (1996) Apoptosis: a 20th Century Scientific Revolution. In: Apoptosis in normal development and cancer. Sluyser M (Hrsg.) Verlag Taylor and Francis, London. 345-59
72. Hengartner MO, Horvitz HR (1994) C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 76: 665-76
73. Herve P, Wijdenes J, Bergerat JP (1990) Treatment of corticosteroid resistant acute Graft-vs-host disease by in vivo administration of anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody (B-B10). *Blood* 75: 1017-23
74. Hill GR, Cooke KR, Bungard D, Ferrara JL (1998) Interleukin-11 promotes T cell polarisation and prevents acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 102 (1): 115-23

75. Hill LL, Ouhtit A, Loughlin SM, Owen-Schaub LB (1999) Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science* 285: 898-00
76. Holler E, Kolb HJ, Eissner G (1998) Cytokines in GvH and GvL. *Bone Marrow Transplant* 22 (4): 3-6
77. Horn TD, Zahurak ML, Atkins D, Solomon AR, Vogelsang GB (1997) Lichen planus-like histopathologic characteristics in the cutaneous graft-versus-host reaction. Prognostic significance independent of time course after allogeneic bone marrow transplantation *Arch Dermatol* 133(8):961-65
78. Horn TD, Atkins D, Solomon AR, Vogelsang GB (1999) Effector cells in cutaneous graft-versus-host disease. Who? What? When? Where? How?. *Br J Dermatol* 141(5):779-80
79. Hsu HC, Mountz JD, Zhou T (1999) Regulation of Fas-mediated apoptosis in CD2-fas transgenic mice. *Int Rev Immunol* 18(4):309-27
80. Itoh N, Yonehara S, Ishii A (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66(2):233-43
81. Jacobsen MD, Weil M, Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 341-50
82. Jerome KR, Conyers SJ, Hansen DA, Zebala JA (1998) Keratinocyte Apoptosis following bone marrow transplantation for CTL-dependent and independent pathways. *Bone Marrow Transplantation* 22: 359-66

83. Johnson RP (1997) Upregulation of Fas-Ligand by simian immunodeficiency virus: a nefarious mechanism of immune invasion. *J Ecp Med* 186:91
84. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57
85. Kerr JFR, Searle J (1980) Apoptosis: its nature and kinetic role. In: *Radiation biology in cancer research*, Meyn R and Withers R (Hrsg.), Verlag: Raven Press, New York, 367-384
86. Kerr JFR, Harmon BV (1991) Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In: *Apoptosis: the molecular biology of cell death*. Tomei, LD and Cope FO (Hrsg.), Verlag: Cold Spring Harbor Press, New York, 5-29
87. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV, (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8) 2013-26
88. Klein J (1975) *The Biology of the Mouse Histocompatibility 2 Complex. The Histocompatibility Complex*, Klein J (Hrsg.), New York, Verlag Springer, 13-21
89. Klein J, Figuera F, Nagy Z (1983) Genetics of the major histocompatibility complex: the final act. *Annu Rev Immunol* 1:119
90. Klingebiel T, Schlegel PG (1998) GVHD: overview on pathophysiology, incidence, clinical and biological features. *Bone Marrow Transplant* 21(2):45-9

91. Koppler JW, Roehm N, Murrack P (1987) T-cell tolerance by clonal elimination in the thymus, *Cell* 49: 273-80
92. Korngold R, Sprent J (1978) Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice: prevention by removing mature T cells from marrow. *J Exp Med* 148:1687-98
93. Korngold R, Sprent J (1983) Lethal graft-versus-host disease across minor histocompatibility barriers in mice. *Clin Haematol*, 12: 681-85
94. Krenger W, Hill GR, Ferrara JL (1997) Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 64(4): 553-58
95. Lampert IA, Janossy G, Smiters AJ (1982) Immunological analysis of the skin in graft versus host disease. *Clin Exp Immunol* 50(1):123-31
96. Langley RGB, Walsh N, Nevill T, Thomas L, Rowden G (1996) Apoptosis is the mode of keratinocyte death in cutaneous graft-versus-host disease. *J Am Acad Dermatol* 35: 187-90
97. Lee SH, Jang JJ, Lee JY, Kim SH, Yoo NJ (1998) Fas ligand is expressed in normal skin and some cutaneous malignancies. *Br J Dermatol* 139: 186-91
98. Leithauser F, Dhein J, Mechtersheimer G (1993) Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 69(4): 415-29

99. Lenhard V (1983) Transplantationsimmunologie, In: Immunologie, Vorlaender, KO (Hrsg.), Verlag Thieme, Stuttgart, 776-811
100. Lerner KG, Kao GF, Storb R et al (1974) Histopathology of graft-versus-host reaction (GVHR) in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transpl Proc* 6:367-71
101. Leverkus M, Yaar M, Gilchrist BA (1997) Fas/Fas-Ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp Cell Res* 232:255-59
102. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Gordon J, MacLennan IC (1989) Mechanisms of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342: 929-31
103. Lotem J, Sachs L (1993) Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood* 82: 1092-96
104. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA (1993) p53 is required for irradiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362: 847-49
105. Lowin B, Hahne M, Mattman C, Tschopp J (1994) Cytotoxic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and fas lytic pathway. *Nature* 370:650-55
106. Marmont AM (1998) Stem cell transplantation for severe autoimmune diseases: progress and problems. *Haematologica* 83(8):733-43

107. Martin PJ, Hansen JA, Anasetti C (1988) Treatment of acute GvHD with anti-CD3 monoclonal antibodies. *Am J Kidney Dis* 11:149-52
108. Martin SJ, Green DR (1995) Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts? *Cell* 82: 349-52
109. Martin SJ (1998) Apoptosis. In: *Encyclopedia of Immunology*, Delves, Roitt (Hrsg.), Verlag: Academic Press London
110. Matsue H, Kobayashi H, Ohkawara A (1995) Keratinocytes constitutively express the fas antigen that mediates apoptosis in IFN-gamma-treated cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 287:315-17
111. McGregor DD (1968) Bone marrow origin of immunologically competent lymphocytes in rats. *J Exp Med* 127:953-66
112. Meyn RE, Stephens LC, Mason KA (1996) Radiation-induced apoptosis in normal and pre-neoplastic mammary glands in vivo: significance of gland differentiation and p53 status. *Int J Cancer* 65(4):466-72
113. Morris PJ (1973) Histocompatibility in organ transplantation in man. In: Joachim HL (Hrsg.), *Pathobiology Annual 1973*, New York, Verlag Appleton-Century-Crofts, 45-59
114. Muller-Wieprecht V, Riebeling C, Orfanos CE (2000) Bcl-2 transfected HaCaT keratinocytes resist apoptotic signals of ceramides, tnf-alpha, 25-dihydroxyvitamin D. *Arch Dermatol Res* 292:455-62

115. Mutis T, Gillespie G, Schrama E, Goulmy E (1999) Tetrameric HLA class I-minor histocompatibility antigen peptide complexes demonstrate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with graft-versus-host disease. *Nat Med* 5(7):839-42
116. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85(6): 817-27
117. Murphy GF, Merot Y, Tong AK (1985) Depletion and repopulation of epidermal dendritic cells after allogeneic bone marrow transplantation in humans. *J Invest Dermatol* 84(3): 210-14
118. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY (1990) Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺ CD8⁺ TCR (LO) thymocytes in vivo. *Science* 250: 1720-23
119. Nagata S, Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267: 1449-56
120. Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-65
121. Nakajima H, Park HL, Henkart PA (1995) Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. *J Exp Med* 181(3):1037-46
122. Nakamura H, Komatsu K, Murakami M, Uoshima N (2000) Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12, IL-18, and IFN-gamma in

patients with acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Allergy Clin Immunol* 106: 45-50

123. Nathenson SG (1986) Murine major histocompatibility complex class-I mutants: molecular analysis and structure-function implications. *Annu Rev Immunol* 4:471-74
124. Nikolic B, Lee S, Bronson RT (2000) Th1 and Th2 mediate acute graft-versus-host disease, each with distinct end-organ targets. *J Clin Invest* 105(9):1289-98
125. Oishi M, Maeda K, Sugiyama S (1994) Distribution of apoptosis-mediating Fas antigen in human skin and effects of anti-Fas monoclonal antibody on human epidermal keratinocyte and squamous cell carcinoma cell lines. *Arch Dermatol Res* 286(7): 396-07
126. Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, Kurimoto M (2000) IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 164 (11): 6067-74
127. Olson RL, Everett MA (1975) Epidermal Apoptosis: cell deletion by phagocytosis. *J Cutan Pathol* 2: 53-57
128. Ouhtit A, Gorny A, Muller HK, Hill LL, Ananthaswamy HN (2000) Loss of Fas-Ligand expression during UV carcinogenesis. *Am J Pathol* 157 (6):1975-81
129. Paller AS, Nelson A, Steffen L (1988) T-lymphocyte subsets in the lesional skin of allogeneic and autologous bone marrow transplant patients. *Arch Dermatol* 124(12):1795-01

130. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM (1997) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276(5309):111-13
131. Peitsch MC, Tschopp J (1994) Granzyme B. *Methods Enzymol* 244: 80-87
132. Perreault C, Pelletier M, Landry D (1984) Study of Langerhans cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 63(4): 807-11
133. Piguet PF, Grau GE, Allet B (1987) Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-versus-host disease. *J Exp Med* 166(5): 1280-89
134. Rappaport FT, Converse JM, Billingham RE (1977) Recent advances in clinical and experimental transplantation. *JAMA* 27:2835-37
135. Resch K, Gemsa D (1983) Immunsystem. In: *Immunologie*, Vorlaender (Hrsg.), Verlag Thieme, Stuttgart , 2-41
136. Roit I, Brostoff J, Male D (1985) Mechanisms in Immunology. In: *Immunology*, Roit (Hrsg.) Verlag Gower Medical Publishing, London, 4.1-4.8, 11.1-11.8, 19.1-24.8
137. Romagnani P, Annunziato F, Manetti R (1998) High CD30 ligand expression by epithelial cells and Hassal's corpuscles in the medulla of human thymus. *Blood* 91(9): 3323-32
138. Rothstein TL, Zhong X, Scheam BR, Schneider TJ (2000) Receptor-specific regulation of B-cell susceptibility to Fas-

mediated apoptosis and a novel fas apoptosis inhibitory molecule. *Immunol Rev* 176:116-33

139. Sakamoto H, Michaelson J, Jones WK (1991) Lymphocytes with a CD4+ CD8- CD3- phenotype are effectors of experimental cutaneous graft-versus-host disease. *Proc Natl Acad Sci* 88(23): 10890-94
140. Sale GE, Lerner KG, Barker EA, Shulman HM, Thomas ED (1977) The skin biopsy in the diagnosis of acute graft-versus-host disease in man. *Am J Pathol* 89: 621-25
141. Sale GE, Shulman HM, MacDonald GB, Thomas ED (1979) Gastrointestinal GvHD in man. A clinical study of rectal biopsy. *Am J Surg Pathol* 3: 291-99
142. Sayama K, Yonehara S, Watanabe Y, Miki Y (1994) Expression of Fas antigen on keratinocytes in vivo and induction of apoptosis in cultured keratinocytes. *J invest Dermatol* 103: 330-34
143. Schwarz A, Bhardwaj R, Aragane Y (1995) Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. *J Invest Dermatol* 104(6) 922-27
144. Schwarz T (2000) No eczema without keratinocyte death. Commentary. *J Clin Invest* 106: 9-10
145. Schwartzendruber DC, Congdon CC (1963) Electron microscope observations on tingible body macrophages in mouse spleen. *J Cell Biol*, 19: 641-46

146. Schaefer UW, Beelen DW (1989) Knochenmarkstransplantation. In: Knochenmarkstransplantation, Schaefer (Hrsg.), Karger Verlag Basel, 45-47
147. Schneider P, Tschopp J (2000) Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv* 74: 281-6
148. Sefrioui H, Billiau AD, Overbergh L, Rutgeerts O, Waer M (1999) Influence of the additional injection of host-type bone marrow on the immune tolerance of minor antigen-mismatched chimeras: possible involvement of double-negative (natural killer) T cells. *Transplantation*. 68(10):1560-67
149. Selby WS, Janossy G, Mason DY, Jewell DP (1983) Expression of HLA-DR antigens by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 53:614-618
150. Sermadiras S, Dumas M, Joly-Berville R, Ratinaud MH (1997) Expression of Bcl-2 and Bax in cultured normal human keratinocytes and melanocytes: relationship to differentiation and melanogenesis. *Br J Dermatol* 137:883-89
151. Sheikh MS, Fornace AJ (2000) Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia* 14:1509-13
152. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285(5426): 412-15

153. Shulman HM, Sale GE, Lerner KG, Sullivan KM, Thomas ED, Storb R (1978) Chronic cutaneous graft-vs.-host disease in man. *AM J Pathol* 91:545-64
154. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL (1980) Chronic graft-vs.-host syndrom in man: a long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 69: 204-17
155. Skinner MM, Puvathingal JM, Walter RL, Friedman AM (2000) Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase: a catalyst for protein repair. *Structure Fold Des* 8(11):1189-01
156. Sloane JP, Thomas JA, Imrie SF (1984) Morphological and immunohistological changes in the skin in allogeneic bone marrow recipients. *J Clin Pathol* 37(8): 919-30
157. Storb R, Gluckman E, Thomas ED (1974) Treatment of established human graft-versus-host disease by antithymocyte globulin. *Blood* 44(1):56-75
158. Sullivan HM, Shulman KM, Storb R (1981) Chronic graft-vs.-host disease in fifty-two patients: adverse natural course and succesful treatment with combination immunosuppression. *Blood* 57:267-76
159. Sullivan KM, Deeg HJ, Amos D, Shulman H, Sale G, Witherspoon R, Appelbaum F (1986) Hyperacute graft-v-host disease in patients not given immunosuppression after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 67(4):1172-75
160. Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M (1994) Apoptosis of murine large intestine in acute graft-vs-host disease after allogeneic bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers. *Transplantation* 57:1284-87

170. Thomas ED, Storb R, Clift RA (1975) Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 292: 832-43, 895-02
171. Thomas ED (1985) High-dose therapy and bone marrow transplantation. *Semin Oncol* 12(4,6):15-20
172. Thorsby E (1981) Histocompatibility antigens: immunogenetics and role of matching in clinical renal transplantation. *Ann Clin Res* 13: 190-94
173. Thompson EB, Thulasi R, Saeed MF (1995) Glucocorticoid antagonist RU 486 reverses agonist-induced apoptosis and c-myc repression in human leukemic CEM-C7 cells. *Ann N Y Acad Sci* 761:261-75
174. Touraine JL, Incefy GS (1974) Differentiation of human bone marrow cells into T lymphocytes by in vitro incubation with thymic extracts. *Clin Exp Immunol* 17(1):151-58
175. Traweek ST, Slovak ML, Brynes RK, Niland JC, Forman SJ (1996) Myelodysplasia and acute myeloid leukemia occurring after autologous bone marrow transplantation for lymphoma. *Leuk Lymphoma* 20:365-72
176. Trautmann A, Akdis M, Kleemann D (2000) T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest* 106(1): 25-35
177. Trentin JJ (1956) Mortality and skin transplantability in irradiated mice receiving isologous or heterologous bone marrow. *Proc Soc Exp Med* 92:688-91

178. Trimble LA, Xu Z, Liebermann J (1999) Clonal expansion of antigen specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes is regulated by late exposure to serum to prevent apoptosis. *J Immunol Meth* 225: 39-52
179. Truitt RL, La Fever AV, Jeske JM, Martin TM (1990) Graft-vs-leukemia effect. In: *Graft-vs.-host-disease: immunology, pathophysiology, and treatment*, Burakoff SJ, Deeg HJ, Ferrara J (Hrsg.), Verlag Marcel Dekker, New York, 177-204
180. Tschopp J, Schafer S, Heusser C (1989) Phosphorylcholine acts as a Ca²⁺-dependent receptor molecule for lymphocyte perforin. *Nature* 337: 272-74
181. van den Brink MR, Moore E, Horndasch KJ (2000) Fas ligand-deficient gld mice are more susceptible to graft-versus-host-disease. *Transplantation* 70(1): 184-91
182. Vaux DL, Cory S, Adams JM (1998) *Bcl-2* gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with *c-myc* to immortalise pre-B cells. *Nature* 335:440-42
183. Viard I, Wehrli P, Bullani R (1998) Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* 282(5388): 490-93
184. Volc-Platzer B, Majdic O, Knapp W, Wolff K, Hinterberger W, Stingl G (1984) Evidence of HLA-DR antigen biosynthesis by human keratinocytes in disease. *J Exp Med* 159:1784-91

185. Volc-Platzer B, Leibel H, Luger T, Zahn G, Stingl G (1985) Human epidermal cells synthesize HLA-DR alloantigens *in vitro* upon stimulation with γ -interferon. *Invest Dermatol* 85:16-19
186. Volc-Platzer B, Rappersberger K, Mosberger I (1988) Sequential immunohistologic analysis of the skin following allogeneic bone marrow transplantation. *J Invest Dermatol* 91(2): 162-8
187. Volc-Platzer B, Stingl G (1990) Changes in human skin in GvHD. In: *Graft-versus-Host disease: Immunology, pathophysiology and treatment*, Burakoff SJ, Deeg HJ, Ferrara J, Atkinson K (Hrsg.), Verlag Marcel Dekker, New York, 132-143
188. Volc-Platzer B (1992) Graft-versus-Host disease (GvHD), *Hautarzt* 43:669-75
189. Walczak H, Krammer PH (2000) The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* 256: 58-66
190. Weedon D, Searle J, Kerr JFR (1979) Apoptosis: its nature and implication for dermatopathology. *Am J Dermatol* 1: 133-44
191. Wehrli P, Viard I, Bullani R, Tschopp J, French LE (2000) Death receptors in cutaneous biology and disease. *J Invest Dermatol* 115:141-48
192. Wick MR, Breanndan Moore S, Gastineau DA, Hoagland HC (1983) Immunological, clinical and pathological aspects of human GvHD. *Mayo Clin Proc* 58:603-12

193. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673-82
194. Wiesmann A, Weller A, Lischka G, Einsele H (1999) Treatment of acute GvHD with PUVA: results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant* 23:151-55
195. Williams GT, Smith CA, Dexter TM (1990) Haematopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343:76-79
196. Williams GT, Smith CA (1993) Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 2: 263-67
197. Williams GT (1995) Apoptosis in the immune system: concepts and questions, In: *Apoptosis and the immun response*, Gregory CD (Hrsg.), Verlag Wiley-Liss, New York, 1-12
198. Wirt DP, Brooks EG, Vaidya S (1989) Novel T-lymphocyte population in combined immunodeficiency with features of graft-versus-host disease [see comments. *N Engl J Med* 321(6) 370-74
199. Woo M, Przepiorka D, Ippoliti C, Warkentin D, Fritsche H (1997) Toxicities of tacrolimus and cyclosporin A after allogeneic blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 20(12):1095-08
200. Woodcock A, Magnus IA (1976) The sunburn cell in the mouse skin: preliminary quantitative studies on its production. *Br J Dermatol* 95: 459-68

201. Woodruff JM, Eltringham JR, Casey HW (1969) Early secondary disease in the rhesus monkey.I. A comparative histologic study. *Lab invest* 20: 85-98
202. Woodruff JM, Hansen JA, Good RA, Slavin RE (1976) The pathology of Graft-vs.-host reaction (GvHR) in adults receiving bone marrow transplants. *Transplant Proc* 8:675-84
203. Wiley SR, Goodwin RG, Smith CA (1996) Reverse signaling via CD30 ligand. *J Immunol* 157(8):3635-39
204. Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-56
205. Wyllie AH, Morris RG (1982) Hormone-induced cell death: purifications and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. *Am J Pathol* 109:78-87
206. Wyllie AH (1995) Death from inside out: an overview. In: *The role of Apoptosis in development, tissue homeostasis and malignancy*, Dexter TM, Raff MC, Wyllie AH (Hrsg.), Verlag Chapman and Hall, London, 26-35
207. Yabe M, Yabe H, Hattori K, Hinohara T, Kato S (1994) Transition of Tcell receptor gamma/delta expressing double negative (CD4-/CD8-) lymphocytes after allogeneic. *Bone Marrow Transplantation* 14:741-46
208. Yang E, Zha J, Jockel J (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80:285-91

209. Yang YG, Sykes M (1999) The role of interleukin-12 in preserving the graft-versus-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells independently of GvHD. *Leuk Lymphoma* 33: 409-20
210. Yuan JS, Shaham S, Ledoux HM, Horvitz HR (1993) The *C.elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 75:641-52
211. Yue CC, Reynolds CW, Henkart PA (1987) Inhibition of Cytolysin activity in large granular lymphocyte granules by lipids: Evidence for a membrane insertion mechanism of lysis. *Mol Immunol* 24: 647-53
212. Zhuang L, Wang B, Sauder DN (2000) Molecular Mechanism of ultraviolet-induced keratinocyte apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 20:445-54

6. Abkürzungen

aGvHD	akute GvHD
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
AR	„advanced risk“
AZA	Azathioprin (Imurek®)
Bf	Faktor B
Bx	Biopsie
C	Corticosteroide (Aprednisolon®)
cAMP	cyklisches AMP
cGvHD	chronische GvHD
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
CSA	Cyclosporin A (Sandimmun®)
CTLs	Cytotoxische T-Lymphozyten
Cy	Cyclophosphamid (Endoxan®)
DEJ	Dermo-epidermale Junktioszone
dUTP	biotinyliertes Deoxyuridin-Triphosphat
DLI	„donor leucocyte infusion“
DN-Zellen	„double negative“ T-Zellen
ECP	„extra corporal photopheresis“
FADD	FAS-assoziierte Adapterprotein
FAIM	„Fas apoptosis inhibitory molecule“
FLICE	„Fas-like interleukin 1 β converting enzyme“
FLIP	FLICE -Inhibitionsprotein
GB I-IV	„Grading“ in Glucksberg-Klassifikation
GM-CSF	„granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“
GvHD	„Graft-versus-Host Disease“
GvHR	„Graft-versus-Host Reaction“
HLA-System	„Human Leucocyte Antigen-System“
ICE	„Interleukin 1- β -converting enzyme“

IL-x	Interleukin-x
INF γ	Interferon γ
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
CR	„complete remission“
LRP	<i>Lichen ruber planus</i>
M	männlich
MD	matched donors
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	„major histocompatibility“
MM	Multiplles Myelom
MSH	Mundschleimhaut
MUD	„matched unrelated donor“
NGF	„nerve growth factor“
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
PARP	„poly-ADP-ribose-polymerase“
PBSC	„peripheral bone marrow stem cells“
MRD	„matched related donor“
SAA	„severe aplastic anemia“
SM I	Einteilung in Shulman-Klassifikation, lokalisierter Typ
SM II	Einteilung in Shulman-Klassifikation, generalisierter Typ
SR	„standard risk“
TBI	„total body irradiation“
TLI	„total lymphoid irradiation“
TCR	„T-Cell receptor“
TEN	toxische epidermale Nekrolyse
TGF β	„transforming growth factor β “
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TUNEL	„terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end label
TX	Transplantation
UD	„unrelated donor“

UV-Strahlung	ultraviolette Strahlung
W	weiblich
+	verstorben

7. Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung meiner Dissertation danke ich Frau tit. ao. Univ. Prof. Dr. med. Beatrix Volc-Platzer aus Wien. Für die darüber hinaus gehende großartige Betreuung meiner Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Luger aus Münster. Beiden Betreuern danke ich insbesondere herzlich für die Ermöglichung dieses österreichisch-deutschen Projektes.

Ich danke den Mitarbeitern des Immunpathologischen Labors der Abteilung für Immundermatologie und Infektiöse Hautkrankheiten (Leiter: o. Univ. Prof. Dr. med. Georg Stingl) an der Universitätsklinik für Dermatologie Wien (Vorstand: o. Univ. Prof. Dr. med. Klaus Wolff) - MTA Tuulikki Forström, Mag. M.Ciovica, MTA F. Pieczkowski, und den Mitarbeitern des hämatopathologischen Labors (Vorstand: o. Univ.-Prof. Dr. Donscho Kerjaschki) Ing. I. Moosberger, MTA A. Lamprecht für die technische Unterstützung. Desweiteren danke ich Jens Vogelgesang vom Institut für Medizinische Statistik der FU Berlin für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie und Freunden, insbesondere Benjamin O'Brien und Susanne Krebs-Posingies für die großartige Unterstützung.

8. Lebenslauf

Name	Anna Roberta Lawin-O'Brien, geb. Lawin
geboren	26.12.1973 in Hamburg
wohnhaft	14-15 Hoxton Square N1 6NU London, UK
1984-1990	Wilhelm-Hittorf-Gymnasium, Münster
1990-1991	Pembroke School in Adelaide, Australien
1991-1993	Wilhelm-Hittorf-Gymnasium, Münster, Abitur
1993-1996	Universität Hamburg, Medizinische Fakultät
1995	Ärztliche Vorprüfung
1996	I. Staatsexamen
1996 - 1997	Universität Wien, Medizinische Fakultät
1997 - 1999	Freie Universität Berlin, Medizinische Fakultät
1999	II. Staatsexamen
1999 - 2000	Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Praktisches Jahr
2000	III. Staatsexamen, Teilapprobation
02 / 2001	AiP in der Gynäkologie, Universitätsklinikum Bonn
08/ 2001	AiP in Dep.of Surgery, King's College Hospital, London, UK
03/2002	AiP in Dep. of Obstetrics&Gynaecology, King's College Hospital, London, UK
seit 08/2002	Senior House Officer in Dep. for Obstetrics&Gynaecology, Queen Charlotte's and Chelsea Hospital for Women, London, UK
03/2003	Part 1 MRCOG (Member of the Royal College of Obstetricians & Gynaecologists)