

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Was ist Leukozytoklasie?

**Eine histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung
an kutaner leukozytoklastischer Vaskulitis**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Kristin Ladell
aus Köln

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G. Kolde
2. Prof. Dr. med. G.-R. Burmester
3. Prof. Dr. med. C. Sorg

Datum der Promotion: 25.05.2001

Keywords

cutaneous leukocytoklastic vasculitis, neutrophils, atypical apoptosis, Fcγ receptors

Abstract

The aim of this study was to find out whether leukocytoklastic cell disintegration of neutrophils in cutaneous leukocytoklastic vasculitis (clv) is apoptosis. In order to find out more about the underlying mechanisms leading to this form of cell disintegration and subsequent cell death skin sections of 9 patients with clinically and histologically verified clv and of 13 patients with clv after intradermal injection of histamine were examined at different time points. The structural and ultrastructural morphological features of leukocytoklasia were evaluated by light and electron microscopy. Immunohistochemistry included well known death receptors (CD95/CD95L), mitochondrial proteins (Bax/Bcl-2), proteins interfering with the cell cycle (p53/p21) and cell surface receptors (FcγRIII/FcγRII). Furthermore DNA fragmentation was assessed by the TUNEL method. Although the structural and ultrastructural features of leukocytoklastic cell disintegration of neutrophils in clv revealed typical apoptotic morphology, the underlying biochemistry did not match apoptotic means. DNA fragmentation was only seen in a minor fraction of fragmented nuclei and prominent in already phagocytosed debris. Neutrophils at different locations (in the lumen of the postcapillary venules, within the wall of the blood vessels and in the perivascular tissue) were always negative. The examined death receptors, mitochondrial proteins and cell cycle proteins play no (Bcl-2/Bax, p53/p21) or only a minor (CD95/CD95L) role in the biochemical mechanisms leading to cell disintegration of these cells in this self-limited inflammation. Interestingly FcγRIII was highly expressed not only in intact but also extremely disintegrated neutrophils as well as on the surface of their fragments. One could therefore assume that this receptor not only plays a role in activation of these cells, but also might be involved in the following induction of the cell death program. Maybe this highly glycosylated receptor also functions as an 'eat-me' flag in the recognition-mechanism by macrophages. FcγRII could not be shown on the cell surface of these cells in this context, which on the one hand could be due to the high expression of FcγRIII with no room left for FcγRII on the cell surface or due to a separate or additional role in the induction of the cell death program. Finally leukocytoklastic cell disintegration shows strong resemblance to apoptosis but with non-classical underlying biochemical mechanisms, most importantly to mention the delay in DNA fragmentation which could also be due to DNA degradation by DNases of macrophages.

Schlagworte

kutane leukozytoklastische Vaskulitis, neutrophile Granulozyten, atypische Apoptose, Fcgamma-Rezeptoren

Deutsches `Abstract`

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob es sich bei der leukozytoklastischen Zelldesintegration der neutrophilen Granulozyten in kutaner leukozytoklastischer Vaskulitis (kLV) um Apoptose handelt. Um die zugrundeliegenden Mechanismen dieses Zellzerfalls näher zu charakterisieren, wurden Hautbiopsien von 9 Patienten mit klinisch und histologisch gesicherter kLV und 13 Hautbiopsien von Patienten mit kLV folgend auf intrakutane Histamin-Injektion im zeitlichen Verlauf untersucht. Licht- und elektronenmikroskopisch wurde die Morphologie der Leukozytoklasie beurteilt. Immunhistologische Untersuchungen beinhalteten klassische pro-apoptotische Rezeptoren (CD95/CD95L), desweiteren über die Mitochondrien (Bax/Bcl-2) und auf genetischer Ebene die Apoptose regulierende Proteine (p53/p21). Es wurde zusätzlich die Expression von Zelloberflächen-Rezeptoren (FcgammaRIII/ FcgammaRII) beurteilt. Mittels der TUNEL-Methode wurde versucht die klassische DNA-Fragmentierung nachzuweisen. Obwohl strukturell und ultrastrukturell die klassischen morphologischen Merkmale der Apoptose vorlagen, konnte diese biochemisch nicht untermauert werden. DNA-Fragmentierung liess sich nur in schon von Makrophagen phagozytierten Kernfragmenten nachweisen. Neutrophile waren negativ und ihre Fragmente waren es vorwiegend. Den untersuchten Rezeptoren CD95/CD95L kommt allenfalls eine geringe und den Proteine, Bax/Bcl-2 und p53/p21 keine Rolle im Zellzerfall der Neutrophilen in dieser selbstlimitierten Entzündung zu. Interessanterweise wurde jedoch FcgammaRIII sehr stark auf der Oberfläche nicht nur intakter, sondern auch schon fragmentierter neutrophiler Granulozyten exprimiert. Dementsprechend ist anzunehmen, dass diese konstitutionell exprimierten Rezeptoren nicht nur eine Rolle in der Aktivierung, sondern auch eine Rolle in der darauf folgenden Auslösung der Apoptose in diesen Zellen spielen. Desweiteren dienen diese stark glykosylierten Rezeptoren möglicherweise als Phagozytose-Erkennungsmerkmal für Makrophagen. FcgammaRII liess sich hingegen nicht auf der Oberfläche der Neutrophilen und ihrer Fragmente nachweisen. Dies könnte einerseits durch eine Verdrängung durch FcgammaRIII bedingt sein, andererseits könnten sie durch Immunkomplex-Bindung eine separate oder zusätzliche Rolle in der Induktion des Zellzerfalls spielen. Zusammenfassend weist der leukozytoklastische Zellzerfall der Neutrophilen in kLV die klassischen morphologischen Merkmale der Apoptose auf, die biochemisch jedoch auf atypische Weise abläuft. In dieser Hinsicht zu erwähnen, ist vor allem die verzögerte oder durch DNasen der Makrophagen bedingte DNA-Fragmentierung.

1	EINLEITUNG	10
<hr/>		
1.1	DEFINITION DER VASKULITIS	10
1.2	KLASSIFIKATION DER VASKULITIDEN	10
1.3	DAS PHÄNOMEN DER LEUKOZYTOKLASIE	12
1.4	ZIELSETZUNG & FRAGESTELLUNG	14
2	INZIDENZ, ÄTIOLOGIE, KLINIK UND PATHOLOGIE DER KLV	15
<hr/>		
2.1	INZIDENZ	15
2.2	ÄTIOLOGIE	15
2.3	KLINIK	16
2.4	HISTO- UND IMMUNPATHOLOGIE	17
2.4.1	IMMUNKOMPLEXE	18
2.5	EXPERIMENTELLE MODELLE ZUM BESSEREN VERSTÄNDNIS VON IMMUNKOMPLEXERKRANKUNGEN UND VASKULÄREN REAKTIONEN	19
2.5.1	ARTHUS-REAKTION (TIEREXPERIMENT: MAUS)	19
2.5.2	SHWARTZMAN-REAKTION	20
2.6	ANCA	22
2.7	LABOR	23
2.8	PROGNOSE	24
2.9	THERAPIE	24
3	MATERIAL & METHODEN	25
<hr/>		
3.1	MATERIAL	25
3.1.1	HAUTBIOPSIEN	25
3.1.2	MONOKLONALE ANTIKÖRPER	26
3.2	SPEZIFITÄT/FUNKTION	29
<hr/>		
3.1.3	QUELLEN DER REAGENZIEN, GERÄTE & MATERIALIEN	30
3.2	METHODEN	31
<hr/>		
3.2.1	VORARBEITEN	31
3.2.1.1	VERARBEITUNG DER HAUTBIOPSIEN	31
3.2.1.2.1	VORBEREITUNG DER PARAFFINSCHNITTE	31
3.2.1.3	GEFIERBIOPSIEN	32
3.2.1.3.1	HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITTEN	32
3.2.1.4	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE	32
3.2.2	HISTOLOGISCHE, IMMUNHISTOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE FÄRBEMETHODEN	34
3.2.2.1	HISTOLOGISCHE ÜBERSICHTSFÄRBUNG MIT HÄMATOXYLIN-EOSIN (H & E) [170]	34
3.2.2.1.1	METHODIK	34
3.2.2.2	IMMUNHISTOLOGISCHE ALKALISCHE PHOSPHATASE ANTI-ALKALISCHE PHOSPHATASE- METHODE 35	
3.2.2.2.1	PRINZIP DER APAAP-TECHNIK	35
3.2.2.2.2	VORBLOCKEN	38
3.2.2.2.3	STAMMLÖSUNGEN FÜR DIE APAAP-METHODE	38
3.2.3	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	40
3.2.3.1	BEURTEILUNG DER INFILTRATSTÄRKE	41
3.2.3.2	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL	41

4 ERGEBNISSE **42**

4.1 LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE PATHOLOGIE DER DIAGNOSTISCH GEWONNENEN GEWEBEPROBEN	42
4.1.1 HISTOPATHOLOGIE	42
4.1.2 ELEKTRONENMIKROSKOPIE	44
4.2 IMMUNHISTOLOGIE	45
4.3 HISTOCHEMISCHE TUNEL-FÄRBUNG	52
4.4 HISTOPATHOLOGIE DER HISTAMINQUADDELN BEI LEUKOZYTOKLASTISCHER VASKULITIS	54
4.4.1 HISTOCHEMISCHE TUNEL-FÄRBUNG DER DURCH HISTAMIN AUSGELÖSTEN LÄSIONEN	55

5 DISKUSSION **69**

5.1 HISTOPATHOLOGIE DER GEWEBEPROBEN	69
5.2 LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPIE DER LEUKOZYTOKLASIE	70
5.3 APOPTOSE UND DNA-FRAGMENTIERUNG	72
5.4 EXPRESSION VON APOPTOSE-REGULIERENDEN PROTEINEN	74
5.4.1 EXPRESSION VON CD95 UND CD95 LIGAND	74
5.4.2 EXPRESSION VON BCL-2 UND BAX	75
5.4.3 EXPRESSION VON P53 UND P21	77
5.5 EXPRESSION CHARAKTERISTISCHER UND SPEZIFISCHER OBERFLÄCHENREZEPTOREN	77
5.6 CD68, EIN LYSOSOMALER MARKER UND SEINE RELEVANZ FÜR DIE APOPTOSE	79
5.7 ABSCHLIEßENDE BEMERKUNGEN	80

6 ZUSAMMENFASSUNG **81**

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

ERKLÄRUNG

LITERATUR

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten monoklonalen Antikörper	29
Tabelle 2: Semiquantitative Auswertung der histologischen Alterationen (HE)	44
Tabelle 3: Immunhistologische Auswertung, CD95, CD95L	46
Tabelle 4: Immunhistologische Auswertung, bcl-2, bax	48
Tabelle 5: Immunhistologische Auswertung, CD68, CD16 (Fc γ RIII)	50
Tabelle 6: Immunhistologische Auswertung, CD32 (Fc γ RII)	52
Tabelle 7: Beurteilung der histochemischen TUNEL-Färbung (Berlin) im Vergleich mit CD68-positiven Makrophagen	53/54
Tabelle 8: Ergebnisse der histochemischen TUNEL-Färbung (Münster)	55/56

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Klassifikation vaskulitischer Syndrome	11
Abb.2: Eine Übersicht der Unterschiede zwischen Apoptose & Nekrose	14
Abb.3: Ein Modell zur Entstehung der kLV	22
Abb.4: Schema der APAAP-Methode	35
Abb.5: Frühes Stadium einer kutanen leukozytoklastischen Vaskulitis	57
Abb.6: Späteres Stadium einer kutanen leukozytoklastischen Vaskulitis	57
Abb.7: Intakter neutrophiler Granulozyt intraluminal	58
Abb.8: Beginnende Schrumpfung der Zelle und des Zellkernes	58
Abb.9: 'Blebbing' der Zellmembran	59
Abb.10: Nekrotischer Granulozyt neben apoptotischem Granulozyt	59
Abb.11: Makrophage mit phagozytierten Apoptosestrukturen	60
Abb.12: Apoptotisches Fragment eines Granulozyten	60
Abb.13: Immunhistochemische Färbung mit CD95	61
Abb.14: Immunhistochemische Färbung mit CD95L	61
Abb.15: Immunhistochemische Färbung mit bcl-2	62
Abb.16: Immunhistochemische Färbung mit bax	62
Abb.17: Immunhistochemische Färbung mit p53	63
Abb.18: Immunhistochemische Färbung mit p21	63
Abb.19: Immunhistochemische Färbung mit PCNA	64
Abb.20: Immunhistochemische Färbung mit Faktor 8	65
Abb.21: Immunhistochemische Färbung mit Faktor 8	65
Abb.22: Immunhistochemische Färbung mit CD68	66
Abb.23: Immunhistochemische Färbung mit CD68	66
Abb.24: Immunhistochemische Färbung mit FcgammaRIII/CD16	67
Abb.25: Immunhistochemische Färbung mit FcgammaRII/CD32	67
Abb.26: Histochemische TUNEL-Färbung	68
Abb.27: Histochemische TUNEL-Färbung	68

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	'antibody-dependent cellular cytotoxicity'
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
ANCA	'anti-neutrophil-cytoplasmic-antibodies'
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase-Methode
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäuren
ASS	Acetylsalicylsäure
C5a	Komplement-Faktor mit chemotaktischer Funktion
C3b	Komplement-Faktor mit opsonierender Funktion
C1q	Komplement-Faktor
CD	'Cluster of differentiation', Zelloberflächenmoleküle von Leukozyten und Plättchen, die mit Hilfe monoklonaler Antikörper zu deren Differenzierung genutzt werden können
CD..L	'Cluster of differentiation'..Ligand
cdk	'cyclin dependent kinase'
CR-1	Rezeptor für aktivierte C3 Fragmente
DAB	Diaminobenzidin
DMS	Dimethylsulfoxid
DNA	'deoxy-nukleotidyl acid'
EM	Elektronenmikroskop
Fab-Fragmente	Antigen-bindende Region der Antikörper
Fc	konstante Region der Antikörper, die verantwortlich ist für an Antikörper Rezeptoren von Zellen und die Bindung der Komplement- Komponente C1q
G	Gefrierschnitt
G-CSF	'granulocyte colony stimulating factor', Wachstumsfaktor, Zytokin
GM-CSF	'granulocyte & macrophage colony stimulating factor', Wachstumsfaktor, Zytokin
G1/G2-Phase	'Gap1/Gap2'-Phase des Zellzyklus
h	Stunde/n
HLA	'human leukocyte antigen system'
ICAM	'intercellular adhesion molecule',

	Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilo-Dalton
kLV	kutane leukozytoklastische Vaskulitis
m	mononukleär
MHC	'major histocompatibility complex', sog. Haupthistokompatibilitätskomplex (HLA-Genkomplex) des HLA-Systems
min	Minute/n
moAk	monoklonale/r Antikörper
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
MPO	Myeloperoxidase
MPS	mononukleäres phagozytäres System
NGF	'nerv-growth factor'
NO	'nitric oxide'
p	polymorphkernig
P	Paraffinschnitt
PAN	Polyarteriitis nodosa
PBS	'sodium phosphate buffered saline' (Puffer)
PCNA	'proliferating cell nuclear antigen'
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
p>m & m>p	polymorphkernig > mononukleär und umgekehrt
PR3	Proteinase 3
RT	Raumtemperatur
RPMI 1640	Kulturmedium
sec	Sekunden
SLE	systemischer Lupus erythematosus
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
Tab.	Tabelle
TBS	'Tris buffered saline' (=Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TNF	'tumor necrosis factor'
TUNEL	'terminal desoxynukleotidyl transferase mediated dUTP nick end-labeling'
VCAM	'vascular cell adhesion molecule', Adhäsionsmolekül
vWF	von Willebrand Faktor

1 EINLEITUNG

1.1 Definition der Vaskulitis

Vaskulitiden sind, wie der aus den Wortteilen vas- und -itis zusammengesetzte lateinisch-neulateinische Name schon sagt, Entzündungen der Blutgefäße. Genauer gesagt, handelt es sich um Entzündungen der Gefäßwände, die von Granulozyten geschädigt und im weiteren Verlauf zerstört werden [202]. Werden die Gefäße durch äußere Faktoren oder als Begleiterscheinung geschädigt, wie es unter anderem bei entzündlichen Geschehen des umliegenden Gewebes der Fall ist, spricht man definitionsgemäß nicht von Vaskulitiden [86; Kolde G., *im Druck*]. Ursprünglich ging man davon aus, dass abgesehen von den vornehmlich durch neutrophile Granulozyten ausgelösten auch lymphozytäre Vaskulitiden existieren, da die Histologie diesen Eindruck vermitteln kann. Diese Annahme ist jedoch mittlerweile umstritten. Einerseits ist schon seit langer Zeit bekannt, dass sich im Laufe der Resolution von Entzündungen das anfangs polymorphkernige Infiltrat später zu einem vorwiegend mononukleären umwandelt. Andererseits ist noch keine Erkrankung bekannt geworden, bei der Lymphozyten selektiv die Gefäßwände zerstören [92]. Handelt es sich tatsächlich um primär lymphozytäre Gefäßinfiltrationen ohne Zerstörung der Gefäßwand, wie bei der Purpura pigmentosa progressiva, sollte daher von einem vaskulopathischen und nicht einem vaskulitischen Geschehen gesprochen werden [86].

1.2 Klassifikation der Vaskulitiden

Da die Ätiologie und die pathogenetischen Aspekte dieser Entzündungen noch nicht vollkommen verstanden werden, existiert nach wie vor keine allgemein gültige Klassifikation der Vaskulitiden [202,173]. Eine sinnvolle und einfach zu handhabende Einteilung nach der Größe der betroffenen Blutgefäße wurde 1994 von Jennette und Mitarbeitern vorgeschlagen [83]. In dieser Klassifikation werden, abgesehen von der Gefäßgröße, zusätzlich histopathologische Kriterien, pathogenetische Faktoren, d.h. vaskuläre Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement, ätiologische Gesichtspunkte und begleitende Organmanifestationen berücksichtigt.

Üblicherweise spricht man nur dann von kutaner Vaskulitis, wenn ausschließlich die Haut betroffen und keine systemische Beteiligung zu eruieren ist [83]. Es können sich aber fast alle Systemvaskulitiden auch an den kutanen Blutgefäßen zeigen. Liegt eine kutane Vaskulitis vor, muss dementsprechend eine Mitbeteiligung innerer Organe (ZNS, Niere) ausgeschlossen werden, bevor die Diagnose gestellt wird, auch

wenn der alleinige Befall der Haut zu den häufigen und bevorzugten Organmanifestationen einer Vaskulitis zählt [118; Kolde G., *im Druck*].

Die kutane Vaskulitis betrifft in den meisten Fällen kleine Gefäße, d.h. postkapilläre Venolen [118,172,86,196,193,87], und ist histopathologisch gekennzeichnet durch die Fragmentierung der Kerne der eingewanderten neutrophilen Granulozyten (Karyorrhesis, Leukozytoklasie) [202,119]. Diese Gefäßentzündungen werden als kutane leukozytoklastische Vaskulitis (kLV) bezeichnet. Eine in Anlehnung an die von Jennette entwickelte Klassifikation der vaskulitischen Syndrome zeigt Abbildung 1 [202].

- | |
|--|
| <p>A) Entzündung der großen, mittelgroßen und kleinen Blutgefäße</p> <ol style="list-style-type: none">1. Takayasu Arteriitis2. Riesenzellerteriitis (z.B. Arteriitis temporalis)3. Aortitis bei rheumatischen Erkrankungen4. Aortitis im Rahmen anderer Erkrankungen (z.B. Mesaortitis luica) <p>B) Entzündung der mittleren und kleinen Blutgefäße</p> <ol style="list-style-type: none">1. Polyarteriitis nodosa (PAN)-Gruppe<ol style="list-style-type: none">1.1 klassische PAN1.2 kutane PAN (gutartig, ohne systemische Beteiligung)1.3 mikroskopische PAN (glomeruläre Herdnephritis, ohne Beteiligung interlobulärer und intralobulärer Arterien)1.4 Mikroskopische Polyangiitis (im Gegensatz zur klassischen PAN: Beteiligung kleinerer Gefäße, häufig mit Hämorrhagie der Lunge, positiven ANCA., rapid progressiver Glomerulonephritis, aber ohne renale Vaskulitis und Mikroaneurysmen)1.5 PAN im Kindesalter (Kawasaki-Syndrom)2. Thrombangiitis obliterans (M. Winiwarer-Buerger) (die Gefäßschädigung kann durch primäre Thrombosierung der Gefäße bedingt sein und ist dann keine Vaskulitis im eigentlichen Sinne)3. Pathergie-allergische Granulomatose und Angiitis<ol style="list-style-type: none">3.1 Wegenersche Granulomatose3.2 Churg-Strauss Syndrom <p>C) Entzündung der kleinen Blutgefäße</p> <ol style="list-style-type: none">1. Vaskulitis assoziiert mit vaskulären Ablagerungen von Immunglobulinen (leukozytoklastische Vaskulitis)<ol style="list-style-type: none">1.1 Purpura Schönlein-Henoch (anaphylaktoide Purpura)1.2 Kryoglobulinämische Vaskulitis1.3 Urtikarielle Vaskulitis1.4 Medikament-assoziierte Hypersensitivitätsvaskulitis1.5 Serumkrankheit1.6 Vaskulitis assoziiert mit vaskulären Ablagerungen von Immunglobulinen, deren Ursprung sowohl bekannt als auch unbekannt ist (bei rheumatoider Arthritis, SLE, Infektionen und malignen Erkrankungen)2. Vaskulitis, die mit der Infektion der Endothelzellen assoziiert ist3. Vaskulitis, die mit der Shwartzman-Reaktion ähnlicher Pathophysiologie assoziiert ist |
|--|

Abb. 1: Klassifikation vaskulitischer Syndrome

1.3 Das Phänomen der Leukozytoklasie

Die Leukozytoklasie stellt ein besonderes Phänomen der kLV dar. Mit diesem Begriff wird das morphologische Korrelat des geordneten Zell- und Kernzerfalls (Karyorrhexis) der neutrophilen Granulozyten im Gewebe bei dieser Erkrankung bezeichnet. Leukozytoklasie kann außerdem in urtikarieller Vaskulitis und in chronischen Entzündungen der kleinen Gefäße gesehen werden [202]. Die zellulären und molekularen Vorgänge dieses Zellzerfalls sind bisher nicht bekannt. Insbesondere wurde bislang nicht geklärt, ob es sich, wie in der Literatur für das Schicksal der neutrophilen Granulozyten bei der Resolution verschiedener akuter entzündlicher Prozesse beschrieben, um einen Zelltod im Sinne der Apoptose handelt [183, 68, 28, 132].

Der Begriff Apoptose wurde erstmals durch Kerr, Wyllie und Currie 1972 eingeführt und beschreibt eine morphologische Sequenz, die zum Absterben von Zellen führt [96]. Ursprünglich fand der Begriff Schrumpfnekrose Verwendung [95]. Histologisch zeigt sich eine Kondensation des Chromatins und des Zytoplasmas mit einer Schrumpfung der ganzen Zelle. Ultrastrukturell sieht man in der frühen Phase eine Kondensation und Margination des Chromatins. Es schließt sich ein Prozess der Kondensation und Knospung (budding) sowohl der Zelle, als auch des Zellkerns an [9]. Im Laufe der Zeit kommt es zur Separation des Zellkerns (Karyorrhexis) und des Zytoplasmas, und es bilden sich kleine, runde, zytoplasmatische, von der Zellmembran umschlossene Fragmente des Zytoplasmas und Kerns [97]. Phasenweise weist die Zelloberfläche viele kleine Ausstülpungen auf. Dieses Phänomen wird auch als 'blebbing' bezeichnet [96,101]. Die Zellorganellen bleiben währenddessen intakt, insbesondere die Mitochondrien schwellen nicht an. Phasenkontrastmikroskopisch erfolgt die Formation der apoptotischen Fragmente innerhalb von wenigen Minuten [171]. Abhängig von der Zellart findet im Anschluß eine sehr schnelle Phagozytose der Fragmente durch Zellen des umliegenden Gewebes oder professionelle Phagozyten statt [146,41]. Charakteristischerweise kommt es nicht zu einer lokalen Entzündungsreaktion [183]. Allem Anschein nach handelt es sich um einen physiologischen Selbstmordmechanismus, der spiegelbildlich zur Mitose in der Gewebemöostase abläuft [58]. Oft wird die Bezeichnung 'programmierter Zelltod' als Synonym verwandt. Dieser Begriff bezieht sich jedoch eher auf die biochemischen und vor allem genetischen Hintergründe [116,151,41].

Als Nekrose oder provoziertes Zelltod wird die Endstrecke irreversibler Stoffwechselstörungen, die entweder Struktur-, Funktions-, Proliferationsstoffwechsel oder alle gleichzeitig betrifft, bezeichnet [9,229,213]. Ursächlich können unterschiedliche, meist extreme äußere Bedingungen sein. Zu diesen zählen UV-Strahlen, elektrische Entladungen, freie Radikale, Bakterien, extreme Temperaturen, Hypoxie, deutliche Änderungen des pH-Wertes, terminale Komponenten der Komplementkaskade und viele mehr [186]. Es geht eine reversible Phase voraus, die gekennzeichnet ist durch Schwellung und Membranschädigung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums. In der anschließenden irreversiblen Phase laufen verschiedene Stoffwechselforgänge immer unvollständiger und unkoordinierter ab. Durch das Versagen der Ionenpumpen der Zellmembran zeigt sich eine Schwellung und Vakuolisierung der ganzen Zelle [229,123]. Die mangelnde Energiebereitstellung führt zur Kernauflösung (Karyolyse) [98] und zur Lyse der Zelle [41].

Bisher wurde nicht detailliert untersucht, ob die Leukozytoklasie von neutrophilen Granulozyten einem nekrotischen oder apoptotischen Zelluntergang entspricht. Erst in den letzten zwei Jahren lassen sich zu diesem Thema drei Publikationen finden [7,8,191]. Das Ziel dieser Untersuchungen war, herauszufinden, ob es sich bei der leukozytoklastischen Desintegration um Apoptose handelt. Diese Fragestellung ergab sich, da in zahlreichen Studien gezeigt wurde, dass *in vitro* gealterte neutrophile Granulozyten dem Prozess der Apoptose unterliegen [183,154,99]. In allen drei Untersuchungen konnte nicht ohne Einschränkung bewiesen werden, dass die Zellen bei kLV ausschließlich apoptotisch absterben. Zudem wurden Kriterien zum Beweis der Apoptose hinzugezogen, die in der Literatur kontrovers beurteilt werden. Insgesamt wurde vermutet, dass Apoptose in kutaner nekrotisierender Vaskulitis/anaphylaktoider Purpura vorhanden ist und klastische Partikel apoptotische Körperchen darstellen könnten.

Die entscheidenden Kriterien der Apoptose und Nekrose sind in Abbildung 2 gegenübergestellt [212].

Apoptose	Nekrose
Morphologie: <ul style="list-style-type: none"> • 'blebbing' der Zellmembran, aber kein Verlust der Integrität • Aggregation des Chromatins an der Kernmembran • zelluläre Kondensation (Schrumpfen der Zelle) • Formation von membrangebundenen Vesikeln (apoptischen Körperchen) • Keine Desintegration der Organellen, Organellen bleiben intakt 	Morphologie: <ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Zellmembranintegrität • Flockige Auflösung des Chromatins • Schwellung und Lyse der Zelle • keine Formation von Vesikeln, komplette Lyse • Desintegration (Schwellung) der Organellen
Biochemie: <ul style="list-style-type: none"> • streng regulierter Prozess, der der Aktivierung bestimmter enzymatischer Schritte bedarf • Energie (ATP)-abhängiger Prozess, (aktiver Prozess, der bei -4C° nicht abläuft) • geordnete DNA-Fragmentierung, mit charakteristischer 'Leiter' in der Agarose-Gel-Elektrophorese • prä-lytische DNA-Fragmentierung (=frühes Ereignis des Zelltodes) 	Biochemie: <ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Regulation der Ionen-Homöostase • Kein Energieverbrauch (passiver Prozess, der auch bei 4C° stattfindet) • ungeordnete Verdauung der DNA • post-lytische DNA-Fragmentierung (=spätes Ereignis des Zelltodes)
Physiologische Bedeutung: <ul style="list-style-type: none"> • Tod einzelner, individueller Zellen • induziert durch physiologische Stimuli • Phagozytose durch Zellen der Umgebung und Makrophagen • keine entzündliche Reaktion 	Physiologische Bedeutung: <ul style="list-style-type: none"> • Tod von Zellgruppen • bedingt durch nicht-physiologische Gegebenheiten • Phagozytose durch Makrophagen • signifikante entzündliche Reaktion

Abb. 2: Eine Übersicht der Unterschiede zwischen Apoptose & Nekrose

1.4 Zielsetzung & Fragestellung

Neutrophile Granulozyten spielen eine maßgebliche Rolle in der Resolution oder Chronifizierung von Entzündungen. Dabei erfüllen sie teilweise wesentliche und sinnvolle Aufgaben. Sie dienen als erste Zellen, die in Entzündungsgebiete einwandern der Abwehr fremder Eindringlinge, wie Bakterien. Sie bergen dabei aber auch immer die Gefahr, durch ihre lysosomalen Enzyme das umliegende Gewebe zu schädigen [186]. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass sie sich nur begrenzte Zeit im Gewebe aufhalten. Dies ist in akuten, selbstlimitierten Entzündungen der Fall. Somit könnte eine Aufklärung der Mechanismen bei akuten Entzündungen in der Zukunft zu neuen therapeutischen Ansätzen bei der Behandlung von chronischen entzündlichen Erkrankungen führen [220].

Savill erwähnte bereits 1993, dass die kLV ein ideales *in/ex vivo* Modell für die Aufklärung des Absterbens der neutrophilen Granulozyten in Entzündungen darstellt

[186]. Bis heute existieren in diesem Zusammenhang kaum repräsentative humane *in vivo/ex vivo* Modelle. Die kLV bietet einige sehr interessante Aspekte. Es handelt sich um eine selbstlimitierte Entzündung, und es ist die einzige Entzündung, bei der man das Phänomen der Leukozytoklasie so ausgeprägt sieht. Vorteilhaft ist außerdem, dass Hautbiopsien bei dieser Erkrankung zur diagnostischen Sicherung entnommen werden, wodurch detaillierte Untersuchungen möglich werden. Aufgrund der charakteristischen Morphologie der Leukozytoklasie und der schon mehrfach geäußerten Hypothese, dass neutrophile Granulozyten in akuten entzündlichen Prozessen in Apoptose gehen, sollte geklärt werden, ob neutrophile Granulozyten in kLV durch Apoptose oder Nekrose absterben. Dabei galt das besondere Interesse den zellulären Kennzeichen und der molekularen Regulation, die dem Zelltod dieser Zellen im Entzündungsgebiet zugrunde liegen. Präziser ausgedrückt sollte aufgedeckt werden, ob Neutrophile die zellulären und molekularen Kennzeichen einer Apoptose aufweisen und wie sie letztlich aus dem Entzündungsgebiet entfernt werden.

Um diese Fragen zu klären, wurden histologische, immunhistologische, histochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen an diagnostisch gewonnenen Proben kutaner leukozytoklastischer Vaskulitiden und an durch Histamin-induzierten Proben bei Patienten mit kLV vorgenommen.

2 Inzidenz, Ätiologie, Klinik und Pathologie der kLV

Für den Begriff kLV sind zahlreiche Synonyme im Gebrauch. Zu den wichtigsten zählen: Hypersensitivitätsangiitis, kutane allergische Vaskulitis (*Vasculitis allergica*), anaphylaktoide Purpura, Immunkomplexvaskulitis [177,179,11] und als besondere Variante zählt die Purpura rheumatica Schönlein-Henoch dazu [Schönlein 1832, Henoch 1868].

2.1 Inzidenz

Die kLV kommt gleichermaßen in beiden Geschlechtern und in allen Altersstufen vor, dabei sind ca. 10% der Patienten Kinder [118,167,121].

2.2 Ätiologie

In den meisten Fällen läßt sich keine zugrundeliegende Ursache feststellen. Als Auslöser werden zahlreiche Faktoren postuliert: (1) bakterielle (Streptokokken) und

virale (Influenza) Infektionen; (2) Fremdproteine (Serumkrankheit); (3) chemische Substanzen (Insektizide, Herbizide); (4) Medikamente (vor allem Aspirin, Phenacetin, Phenothiazine, Penicillin, Sulfonamide, Jod, Tetrazykline); (5) Nahrungsmittel (z.B. Milchproteine) und (6) Systemerkrankungen (vor allem Autoimmunerkrankungen, Lymphome, Karzinome, Hepatitiden) [118,172,196,121,15,188]. Am häufigsten wird den Streptokokken, beziehungsweise den darauf folgenden Abwehrreaktionen des Körpers, eine ursächliche Beteiligung zugeschrieben. Allgemein wird davon ausgegangen, dass es sich um eine Immunkomplexerkrankung handelt, d.h. immunologisch um eine Typ III-Hypersensibilitätsreaktion [122,234].

2.3 Klinik

Akut und schubweise treten innerhalb weniger Tage dunkelrote Petechien auf, oft nur an Unterschenkel- und Knöchelregion. Bei ausgedehnten Entzündungen finden sich diese auch an Oberschenkeln, am Rumpf (Aufliegestellen) und schließlich am gesamten Integument, auch an den Schleimhäuten [118,172]. Die Größe der Petechien schwankt von stecknadelkopfgroß bis mehrere Zentimeter. Sie sind entzündlich, flach erhaben, tastbar, überwärmt und brennend schmerzhaft (palpable Purpura) [193,177,118,172,196,15,178]. Sie können sich peripher vergrößern, konfluieren und zu dunkelroten schmerzhaften Infiltraten wachsen. Kleinere und mildere Läsionen bilden sich innerhalb von Tagen bis Wochen unter Hinterlassung von bräunlichen Hyperpigmentierungen zurück. Bei größeren, heftig entzündlichen Läsionen kommt es hingegen zentral zur Bildung hämorrhagischer, nekrotischer Blasen. Später disseminieren trockene Nekrosen oder hämorrhagisch verkrustete Ulzera. Bei diesen dauert der Heilungsvorgang mehrere Wochen. Es entstehen hyperpigmentierte, leicht atrophe Narben [118,196]. Es können milde Systemzeichen, wie Fieber, Krankheitsgefühl Arthralgien und/oder Myalgien mit kutanen Läsionen einhergehen [118,172,86]. Klinisch manifester Organbefall besteht in bis zu 50% der Fälle. Betroffen sind Gelenke (40%), Niere (30%), Gastrointestinaltrakt (30%), Lunge (20%), ZNS (10%), seltener Herz, Leber und Muskulatur [11]. Der Organbefall ist meist milde. Gelegentlich treten jedoch dramatische Komplikationen auf. Diese betreffen vor allem die Niere (Glomerulonephritis) und das ZNS (zerebrale Vaskulitis), aber auch den Gastrointestinaltrakt (erosive Gastritis, Magenulzera, Darmkoliken, Meläna, Diarrhöen, Ileus) [Kolde G., *im Druck*; 52].

2.4 Histo- und Immunpathologie

Die Läsionen weisen charakteristischerweise eine akute nekrotisierende Entzündung der kleinkalibrigen Blutgefäße der oberen Dermis auf. Das vaskuläre und perivaskuläre Infiltrat setzt sich aus neutrophilen Granulozyten, Leukozytoklasie, Fibrin-Ablagerungen und Hämorrhagie zusammen. Die Migration der neutrophilen Granulozyten zeigt sich an den postkapillären Venolen [177] in Form einer komplexen Serie von Endothel-Leukozyten-Interaktionen. Normalerweise lassen sich mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung in den Gefäßwänden und um diese herum IgG, IgM, C3, C4 und C1q nachweisen. IgM ist der einzige Antikörper, der sich vergleichsweise konstant zusammen mit C3 nachweisen lässt [63]. Die Immunkomplexe persistieren nur für kurze Zeit in den Gefäßwänden. Weniger häufig läßt sich IgA nachweisen, was dann zu der Diagnose einer Schönlein-Henoch-Purpura führt. Der positive Nachweis von Immunkomplexen korreliert direkt mit der Zeit der Biopsie-Entnahme. In Läsionen, die älter sind als 72 Stunden, hat sich das Infiltrat dahingehend verändert, dass es von lymphozytären Zellen dominiert wird [179,226]. Obwohl der Nachweis von Immunkomplexen zum Verständnis der Pathogenese der kLV wichtig ist, ist dieser Nachweis üblicherweise für die Diagnosestellung nicht nötig [16]. Braverman und Yen beschrieben erstmals, dass sich nach intradermaler Injektion von Histamin in unbefallene Haut bei Patienten mit kLV, an den Injektionsstellen ebenfalls leukozytoklastische Reaktionen auslösen lassen [12]. Diese Erkenntnis eröffnete die Möglichkeiten, den zeitlichen Verlauf des pathologischen Geschehens genauer zu untersuchen und im klinischen Alltag die Diagnose zu sichern.

Experimentelle Untersuchungen sprechen dafür, dass es sich bei der leukozytoklastischen Vaskulitis um eine Hypersensibilitätsreaktion vom Typ III handelt, ähnlich der experimentell ausgelösten Arthus-Reaktion [47,87]. Die essentiellen Elemente der Arthus-Reaktion beinhalten Antigen, Komplement-fixierende Antikörper, ein intaktes Komplementsystem und eine adäquate Anzahl an neutrophilen Granulozyten [17]. Lösliche Immunkomplexe, die sich in Antigen-Überschuß formiert haben, zirkulieren so lange, bis es zu einem Ereignis wie einer Verlangsamung des Blutflusses oder zu Turbulenzen kommt (z.B. an Bifurkationen der Blutgefäße, durch lokale vasoaktive Substanzen und Hydrostase), was deren Ablagerung an den Gefäßwänden nach sich zieht [203]. Folgend darauf wird das Komplementsystem aktiviert und generiert chemotaktische Faktoren (C3a, C5a), die

neutrophile und basophile Granulozyten anlocken. Basophile stellen eine Quelle für Histamin dar, wodurch die vaskuläre Permeabilität gesteigert, und die Migration der polymorphkernigen Neutrophilen und Immunkomplexe durch die Gefäßwände ermöglicht wird [16]. Die Endothelzellen der Kapillaren und postkapillären Venolen bieten Bindungsstellen für die Fc-Fragmente der Immunglobuline und für C3b [210]. Des Weiteren induziert die funktionelle Kooperation zwischen FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16), als Antwort auf die mit Immunkomplexen beladenen Endothelzellen, eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten [139]. Im aktivierten Zustand polymerisieren diese Aktin und bedingen, dass die Zellen in den Kapillaren retiniert werden [16]. Eine Schlüsselfunktion in diesem Prozess stellen sowohl die durch Endothelzellen freigesetzten Adhäsionsmoleküle und Zytokine als auch die aktivierten neutrophilen Granulozyten dar [17,139]. Möglicherweise spielt der MAK (= 'membran attack'-Komplex) des Komplementsystems eine signifikante Rolle in der Veränderung der Integrität der Endothelzellmembran [94]. Aktivierte polymorphkernige Neutrophile setzen proteolytische Enzyme frei. Es handelt sich insbesondere um Kollagenasen und Elastasen sowie freie Radikale, die die Gefäßwände und das umliegende Gewebe schädigen [16,47]. Sensibilisierte T-Lymphozyten könnten im Zusammenhang mit Antikörper-abhängigen Zellzytotoxischen (ADCC) Mechanismen auch einen direkten zytotoxischen Effekt auf die Endothelzellen haben [16].

2.4.1 Immunkomplexe

Immunkomplexe werden gebildet, wenn Antigen auf Antikörper trifft. Üblicherweise werden sie anschließend an eine Komplementaktivierung durch das mononukleäre phagozytäre System (MPS) entfernt. Persistierende Antigene bei chronischen entzündlichen oder autoimmunen Prozessen führen zu Immunkomplexerkrankungen [187,69]. Komplexe können sich sowohl in der Zirkulation als auch lokal bilden und so im ersten Fall zu systemischen, im letzteren zu lokalen Erkrankungen führen (z.B. Lunge, Niere, Haut). Die Fähigkeit Komplexe löslich zu halten, ist eine Funktion des Komplementsystems [187]. In gesunden Individuen kommt es immer wieder zur Bildung von Komplexen, die aber löslich gemacht und daraufhin wieder entfernt werden. Die Erythrozyten der Primaten besitzen Rezeptoren für C3b (auch als CR-1 bezeichnet). Diese sind von großer Bedeutung für den Transport der durch Komplement opsonierten Immunkomplexe zur Leber und Milz, wo sie dann aus der

Zirkulation entfernt werden können. Komplement-Defizienzen führen zur Formation unlöslicher Komplexe, die sich in Geweben ablagern [187,69]. Faktoren, die die Permeabilität der Gefäße steigern (z.B. Histamin und Serotonin), erhöhen die Ablagerung der Immunkomplexe in Geweben [23,12]. Die auf persistierende Komplexe folgende Schädigung durch die Effektorzellen selbst und Komplement ist als Typ III-Hypersensibilitätsreaktion, bzw. als Immunkomplex-Erkrankung bekannt [169].

2.5 Experimentelle Modelle zum besseren Verständnis von Immunkomplexerkrankungen und vaskulären Reaktionen

2.5.1 Arthus-Reaktion (Tierexperiment: Maus)

Es handelt sich um eine experimentell durch extrinsisches Antigen ausgelöste Immunkomplexvaskulitis der kleinen Blutgefäße, eine klassische Hypersensibilitätsreaktion vom Typ III. Injektionen von Antigen in die Haut von spezifisch sensibilisierten Tieren produzieren die Arthus-Reaktion [6]. Ein Tier wird solange immunisiert, bis es einen gewissen Spiegel an Serum-Antikörpern, vorwiegend IgG, aufweist. Folgend auf die intradermale Injektion des Antigens entwickelt sich eine Läsion an der Injektionsstelle, manchmal mit sichtbarem Ödem und Hämorrhagie. Ihren Höhepunkt erreicht die Reaktion innerhalb von 4 bis 10 Stunden, nimmt dann wieder ab und ist normalerweise nach 48 Stunden minimal. Immunfluoreszenzmikroskopische Studien zeigen, dass auf die initiale Ablagerung von Antigen, Antikörpern und Komplement in den Gefäßwänden eine Infiltration durch neutrophile Granulozyten und eine intravaskuläre Plättchenaggregation folgen [21,169]. Letztere kann zur Okklusion der Blutgefäße führen und in schwerwiegenden Fällen zur Nekrose derselben. Nach 24 bis 48 Stunden werden die neutrophilen Granulozyten durch mononukleäre Zellen ersetzt, und es erscheinen schließlich einige Plasmazellen.

Komplement soll eine sehr wichtige Rolle in der Auslösung dieser Reaktion spielen, da Mäuse mit einem Komplement-Mangel eine abgeschwächte Arthus-Reaktion zeigen [22] und die ausschließliche Ablagerung zirkulierender Immunkomplexen an den Gefäßwänden nicht zur Ausbildung einer Läsion führt [202]. Des Weiteren ist mittlerweile bekannt, dass Zellen mit intakten Fc γ -Rezeptoren zur Auslösung der Arthus-Reaktion nötig sind (Fc γ RI-III) [204,76,164]. Die chemotaktisch angelockten Leukozyten sollen über diese Rezeptoren aktiviert werden, d.h. ihre lysosomalen

Enzyme freisetzen, wodurch die Endothelzellen geschädigt werden [164,202]. Die Arthus-Reaktion ist ein sehr brauchbares Tier-Modell zur Aufklärung der Pathophysiologie der Immunkomplexerkrankungen. Dennoch ist bei der Interpretation von Tierexperimenten in Bezug auf die Verhältnisse im menschlichen Körper Vorsicht geboten, da Tiere den C3b-Rezeptor, der vorwiegend auf den Erythrozyten lokalisiert ist, hier nicht exprimieren. Tiere sind auf die geringeren Mengen der auf den Plättchen lokalisierten C3b-Rezeptoren angewiesen [169]. Primaten besitzen ca. 700 dieser Rezeptoren auf den Erythrozyten. Von Erythrozyten werden bevorzugt solche Komplexe gebunden, die opsoniert sind. Da die Erythrozyten zentral im Plasma schwimmen und somit die Gefäßwände nicht berühren, fungieren sie als eine Art Puffersystem. Nur in den Sinus der Leber und der Milz, bzw. an Orten mit größerer Turbulenz kommen komplex-beladene Erythrozyten in Kontakt mit den Endothelzellen. Wie schon erwähnt, werden Komplexe in Leber und Milz durch fixe Makrophagen aus der Zirkulation entfernt. Bei diesem Prozess wird Komplement (d.h. C3b) ebenfalls entfernt. Dies führt in Prozessen mit kontinuierlicher Formation von Komplexen zu einer Abnahme von C3b, wodurch möglicherweise die Entfernung der Komplexe durch das MPS beeinträchtigt wird (z.B. bei systemischem Lupus erythematosus/SLE) [169,77,205].

2.5.2 Shwartzman-Reaktion

Obwohl es sich bei der Shwartzman-Reaktion nicht um ein Immunkomplex-Geschehen handelt, kann sie möglicherweise aufschlussreich in Bezug auf die Relevanz von Adhäsionsmolekülen sein. Während einer Septikämie durch Meningokokken oder Gram-positive Bakterien, wie Staphylokokken (toxisches Schock-Syndrom) kann sich ebenfalls eine Purpura der Haut zeigen. Die Schädigung der Endothelzellen ist dabei nicht immer durch die Bakterien selbst bedingt, sondern es kann sich auch um eine (lokale) Shwartzman-Reaktion handeln. Zwar wird in der Dermatologie nur selten eine klassische lokale Shwartzman-Reaktion gesehen, dennoch ist davon auszugehen, dass die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen auch bei der Entwicklung von kutanen Vaskulitiden eine Rolle spielen. [202]

Sunderkötter et al konnten in einem Tiermodell zeigen, dass wiederholte Injektionen von Endotoxin (LPS) zu einem Gefäßschaden mit intravasalen Thromben und Leukozytoklasie führten. Es bildete sich also eine von Immunkomplexen unabhängige Vaskulitis aus [201]. Dabei führte eine Kaskade von Zytokin-

Interaktionen zur Ausbildung der Shwartzman-Reaktion. Makrophagen setzen nach der lokalen Aktivierung durch LPS IL-12 frei. Dies führte zu einer Sekretion von $\text{INF}\gamma$ durch NK-Zellen, mit folgender Freisetzung von IL-1 und $\text{TNF}\alpha$ durch Makrophagen. Diese wiederum führten zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen. Injektionen von LPS 18 bis 24 Stunden später löste die sogenannte Änderung der Effektor-Phase aus, in der erhöhte Spiegel von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 und $\text{INF}\gamma$ im Serum gemessen werden können. Ein Effekt dieser Zytokine ist die Aktivierung von Leukozyten (CD11b/CD18) [5,57]. Diese Aktivierung steigert einerseits die Adhäsion an das Endothel, andererseits das toxische Potential der Leukozyten. Blockierungen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 oder CD11b/CD18 durch Antikörper [5,228], beziehungsweise der genetisch ausgelöste Mangel an ICAM-1 [231], vermindern die vaskuläre Reaktion. Da die Blockierung oder der genetisch induzierte Mangel von Adhäsionsmolekülen auch andere Formen von Vaskulitiden und Entzündungen ohne Gefäßbeteiligung unterdrückt, ist davon auszugehen, dass Adhäsionsmoleküle ebenfalls wesentlich an der Pathophysiologie vaskulitischer Prozesse beteiligt sind [202].

Adhäsionsmoleküle agieren in einer sequentiellen Art und erlauben es den Neutrophilen in kLV, sich außerhalb der Gefäße zu bewegen. Der erste Schritt ist das sogenannte Rollen intraluminal an der Gefäßwand, bis es nach stetiger Verlangsamung zum Stillstand kommt und zur darauf folgenden Fixierung/Adhäsion an die Endothelzelle [147]. Verschiedene Selektine sollen in kLV bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen. Für die Adhäsion der Neutrophilen an das Endothel soll E-Selektin verantwortlich sein [225,174].

Zum besseren Verständnis bietet die Abbildung 3 einen Überblick über die Mechanismen, die zur Manifestation der leukozytoklastischen Vaskulitis führen sollen [17].

<u>Initiationsphase</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Antigen-Signal • Immunkomplexformation • Komplement-Aktivierung • Chemoattraktion der neutrophilen und basophilen Granulozyten • Aktivierung der Endothelzellen 	
<u>Vasoinduktive Phase</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • TNFα , IL-1, IL-6, GM-CSF • Chemokine: IL-8, MCP, GROα 	
Adhäsionsmoleküle	
-Rollen: P- und E-Selektin	
-Arrest: VCAM-1	
-feste Adhäsion: ICAM-1	
<u>Effektorphase</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Transendotheliale Migration <ul style="list-style-type: none"> -Adhäsionsmoleküle -chemotaktische Gradienten -Histamin, NO • Gewebedestruktion <ul style="list-style-type: none"> -MAK-induzierte Alteration der Endothelzellen -Aktivierung der Neutrophilen <ul style="list-style-type: none"> Proteolytische Enzyme toxische O₂-Metaboliten 	
<u>Resolution</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • IL-1 Inhibitoren • TGFβ • PGE2 	
<u>Chronizität</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Fibrinabbauprodukte • degenerierte Leukozyten • degradiertes Kollagen • aggregierte Igs 	<p>GRO: growth regulating gene ; MCP: monocyte chemoattractant protein MAK: 'membrane attack complex'; NO: nitric oxide; TGF: transforming growth factor; PGE: Prostaglandin; TNF: tumor necrosis factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.</p>

Abb. 3: Ein Modell zur Entstehung der kLV

2.6 ANCA

ANCA (= 'anti-neutrophil-cytoplasmic-antibodies') sind eine Gruppe vorwiegend gegen lysosomale Antigene von Neutrophilen und Monozyten gerichtete IgG-Autoantikörper, die sich (im Gegensatz z.B. zu ANA) nicht bei Gesunden finden. Sie sind vor allem mit primären Systemvaskulitiden, seltener mit Kollagenosen und anderen System- oder Infektionskrankheiten assoziiert [57,62]. Sie werden mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Methode nachgewiesen. Zytoplasmatische ANCA (cANCA) richten sich gegen Proteinase 3 (PR3). Perinukleäre ANCA (pANCA) erkennen Myeloperoxidase (MPO), Kathepsin G und humane neutrophile Elastase. Diffuse, atypische ANCA (aANCA) richten sich gegen ein bislang unbekanntes Antigen. cANCA sind charakteristisch für die Wegenersche Granulomatose, pANCA lassen sich bei der mikroskopischen Polyangiitis (=PAN) und dem Churg-Strauss-Syndrom nachweisen [57,62].

Welche Ursachen zur Ausbildung von ANCA führen, ist nicht genau bekannt.

Gelegentlich gehen klinischen Manifestationen Infektionen voraus [157]. Hinsichtlich einer genetischen Komponente existieren keine einheitlichen Ergebnisse, so dass eine MHC-Assoziation möglicherweise nur gering ist [67]. Auch die Rolle der verschiedenen Autoantikörper ist nicht vollständig aufgeklärt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass mit TNF α [30] und IL-8 [162] vorbehandelte neutrophile Granulozyten durch die Bindung von ANCA aktiviert wurden, d.h. es folgte eine Freisetzung ihrer entzündlichen Mediatoren [90,45]. Die Bindung der ANCA soll dabei an Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RIIa, Fc γ RIIIb) erfolgen [227,142]. Zusätzlich ist für die Signaltransduktion eine durch β_2 -Integrin-vermittelte Adhäsion an eine Oberfläche nötig [168]. Monozyten exprimieren MPO und PR3 auf ihrer Zelloberfläche und sind möglicherweise zu späteren Zeitpunkten an der Pathogenese ANCA-assoziiierter Vaskulitiden beteiligt [142,163].

Klassischerweise finden sich bei der kLV keine ANCA. Dennoch haben die in jüngster Zeit durchgeführten Untersuchungen der ANCA erstmals gezeigt, wie und über welche Mechanismen neutrophile Granulozyten bei Vaskulitiden aktiviert werden. Es ist zu vermuten, dass ähnliche pathophysiologische Mechanismen auch für die Granulozytenaktivierung bei der kLV von Bedeutung sind.

2.7 Labor

Zur Sicherung der Diagnose und Beurteilung der systemischen Beteiligung sind histopathologische und immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, die Bestimmung der Blutparameter und Urinalysen angezeigt [118,172,86,195,196,121,188]. In der direkten Immunfluoreszenz können Immunglobuline, Komplement-Faktoren und Fibrinablagerungen vaskulär und perivaskulär nachgewiesen werden [15,178]. Die Blutuntersuchungen zeigen zunächst unspezifische Veränderungen im Sinne entzündlicher Prozesse, d.h. Leukozytose und eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit. Eine Verminderung von Komplement-Faktoren sieht man vor allem, wenn die kutane Vaskulitis mit rheumatoider Arthritis (C1, C4, C2), einem SLE (C1q, C4, C2, C3, C9), einer Kryoglobulinämie, einem Sjögren-Syndrom oder einer urtikariellen Vaskulitis assoziiert ist [118,172,86,195,196,188]. Weitere Befunde richten sich je nach Art des Systembefalls. Der Gerinnungsstatus ist normal. Bei der Durchführung spezifischer Bindungstests für Immunglobuline und Komplement (Rajzell-Test, C1q-Bindungstest u.a.m.) können in einigen Fällen zirkulierende Immunkomplexe (IgG, IgM und IgA,

letzteres vor allem bei der Purpura Schoenlein-Henoch) nachgewiesen werden. Des Weiteren lassen sich je nach zugrundeliegender Erkrankung Rheumafaktoren, ANA, Antiphospholipid-Antikörper oder Kryoglobuline nachweisen. Die Bestimmung des Antistreptolysin-Titers und eine Hepatitis-Serologie können ebenfalls aufschlussreich sein. Eine renale Beteiligung wird durch den Nachweis einer Proteinurie gesichert [118,172,86,195,196,188]. Okkultes Blut im Stuhl findet man bei gastrointestinaler Manifestation. Da es keinen spezifischen Laborparameter für eine kLV gibt, dient ihre Bestimmung dem Ausschluss einer systemischen Beteiligung. Eine gründliche Anamnese und körperliche Untersuchung ist zusätzlich immer angezeigt [14].

2.8 Prognose

Die Prognose einer kLV hängt von der Schwere der systemischen Beteiligung ab. Für die reine Hauterkrankung ist sie günstig. Als Komplikation kann sich gelegentlich eine bakterielle Sekundärinfektion einstellen [11]. Nach der akuten Phase kann es zu Rezidiven kommen. Häufige Rezidive korrelieren oft mit einer vermehrten perivaskulären Expression von HLA-DR und VCAM-1 [160]. Bei einer Nierenbeteiligung im Rahmen einer Purpura Schönlein-Henoch erstreckt sich der Verlauf manchmal über Monate. Die Komplikationen reichen von akutem Nierenversagen bis zu chronischer Nephropathie, die bei 5-10% aller Patienten eintritt. Bleibt die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz aus, so ist die Prognose der Erkrankung in der Regel gut [11].

2.9 Therapie

Die Behandlung zielt, sofern möglich, auf die Elimination des auslösenden Faktors (Infekte, Absetzen ursächlicher Medikamente, Behandlung von Systemkrankheiten, bzw. Neoplasien) hin. In den meisten Fällen kutaner und systemischer leukozytoklastischer Vaskulitiden bleibt dieser Trigger jedoch unbekannt [118,172,86,196,121,15,178,188].

Da die zugrundeliegenden Pathomechanismen des entzündlichen, möglicherweise immunpathologischen Geschehens bis heute noch nicht aufgeklärt sind, kann die Therapie nicht kausal, sondern nur symptomatisch erfolgen. Dabei stehen verschiedene immunsuppressive und immunmodulatorische Medikamente zur Verfügung. Sinnvolle Kombinationstherapien sind häufig effektiver, tragen zur Dosisersparnis bei und vermindern die Nebenwirkungsrate [202].

Zur Therapie der ersten Wahl gehört die systemische Gabe von Kortikosteroiden

[118,172,196,117]. Initial werden diese in mittlerer Dosierung verabreicht und daraufhin abhängig vom klinischen Bild langsam auf eine niedrigere Erhaltungsdosis reduziert. Additiv haben sich Zytostatika wie Cyclophosphamid etabliert [118,117,197]. Einen Nachteil dieser Therapie stellen jedoch die möglichen Entwicklungen von opportunistischen Infektionen und Malignomen dar. Immunmodulatorische Medikamente, die sich als wirksam erwiesen haben, sind Dapson und Pentoxifyllin [93,176]. Ebenfalls immunmodulierend wirkt das Spindelgift Colchicin [70]. Ein weiteres wirkungsvolles, aber auch sehr teures Behandlungsverfahren bieten die intravenösen Immunglobuline (z.B. Ak gegen Adhäsionsmoleküle von Leukozyten und Endothelzellen, wie ICAM-1 oder VCAM-1 und weitere), die bei ansonsten therapieresistenten Vaskulitiden eingesetzt werden können [197; Kolde G., *im Druck*].

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Hautbiopsien

Es wurden Hautbiopsien von 9 Patienten mit klinisch und histologisch gesicherter kLV der dermatologischen Abteilung des Universitätsklinikums Charité zu Berlin untersucht. Die Exzisionstelle war entweder der linke oder der rechte Unterschenkel medial oder lateral. Das Alter der 2 männlichen und 7 weiblichen Patienten variierte von 17 bis 85 Jahren. Die Ätiologie der kLV war in fast allen Fällen unklar. In einem Fall schien die Einnahme von ASS im Rahmen eines grippalen Infektes ursächlich zu sein. Bei 4 Patienten kam es zum Rezidiv, wobei dies bei einem Patienten nach Absetzen der systemischen Gabe von Kortison erfolgte. Alle anderen Patienten blieben ohne Therapie. Die Diagnose einer kLV wurde zudem immunfluoreszenzoptisch gesichert. Sieben der untersuchten Proben waren Anti-C3 positiv und in zwei Fällen konnten zusätzlich Immunglobuline (Anti-IgA und Anti-IgA/Anti-IgM) an den kleinen Blutgefäßen nachgewiesen werden. Außerdem wurden 13 Probeexzisionen von Patienten mit kLV, der dermatologischen Abteilung des Universitätsklinikums Münster zur Verfügung gestellt, die folgend auf eine Histaminquaddelung nach 1, 2, 3, 4.5, 8, 12 Stunden und nach klinischer Manifestation, beziehungsweise in zwei Fällen routinemäßig entnommen wurden, untersucht.

Als Negativkontrollen dienten 5 Biopsien von Normalhaut, die unter den gleichen Bedingungen gefärbt wurden.

3.1.2 Monoklonale Antikörper

Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich um monoklonale Antikörper von der Maus, die die Induktion oder Inhibition der Apoptose, die Induktion von negativer Zellwachstumskontrolle, die Zellproliferation oder das Vorhandensein verschiedener Zellarten, wie Makrophagen/Monozyten, neutrophilen Granulozyten oder Endothelzellen nachweisen.

CD95/CD95L

CD95/Fas ist ein Zelloberflächen-Antigen, das zur NGF/TNF-Familie gehört und eine wichtige Rolle bei der Gewebe-Homöostase spielt. CD95 induziert Apoptose in verschiedenen Zellarten, indem es an den Fas-Ligand oder an Anti-Fas-Antikörper bindet [189,79]. Man ist heute der Ansicht, dass die meisten Zellen CD95 mindestens in geringem Maß exprimieren.

CD95L/FasL gehört zur korrespondierenden TNF-Familie und kommt sowohl als Oberflächenrezeptor, als auch in löslicher Form vor [200]. CD95 und sein Ligand spielen eine Rolle in der Zellalterung [143,144,200].

bcl-2

bcl-2 ist ein Proto-Onkogen. Sein Gen kodiert für ein Protein, das an der Membran der Mitochondrien, an nukleären Strukturen und am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist [138,103]. Es inhibiert die Apoptose, wobei der Mechanismus noch nicht genau geklärt ist. Bekannt ist, dass es in Tumorzellen dereguliert wird, so z.B. im folliculären B-Zell-Lymphom und chronisch lymphatischer B-Zell-Leukämie [214]. Bcl-2 interagiert mit anderen Proteinen einer ganzen Genfamilie, die ähnliche Aminosäuren-Sequenzen aufweisen. Genprodukte, die dieser Genfamilie angehören, sind: bax, bcl-XI, bcl-Xs und Mcl-1 [182,150,104]. Diese wirken entweder ebenfalls anti-apoptotisch oder pro-apoptotisch. Es spricht immer mehr dafür, dass bcl-2 die Permeabilitätsänderung der Mitochondrien verhindert, ein frühes Ereignis der Apoptose [156,233,166]. Andere Hypothesen besagen, dass in die Regulation des intrazellulären Calciums eingegriffen wird. Dadurch kann die Aktivität der Calcium-abhängigen Endonuklease, die für die DNA-Fragmentierung nötig ist, beeinflusst werden [130]. Desweiteren wurde ein antioxidativer Effekt für bcl-2 postuliert [91].

bax

Bax ist ein 21 kDa Protein, das wie schon erwähnt, der bcl-2-Familie angehört. Bax und bcl-2 weisen ausgeprägte Homologien in ihrer Aminosäure-Sequenz auf, haben jedoch gegenteilige Wirkungen [104]. Bax formt Heterodimere mit bcl-2. Die apoptotische Aktivität hängt von dem Verhältnis dieser beiden Moleküle ab. Eine Überexpression von bax führt zu einer Beschleunigung der Apoptose [150,66]. Ein apoptotischer Stimulus und damit eine vermehrte Expression von bax kann nach der Entfernung von Wachstumsfaktoren erfolgen [150,102]. Ebenso wird die Synthese durch die Aktivierung von p53-Wildtyp stimuliert, basierend auf der Beobachtung, dass die Promoter-Region von bax 4 Stellen aufweist, die p53-Bindungsstellen entsprechen [136]. Sowohl die mangelnde Bindung von bcl-2 an bax, als auch die Formation von bax-Homodimeren führt zur Apoptose. Einen absoluten Schutz vor apoptotischem Zelltod stellt die Formation von bcl-2-bax-Heterodimeren nicht dar [66].

p53/p21

p53 ist ein Tumorsuppressor-Gen. Das entsprechende Protein befindet sich im Nukleus. Es ist ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor, der sowohl die Proliferation, die Differenzierung als auch die Apoptose induzieren kann [111]. Es unterdrückt das Zellwachstum, indem es das WAF1-Gen, dessen Genprodukt p21 genannt wird, aktiviert. Dieses inhibiert als sogenannte cdk (cyclin dependent kinase) den Zellzyklus in der G1 und G2-Phase, wodurch es zur Hemmung der Proliferation kommt. Sowohl G1/G2-Stillstand, als auch Apoptose finden im Anschluß an die Aktivierung von WAF1 statt [230]. Nach derzeitigen Vorstellungen lokalisiert p53 DNA-Strang-Brüche oder Schädigungen und hält den Zellzyklus an, um dadurch eine Reparatur der DNA zu ermöglichen. Findet keine Reparatur statt, kommt es zur Apoptose, wodurch vermieden wird, dass ganze Generationen von Zellen mit genetischem Defekt produziert werden [111]. Zudem kann p53 die Expression von bcl-2 herunter- und diejenige von bax heraufregulieren [49].

PCNA

PCNA steht für 'proliferating cell nuclear antigen' und identifiziert proliferierende Zellen. Das 'proliferating cell nuclear antigen' (PCNA) wurde erstmals im Zusammenhang mit systemischem Lupus erythematoses (SLE) beschrieben, wo es

als Zielantigen einer Subpopulation von Autoantikörpern identifiziert wurde [206,148]. Die humane Nukleinsäuresequenz, die bereits bekannt ist [3], ist identisch mit Cyclin [127] und dem Hilfsprotein der DNA-Polymerase δ [208,13]. Im Verlauf eines Zellteilungszyklus kommt es während der G1-Phase zur Akkumulierung von PCNA. In der S-Phase erreicht PCNA seine höchste Konzentration, die dann im Verlauf der G2/M-Phase wieder abfällt [105]. Dieses zeitlich differenzierte Auftreten von PCNA macht es zu einem idealen Marker der Zellproliferation.

CD68 (clone: KP1)

CD68 kann zur Immunphänotypisierung von Monozyten, Makrophagen und myeloischen Zellen verwendet werden, besonders auch zum Nachweis reaktiver Makrophagen [158,159]. Der Antikörper erkennt ein Glykoprotein. Das Antigen wird primär als intrazytoplasmatisches Molekül exprimiert und ist wahrscheinlich mit den lysosomalen Granula assoziiert. Seit 1989 dient der Antikörper offiziell zur Differenzierung humaner Leukozyten. Makrophagen verschiedener Lokalisationen (Leber, Milz, Knochenmark, Magen-Darm-Trakt, Gewebe-Histiozyten) und Mikroglia werden positiv angefärbt. Antigen präsentierende Zellen, wie Langerhans-Zellen sind entweder negativ oder zeigen schwache, örtlich begrenzte Reaktivität. Monozyten des peripheren Blutes zeigen ein granuläres Anfärbungsmuster. Des Weiteren reagiert der Antikörper auch mit myeloischen Vorläuferzellen und Granulozyten des peripheren Blutes [133].

Faktor 8

Faktor 8 geht mit dem von Willebrand Faktor (vWF) der Endothelzellen eine Komplexbindung ein, und hat plättchenagglutinierende Eigenschaften. Unter normalen Bedingungen zeigt sich ein granuläres Anfärbungsmuster der Endothelzellen. Das Zytoplasma von Megakaryozyten des Knochenmarks reagiert ebenfalls positiv [73].

CD16/CD32

CD16, auch bekannt als Fc γ RIII, ist ein Glykosyl-phosphatidyl-Inositol-verankerter niedrig-affiner IgG-Oberflächenrezeptor. Der Isotyp Fc γ RIIIb wird spezifisch auf neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes und des Knochenmarks exprimiert [33]. CD32/Fc γ RII ist ein transmembranöses 40 kDa Glykoprotein [46]. Ebenso wie

CD16 handelt es sich um einen niedrig-affinen Rezeptor für IgG. Über diese beiden Rezeptoren werden verschiedene Funktionen vermittelt, wie Endozytose, Aktivierung der Sekretion, Signaltransduktion und Zytotoxizität. Insgesamt spielen sie eine Rolle in der Immunmodulation (humorale und Zell-vermittelte Immunantworten) [56,74,194,78].

Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper bietet Tabelle 1 (G = Gefrierschnitt, P = Paraffinschnitt).

moAk	CD	Subklasse	Titer	3.2 Spezifität/Funktion	Hersteller
Fas	95	IgG ₁	G: 1:5000 '30 1 WH	Zelloberflächenprotein, induziert Apoptose	Dianova Oncogene Science
FasL	95L	IgG ₁	G: 1:10 '30 1 WH	zugehörig zur TNF-Familie, bindet an CD95	Pharmingen, San Diego/USA
bcl-2		IgG ₁	G: 1:80 '30 1 WH	im B-Zell-Lymphom produziert, inhibiert Apoptose	Dianova Hamburg/Germany
bax (Ab-1)		IgG	G:1:1000 '60 1 WH	AS -Homologie zu bcl-2 beschleunigt Apoptose	Immonotech A Coulter Company/ France
p53		IgG _{2a}	P: 1:50 '30 1 WH Mikrowelle	Tumorsupressor-Gen, aktiviert das WAF1-Gen	Oncogene Science, über Dianova
p21		IgG ₁	P: 1:250 '30 1 WH Mikrowelle	WAF1-Gen, inhibiert 'cyclin dependent kinases' (cdk)	Oncogene Science
PCNA		IgG _{2a}	P: 1:200 1WH	= 'proliferating cell nuclear antigen', identifiziert proliferierende Zellen	DAKO, Glostrup/Dänemark
KP1	68	IgG ₁	P: 1:100 '30 1WH mit Andauen	Immunphäno-typisierung von myeloischen und histiozytären Zellen	DAKO Glostrup/Dänemark
Faktor 8 v.Wille-brand Faktor			P: 1:2000 '30 1 WH mit Andauen	F8 reagiert mit vWF in Endothelzellen und dem Zytoplasma von Megakaryozyten	DAKO, Glostrup/Dänemark
FcγRIII-Rezeptor	16	IgG ₁	P: 1:50 1 WH mit Andauen	Immunphäno-typisierung von NK-Zellen, neutrophilen-, und z.T.basophilen Granulozyten	DAKO, Glostrup/Dänemark
FcγRII-Rezeptor	32	IgG ₁	G: 1:100 '30 1WH	Rezeptor für die konstante Region von IgG; Immunmodulation	Dianova Hamburg/Germany

Tab. 1: Eine Übersicht der verwendeten monoklonalen Antikörper

Küvetten
Aqueous Mounting Media
Cryomatrix
MC1 Analytic AC120s Elektronische Waage
manuelle Waage Type 2255
Kühlschrank & Gefrierschrank SIKAFROST
Wärmeschrank für Glyzeringelatine
Clatronic Mikrowelleherd MW-701

Assistent, Sondheim/Rhön
SHANDON, EnglandSHANDON, England
SHANDON, EnglandSHANDON, England
Sartorius AG, Göttingen
Sartorius Werke GmbH, Göttingen
Siemens, Deutschland
Haereus, Osterode/Harz
Clatronic, Kempen

3.2 METHODEN

3.2.1 Vorarbeiten

Die Gewebeproben wurden für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen aufgearbeitet.

3.2.1.1 Verarbeitung der Hautbiopsien

3.2.1.2 Paraffineinbettung

Es wurden in Formalin fixierte Biopsien verarbeitet. Diese wurden in Plastikkassetten (Reichert-Jung) um 16 Uhr über Nacht im Entwässerungsautomat (SHANDON Citadell 2000) stufenweise in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zuvor wurden sie 1 min in 5%iges Formalin verbracht, um eine ausreichende Stabilisierung durch die Fixierflüssigkeit zu gewährleisten. Nach der Entwässerung wurde, durch zweimaliges Einbringen in ein Intermedium, in diesem Fall Xylol, der Alkohol entfernt. In den letzten beiden Stufen erfolgte das Durchtränken mit Paraffin bei 60°C (Schmelzpunkt 57/58°C).

Es folgte das Ausgießen mit Histowax (Reichert-Jung) in einer Ausgießstation (ReichertHistoStat Tissue Embedding Center). Nach Erstarren konnten die Biopsien dann mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Reichert-Jung Histoslid 2000) geschnitten und auf Objektträger aufgezogen werden. Die Schnitte von 4-6µm Dicke wurden in einem Wasserbad schwimmend auf die bereits beschichteten Objektträger (SuperFrostPlus, Menzel) aufgezogen. Vor der Färbeprozedur sollten die Präparate bei 37°C über Nacht oder für 48 Stunden bei Raumtemperatur trocknen.

3.2.1.2.1 Vorbereitung der Paraffinschnitte

Zunächst mussten die Schnitte mindestens 18 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank abschmelzen, dann wurden sie entparaffiniert, indem sie zweimal in Xylol, dann einmal in Aceton und einmal in ein Aceton/TBS-Puffer Gemisch (1:2) verbracht wurden. Bei einigen verwendeten Antikörpern war es zudem notwendig, die Schnitte vor der Färbung in 0.1% Protease-Lösung (37°C) anzudauen, bzw. sie dreimal in 5

min-Zeittakten, in 10 ml Zitratpuffer, pH 6.0, in der Mikrowelle zu kochen. Damit die Schnitte während des Kochvorganges nicht austrockneten, musste der Flüssigkeitsverlust durch Nachfüllen von Aqua dest., ausgeglichen werden. Weiteres Vorgehen wie bei der Färbung der Gefrierschnitte (siehe unten).

Zusammensetzung der 0.1% Proteaselösung:

150 mg Protease (gelagert bei -30°C) werden in 150 ml auf 37°C erwärmten TBS-Puffer gelöst. Diese Lösung ist im Brutschrank max. 2 Tage haltbar.

Zusammensetzung des Zitratpuffers:

9 ml Stammlösung A und 41 ml Stammlösung B zu 450ml Aqua dest. gießen und mischen.

Stammlösung A: 0.1M Zitronensäure (21.01g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) in 1000 ml Aqua dest., SIGMA.

Stammlösung B: 0.1M Natriumzitrat (29.41g $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) in 1000 ml Aqua dest., SIGMA.

3.2.1.3 Gefrierbiopsien

Frisch entnommene Biopsien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, im Kryostat (Bright cryostat Model: OTF/AS/MR, Shandon, England) in Cryomatrix eingebettet und bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.2.1.3.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Mit Hilfe des Gefriermikrotoms wurden die Hautproben angeschnitten. Es wurden ca. $5\mu\text{m}$ dicke Schnitte hergestellt, die auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgebracht wurden, indem ein Objektträger dem gefrorenen Schnitt genähert wurde, der dann sofort an die warme Glasoberfläche anschmolz.

Da unfixierte Schnitte durch das Antrocknen, bzw. Anfixieren der in ihnen selbst enthaltenen nativen Eiweißlösung haften, konnten die Schnitte, nachdem sie 2 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und 10 min bei -20°C in Aceton fixiert worden waren, bei -30°C in Objektträger-Kästen bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

3.2.1.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Gewebeproben mussten, da im Elektronenmikroskop Vakuumbedingungen

herrschen, stabilisiert werden. Im stabilisierten Zustand sind sie weitgehend unempfindlich, auch gegenüber der Entwässerung und der Einbettung in Kunstharze. Die strukturelle Stabilisierung sollte mit einem Minimum an Veränderung des Vitalzustandes erreicht werden.

Die Gewebeproben wurden zunächst in einem Glutar- und Paraformaldehyd-Gemisch nach Karnovsky mit einem pH-Wert von 7,3 bei 4°C fixiert. Nach 2 Stunden wurde das Gemisch abpipetiert und die Proben mehrmals mit Leitungswasser gewaschen. Darauf folgten die Nachfixierung und Kontrastierung mit 1,33%igem Osmiumtetroxid (OsO_4) bei 4°C über 2 Stunden. Die Osmiumlösung setzte sich aus 0,89 ml Collidin plus 74,11 ml Aqua dest. plus 1 g OsO_4 zusammen, mit einem pH-Wert von 7,4. Nach Ablauf der Zeit wurde das Osmium mehrmals mit Leitungswasser ausgewaschen.

Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe folgendermaßen entwässert:

70%iger Alkohol für 60 min;

90%iger Alkohol für 15 min;

96%iger Alkohol für 15 min;

100%iger Alkohol für 2x 15 min;

Propylenoxid für 2x 15 min.

Danach erfolgte die Einbettung in ein Gemisch von 1:1 aus Araldit und Propylenoxid für ca. 12 Stunden. Schließlich mussten die Proben in das reine Araldit übertragen werden. Nach der zweiten Übertragung erfolgte die Polymerisation bei ca. 70°C über 48 Stunden. Hinterher konnten die Araldit Blöckchen aus der Gießform gelöst werden.

An einem Reichert-Jung Ultramikrotom (Reichert, Wien, Österreich) wurden die Proben senkrecht zur epidermalen Oberfläche angeschnitten. Sie waren 70 nm dick und wurden auf Kupfernetze (Gilders Grids, 3,05 mm, G200 Cu, Mikrotechnik Dr. Hert, München) aufgeschwemmt.

Die durch das OsO_4 erreichte Kontrastierung wurde durch eine Doppelkontrastierung am Schnitt mit Uranylazetat (20 min) und Bleizitrat (2 min) verstärkt. Zwischen diesen beiden Vorgängen wurden die Präparate mit Aqua dest. abgespült.

3.2.2 Histologische, immunhistologische und histochemische Färbemethoden

3.2.2.1 Histologische Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (H & E) [170]

Es handelt sich um eine Übersichtsfärbung, die routinemäßig in histologischen Labors durchgeführt wird. Die Färbung stellt alle basophilen Zell- und Gewebestrukturen (z.B. Chromatin der Zellkerne, manche Zytoplasmabestandteile, Teile der Knorpelgrundsubstanz) blau, alle azidophilen Bestandteile (z.B. Zytoplasma, die meisten Interzellulärsubstanzen) in verschiedenen Tonabstufungen rot dar.

3.2.2.1.1 Methodik

1. Einstellen der entparaffinierten Schnitte in Aqua dest.
2. In Hämatoxylin zur Kernfärbung einstellen, 3-8 Minuten
3. Spülen in Aqua dest.
4. Bläuen in fließendem Leitungswasser, 10 Minuten
5. Färben in Eosin, 0,1% in Aqua dest., 5-15 Minuten. Es soll mäßig überfärbt werden.
6. Auswaschen in Wasser, 1-5 Minuten
7. Differenzieren in 80%igem Äthanol.
8. 96-100%igem Äthanol, 2 x 2 Minuten.
9. Xylol, 3-5 Minuten.
10. Eindecken in Kaisers' Glyzerin Gelatine.

Die Dauer der Färbung mit Eosin hängt von der Konzentration der Farbstofflösung ab, aber auch von der Fixierung der Präparate. Eosin ist die meistgebrauchte Plasma- und Gegenfärbung. Es wird in 0,1%iger wässriger Lösung angewendet. Man färbt 5 bis 15 min, wäscht in Aqua dest. aus und differenziert in 80%igem Äthanol. Um die Färbintensität zu steigern, kann man 1 Tropfen Eisessig auf 100 ml Färbelösung zusetzen.

Die verwendete Hämatoxylin-Stammlösung setzte sich aus 10% Hämatoxylin in 96%igem Alkohol zusammen.

3.2.2.1.2 Immunhistologische Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase-Methode

3.2.2.2.1 Prinzip der APAAP-Technik

Bei der APAAP-Methode erfolgt zunächst die spezifische Bindung des Primärantikörpers an das Antigen. Über einen Sekundärantikörper (=Brückenantikörper) wird dann die Anlagerung eines Enzym-Immune-Komplexes (APAAP-Komplex) ermöglicht. Der Enzym-Immune-Komplex besteht aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase und einem dagegen gerichteten Antikörper. Primärantikörper und Anti-alkalische Phosphatase-Antikörper müssen aus derselben Spezies stammen, damit sie über den Brückenantikörper gekoppelt werden können. Der Brückenantikörper sollte im Überschuss vorliegen, um zu gewährleisten, dass genügend freie Fab-Fragmente für die Bindung des Antikörpers aus dem APAAP-Komplex zur Verfügung stehen. Über eine chromogene Substratlösung für die alkalische Phosphatase wird die Antigen-Antikörper-Bindungsstelle sichtbar gemacht. Durch wiederholte Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex kann eine Signalintensivierung im Sinne einer verstärkten Farbreaktion erreicht werden.

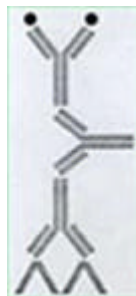


Abb. 4: Schema der APAAP-Methode

Versuchsablauf

Zur Markierung, sowohl der Gefrierschnitte als auch der Paraffinschnitte mit den an anderer Stelle aufgeführten Antikörpern, wurde die von Cordell erstmals beschriebene APAAP-Methode in folgenden Schritten angewandt [27]:

Vorbereitung

Am Tag der Färbung oder abends zuvor wurden die Schnitte bei RT aufgetaut und mit einem hydrophoben Stift (PAP-PEN) eingekreist, um ein Auseinanderfließen der

später aufgetropften Reagenzien zu vermeiden.

Inkubation mit dem Primärantikörper

Die monoklonalen Antikörper wurden entsprechend des anzuwendenden Titers mit einem Medium (pH 7,4-7,6) verdünnt, das sich aus

5 ml RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin,

45 ml Aqua dest. und

5 ml Rinderserum zusammensetzte.

Das Rinderserum, das vor Gebrauch 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert wurde, verhindert durch Anlagerung an elektrisch geladene Gewebelemente eine unspezifische Adsorption der eingesetzten Antikörper. Die Präparate wurden in eine feuchte Kammer gelegt und nach Auftropfen der entsprechenden Antikörperverdünungen 30 min bei RT inkubiert. Gleichzeitig wurde ein Präparat nur mit Verdünnungsmedium inkubiert, zur Negativkontrolle.

Waschvorgang

Nach Abklopfen der Objektträger auf einer saugfähigen Unterlage wurden sie viermal in TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) gespült. Der Tris-Puffer (pH 7,4-7,6) setzte sich aus

1,80 g Tris-Base,

13,70 g Tris-Hydrochlorid und

17,56 g Natriumchlorid,

auf 2 l Aqua dest. zusammen.

Das Verbleiben in einem fünften Pufferbad bis zur nächsten Inkubation, verhinderte ein Eintrocknen der Präparate.

Inkubation mit dem Brückenantikörper

Der Brückenantikörper, ein Kaninchen-Immunglobulin Anti-Maus-Immunglobulin (Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins, DAKO, Dänemark), wurde 1:40 mit einem Medium verdünnt, das aus 50 ml RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin und 10 ml AB-Serum (human) bestand.

Nach Abklopfen des überflüssigen Spülpuffers wurde dieses Reagenz aufgetropft und in einer feuchten Kammer 30 min bei RT inkubiert. Das AB-Serum, das unspezifische Kreuzreaktionen des Brückenantikörpers mit dem humanen Gewebe verhindert und die Hintergrundfärbung reduziert, wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert werden. Danach erfolgte ein Waschvorgang (s.o.).

Inkubation mit dem APAAP-Komplex

Der APAAP-Komplex (APAAP, Mouse Monoclonal, DAKO, Dänemark) wurde analog zum Brückenantikörper 1:40 verdünnt. Die Inkubation erfolgte 30 min unter denselben Bedingungen, mit nachfolgendem Waschvorgang (s.o.).

Wiederholung der Inkubation mit Brückenantikörper und APAAP-Komplex

Zur Verstärkung des Signals wurde ein zweites Mal mit dem Brückenantikörper inkubiert, jedoch nur für 10 min. Darauf folgte ein Waschvorgang wie oben beschrieben. Die Inkubation mit dem APAAP-Komplex wurde ebenfalls für 10 min wiederholt, gefolgt von einem Waschvorgang (s.o.). Die Präparate verblieben bis zur Entwicklung in TBS.

Der Spülpuffer wurde erneuert.

Entwicklung in hexazotierter Astraneufuchsin-Entwicklungslösung

Um die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen über eine Farbreaktion sichtbar zu machen, wurde folgende Substratlösung (250 ml), ausreichend für 40 Präparate, angesetzt:

Lösung A:

175 ml eines Tris-Puffers, bestehend aus

0,98 g Tris-Base,

0,30 g Tris-Hydrochlorid und

1,74 g Natriumchlorid

auf 200ml Aqua dest.,

wurden mit 62,5 ml 0,2 M Propandiol-Stammlösung und 100 mg Levamisole auf dem Magnetprüher gemischt. Levamisole hemmt die endogene alkalische Phosphatase.

Lösung B:

125 mg Naphtol AS-BI Phosphat wurden unter dem Abzug in 1500 µl N,N-Dimethylformamid gelöst. Naphtol AS-BI Phosphat fungiert als Substrat für die eingesetzte alkalische Phosphatase.

Lösung C:

50 mg Natriumnitrit wurden unter dem Abzug tropfenweise in 1250µl Aqua dest. gelöst und danach mit 500 µl Neufuchsin-Stammlösung in 1 min versetzt.

Natriumnitrit aktiviert Neufuchsin zum Farbstoff.

Die Lösungen A und C wurden zuerst auf dem Magnetprüher gemischt, daraufhin wurde Lösung B dazugegeben. Die Einstellung des pH-Wertes der

Entwicklungslösung auf 8,8 erfolgte mit 2 N Salzsäure. Nach Filtration der Lösung in eine Küvette wurden die Objektträger eingestellt und auf dem Schüttler 30 min entwickelt.

Der Nachweis von angelagerten monoklonalen Antikörpern zeigt sich in einer Rotfärbung. Der Waschvorgang wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Der Spülpuffer wurde erneuert.

Gegenfärbung mit Mayers'Hämalaun

Die Präparate wurden 10 min in der vorher filtrierten Gebrauchslösung gefärbt. Es folgte ein Waschvorgang (s.o.) mit einer zusätzlichen Küvette.

Eindecken

Die Objektträger wurden vorsichtig um die Gewebsschnitte herum abgetrocknet und luftblasenfrei in Kaisers'Glyzeringelatine eingedeckt.

3.2.2.2 Vorblocken

Um die Hintergrundfärbung weiter zu minimieren, war es bei manchen Antikörpern erforderlich, mit 1:10 verdünntem humanem AB-Serum die unspezifischen Bindungen zu reduzieren.

3.2.2.2.3 Stammlösungen für die APAAP-Methode

Die verwendeten Stammlösungen wurden wie folgt angesetzt:

Poly-L-Lysin-Lösung (0,1%):

500 mg lyophilisiertes Poly-L-Lysin wurden in 500ml Aqua dest. gelöst und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Propandiol-Stammlösung (0,2 M):

21 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol wurden in 1l Aqua dest. gelöst und in einer dunklen Flasche bei 4°C aufbewahrt.

Neufuchsin-Stammlösung:

5 g Neufuchsin wurden in 100 ml 2 N Salzsäure schrittweise auf dem Magnetrührer gelöst und in einer dunklen Flasche bei 4°C aufbewahrt.

Mayers' Hämalaun:

1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat und 50 g Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat-

Dodecahydrat) wurden in 1l Aqua dest. über Nacht auf dem Magnetrührer gelöst. Nach vorsichtiger Zugabe von 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure (Zitronensäure-Monohydrat) wurde wiederum über Nacht gemischt. Vor Gebrauch musste die Lösung mindestens eine Woche stehen bleiben. Die Aufbewahrung erfolgte in einer dunklen Flasche bei RT.

Anmerkung:

Eine Titration der Antikörper war nicht erforderlich, da die verwendeten Antikörper schon austitriert waren.

3.2.2.3 Histochemische TUNEL-Färbung

Das ApopTag *In Situ* Apoptose Detection Kit *Peroxidase* (Oncor, Gaithersburg, Catalog #:S7100-KIT) dient zum histochemischen Nachweis der Apoptose. Dargestellt werden die freien 3'OH-Enden der während der Apoptose in charakteristischerweise fragmentierenden DNA [55]. Es handelt sich um eine enzymatische Markierung mit Hilfe des Enzyms Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase.

Zunächst wurde entparaffiniert, indem man die Schnitte zweimal je 5 min in Küvetten mit Xylol einstellte; daraufhin zweimal 5 min in absoluten Alkohol und dann jeweils einmal in 95%igen und 70%igen Alkohol. Nach einem Waschgang (5 min in PBS) wurden die Schnitte zum Andauen in eine frisch hergestellte Proteinase K-Lösung (1 mg/50 ml Aqua dest.) verbracht und für 15 min bei Raumtemperatur darin belassen. Es folgten 4 Waschgänge in Aqua dest. für jeweils 2 min.

Zum Blocken der endogenen Peroxidase Aktivität wurden die Schnitte 5 min in eine 2%ige Wasserstoffperoxid-Lösung (hergestellt aus 30%igem H₂O₂ und PBS) eingestellt und dann zweimal für 5 min in PBS gespült. Nachdem die Objektträger auf einem Papiertuch abgeklopft worden waren, wurden auf jeden Schnitt zwei Tropfen 'Equilibration Buffer' aufgetropft und eine Plastikfolie appliziert, damit sich die Flüssigkeit gleichmässig verteilen konnte. Mindestens 10 bis 15 sec bis maximal 30 min wurden die Schnitte bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Abklopfen der Objektträger und Entfernen der Plastikfolien, wurde ca. 54µl 'WORKING STRENGTH TdT Enzym' auf je einen der beiden Schnitte auf den jeweiligen Objektträgern pipettiert. Dieses Reagenz bestand aus einem Vielfachen von 2

Tropfen 'Reaction Buffer' und 1 Tropfen TdT Enzym (dies ergibt ca.108µl, eine Menge, die für 2 Schnitte ausreichend ist) aus vorgegebenen Fläschchen aus dem Kit. Auf den zweiten Schnitt tropfte man zur Negativkontrolle eine Lösung, bei der statt des Enzyms, Aqua dest. mit 'Reaktion Buffer' vermischt wurde. Diesmal wurde für jeden einzelnen Schnitt eine separat zugeschnittene Plastikfolie appliziert und dann für 1 Stunde in einer schon vorgewärmten feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Der nächste Schritt bestand darin, die Schnitte, ohne sie vorher zu spülen, in ein schon vorgewärmtes Coplin Gefäß mit ebenfalls vorgewärmtem WORKING STRENGTH STOP/WASH BUFFER, den man schon am Anfang des Färbeprotokolls hergestellt hatte, zu belassen. Dieser Puffer wurde aus 1 ml Stop/Wash Buffer (aus dem Kit) und 34 ml Aqua dest. hergestellt und dann sofort in den Inkubator gestellt. Die Schnitte wurden anfangs kurz agitiert und dann 10 min in dieser Lösung belassen. Es folgten 3 Waschgänge in PBS für je 5 min. Dann wurden je 2 Tropfen Anti-Digoxigenin-Peroxidase und eine Plastikfolie appliziert und in einer feuchten Kammer bei RT 30 min inkubiert. Nach weiteren Waschgängen wurden die Schnitte in 0,05% DAB gefärbt. Dazu wurde eine Tablette DAB in 18 ml PBS-Puffer (0,05 M, pH 7,4) aufgelöst und filtriert. Kurz vor der Verwendung wurden 15 ml der filtrierten Lösung entnommen und 10µl 30% H₂O₂ hinein pipettiert. Auf jeden Schnitt wurde genügend Färbelösung verbracht und für 2-5 min bei RT belassen. Es folgten 3 Waschgänge für je 1 min und einer für 5 min in Aqua dest..

Gegengefärbt wurde für 10 min in Mayer's Hämalaun, daraufhin mehrmals in Aqua dest. gespült und mit Kayser's Glyzeringelatine eingedeckt.

3.2.3 Mikroskopische Auswertung

Für die Auswertung der lichtmikroskopischen Präparate wurde ein Axioskop der Firma Zeiss verwendet.

Die Ultradünnschnitte wurden mit einem Siemens Elektronenmikroskop 910 unter Verwendung des Doppelkondensors bei einer Strahlenspannung von 60 kV betrachtet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen entstanden mit der im Mikroskop eingebauten Plattenkamera.

3.2.3.1 Beurteilung der Infiltratstärke

Das histologisch nachweisbare entzündliche Infiltrat wurde semiquantitativ anhand eines sogenannten High Power Fields (HPF=400er Vergrößerung) folgendermaßen beurteilt.

+	wenig Infiltrat, ausschließlich vaskulär und perivaskulär
++	perivaskulär ausgeprägteres Infiltrat mit einzelnen Entzündungszellen unmittelbar im umliegenden Gewebe
+++	ausgeprägtes perivaskuläres Infiltrat mit diffuser Infiltration des umliegenden Gewebes durch Entzündungszellen
+++(+)	sehr ausgeprägte Infiltration des Gewebes

3.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zahl der immunhistologisch und histochemisch positiv angefärbten Zellen wurde semiquantitativ innerhalb eines High Power Fields (HPF=400er Vergrößerung) nach folgender Einteilung erfaßt:

0	keine positiven Zellen
0/+	vereinzelt positive Zellen
+	5-24% positive Zellen
++	25-49% positive Zellen
+++	50->75% positive Zellen

Aufgrund der geringen Fallzahlen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Licht- und elektronenmikroskopische Pathologie der diagnostisch gewonnenen Gewebeproben

4.1.1 Histopathologie

Die Epidermis war, mit einer Ausnahme, histomorphologisch unauffällig. In diesem Fall konnte eine subepidermale Blase mit im Blasendach nekrotischen, d.h. geschwollenen, teilweise lysierten Keratinozyten gesehen werden. Das entzündliche Geschehen spielte sich in der Dermis, hauptsächlich an den postkapillären Venolen des oberen und mittleren Coriums ab. Das unterschiedlich starke perivaskuläre Infiltrat setzte sich in 5 Fällen aus vorwiegend neutrophilen Granulozyten und Kernstaub (Tabelle = p>m), in den verbleibenden 4 Fällen aus vorwiegend mononukleären Zellen, wie Lymphozyten, Monozyten und Histiozyten (Tabelle = m>p) zusammen.

Die neutrophilen Granulozyten waren intravasal immer intakt. Auch intramural gab es morphologisch keinen Anhalt für einen Zerfall der Neutrophilen. Perivaskulär hingegen befanden sie sich in verschiedenen Stadien der Desintegration. Dabei variierte der Fortschritt des Zerfalls teilweise sowohl innerhalb des jeweiligen Hautschnittes als auch abhängig von der Entfernung zum betroffenen Gefäß. In der Nähe der Gefäße konnte manchmal nicht genau differenziert werden, ob es sich schon um einen beginnenden Zerfall im Sinne der Leukozytoklasie handelte, da angeschnittene ältere Neutrophile, bedingt durch die Zunahme der Anzahl ihrer Kernsegmente, histologisch ein ähnliches Bild boten. Die angeschnittenen Kernsegmente oder -fragmente zeigten in dieser Lokalisation eine glatte und runde Begrenzung. Je weiter die Entfernung vom Gefäß, beziehungsweise in fortgeschrittenen Stadien auch durch das gesamte Infiltrat hindurch, waren die Kernsegmente oder -fragmente zwar nach wie vor glatt gegenüber der Umgebung abgrenzbar, jedoch nicht mehr rund, sondern eher vieleckig, so als zögen sie sich in sich selbst zusammen. Soweit das lichtmikroskopisch beurteilt werden kann, blieben Kernfragmente der fortgeschrittenen Stadien von Anteilen der Zellmembran umhüllt. In einigen Fällen lagen diese Fragmente dicht beieinander, jedoch konnte in der HE-Färbung nicht festgestellt werden, ob sie in diesem Zustand gegebenenfalls schon phagozytiert waren. Sowohl die beginnende Fragmentierung (=Kernfragmente, die nicht mehr ganz rund aussahen) als auch dicht beieinander liegende Kernfragmente wurden in der Tabelle als Klasie zusammengefasst. Diese zeigte, je nach

Zusammensetzung des Infiltrats und Fortschritt des Prozesses, in ihrer Ausprägung eine Variationsbreite von kaum bis stark vorhanden. Vorwiegend mononukleäre Infiltrate unterschieden sich dahingehend, dass in einigen nur unmittelbar perivaskulär mononukleäre Zellen vorherrschten. Weiter peripher konnte in diesen Fällen nach wie vor viel Leukozytoklasie gesehen werden. Andere von mononukleären Zellen dominierte Infiltrate wiesen kaum noch Neutrophile oder Leukozytoklasie auf.

Bei den betroffenen Gefäßen handelte es sich ausschließlich um postkapilläre Venolen, die in unterschiedlichem Ausmaß in den Entzündungsprozess einbezogen waren. Arteriolen und Venolen waren unauffällig. Die postkapillären Venolen zeigten in der HE-Färbung Endothelschwellung, Auflockerung der Gefäßwände, perivaskuläre Fibrinmanschetten und z.T. ausgeprägte Erythrozyten-Extravasate, in einem Fall mit Ablagerungen von Hämosiderin. Auch innerhalb eines histologischen Schnittes konnte hinsichtlich des Zerstörungsgrades teilweise eine große Variationsbreite beobachtet werden. Einige Gefäßwände waren nicht mehr zu erkennen. Sie konnten nur noch aufgrund der Ansammlung von vorwiegend polymorphkernigen Entzündungszellen lokalisiert werden. Waren angeschnittene Kernanteile der neutrophilen Granulozyten noch rund abgrenzbar, so waren auch die Gefäße weniger zerstört. In Fällen der fortgeschrittenen Desintegration der Neutrophilen, waren die Endothelien nicht nur geschwollen, sondern weitgehend lysiert und von Entzündungszellen überlagert. Je zerstörter die Gefäße waren, desto ausgeprägter waren die Erythrozyten-Extravasate. Diese zogen sich teilweise durch das ganze obere und mittlere Corium, wobei sie im oberen Corium, d.h. unmittelbar unterhalb der Epidermis, besonders ausgeprägt waren. Gefäße in Schnitten mit vorwiegend mononukleären Zellen waren meistens intakt. Die Subcutis, sofern sie angeschnitten wurde, war in allen Fällen unauffällig.

Die histopathologisch erhobenen Befunde sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.

Präparat	Infiltratstärke	Zusammensetzung	Klasie	Erythrozyten-Extravasate	Anti-C3	Anti-Ig
HE1748/91 =825/91	+++	p>m 9:1	+++	+++	+	IgA & IgM
HE2757/94 =676/94	+++	p>m 9:1	+++	+++	-	
HE3119/94 =748/94	+++(+)	p>m 8:2	+++	+++	+	
HE1533/91 =749/91	++/+++	p>m 7:3	++/+++	+++	+	
HE798/95 =173/95	++	p>m 6:4	++/+++	+++	+	
HE647/95 =129/95	+/++	m=p bis m>p	++	+++	+	IgA
HE369/91 =239/91	+/++	m>p 6:4	0/+	+	+	
HE2099/9 =523/94	++/+++	m>p	+/++	+++	-	
HE2979/95 =573/95	++/+++	m>p	+	+++	+	

Tab. 2: Semiquantitative Auswertung der histologischen Alterationen (HE)

4.1.2 Elektronenmikroskopie

Die intravasalen und intramuralen neutrophilen Granulozyten stellten sich ultrastrukturell weitgehend regelrecht dar. Die Zellen wiesen zahlreiche Mitochondrien, ein gut entwickeltes endoplasmatisches Retikulum sowie prominente Lysosomen auf. Die in das Gewebe eingewanderten Neutrophilen waren zunächst durch eine periphere Vakuolisierung des Zytoplasmas gekennzeichnet. Das intakte Zytoplasma war stärker elektronendicht, die Organellen waren jedoch erhalten. Die Septierung und Chromatin-Kondensation der Kerne wurde zunehmend deutlicher. Schließlich kam es zu einer Fragmentierung des Zellkerns und des Zytoplasmas. Diese Fragmente waren von einer intakten Zellmembran umgeben. Die Organellen und insbesondere Mitochondrien wiesen eine regelrechte Ultrastruktur auf.

Neutrophile Granulozyten mit ungeordneter Vakuolisierung und Ödematisierung des Zytoplasmas und Kernschwellung wurden nur vereinzelt gesehen. Bei diesen Zellen

waren die Mitochondrien, endoplasmatischen Membranen und Lysosomen ödematisiert und fragmentiert. Die Zellmembran war an zahlreichen Stellen eingerissen.

Im Zytoplasma der Histozyten fand sich regelmäßig Material, das phagozytierten Fragmenten von Neutrophilen entsprach. Diese Fragmente zeigten unterschiedliche Stadien der Lyse, so dass intakte Kernstrukturen, Organellen und umgebende Membranen nur initial zu sehen waren.

4.2 Immunhistologie

CD95, CD95L

Die Zellen des Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und dendritische Zellen der Epidermis wurden durch CD95 in einem granulären Muster auf den jeweiligen Zelloberflächen positiv angefärbt. In einzelnen Fällen stellte sich das Endothel der kleinen Blutgefäße positiv dar, meistens war es jedoch negativ. Des Weiteren waren 75% der Schweißdrüsenzellen schwach positiv. 25 bis 75% der Zellen der entzündlichen, perivaskulären Infiltrate waren CD95positiv. Diese beinhalteten sowohl neutrophilen Granulozyten als auch mononukleäre Zellen, wie Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen. In den eher polymorphkernigen Infiltraten färbten sich vorwiegend 25 bis 50% der Zellen positiv an, im Gegensatz zu den eher mononukleären Infiltraten, die mindestens zu 75% positiv waren. Intravasale, intramurale und peripher im Gewebe liegende Neutrophile waren zumeist negativ. Polymorphkernige Zellen, die sich perivaskulär positiv darstellten, reagierten schwächer und diffuser positiv. Das Fettgewebe infiltrierende Neutrophile (in einem Präparat) waren entweder negativ oder nur sehr schwach positiv. Mononukleäre Zellen stellten sich ebenso stark positiv dar, wie die Epidermis. Alle weiteren Zellen waren negativ.

CD95L färbte nur einzelne Zellen der Epidermis an. Es handelte sich bei diesen Zellen um dendritische Zellen. In einem Fall wurde die gesamte Epidermis unspezifisch positiv angefärbt. Einzelne bis maximal 25% der infiltrierenden Zellen reagierten positiv. Intraluminal und intramural gelegene Neutrophile waren negativ. Polymorphkernige Infiltrate zeigten nur vereinzelte positive Zellen. Peripher gelegene Neutrophile waren immer negativ. Mindestens 10% bis maximal 25% der Zellen der

vorwiegend mononukleären Infiltrate reagierten positiv. Dabei ließ sich eine Korrelation dahingehend feststellen, dass mit der Anzahl der Lymphozyten auch die Anzahl positiver Zellen anstieg. Diese positiven Lymphozyten befanden sich unmittelbar perivaskulär. Das Endothel wurde mit diesem moAk nicht angefärbt. Zellen der Schweißdrüsentubuli stellten sich ebenfalls nicht positiv dar. Insgesamt fiel die CD95L-Färbung schwächer und diffuser aus als diejenige mit CD95. Die Befunde der beiden Färbungen sind in Tabelle 3 angeführt.

Präparat	CD95 (Fas) Infiltrat gesamt	CD95 davon neutrophile Granulozyten	CD95L (FasL) Infiltrat gesamt	CD95L davon neutrophile Granulozyten
HE1748/91 =825/91	++	+	0/+	0/+
HE2757/94 =676/94	+ /+++	+	0/+	0/+
HE3119/94 =748/94	++	+ /+++	+	0/+
HE1533/91 =749/91	++	+ /+++	+	0/+
HE798/95 =173/95	++ /+++	+ /+++	0/+	0
HE647/95 =129/95	+++	+ /+++	+	0/+
HE369/91 =239/91	++ /+++	+ /+++	++	0/+
HE2099/94 =523/94	++ /+++	+ /+++	+ /+++	0/+
HE2979/95 =573/95	+++	+	+ /+++	0/+

Tab. 3: Immunhistologische Auswertung, der CD95- und CD95L-Färbungen

bcl-2, bax

Basalständige Zellen der Epidermis und einige Zellen der Junctionszone reagierten bcl-2-positiv. Einzelne dendritische Zellen der Epidermis wurden ebenfalls positiv angefärbt. Die Zellen der Drüsentubuli der Schweißdrüsen waren zu mindestens 75% positiv. Positiv dargestellte Strukturen befanden sich innerhalb der Zellen. Dies gilt sowohl für die schon aufgeführten Zellen als auch für die positiven Zellen innerhalb der entzündlichen Infiltrate.

20 bis 75% der Zellen der Infiltrate stellten sich positiv dar. In vorwiegend polymorphkernigen Infiltraten zeigten sich 20% bis maximal 50% positive Zellen. Neutrophile waren intraluminal, intramural und perivaskulär negativ. Bei den positiven Zellen handelte es sich um mononukleäre Zellen (Monozyten, Lymphozyten), die sich vorwiegend unmittelbar perivaskulär, entweder kranzförmig und gleichmäßig verteilt oder halbmondförmig um die Gefäßlumina herum befanden. Besonders bei kleinen Lymphozyten, deren Zellkern in Relation zum Zytoplasma sehr groß ist, imponierte die Lokalisation der positiven, intrazytoplasmatischen Strukturen. Diese umrandeten den Kern und wurden durch diesen an die Zellwand gedrängt. Mononukleäre Infiltrate zeigten insgesamt mindestens 75% positive Zellen. Infiltrierende Lymphozyten färbten sich fast immer positiv an. Das Endothel und alle weiteren Zellen waren negativ. Insgesamt reagierten ähnliche Zellpopulationen positiv, wie mit CD95. Im Vergleich war die Verteilung der bcl-2-positiven Zellen konzentrisch um die Gefäßlumina herum, diejenige von CD95-positiven Zellen eher verstreuter. Die Intensität der Färbung mit bcl-2 fiel stärker aus als mit CD95. Bax färbte einzelne dendritische Zellen der Epidermis und der Haarfollikel positiv an. Alle weiteren Zellen der Epidermis waren negativ. Zellen der Drüsentubuli der Schweißdrüsen reagierten in bis zu maximal 50% schwach positiv. Die meisten Zellen der Infiltrate waren negativ, nur einzelne Zellen waren positiv. Bei diesen Zellen handelte es sich um Monozyten oder seltener neutrophile Granulozyten. Alle weiteren Zellen waren negativ. Positiv angefärbtes Material wurde punktförmig innerhalb des Zytoplasmas sichtbar.

Die Befunde sind in Tabelle 4 angeführt.

Präparat	bcl-2 Infiltrat gesamt	davon bcl-2 positive neutrophile Granulozyten	bax Infiltrat gesamt
HE1748/91 =825/91	+ / ++	0 / +	0
HE2757/94 =676/94	++	0 / +	0 / +
HE3119/94 =748/94	+ / ++	0 / +	0 / +
HE1533/91 =749/91	++	0 / +	0
HE798/95 =173/95	++	0 / +	0 / +
HE647/95 =129/95	++ / +++	0 / +	0 / +
HE369/91 =239/91	++ / +++	0 / +	0 / +
HE2099/94 =523/94	+++	0 / +	0 / +
HE2979/95 =573/95	+++	0	0

Tab. 4: Immunhistologische Auswertung, der bcl-2- und bax

p53/p21

Einige Zellkerne der Epidermis stellten sich p53-positiv dar. Es handelte sich um entweder basalständige Zellen, Zellen des Stratum granulosum oder um dendritische Zellen der Epidermis. Einzelne große mononukleäre Zellen der Entzündungsinfiltrate wiesen zwar negative Zellkerne auf, zeigten aber ein granulär angefarbtes Zytoplasma. Dieses war jedoch schwächer positiv als die Zellkerne der Epidermis. Zellkerne der Haarfollikel und Drüsentubuli wurden nicht angefarbt. Einige wenige Zellkerne der basalen Zellen der Epidermis reagierten auch p21-positiv. Des Weiteren waren Zellkerne einiger Haarfollikelzellen und von einzelnen großen mononukleären Infiltratzellen p21-positiv. Zellkerne der Schweißdrüsentubuli waren negativ. Neutrophile wurden intravasal, intramural, perivaskulär und peripher im Gewebe weder von p53, noch von p21 angefarbt. Auch Endothelzellen reagierten p53- und p21-negativ. Alle weiteren Zellen waren negativ.

PCNA

PCNA färbte in einigen Hautschnitten nur einzelne, in anderen etliche Zellkerne der epidermalen Zellen positiv an. Reagierten weniger Zellen positiv, handelte es sich vorwiegend um basalständige Zellen. Zellkerne der Haarfollikel waren ebenfalls teilweise positiv. Einige Kerne mononukleärer Zellen, vor allem großer Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, stellten sich positiv dar. Die Anzahl der positiven Zellen zeigte eine starke Korrelation zum Vorhandensein von Monozyten und Makrophagen. Kleine Lymphozyten, intakte und desintegrierende neutrophile Granulozyten wurden intraluminal, intramural, perivaskulär und peripher im Gewebe nicht angefärbt. Die Kerne der Endothelzellen reagierten teilweise positiv, jedoch nicht in allen Präparaten und auch nicht im jeweiligen Präparat einheitlich. Die Zellkerne der Drüsentubuli waren nur in vereinzelt Fällen positiv. In einzelnen Präparaten wurden teilweise die Kerne von Fibrozyten angefärbt, in der Mehrzahl der Präparate waren diese Zellen jedoch negativ.

CD68, Faktor 8, CD16/FcγRIII, CD32/FcγRII

Die moAk gegen CD68, Faktor 8, CD16 und CD32 wurden eingesetzt, um das Ausmaß der Monozyteninfiltration, die Struktur der Blutgefäße und die granulozytären Infiltrate zu beurteilen.

CD68 färbte dendritische Zellen der Epidermis positiv an, alle weiteren epidermalen Zellen waren negativ. Infiltrierende Zellen reagierten in einer Spannbreite von 25 bis 75% positiv. Sowohl innerhalb als auch untereinander zeigten die Hautschnitte eine große Variabilität in der Anzahl der positiven Zellen. Einige perivaskulär gelegene neutrophile Granulozyten stellten sich positiv dar. Auch in den septal im Fettgewebe gelegenen Infiltraten, soweit diese vorhanden waren, konnten positive Zellen gesehen werden. Intravasal, intramural und peripher im Gewebe wurden neutrophile Granulozyten nicht angefärbt. Teilweise erweckten auch klastische Partikel den Eindruck, als seien sie positiv. Vorwiegend wurden jedoch Monozyten und Makrophagen in einem granulären Muster des Zytoplasmas angefärbt. Positive Zellen in polymorphkernigen Infiltraten lagen in der Nähe der Gefäße. Diejenigen in mononukleären Infiltraten waren hingegen eher peripher oder in der Umgebung der Gefäße zu sehen. Teilweise waren positive Zellen in polymorphkernigen Infiltraten schwer voneinander abgrenzbar, da fast alle Zellen positiv reagierten. In lymphozytären Infiltraten hingegen konnten Monozyten/Makrophagen immer gut

abgegrenzt werden und waren nicht so zahlreich vorhanden. Alle weiteren Zellen waren negativ.

Insgesamt muss gesagt werden, dass durch CD68 mehr Zellen angefärbt wurden als nach der histopathologischen Beurteilung anzunehmen gewesen wäre. Teilweise enthielten die Infiltrate, die mit p>m klassifiziert wurden, doch sehr viele Makrophagen (Abb. 22/23, Seite 56).

Durch Faktor 8/v.Willebrand Faktor wurde das Zytoplasma der Endothelzellen in einer granulären Form positiv dargestellt, die Zellkerne waren negativ. Dabei wiesen intakte Gefäße eine gleichmäßig starke und glatt begrenzte Reaktion auf. Gefäße mit Endothelschwellung stellten sich weniger intensiv angefärbt dar, bedingt durch ihre unscharfe Begrenzung und ödematöse Aufquellung der Zellen. Zerstörte Gefäße zeigten eine eher diffuse Anfärbung im Bereich der Gefäße, teilweise zog sich die positive Reaktion bis weit in die Infiltrate hinein. Alle weiteren Zellen waren negativ. Die Ergebnisse dieser beiden Färbungen sind in Tabelle 5 angeführt.

Präparat	CD68	Faktor 8/vWF und Zustand der Gefäße
HE1748/91 =825/91	++/+++	diffuse Anfärbung, d.h. stark geschädigt
HE2757/94 =676/94	++	wenig bis mittelmäßig geschädigt
HE3119/94 =748/94	+++	stark geschädigt (oberes Corium) und intakt (unteres Corium)
HE1533/91 =749/91	++	diffus in das Infiltrat hinein granulär ange-färbt, stark geschädigt
HE798/95 =173/95	+ im Infiltrat ++ Umgebung	geschädigt (oberes Corium) > intakt (tieferes Corium)
HE647/95 =129/95	+ oberes Corium ++ mittleres Corium	vorwiegend intakt/ weniger geschädigt
HE369/91 =239/91	++/+++	intakt bis mittelmäßig geschädigt
HE2099/94 =523/94	+	mittelmäßig geschädigt
HE2979/95 =573/95	+ im Infiltrat +++ Umgebung	intakt

Tab. 5: Immunhistologische Auswertung, der CD68- und Faktor 8/ vWF-Färbungen

CD16/Fc γ RIII färbte in einem Präparat vereinzelt dendritische Zellen der Epidermis positiv an, alle weiteren Zellen der Epidermis in diesem Präparat waren negativ. In allen anderen Präparaten waren keine positiven epidermalen Zellen nachzuweisen. Infiltrate reagierten zu 5 bis 75% positiv. Die Dichte der positiven Zellen in den vorwiegend polymorphkernigen Infiltraten war perivaskulär besonders ausgeprägt, bedingt durch die große Anzahl der Zellen, die weiter peripher abnahm. Intakte Neutrophile reagierten immer positiv, d.h. unabhängig von ihrer intravasalen, intramuralen, perivaskulären und peripheren Lokalisation. In den Septen des Fettgewebes gelegene Infiltratzellen konnten in einem Fall gesehen werden und waren positiv. Klastische Partikel stellten sich in den meisten Fällen (mindestens 50 bis 75%) positiv dar. Einige Monozyten und Makrophagen, beziehungsweise ihr phagozytierter Inhalt, färbten sich positiv an. Lymphozyten und alle weiteren Zellen wurden nicht angefärbt. Die meisten positiven Zellen wiesen eine eindeutig an der Zelloberfläche lokalisierte Reaktion auf.

Einige dendritische Zellen der Epidermis und eines angeschnittenen Haarfollikels zeigten sich CD32/Fc γ RII positiv. Neutrophile waren sowohl intravasal, intramural, perivaskulär als auch peripher negativ. In einigen Präparaten wurden vereinzelte mononukleäre Zellen gefäßnah und in einem Präparat intravasal unterschiedlich intensiv angefärbt. Alle weiteren Zellen waren negativ. Die positive Reaktion der benannten Zellen zeigte im Vergleich zu CD16 eine eher unscharfe Anfärbung der Zelloberflächen (transmembranöser Rezeptor). Die Befunde der CD16- und CD32-Färbungen sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Präparat	CD16	CD32/ neutrophile Granulozyten	Bemerkungen zu CD32
HE1748/91 =825/91	+++	negativ	vereinzelte, große mononukleäre Zellen positiv; eine Langerhanszelle positiv
HE2757/94 =676/94	+++	negativ	vereinzelte Langerhanszellen positiv, ganz vereinzelt Makrophagen schwach positiv
HE3119/94 =748/94	+++	negativ	relativ viele Langerhanszellen positiv, sonst alle Zellen negativ
HE1533/91 =749/91	+++	negativ	einzelne Langerhanszellen positiv, vereinzelte Zellen der Infiltrate positiv
HE798/95 =173/95	++/+++	negativ	ganz vereinzelt mononukleäre Zellen positiv, alle weiteren Zellen negativ
HE647/95 =129/95	+ oberes Corium ++ mittleres Corium	negativ	
HE369/91 =239/91 und 238/91	++/+++	negativ	viele Langerhanszellen positiv (Epidermis und Haarfollikel), sonstige Zellen negativ
HE2099/94 =523/94	+	negativ	alle Zellen negativ
HE2979/95 =573/95	0/+ Infiltrate ++ Umgebung	negativ	

Tab. 6: Immunhistologische Auswertung, der CD16- und CD32-Färbungen

4.3 Histochemische TUNEL-Färbung

Die Zellkerne der Epidermis stellten sich in allen Präparaten unterschiedlich zahlreich positiv dar. In einigen Fällen, die keine komplette Anfärbung aller Zellkerne der Epidermis zeigten, wurden die Kerne basalständiger Zellen und Zellkerne des Stratum spinosum und Stratum granulosum angefärbt. Einzelne Zellkerne der Junktionszone waren positiv. In einem Präparat, in dem ein Haarfollikel angeschnitten wurde, reagierten viele Haarfollikelzellkerne positiv. Die Kerne

einzelner dermalen Fibrozyten waren ebenfalls positiv. Zellkerne der Schweißdrüsentubuli reagierten zu 75% bis ausnahmslos positiv. Die Zellkerne intakter neutrophiler Granulozyten waren intravasal, intramural, perivaskulär und peripher negativ. Die frei im Gewebe liegenden klastischen Fragmente wurden entweder nicht oder nur schwach positiv angefärbt. Dabei zeigten einige Präparate kaum positive, andere ca. 50% positive und 50% negative freie klastische Fragmente.

Die Zellkerne der mononukleären Entzündungsinfiltrate stellten sich teilweise und unterschiedlich stark positiv dar. Häufig waren die Kerne kleiner Lymphozyten negativ, außer in denjenigen Infiltraten, die kaum noch polymorphkernige Zellen aufwiesen. In diesen wurden teilweise mehr als 75% der kleinen Lymphozyten-Zellkerne angefärbt. Das Chromatin großer Lymphozyten und Monozyten war annähernd immer positiv. Der phagozytierte Inhalt der Makrophagen stellte sich ausschließlich und deutlich positiv dar. Zellkerne der Endothelzellen waren meistens negativ, in einzelnen Fällen schwächer positiv. Die Befunde sind in Tabelle 7 zusammenfassend dargestellt.

Präparat	CD68/ Makrophagen	TUNEL: intakte Neutrophile	TUNEL: Kernstaub in Makrophagen	TUNEL: freie klastische Fragmente
HE1748/91 =825/91	+	0	immer positiv	positiv = negativ
HE2757/94 =676/94	++	0	immer positiv	negativ (viel Hämosiderin)
HE3119/94 =748/94	++/+++	0	immer positiv	positiv u. negativ
HE1533/91 =749/91	+	0	immer positiv	positiv u. negativ jedoch weniger freie vorhanden
HE798/95 =173/95	++	0	immer positiv	negativ nur wenige freie klastische Partikel vorhanden
HE647/95 =129/95	++	0	immer positiv	positiv u. negativ wenige freie
HE369/91 =239/91	++	0 (auch mehrfach segmentierte negativ)	immer positiv	negativ wenige freie

Fortsetzung:

Präparat	CD68/ Makrophagen	TUNEL: intakte Neutrophile	TUNEL: Kernstaub in Makrophagen	TUNEL: freie klastische Fragmente
HE2099/94 =523/94	+	0	immer positiv	negativ >positiv
HE2979/95 =573/95	+	0	immer positiv	negativ

Tab. 7: Beurteilung der histochemischen TUNEL-Färbung (Berlin) im Vergleich mit CD68-positiven Makrophagen

4.4 Histopathologie der Histaminquaddeln bei leukozytoklastischer Vaskulitis

Die Epidermis war in allen Fällen unauffällig. Das Geschehen spielte sich hauptsächlich an den postkapillären Venolen des oberen und mittleren Coriums ab. Im Unterschied zu den diagnostisch entnommenen Biopsien von leukozytoklastischer Vaskulitis zeigten einige nur an abgrenzbaren Lokalisationen das typische perivaskuläre Infiltrat mit gelegentlich extremer Erythrozyten-Extravasation. Die Infiltratstärke unterlag einer ziemlich großen Variationsbreite von kaum bis sehr stark vorhanden. Nur in einem Drittel der Fälle überwogen infiltrierende mononukleäre Zellen oder es lag ein zu gleichen Anteilen aus polymorphkernigen und mononukleären Zellen bestehendes Infiltrat vor. Die weiteren zwei Drittel zeigten ein vorwiegend polymorphkerniges und weniger histiozytäres Infiltrat. Ähnlich verhielt es sich in bezug auf die Leukozytoklasie, die in drei Präparaten nur kaum oder schwach ausgeprägt, in den anderen stark bis sehr stark vorhanden war. Die Morphologie der klastischen Fragmentierung entsprach derjenigen bei den spontan entstandenen Läsionen. Insgesamt bestand ein auffälliger Unterschied zu diesen Biopsien darin, dass in den durch Histamin ausgelösten Läsionen deutlich weniger Makrophagen im Infiltrat gesehen werden konnten.

Die postkapillären Venolen zeigten in der HE-Färbung Endothelschwellung, Auflockerung der Gefäßwände, mäßig ausgeprägte perivaskuläre Fibrinablagerungen und zum Teil sehr ausgeprägte Erythrozyten-Extravasate. Arteriolen und Venolen waren nicht involviert.

4.4.1 Histochemische TUNEL-Färbung der durch Histamin ausgelösten Läsionen

Bei der Beurteilung der Histaminquaddeln wurden die Ergebnisse der histochemischen TUNEL-Färbung an den vaskulitischen Spontanläsionen bestätigt. Kerne basalständiger Zellen und Zellkerne des Stratum spinosum und granulosum der Epidermis stellten sich positiv dar. Abgesehen von vereinzelt hypersegmentierten neutrophilen Granulozyten in einem Präparat (2020/94) waren alle intakten neutrophilen Granulozyten intravasal, intramural, perivaskulär und peripher negativ. Nur in einem Fall reagierten zahlreiche freie leukozytoklastische Fragmente positiv. In allen weiteren Präparaten war die Mehrzahl der freien klastischen Fragmente negativ. Von Makrophagen phagozytierte Partikel stellten sich wieder ausschließlich positiv dar. Mononukleäre Zellen waren teilweise und unterschiedlich stark positiv. Die Zellkerne kleiner Lymphozyten wurden überwiegend nicht angefärbt. In den meisten Fällen waren die Kerne der Endothelzellen ebenfalls negativ. Eine detaillierte Aufstellung der Befunde ist in Tabelle 8 angeführt.

Präparat	Histamin vor...& klinisch	Histologisch- es Ergebnis	Infiltrat	p & m	Anteil Klasie am Infiltrat	Neutrophile Granulozyten (NG)	Makrophagen	Histologie
1257/96	1h Schub	initiale kLV	+ / ++	p > m 75:25	+ neg. u. pos.	0	0	Gefäße intakt
649/96	1h kLV		++	p > m 80:20	+++ neg. > pos.	0 weniger intakte NG.	+ Inhalt positiv	Gefäße z.T. intakt, z.T. überlagert durch Infiltrat
2738/95	1h	kLV	++	p > m 90:10	+++ vereinzelt schwach pos. neg. > pos.	0	0/+ Inhalt positiv	Gefäße überlagert
414/96	1h	Va kLV	++ / +++	p > m 80:20	++ neg.	0/+	+ Inhalt positiv	Gefäße erkennbar

Fortsetzung:

Präparat	Hista- min vor...& klin- isch	Histo- logisch- es Ergeb- nis	Infiltra t	p & m	Anteil Klasie am Infiltrat	Neutro- phile Granulo- zyten (NG)	Makro- phagen	Histologie
1323/95	2h	Beginn kLV	+ /+++	m=p bis p>m	+ neg.	0	keine	Gefäße intakt
2020/94	3h	kLV initial	+ /+++	m>p 60:40	+ /+++ neg. bis schwächer positiv	0/+	0/+ Inhalt positiv	Gefäße teilweise überlagert, z.T. viele Lympho- zyten
2737/96	4,5h	kLV	++ /+++	p>m 90:10	+++ eher neg. vereinzelt pos.	0	+ Inhalt positiv	Gefäße überlagert; einige positive Monozyten
127/95	8h	initiale kLV	+ /+++	m>p	+ pos.>neg.	keine intakten	0/+ Inhalt positiv	Gefäße eher intakt
1322/95	12h	Va beg kLV	++	m>p 70:30	+ /+++ pos.=neg.	0	0/+ Inhalt positiv	Gefäße erkennbar
2021/94	frische HV	kLV	+ /+++ (*+)	p>m 80:20	++ neg.>pos. (schwach)	0	0/+ Inhalt positiv	Gefäße eher kaputt, wenige intakt
126/95	frische HV	kLV	+++	p>m 80:20	++ /+++ neg.>pos.	0	0/+ Inhalt positiv	Gefäße z.T. noch er- kennbar, von Infiltrat überlagert
1321/95	/ kLV		+++	p>m 80:20	++ /+++ neg. wenig pos.	0	+ /+++ Inhalt pos.	Gefäße überlagert

Tab. 8: Ergebnisse der histochemischen TUNEL-Färbung (Münster)

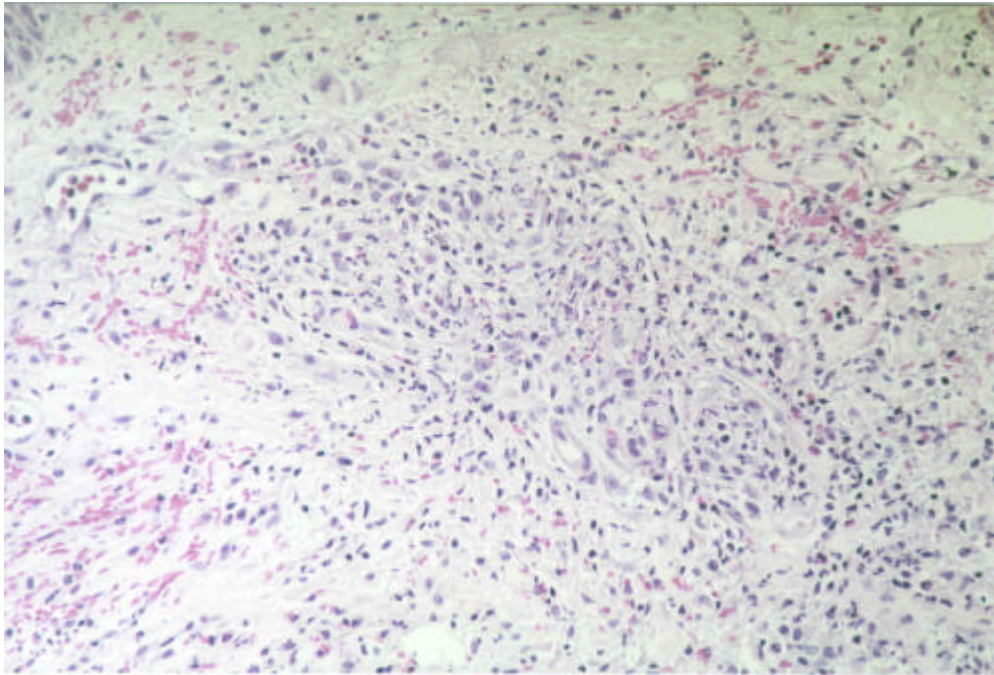


Abb. 5 Frühes Stadium einer kLV mit zahlreichen desintegrierenden Neutrophilen in perivaskulärer Position. (HE, x 200)

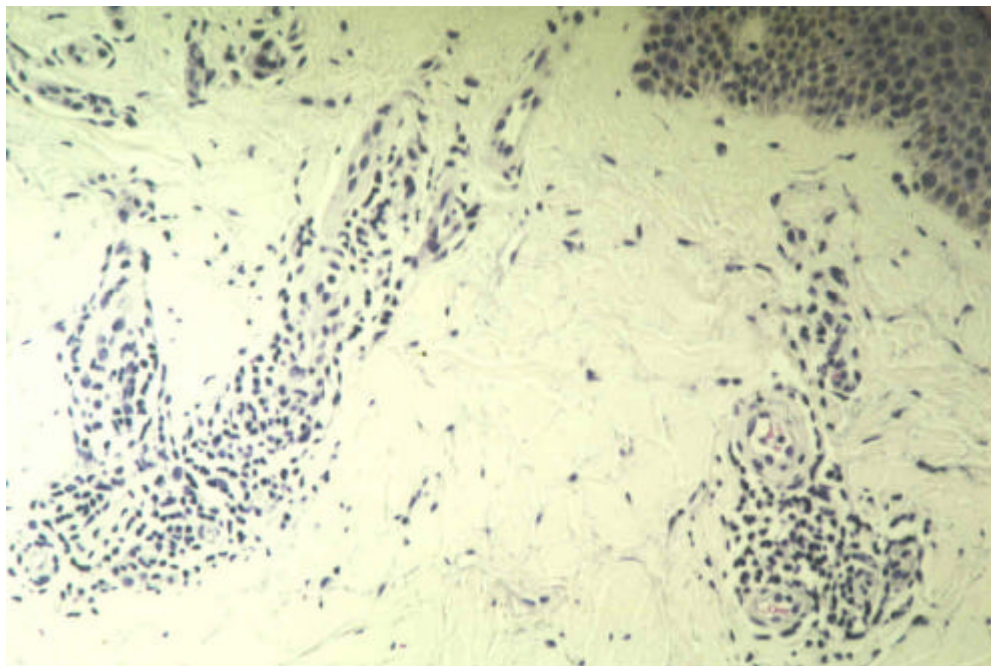


Abb. 6 Späteres Stadium einer kLV mit vorwiegend mononukleärem Infiltrat. (HE, x 200)



Abb. 7 Intakter neutrophiler Granulozyt, der an einer Endothelzelle anhaftet. (EM, x 11.600)

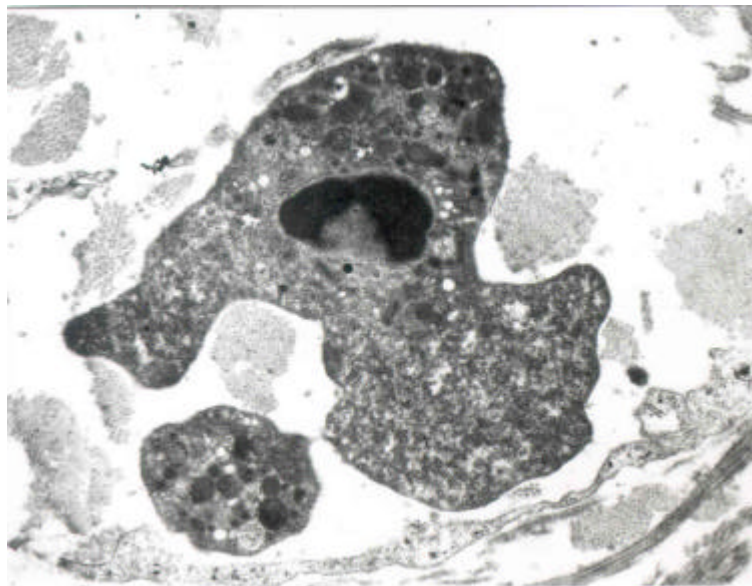


Abb. 8 Im Gewebe liegender neutrophiler Granulozyt mit Schrumpfung des Zellkerns und des Zytoplasmas (EM, x 9.700)

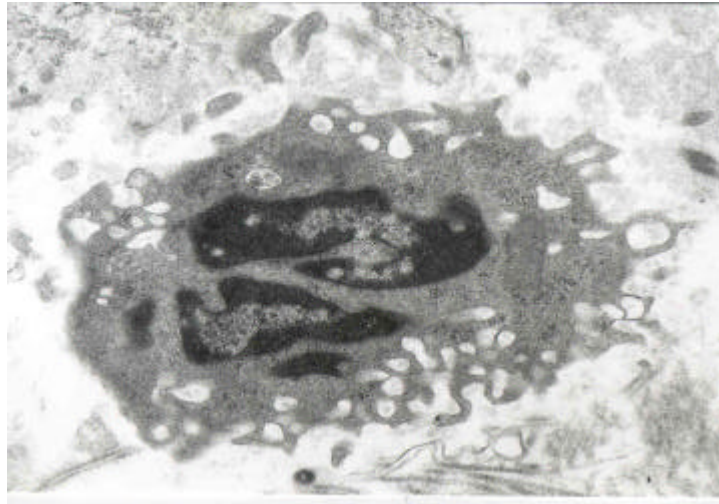


Abb. 9 Neutrophiler Granulozyt mit Vakuolisierung des peripheren Zytoplasmas, das als 'blebbing' bezeichnet wird. (EM, x 13.000)

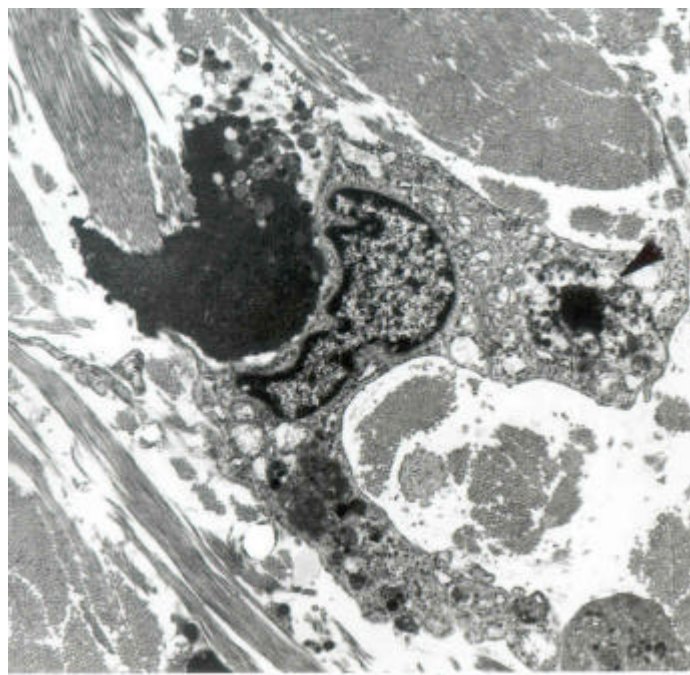


Abb. 10 Nekrotischer Neutrophiler mit lytischen Veränderungen und apoptotischer Neutrophiler mit Kondensation von Zellkern und Zytoplasma. (EM, x 5.600)

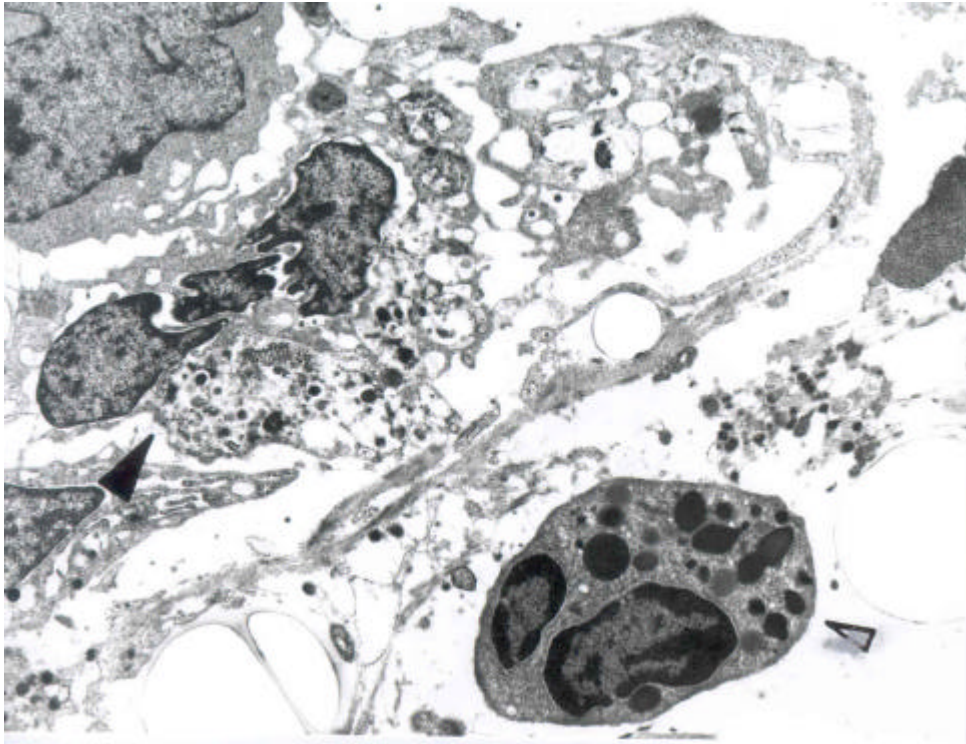


Abb. 11 Makrophage mit Phagolysosomen, die apoptotischen Fragmenten von Granulozyten entsprechen. (EM, x 5.600)

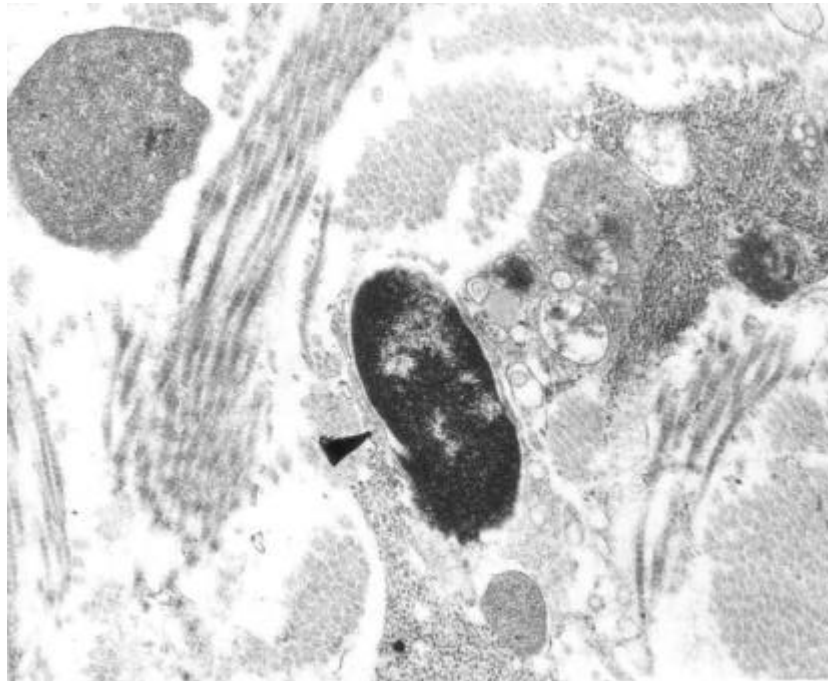


Abb. 12 Apoptotisches Fragment eines Granulozyten (EM, x15.800)

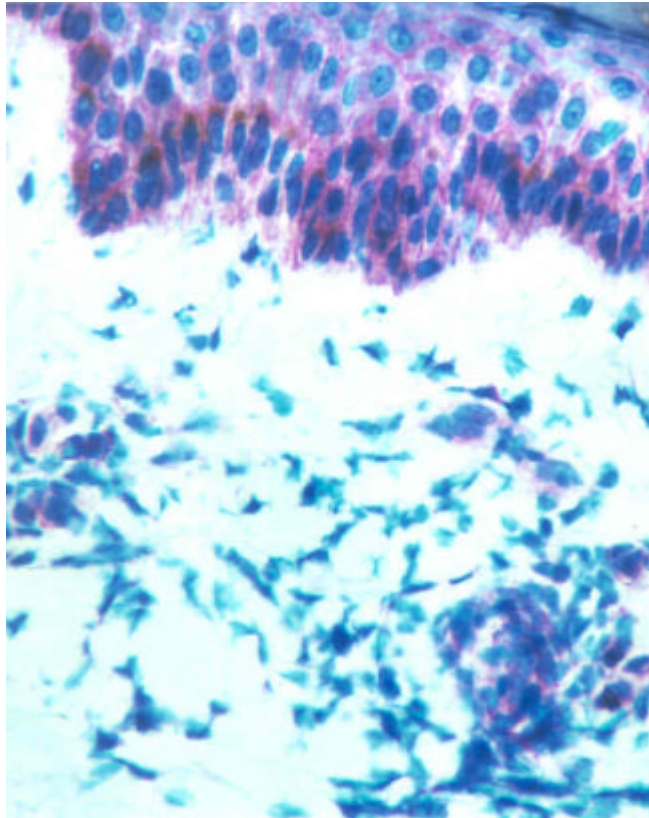


Abb. 13 Entzündliche Infiltrate mit einzelnen CD95 positiven mononukleären und granulozytären Zellen. Die Interzellularräume der basalen und suprabasalen Epidermis sind ebenfalls positiv angefärbt. (x 400)

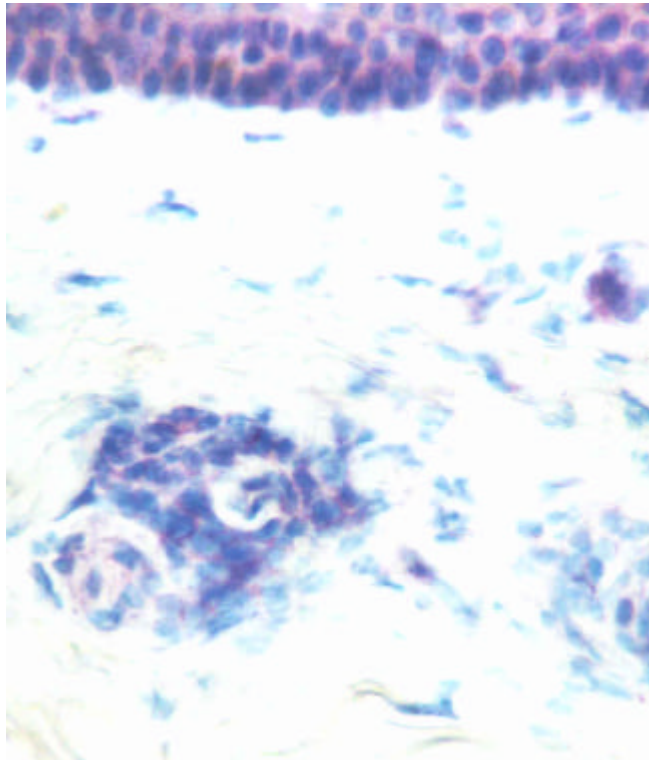


Abb. 14 Entzündliches Infiltrat mit einigen CD95L positiven mononukleären Zellen. (x 400)

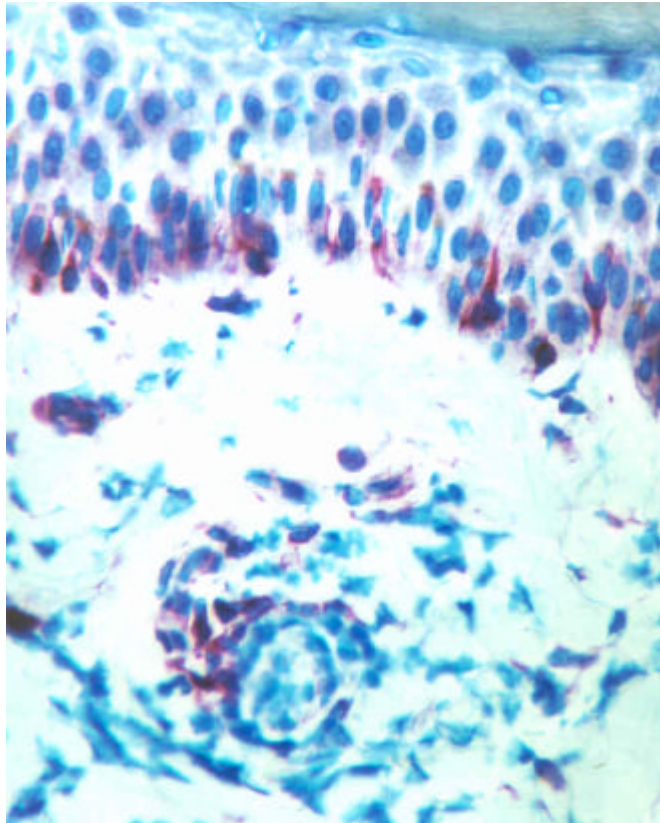


Abb. 15 bcl-2-positive mononukleäre Entzündungszellen. Mehrere dendritische Zellen der Epidermis sind ebenfalls positiv. (x 400)

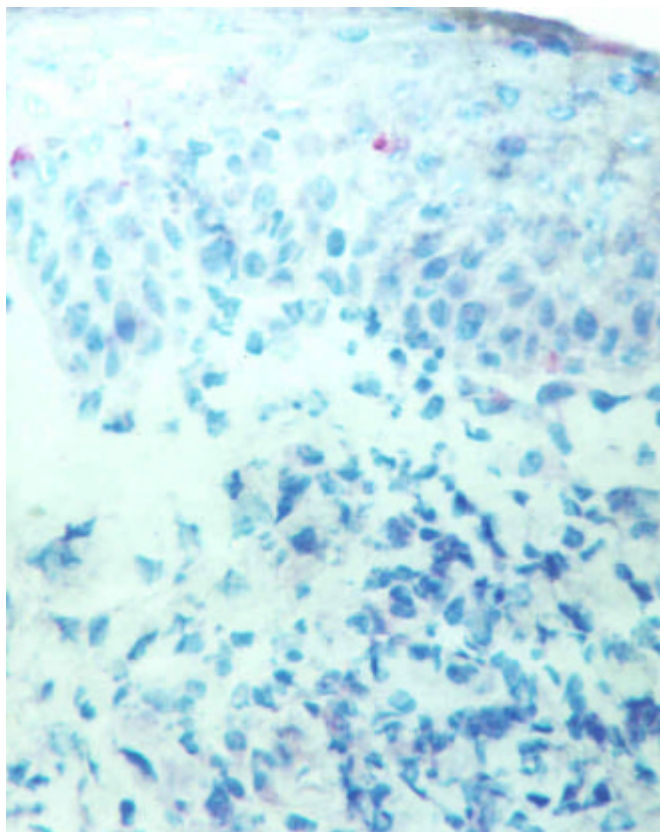


Abb. 16 Die Expression von bax ist auf einzelne dendritische Zellen der Epidermis beschränkt. (x 400)

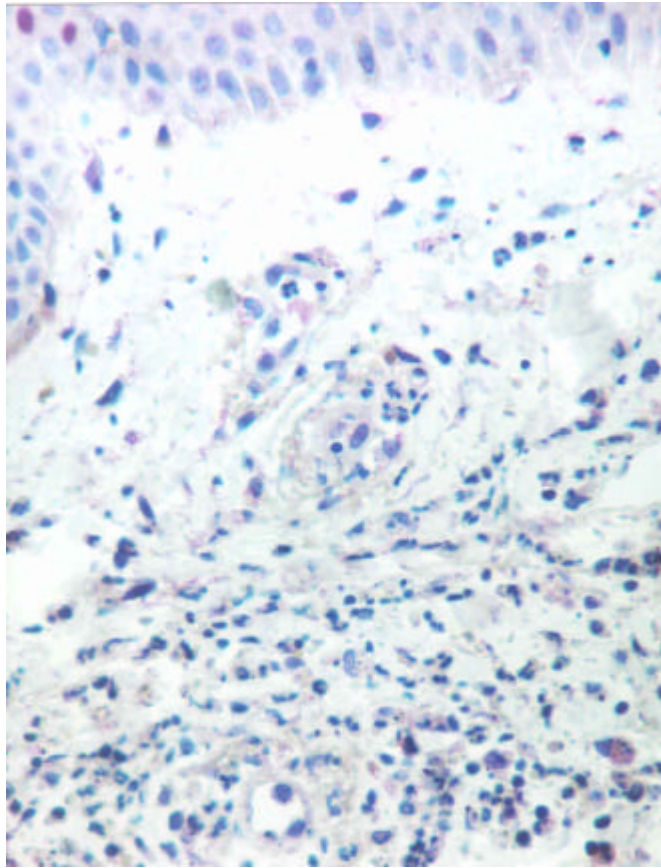


Abb. 17 Einzelne p53-positive mononukleäre Zellen. Die Kerne der basalen Keratinozyten sind häufig positiv. (x 400)

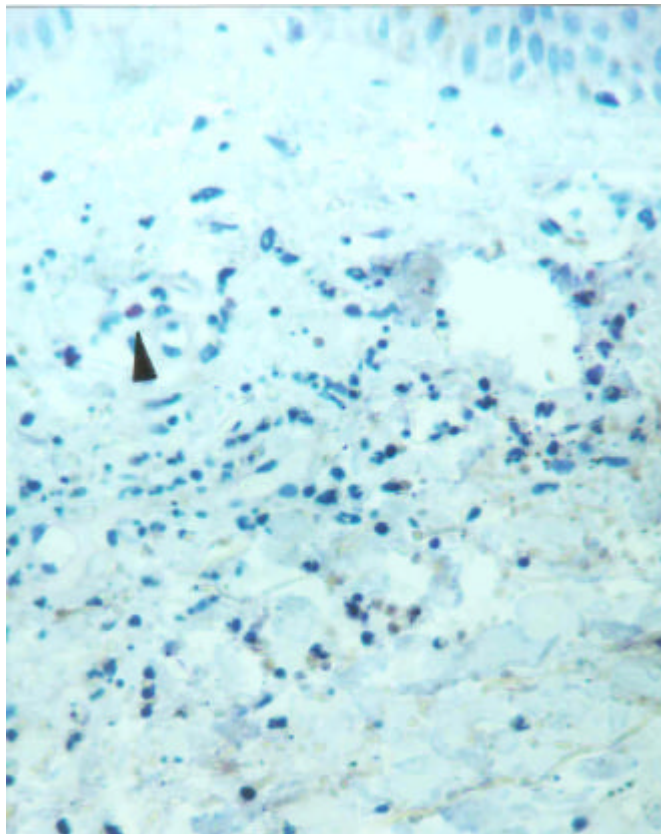


Abb. 18 p21-Färbung ohne positiven Nachweis. (x 400)

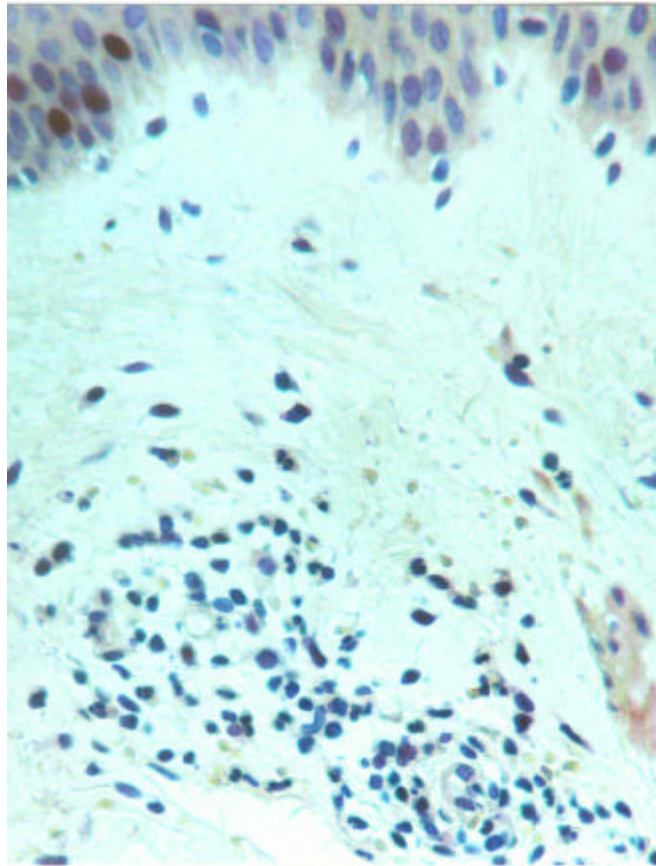


Abb. 19 PCNA-positive Zellen sind lediglich in der basalen Epidermis nachweisbar. (x 400)

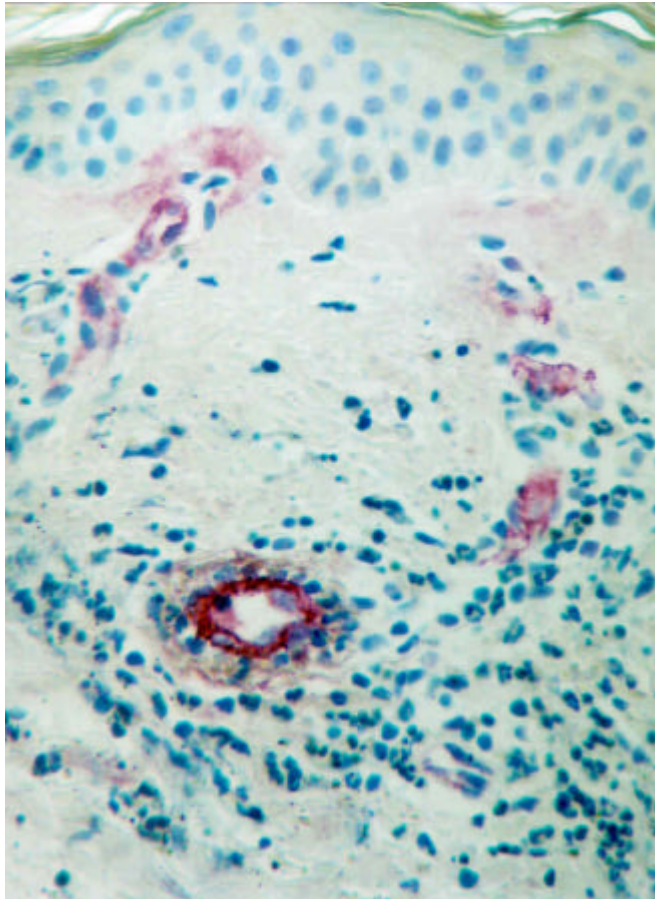


Abb. 20 Intaktes Blutgefäß in der Färbung mit vWF/Faktor 8. (x 400)

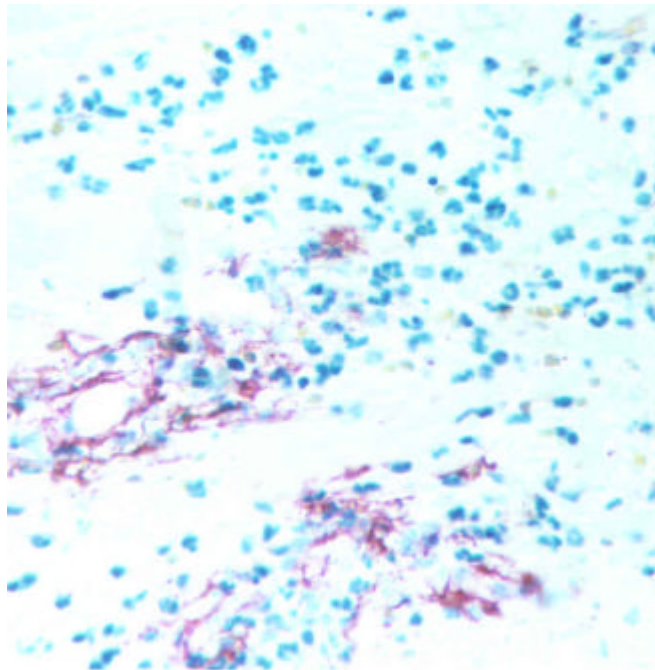


Abb. 21 Weitgehend zerstörte Blutgefäße in der Färbung mit vWF/Faktor 8. (x 400)

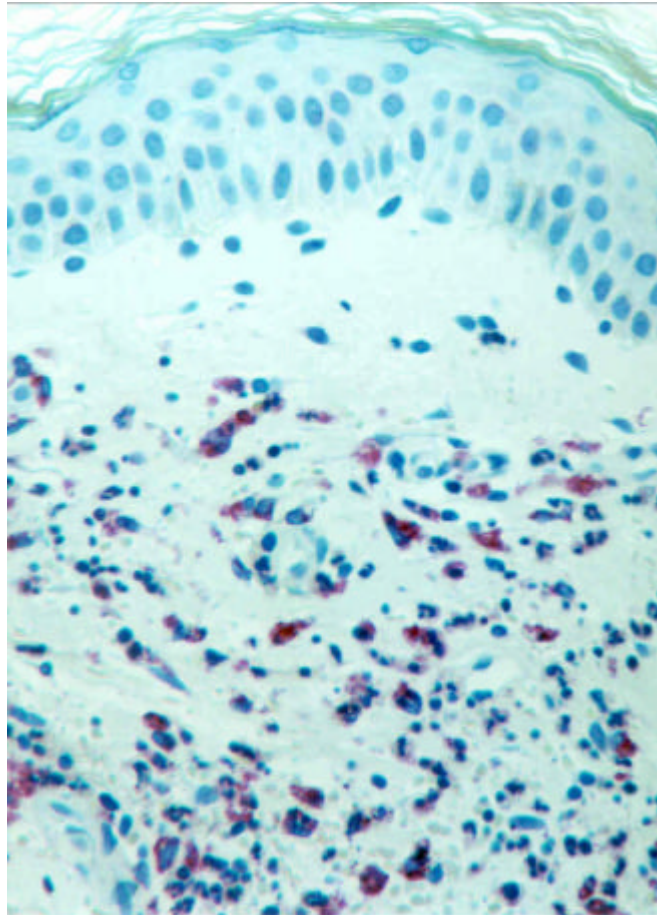


Abb. 22 Überwiegend granulozytäres Entzündungsinfiltrat mit einigen CD68-zyten. (x 400)positiven Monozyten

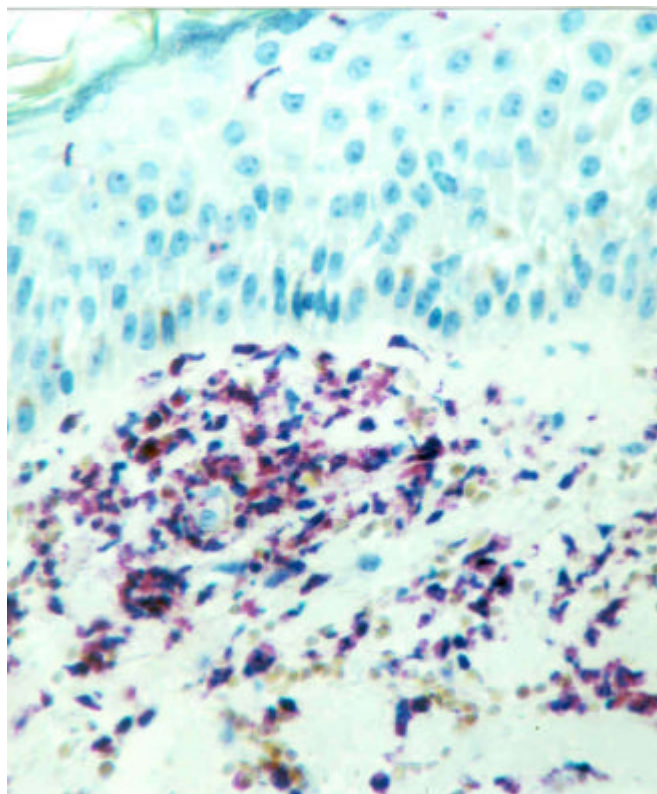
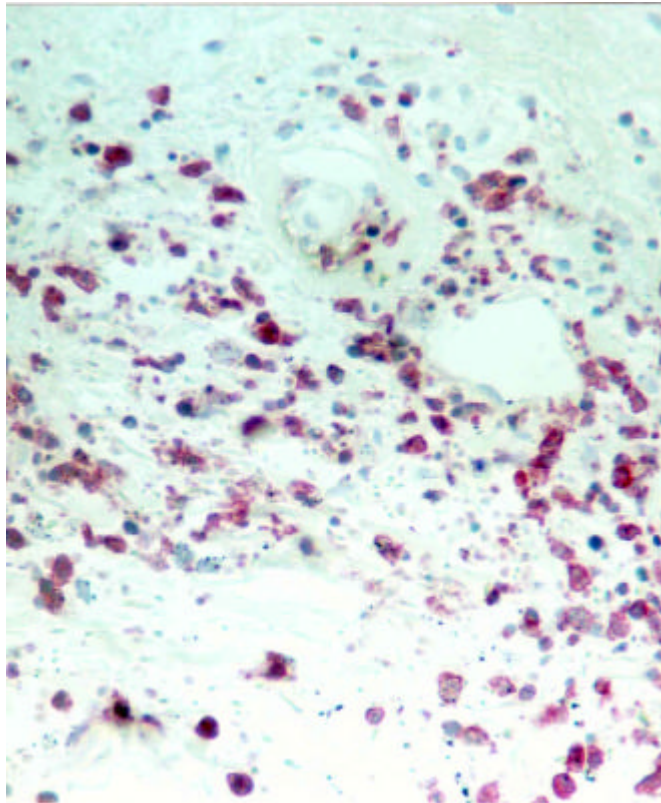


Abb. 23 Überwiegend mononukleäres Entzündungsinfiltrat mit zahlreichen CD68-positiven



**Abb. 24 Intakte und desintegrierende neutrophile Granulozyten mit Expression von CD16/
FcγR3. (x 400)**

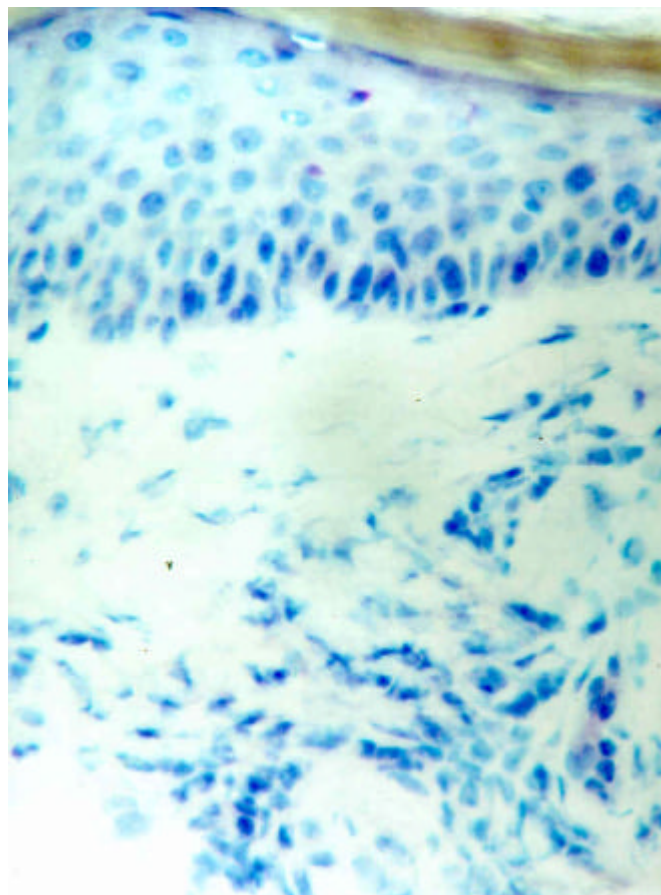


Abb. 25 Granulozytäre Infiltrate ohne Expression von CD32/FcγR2. (x 400)

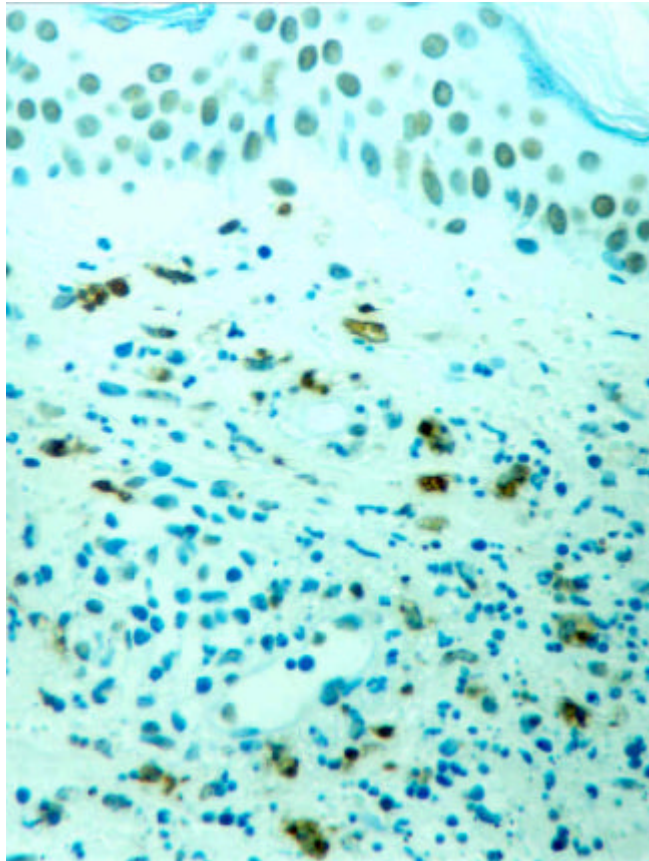


Abb. 26 TUNEL-Färbung einer Histamin-induzierten kLV mit Aggregaten von positiven granulozytären Fragmenten, die ebenfalls auf das Zytoplasma der Makrophagen beschränkt sind. (x 400)

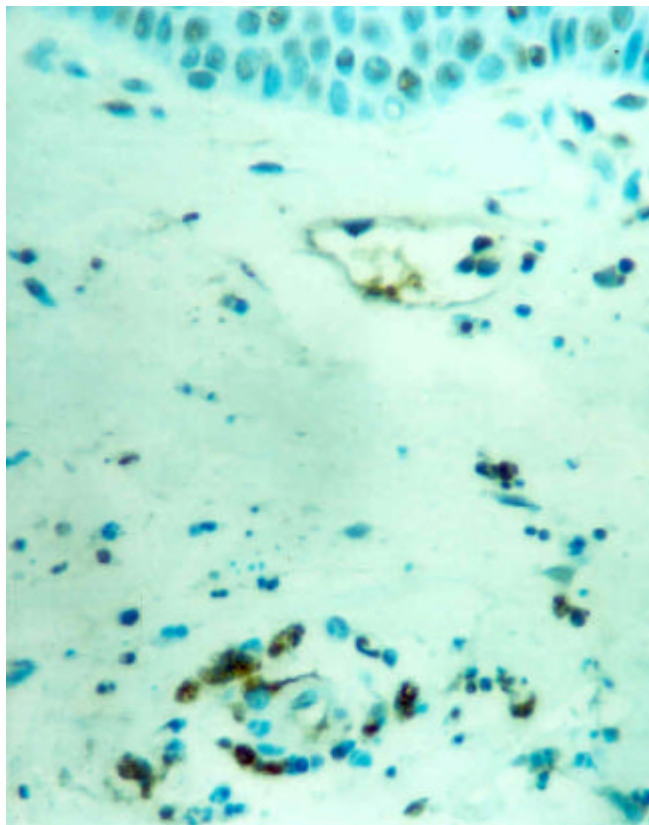


Abb. 27 TUNEL-Färbung einer Histamin-induzierten kLV mit Aggregaten von positiven granulozytären Fragmenten, die ebenfalls auf das Zytoplasma der Makrophagen beschränkt sind. (x 400)

5 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das histologische Phänomen der Leukozytoklasie bei der kutanen leukozytoklastischen Vaskulitis (kLV) durch detaillierte licht- und elektronenmikroskopische, immunhistologische und histochemische Untersuchungen zu charakterisieren. Hierzu wurden diagnostisch entnommene Gewebeproben von 9 Patienten so wie 13 Biopsien einer durch Histamin induzierten kLV aufgearbeitet. Die 13 Biopsien wurden freundlicherweise im Rahmen einer Kooperation von der Universitäts-Hautklinik Münster zur Verfügung gestellt.

5.1 Histopathologie der Gewebeproben

Die histologische Analyse der diagnostisch entnommenen Hautbiopsien zeigte erhebliche Variationen in der Ausprägung und Zusammensetzung der vaskulären und perivaskulären entzündlichen Infiltrate. Bei 5 Biopsien dominierten neutrophile Granulozyten, wohingegen in den anderen Gewebeproben ein eher lymphoides und histiozytäres Entzündungsinfiltrat vorherrschte. Die parallel durchgeführte immunfluoreszenzoptische Aufarbeitung ergab in 7 der 10 Gewebeproben Ablagerungen von Komplement C3 an den kleinen Blutgefäßen der oberen Dermis. Ablagerungen von Immunglobulinen waren demgegenüber lediglich in zwei Hautbiopsien nachzuweisen.

Die Variabilität der histologischen und immunpathologischen Veränderungen ist auf die Dynamik der vaskulären Entzündungsreaktion zurückzuführen. In verschiedenen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das zunächst granulozytäre Entzündungsinfiltrat im weiteren Verlauf durch histiozytäre und lymphoide Entzündungszellen ersetzt wird [234,179,7]. Ursprünglich wurde diese Dynamik nicht bedacht und davon ausgegangen, dass es sich je nach vorherrschender Zellart um eine andere Art von Vaskulitis und Pathomechanismus handelt [195,180]. Zwar geht die breite Literatur heute davon aus, dass es sich dabei um einen Irrtum handelte, dennoch schien es außerordentlich vorteilhaft zu sein, Biopsien auch im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Dazu dienten die 13 Biopsien, die nach Histamin-Injektionen bei Patienten mit kLV in verschiedenen zeitlichen Abständen entnommen wurden.

Die Möglichkeit, eine lokalisierte leukozytoklastische Vaskulitis durch die Injektion von Histamin zu induzieren und damit detaillierte Einblicke in den zeitlichen Ablauf des entzündlichen Geschehens zu erhalten, wurde erstmals 1975 von Braverman

und Yen beschrieben [12]. Histamin induziert eine Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung der kleinen Blutgefäße, so dass sich zirkulierende Immunkomplexe an der Gefäßwand ablagern können [19,20]. Es wurde nicht nur eine direkte Korrelation zwischen klinischer und histologischer Ausprägung möglich, sondern es konnten auch die schon in Tierversuchen beschriebenen Veränderungen in der Nachweisbarkeit von Komplement und Immunglobulinen im zeitlichen Verlauf am Menschen bewiesen werden [29,18]. Üblicherweise lassen sich in Läsionen, die älter sind als 24h keine Immunkomplexe mehr in der IF nachweisen [12]. Wigbels und Mitarbeiter fanden 1997 heraus, dass folgend auf Histamin-Injektionen C3 nach einer Stunde bei all denjenigen Patienten nachzuweisen war, die an der Injektionsstelle eine Läsion entwickelten. Dabei war diese Ablagerung zu 66% gekoppelt mit der Ablagerung von Immunkomplexen. Interessanterweise nahm die Ablagerung von C3 und Ig in ihrer Untersuchung schon nach 2 Stunden wieder ab. Deshalb meinten sie, dass der fehlende Nachweis von Ig mit einer sehr schnell stattfindenden Maskierung durch gebundenes C3 zustande kommen könnte [225]. Bei der histologischen Begutachtung der Gewebeproben aus Münster konnte bei frühzeitig entnommenen Biopsien eine vorwiegend granulozytäre Infiltration des perivaskulären Gewebes gesehen werden. In den zu späteren Zeitpunkten entnommenen Proben wurde die schon beschriebene Umwandlung in ein eher lymphoides und histiozytäres Infiltrat deutlich. Dementsprechend konnte die schon von anderen Autoren beschriebene Dynamik in diesem Prozess bewiesen werden. Schon Savill erwähnte 1993, dass es von großem Interesse sein könnte, die kLV als *in/ex vivo* Modell für die Aufklärung des Absterbens der neutrophilen Granulozyten zu untersuchen [186]. Als noch idealer ist aber die hier vorliegende Kombination der Untersuchungen von spontan entstandenen und durch Histamin induzierten Läsionen kutaner leukozytoklastischer Vaskulitis zur Analyse der Morphologie der Granulozyten-infiltration anzusehen.

5.2 Licht- und Elektronenmikroskopie der Leukozytoklasie

Das besondere histomorphologische Korrelat der kLV, die Leukozytoklasie, beschreibt den geordneten Zerfall der neutrophilen Granulozyten während dieser Entzündung [54,124]. Charakteristischerweise sieht man in früh entnommenen Gewebeproben zahlreiche neutrophile Granulozyten intravasal, intramural und perivaskulär. Dabei unterscheiden sich diese je nach ihrer Lokalisation teilweise erheblich in ihrer Morphologie. Intravasal und intramural sind sie noch intakt, aber

schon in unmittelbar perivaskulärer Lokalisation beginnen ihre Zellkerne dichter zu werden und zu fragmentieren. Je nach Dichte des Infiltrats finden sich zahlreiche kleine Zellkern-fragmente in der Umgebung der Gefäße oder durchsetzen das ganze obere bis mittlere Corium. Je weiter entfernt sich dabei die Granulozyten vom Gefäßlumen befinden, desto weniger intakt sind sie. Fast kreisförmig um die Gefäße herum lässt sich stufenweise das Fortschreiten der Desintegration dieser Zellen beobachten. In späteren Stadien zeigt sich auch erst nur in unmittelbarer Nähe zum Gefäßlumen die lymphoide Infiltration, weiter peripher finden sich nach wie vor die zerfallenden neutrophilen Granulozyten und immer zahlreichere Histozyten. Soweit lichtmikroskopisch beurteilbar, scheinen die Kernfragmente während dieses Prozesses von der Zellmembran umschlossen zu bleiben. Inwieweit dabei die Zellen insgesamt der Schrumpfung unterliegen, lässt sich lichtmikroskopisch schwer beurteilen, da Fragmente dieser Zellen dem Aspekt angeschnittener älterer, noch intakter neutrophiler Granulozyten, die somit mehrere Zellkern-Segmente aufweisen, stark ähneln. Einen Zerfall mit Schwellung und Lyse sieht man jedoch lichtmikroskopisch nicht. In der Literatur lassen sich einige lichtmikroskopische Beschreibungen der Leukozytoklasie finden. Ansatzweise wurden in diesen ähnliche, jedoch meist weniger umfassende Beobachtungen gemacht [7,8,191].

Weitere Aufschlüsse über die Morphologie ergaben die elektronenmikroskopischen Beobachtungen. Intravasal und intramural bestätigten sich die lichtmikroskopischen Erkenntnisse. Perivaskulär wurden neutrophile Granulozyten in verschiedenen Stadien der Desintegration gesehen. Im Frühstadium zeigten sich in der Elektronenmikroskopie periphere Vakuolisierungen der Granulozyten. Das Zytoplasma stellte sich elektronen-dichter dar und die Septierung der Kerne wurde deutlich sichtbar. Im Verlauf konnte das für die Apoptose charakteristische 'blebbing' der Zellmembran gesehen werden. Es kam zur Separation des Zellkerns, und es bildeten sich Kernfragmente. Dabei blieben Zytoplasma, Organellen und die äußere Membran intakt. Zwischen Zellen mit apoptotischer Morphologie konnten nur einzelne mit nekrotischen Veränderungen gesehen werden. Diese zeigten eine Vakuolisierung und Ödematisierung des Zytoplasmas. Die Zellmembran war dabei an umschriebenen Stellen eingerissen und die Ultrastruktur bis auf die Lysosomen zerstört. Außerdem waren von Histozyten phagozytierte Fragmente der Granulozyten zu sehen. Diese zeigten sekundär im Zytoplasma lokalisiert einen Verlust der Integrität der Organellen. Die gleichen Beobachtungen machten Shi und

Mitarbeiter 1998 [191]. In weiteren Publikationen zur Leukozytoklasie wurde entweder auf die elektronenmikroskopische Evaluierung verzichtet oder nicht näher auf die gemachten Beobachtungen eingegangen.

5.3 Apoptose und DNA-Fragmentierung

Für neutrophile Granulozyten wurde in der Mehrzahl der *in vitro* Studien beschrieben, dass sie morphologisch apoptotisch absterben [26, 28,113,72,183]. In diesen Arbeiten zeigten alternde Neutrophile unter anderem auch die charakteristische DNA-Fragmentierung [183]. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen den Veränderungen im Sinne der Apoptose und der Aufnahme durch Makrophagen beobachtet werden. Diese Aufnahme schien mit fortschreitender Zeit vermehrt und sehr schnell abzulaufen [183,106]. Diese Veränderungen wurden nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* an entzündeten Gelenken [183], an entzündeten Atemwegen bei mechanisch beatmeten Neugeborenen [61], bei Glomerulonephritis [185] und experimentell induzierter Peritonitis (Meerschweinchen) [181] beschrieben. Das Vorkommen der Apoptose in dieser Zellart schließt natürlich andere Formen des Zelltodes nicht aus. Einzelne Autoren sind der Meinung, dass Nekrose die übliche Form des Zelltodes der neutrophilen Granulozyten ist [75]. Im Zentrum von Abszessen sterben sie beispielsweise nekrotisch ab [223]. Die allgemein vertretene Hypothese ist jedoch, dass Apoptose und anschließende Phagozytose der bevorzugte Entfernungsmechanismus der neutrophilen Granulozyten in akut entzündeten Geweben sind [109,183]. Dies soll sich auch limitierend auf die Gewebeschädigung auswirken, da apoptotische Zellen im Gegensatz zu nekrotischen nicht zu degenerativen Veränderungen des umliegenden Gewebes führen [224,129].

Das charakteristischste Merkmal der Apoptose, die DNA-Fragmentierung, lässt sich *in situ* mittels der TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) nachweisen. Mit dieser Methode werden die neu entstandenen freien 3'OH-Enden der DNA-Fragmente in morphologisch identifizierbaren Kernen und apoptotischen Fragmenten markiert. Im Gegensatz dazu werden normale proliferative Kerne, die relativ unsignifikante Anzahlen von freien 3'OH-Enden aufweisen, nicht angefärbt [55]. Es ist nicht klar, ob die Methode diejenigen Stadien der Apoptose nachzuweisen vermag, in denen es zur Kondensation/Verdichtung des Chromatins kommt und die DNA-Fragmentierung noch gering ist. Auch Zellen, die morphologisch die Kriterien der Nekrose aufweisen, können angefärbt werden. Sie erscheinen aufgrund des

geringeren Vorkommens von freien 3'OH-Enden aber eher diffus positiv [97]. Daher sollten nur deutlich positive Kerne zur Evaluation herangezogen werden, da unter anderem auch die nötigen Vorbehandlungen (Mikrowellen-Behandlung, Andauen) zu einer DNA-Fragmentierung führen können [145]. In experimentellen Systemen zeigt sich außerdem eine große Variabilität hinsichtlich der DNA-Fragmentierung [59]. Diese kann trotz Apoptose in manchen Zellarten fehlen [24] oder verzögert stattfinden, d.h. sich in manchen Fällen erst den morphologischen Veränderungen anschließen [232,1]. Die Ergebnisse müssen deshalb immer mindestens mit morphologischen Kriterien korreliert werden, und zwar durch die Beurteilung der Zellen bei starker Vergrößerung [25]. Insgesamt ist die Methode kritisch zu beurteilen, auch wenn sie in manchen Fällen spezifischer und sensitiver den Nachweis der Apoptose erbringen kann als andere histochemisch-morphologische Untersuchungen [115].

Die licht- und elektronenmikroskopische Analyse der Leukozytoklasie ergab einen geordneten, den Kriterien der Apoptose entsprechenden Zellzerfall. Um so mehr verwunderte es, dass die TUNEL-Methode für die Neutrophilen sowohl in den spontan entstandenen als auch in den durch Histamin-induzierten Läsionen eindeutig negativ ausfiel. Positiv waren einige Zellen der Epidermis und einige mononukleäre Zellen. Die positiven Zellen der Epidermis können als interne Positiv-Kontrolle gewertet werden, d.h. sie zeigen an, dass die Reaktion stattgefunden hat. Freie klastische Fragmente erschienen schwach positiv oder negativ. Zusätzlich waren jedoch Konglomerate von deutlich TUNEL-positivem Material zu sehen. Bei einem Vergleich der mit der TUNEL-Methode gefärbten Schnitte mit denjenigen, die immunhistochemisch mit dem Makrophagen/Monozyten-Marker CD68 gefärbt wurden, stellte sich heraus, dass es sich um von Makrophagen phagozytierte Kernfragmente handelte. Dies wurde auch durch Shi et al 1998 erkannt [191]. Aufgrund dieser Befunde ist somit festzuhalten, dass leukozytoklastische Neutrophile zwar die licht- und elektronenmikroskopische Morphologie einer Apoptose aufweisen, jedoch keine DNA-Fragmentierung zeigen. Die DNA-Fragmentierung scheint erst nach Ablauf des Zellzerfalls und phagozytotischer Eliminierung zu erfolgen. Ein solcher dissoziierter Prozess wurde schon für HL-60- und Testis-Tumor-Zellen beschrieben [1], nicht jedoch für neutrophile Granulozyten.

5.4 Expression von Apoptose-regulierenden Proteinen

Um erste Einblicke in die molekulare Regulation des leukozytoklastischen Zellerfalls zu erhalten, wurde die Expression von Molekülen der CD95- und bcl-2-Familie, sowie der Proteine des p53- und p21-Gens immunhistochemisch untersucht. Alle diese Moleküle und Proteine spielen eine Schlüsselrolle bei der Induktion und Inhibition von Apoptose.

5.4.1 Expression von CD95 und CD95 Ligand

Ein schon seit langem bekannter pro-apoptotischer Vertreter ist der ubiquitär exprimierte, transmembranöse Oberflächenrezeptor CD95/Fas, der Homologien zur TNF-Familie aufweist [79,143,144]. Getriggert wird die Apoptose durch die Bindung des CD95-Liganden oder durch Bindung von Anti-CD95-Antikörpern. CD95L kommt sowohl als Oberflächenrezeptor, als auch in löslicher Form vor und gehört zur korrespondierenden TNF-Familie [200]. Folgend auf die CD95-CD95L- oder CD95-anti-CD95-Ak-Interaktion führt offensichtlich ein von Caspasen und Mitochondrien abhängiger Mechanismus zur Apoptose in vielen Zellarten [81,216,40,128,221]. Die Rolle dieser Rezeptoren in der konstitutioellen Auslösung der Apoptose in Granulozyten wird jedoch kontrovers beurteilt.

Insgesamt scheint das CD95/CD95L-System eine entscheidende Rolle in der Regulation des peripheren Immunsystems zu spielen [107,60]. Aktivierte natürliche Killerzellen lösen, vermittelt über ihre CD95L-Rezeptoren, die als tödliche Waffe auf CD95 positive und somit sensible Zellen wirken, das Todesprogramm aus [219,152]. Des Weiteren wird CD95 auf CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten exprimiert [37,38]. CD8-positive T-Zellen können im aktivierten Zustand CD95L bilden [88,2] und so ihren eigenen Selbstmord oder das Todesprogramm in benachbarten, sensiblen Zellen auslösen [89,120,198,209]. Auf diese Weise kann die Deletion von reaktiven Zellen und das Überleben von Gedächtniszellen reguliert werden. Es ist leicht vorstellbar, dass ein Ungleichgewicht in diesem Mechanismus drastische Folgen nach sich ziehen kann. Zu wenig CD95-Expression und damit zu wenig programmierter Zelltod führt bei transgenen Mäusen zu Lymphadenopathie und/oder Autoimmunerkrankungen [207]. Dies wurde auch bei Kindern mit ähnlichen genetischen Defekten beobachtet [107,35,125]. Zuviel CD95-Expression, bzw. Hyperaktivität des CD95-Systems hingegen, wird bei AIDS gesehen und führt zu der Abnahme der T-Helfer-Zellen [32].

Die Neutrophilen in kLV zeigten nur in bis zu 50% der Zellen eine CD95-Expression. CD95L wurde kaum exprimiert. Dabei waren in den meisten Fällen weniger als 50% der Neutrophilen positiv. In intravasaler und intramuraler Lokalisation wurden keine positiven Granulozyten gesehen. Andere Zellen, wie epidermale Zellen (CD95) und Lymphozyten (CD95 und CD95L) reagierten positiv. Die Negativ-Kontrollen fielen für beide Antikörper negativ aus. Die positive Darstellung der basalen und suprabasalen Keratinozyten der Epidermis durch CD95 kann als interne Positiv-Kontrolle aufgefasst werden [110]. Eine Maskierung der CD95-Rezeptoren durch CD95L (und umgekehrt) scheint eher unwahrscheinlich, da mononukleäre Zellen teilweise beide Rezeptoren deutlich exprimierten. Insgesamt muss erwähnt werden, dass die Färbung mit CD95L wesentlich schwächer ausfiel. Aufgrund der positiv angefärbten Zellen (z.B. Lymphozyten) ist jedoch davon auszugehen, dass die Färbung stattgefunden hat.

Ursprünglich ging man davon aus, dass die konstitutionelle Co-Expression von CD95 und CD95L in reifen Neutrophilen für die hohe Rate rapider, spontaner Apoptose, die in diesen Zellen *in vitro* gesehen wird, verantwortlich ist [114]. Mittlerweile ist aber bekannt geworden, dass lösliches CD95L sowohl *in vitro* [153] als auch *in vivo* [135,190] in Neutrophilen nicht die Apoptose auslöst, sondern chemotaktisch auf diese Zellen wirkt. Des Weiteren haben Experimente mit CD95L(gld)- und CD95(lpr)-Knockout-Mäusen ebenfalls die postulierte Schlüsselrolle dieser beiden Faktoren für die Lebenszeit der Neutrophilen in Frage gestellt [48]. Die Befunde in kLV sprechen ebenfalls dafür, dass diesen Rezeptoren keine maßgebliche Rolle in der Induktion des geordneten Zellzerfalls der Neutrophilen *in vivo* zukommt.

5.4.2 Expression von bcl-2 und bax

Das Proto-Onkogen bcl-2 ist ein Vertreter einer Genfamilie, die Homologien zu Apoptose-regulierenden-Genen des Nematoden *C.elegans* aufweisen [161]. Bcl-2 kodiert für ein Protein, das an der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist und die Apoptose inhibiert. Der genaue Wirkungsmechanismus ist bisher nicht bekannt. Angenommen wird, dass bcl-2 den frühen Eintritt in die Apoptose reguliert, indem die Permeabilitätsänderung der Mitochondrien verhindert wird. Diese Permeabilitäts-änderung der Mitochondrien soll zu einem Zusammenbruch des Membranpotentials und folgend darauf zur Apoptose führen [156,126,166,215]. Bcl-2 wurde 1985 bei der genetischen Analyse einer chromosomalen Translokation (t(14;18)), die für das folliculäre B-Zell-Lymphom charakteristisch ist, erkannt [214].

Die bcl-2-Expression kommt außerdem in frühen Myeloidzellen des Knochenmarks vor [71,34], jedoch normalerweise nicht mehr in reifen Neutrophilen [81,137,114]. Hämatologische und immunologische Zellen sollen abhängig von ihrer bcl-2-Expression mehr oder minder anfällig sein, CD95 vermittelt in Apoptose zu gehen [155]. In der Literatur wird über komplette Inhibition [82], nur partielle Inhibition [80,42] und gar keinem Effekt [131] von bcl-2 auf das CD95/CD95L-System berichtet. Weitere Vertreter der bcl-2-Genfamilie, wie bax, bcl-XI, bcl-Xs wirken entweder anti- oder pro-apoptotisch [149]. Das Verhältnis der Expression von bcl-2 und bax determiniert, ob es zum Überleben oder Absterben der Zelle kommt. Dieses gilt unter anderem auch für neutrophile Granulozyten, die im Vergleich zu Monozyten und Lymphozyten den höchsten bcl-2/bax-Quotient aufweisen [217]. Es ist demnach wichtig, nicht nur die Expression von bcl-2, sondern auch diejenige von bax zu untersuchen.

In kLV exprimieren die Neutrophilen weder bcl-2, noch bax. Da sich in beiden Färbungen andere Zellen der Haut positiv darstellten, ist davon auszugehen, dass die Reaktionen stattgefunden haben. Im Einklang mit der schon mehrfach beschriebenen Beobachtung, dass reife neutrophile Granulozyten bcl-2 üblicherweise nicht mehr exprimieren, stellten sie sich auch in diesem Fall negativ dar.

Die fehlende bax-Expression könnte die Erkenntnisse einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der neutrophile Granulozyten in Entzündungen auf ihre bax-Expression untersucht wurden, bestätigen. In dieser Studie konnte das schon früher beschriebene verlängerte Leben der neutrophilen Granulozyten in verschiedenen entzündlichen Erkrankungen [10,108,84] durch eine Herunterregulierung von bax erklärt werden. Die bax-Expression wiederum war abhängig von einigen Zytokinen (GM-CSF, G-CSF), die in Entzündungen eine Rolle spielen. Nach der Entfernung dieser Zytokine wurde die bax-Expression wieder induziert und damit die Apoptose ausgelöst [36,222]. In entzündlichen Prozessen scheinen also verschiedene Zytokine zu determinieren, ob und wann es zur Apoptose und damit zur Resolution der Entzündung kommt.

In leukozytoklastischer Vaskulitis sieht man trotz mangelnder bax-Expression das Phänomen des leukozytoklastischen Zell-/Kernzerfalls der neutrophilen Granulozyten. Folglich reicht eine alleinige Herunterregulierung von bax nicht aus, um den Zerfall zu verhindern.

5.4.3 Expression von p53 und p21

Weitere in den Prozess des programmierten Zelltodes involvierte Proteine, wie p53 und p21, ließen sich in neutrophilen Granulozyten in kLV nicht nachweisen. Diese Proteine sind in der Lage, bei Schädigungen der DNA den Zellzyklus diverser Zellen anzuhalten, um entweder eine Reparatur der DNA zu ermöglichen oder die Apoptose auszulösen [111,230]. Zu der Expression p53/p21 in reifen neutrophilen Granulozyten liegt kaum Literatur vor. In den meisten Fällen wurden Vorläuferzellen des Knochenmarks während ihrer hämatopoetischen Differenzierung zu reifen Zellen auf die Expression dieser Proteine hin untersucht [194].

5.5 Expression charakteristischer und spezifischer Oberflächenrezeptoren

Neutrophile Granulozyten exprimieren 2 Arten von Zelloberflächen-Rezeptoren, die mit der Fc-Region von Ig und Komplement interagieren, die CD32/Fc γ RII- und CD16/Fc γ RIII-Rezeptoren. CD32 ist ein transmembranöses Molekül der Zellmembran, CD16 ein Glykosyl-phosphatidyl-Inositol(GPI)-verankerter, niedrig affiner IgG-Oberflächenrezeptor [218,31,165,50,211]. Beide Rezeptoren sind an der Phagozytose, der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) und der Sekretion von löslichen entzündlichen Mediatoren (freien Radikalen, lysosomalen Enzymen und Zytokinen) beteiligt [56,74,192,78]. Durch ihre Aggregation können diese Funktionen in verschiedenen pathologischen Prozessen getriggert und moduliert werden. Dabei werden je nach Bindungspartner und weiteren Bedingungen teilweise gegenteilige Wirkungen ausgelöst.

Gamberale und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Aktivierung der CD32-Rezeptoren durch verschiedene Immunkomplexe (präzipitierte und an Erythrozyten gebundene Immunkomplexe) eine kritische Rolle in der Stimulation der Apoptose der Neutrophilen spielt [53]. Auch für CD16 wird eine Rolle in der Apoptose angenommen. *In vitro* verlieren neutrophile Granulozyten gesunder Probanden diesen Rezeptor im Laufe der Zeit, mit zunehmender Zelldesintegration im Sinne der Apoptose [39,72]. Dieser Rezeptor-Verlust kann durch Zugabe der Zytokine GM-CSF, G-CSF und IFN γ verhindert werden [72,114]. Dennoch sind die Publikationen hinsichtlich der Rolle dieses Rezeptors bei der Apoptose nicht eindeutig, da unter anderem Jones und Mitarbeiter darauf hinwiesen, dass der steile Abfall der Expression von CD16 auf der Zelloberfläche nicht spezifisch für die Apoptose ist. Während der *in vitro* Inkubation von neutrophilen Granulozyten mit

Lipopolysacchariden fiel ihnen auf, dass die Apoptose zwar gehemmt wurde, sich dabei aber die Expression von CD16 dennoch auf apoptotische Werte reduzierte [85]. Außerdem wurde gezeigt, dass es durch GM-CSF sogar zu einem Abwurf der CD16-Rezeptoren kam [141]. Dabei wurde die Expression auf der Zelloberfläche durch Mobilisierung des intrazellulären Pools und nicht durch genetische Transkription aufrecht erhalten. Wachstumsfaktoren wahren nicht nur die Expression dieser Rezeptoren, sondern hemmen auch die morphologisch nachweisbaren apoptotischen Veränderungen und die DNA-Fragmentierung, d.h. sie verlängern das Leben insgesamt [199]. Möglicherweise sind es morphologische Veränderungen, die zum Abwurf der CD16-Rezeptoren führen. Die Polymerisation von Aktin, als Bestandteil des Zytoskeletts, führt Zeit- und Dosis-abhängig zum Abwurf von Oberflächenrezeptoren, unter anderem auch von CD16-Rezeptoren [134].

Es finden weitere Zelloberflächen-Veränderungen statt, von denen einige als ursächlich für die Erkennung der Zellen durch Makrophagen angesehen werden. Welche spezifischen Veränderungen der Zelle bzw. ihrer Zelloberfläche es sind, die durch Makrophagen letztlich erkannt werden und dann zur Phagozytose führen, konnte noch nicht aufgeklärt werden. Manche Autoren bewerten den Vitronektin-Rezeptor und den CD36-Rezeptor (Thrombospondin-Rezeptor) als wichtige Komponenten zur Erkennung der zu phagozytierenden Zellen durch Makrophagen [68,43]. Andere gehen davon aus, dass sich die Ladung der apoptotischen Zellen durch Abwurf der CD16-Rezeptoren ändert [72], mit nachfolgender ladungsabhängiger Phagozytose [184]. Des Weiteren scheinen Phosphatidylrezeptoren von Bedeutung zu sein [43,44]. Möglich und sehr wahrscheinlich ist ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren/Rezeptoren bei der Erkennung der zu phagozytierenden Zellen durch Makrophagen.

Die neutrophilen Granulozyten in kLV wurden weder intravasal, intramural, perivaskulär noch peripher im Gewebe durch CD32 angefärbt, obgleich es sich um einen von diesen Zellen konstitutionell exprimierten Rezeptor handelt. Hingegen stellten sich dendritische/Antigen-präsentierende Zellen der Epidermis positiv dar. Nur vereinzelte, vorwiegend große mononukleäre Zellen der Infiltrate waren positiv. Der fehlende Nachweis der CD32-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Neutrophilen könnte durch die Bindung der an dieser Erkrankung maßgeblich beteiligten Immunkomplexe bedingt sein. *In vitro* zeigten Koenderman und Mitarbeiter, dass vor allem CD32-Rezeptoren eine Rolle in der Bindung von

Immunkomplexen spielen [100]. Beschrieben wurde auch, dass die Abnahme der CD32-Rezeptoren der Granulozyten im Blut von SLE-Patienten mit hohen Spiegeln von Immunkomplexen korrelierte [205]. Die Bindung der Immunkomplexe an diese Rezeptoren könnte einerseits zu einer Aktivierung der Neutrophilen führen, andererseits bei der Auslösung des Todesprogramms mitwirken [53]. Wigbels et al vermuteten, dass die Immunkomplexe durch Komplement maskiert werden [225]. Wie schon erwähnt, ist der frühzeitige fehlende Nachweis der Immunkomplexe durch ihre Bindung an die CD32-Rezeptoren der Neutrophilen bedingt. Diese erfüllen somit schon innerhalb der Zirkulation eine 'Clearance'-Funktion.

CD16 färbte neutrophile Granulozyten demgegenüber bis in späte Stadien der Zellesintegration und sogar die Mehrzahl der klastischen Zellfragmente positiv an. Demnach kommt es bei kLV nicht, wie üblicherweise für die Apoptose beschrieben, zu einem frühen Verlust dieser Rezeptoren. Zusätzlich wurden einige Makrophagen positiv angefärbt. Es wurde beschrieben, dass im Gegensatz zu Histozyten [4], neutrophile Granulozyten nicht über CD16-Rezeptoren phagozytieren können. Erklärt wurde dies durch das Vorliegen von zwei verschiedenen Isotypen dieser Rezeptoren, die geringfügige Unterschiede in der Aminosäuren-Sequenz aufweisen. Der Isotyp der Makrophagen soll sogar eine wichtige Rolle in der Regulation der Phagozytose opsonierter Zellen/Partikel spielen [112]. Es wäre also denkbar, dass die Erkennung und Phagozytose der klastischen Fragmente in kLV durch Makrophagen über diese Rezeptoren reguliert wird. Falls es sich nicht um eine direkte Interaktion handelt, könnte es indirekt über eine Polymerisation von Aktin und darauf folgend zu bevorzugter Phagozytose kommen, wie es schon *in vitro* für Neutrophile beschrieben wurde [175]. In beiden Fällen würde der mangelnde Abwurf dadurch einen Sinn bekommen.

5.6 CD68, ein lysosomaler Marker und seine Relevanz für die Apoptose

Ein besonderes Merkmal der Apoptose ist, dass apoptotische Zellen zu einer massiven Einwanderung von Makrophagen führen [123]. Letztlich werden die apoptotischen Zellen gänzlich durch Makrophagen ersetzt. Beim Einsatz des Monozyten/Makrophagen Markers CD68, der lysosomale Strukturen nachweist, fiel in einigen Präparaten von kLV eine sehr große Anzahl positiver Zellen auf. Neutrophile wurden, da sie ebenfalls lysosomale Enzyme enthalten, teilweise positiv angefärbt. Wie in den vorliegenden Abbildungen (Abb. 22/23, Seite 56) jedoch zu sehen ist, wurden nicht generell alle neutrophilen Granulozyten positiv angefärbt.

Dies ist vereinbar mit der in einer anderen Studie beobachteten Abnahme des toxischen Potentials der neutrophilen Granulozyten in kLV [64].

5.7 Abschließende Bemerkungen

Die Synchronisation der morphologischen Veränderungen, die Morphologie der neutrophilen Granulozyten, der Nachweis zahlreicher Makrophagen und die Tatsache, dass es ein selbstlimitierter Prozess ohne extreme Schädigung des Gewebes ist, machen deutlich, dass es sich bei der Leukozytoklasie um eine Art des programmierten und geplanten Zelltodes der neutrophilen Granulozyten handeln muss. Es ist bekannt, dass es zahlreiche Wege gibt, die zur Apoptose führen und nicht alle Merkmale vorhanden sein müssen, um diese zu beweisen [51]. Bei der kLV handelt es sich um eine Form der Apoptose, die mit verzögerter DNA-Fragmentierung abläuft und von äußeren Faktoren moduliert wird. Offensichtlich spielen dabei die Immunkomplexe und ihre Interaktion mit Fc γ -Rezeptoren eine wichtige Rolle. Sie scheinen sowohl an der Auslösung des Todesprogramms der Neutrophilen als auch an der Phagozytose durch Histiozyten beteiligt zu sein. Die Herunterregulierung von bax soll *in vivo* (aus BAL isolierte Neutrophile) für die Verzögerung der Apoptose von Neutrophilen in entzündlichen Prozessen verantwortlich sein. Da die Entfernung der Zytokine *in vitro* die bax-Expression wieder induziert und die Apoptose der Neutrophilen auslöst, scheint es naheliegend, dass bax in Entzündungen die Resolution reguliert [36]. In kLV findet der Zerfall und letztlich die Resolution jedoch wohl ohne Induktion von bax statt. Andere klassische Apoptose-auslösende Proteine konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Auch der Abwurf der CD16-Rezeptoren, der ein Merkmal der Apoptose dieser Zellen sein soll, zeigte sich nicht. Dafür waren CD32-Rezeptoren schon innerhalb der Zirkulation nicht nachweisbar. Diese spielen einerseits eine wichtige Rolle in der Bindung von Immunkomplexen, andererseits in der Aktivierung der Neutrophilen. Es ist also zu vermuten, dass Immunkomplexe schon innerhalb der Zirkulation an die CD32-Rezeptoren der Neutrophilen binden und diese aktivieren. Durch die Aktivierung kann es:

1. zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen mit Fixierung an die Endothelien kommen,
2. zu vermehrter Produktion von potentiell schädigenden Mediatoren, die zur Zerstörung der Endothelien führen, und

3. möglicherweise auch zur Auslösung des Todesprogramms mit Verminderung des toxischen Potentials der Zellen.

Um den Mechanismus der Leukozytoklasie zu klären, bedarf es künftig weiterer Untersuchungen. Hier ist in erster Linie an eine detaillierte Charakterisierung der die Apoptose regulierenden Gene und Proteine zu denken. Zu nennen sind vor allem Mcl-1, ein anti-apoptotisches Mitglied der bcl-2-Familie, das während der Apoptose von Neutrophilen herunterreguliert wird [140]. Gleiches gilt für das A1 Gen und Protein, das bei Knockout-Mäusen zu einer vermehrten Apoptose von Neutrophilen führte [65]. Auch sind die intrazellulären Signal- und Transduktionswege der Apoptose bei Neutrophilen bisher kaum bekannt. Schließlich sind noch die Mediatoren der Apoptose-Induktion zu analysieren. $\text{TNF}\alpha$ und NO wurden zwar bei der Purpura Schoenlein-Henoch untersucht [7], jedoch sind die erhobenen Befunde ad hoc nicht eindeutig, zumal für beide Mediatoren Dosis-abhängig auch gegenteilige Ergebnisse vorliegen.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die kLV ein hervorragendes *in situ* Modell für die Klärung des programmierten Zelltodes von neutrophilen Granulozyten darstellt. Eine vollständige Aufklärung des Zerfalls der Granulozyten kann in der Zukunft neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen, da immer deutlicher wird, dass feine Unterschiede in der Auslösung der Apoptose in verschiedenen Zellen bestehen. Im Idealfall könnten selektiv und spezifisch ungewollte Zellen durch Apoptose eliminiert werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bis heute sind verschiedene Modi des Absterbens von Zellen beschrieben worden. Eine grobe Unterscheidung, die in diesem Zusammenhang häufig aufgeführt wird, ist diejenige zwischen programmiertem und akzidentellem Zelltod oder anders ausgedrückt, zwischen Apoptose und Nekrose.

In der vorliegenden Arbeit wurde das vaskuläre und perivaskuläre entzündliche Infiltrat in histologischen Hautschnitten von Patienten mit kutaner leukozytoklastischer Vaskulitis (kLV) untersucht. Es wurden sowohl spontane klinische Läsionen als auch durch Histamin-induzierte Läsionen bei Patienten mit kLV untersucht. Dabei galt das besondere Interesse dem leukozytoklastischen Zellzerfall, genauer gesagt, der Desintegration der neutrophilen Granulozyten. Schon mehrfach wurde beschrieben, dass neutrophile Granulozyten *in vitro* gealtert

in Apoptose gehen. Zusätzlich wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt, dass Zytokine in der Lage sind, das Todesprogramm dieser Zellen auf spätere Zeitpunkte aufzuschieben. Dieser Aufschub, der in einigen Entzündungen gesehen werden kann, ist eine logische Konsequenz in Anbetracht dessen, dass diese Zellen noch eine Aufgabe im Entzündungsgebiet zu leisten haben.

Aufgrund der Morphologie der Leukozytoklasie wurde von der Hypothese ausgegangen, dass es sich bei dieser Form der Zelldesintegration um Apoptose handelt. Um diese Hypothese zu beweisen, wurde einerseits die Ultrastruktur elektronenmikroskopisch beurteilt, andererseits wurden die histochemische TUNEL-Methode und die immunhistochemische APAAP-Methode eingesetzt. Mit Hilfe der APAAP-Methode wurde versucht, die in den Prozess des programmierten Zelltodes involvierten Rezeptoren CD95 und CD95L, Proteine p53 und p21, bcl-2 und bax und weitere Rezeptoren, wie CD32/Fc γ RII und CD16/Fc γ RIII, deren Expression sich während der Apoptose ändert, nachzuweisen.

Lichtmikroskopisch zeigte sich ein geordneter Zellzerfall der neutrophilen Granulozyten. Dabei kam es je nach Lokalisation (intravasal, intramural, perivaskulär) und Stadium des Entzündungsprozesses zunehmend zur Desintegration der Neutrophilen. Elektronenmikroskopisch bestätigten sich die lichtmikroskopischen Beobachtungen. Zusätzlich wurden ultrastrukturell die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose gesehen. Es zeigte sich eine Kondensation des Chromatins und Zytoplasmas mit zunehmender Separation der Zellkerne und des Zytoplasmas. Anschließend kam es zur Bildung von Kernfragmenten mit intakten äußeren Membranen und Zellorganellen. Hinsichtlich des Nachweises der charakteristischen pro-apoptotischen Rezeptoren CD95 und CD95L konnten diese hingegen nur in geringem Ausmaß und das pro-apoptotische Protein bax gar nicht nachgewiesen werden. Letzteres spricht dafür, dass bax, wie schon in einigen anderen Entzündungen beobachtet wurde, auch in Neutrophilen in kLV herunterreguliert wird. Die Proteine p21 und p53 reagierten ebenfalls nicht positiv, so dass davon auszugehen ist, dass sie nicht an der Regulation des Prozesses beteiligt sind. Außerdem wurden mit der TUNEL-Methode vorwiegend nur schon phagozytierte Fragmente angefärbt. Der für die Apoptose von neutrophilen Granulozyten typische CD16/Fc γ RIII-Rezeptor-Verlust konnte auch nicht aufgezeigt werden. Im Gegenteil, die neutrophilen Granulozyten exprimierten diese Rezeptoren bis in späte Stadien des Zellzerfalls. Zusätzlich waren die üblicherweise von

neutrophilen Granulozyten exprimierten CD32/Fc γ RII-Rezeptoren kaum nachweisbar, woraus zu schließen ist, dass sie entweder besetzt, abgeworfen und/oder internalisiert wurden. Desweiteren zeigten einige Präparate eine deutliche CD68-Expression, was für das Vorliegen zahlreicher Makrophagen spricht. Aufgrund dieser Beobachtungen handelt es sich somit um eine Form des programmierten Zelltodes mit verzögerter DNA-Fragmentierung. Die Bindung von Immunkomplexen an CD32/Fc γ RII-Rezeptoren spielt dabei möglicherweise eine maßgebliche Rolle in der Aktivierung und darauf folgender Auslösung des synchronisierten Zelltodes der Neutrophilen in kLV. Bei der Erkennung der Neutrophilen durch Makrophagen scheinen CD16/Fc γ RIII-Rezeptoren eine Rolle zu spielen.

Die Erkenntnisse, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, machen deutlich, dass feine Unterschiede in der Auslösung der Apoptose nicht nur in verschiedenen Zellen, sondern auch in denselben Zellen unter anderen Bedingungen bestehen. Eine vollständige Aufklärung der auslösenden Faktoren kann in der Zukunft die Möglichkeit eröffnen, therapeutisch selektiv und spezifisch ungewollte Zellen in chronisch entzündlichen und anderen Erkrankungen zu eliminieren.

Danksagung

Danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. G. Kolde für die freundliche Vergabe dieses Dissertationsthemas und die Möglichkeit, diese Dissertation in der Forschungsabteilung der Dermatologie der Charité durchzuführen.

Ganz besonderer Dank gebührt ihm für seine fundierte fachliche Beratung und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Auch bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet hinsichtlich der Zeit, die er sich für die Durchsicht, beziehungsweise die kritische Begutachtung meiner Entwürfe und für entscheidende Vorschläge zur Ausarbeitung des Themas gab.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau C. Wesendahl, die mich geduldig in die Methoden einarbeitete und mir auch sonst jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ohne Ihre Sorgfalt, ihre Ordnung im immunhistochemischen Labor und ihre Ideen zur Lösung diverser Probleme wäre es für mich wesentlich schwerer gewesen, die Experimente durchzuführen.

Für die Bereitstellung und Zusendung der im zeitlichen Verlauf untersuchten Proben gebührt Herrn PD Dr. med. C. Sunderkötter und Frau Dr. med. B. Wigbels der Dermatologie des Universitätsklinikums Münster ganz besonderer Dank.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. E. von Stebut, die mir ihre Erfahrungen sowohl hinsichtlich einer Methode als auch hinsichtlich des Fotografierens der histologischen Präparate vermittelte.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Dr. U. Hennig, die mich in das Fotografieren an einem weiteren Mikroskop einführte.

Ich möchte auch meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Unterstützung und ihr stetes Interesse an meiner Arbeit danken

Meinen Eltern bin ich dabei ganz besonders dankbar, da sie mir das Studium der Medizin ermöglichten.

Des Weiteren danke ich meinen Freunden, M. Höse, V. Asamoah, F. Eichert und O. Tzschätzsch, die ebenfalls, entweder meine Arbeit durchsahen oder mir ansonsten hilfreich zur Seite standen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Lehrern an Schule und Universität, die die Grundlagen für die Anfertigung dieser Arbeit legten und allen nicht namentlich genannten Helfern, die mich entweder direkt oder indirekt unterstützten, bedanken.

Lebenslauf

Name	Ladell
Vorname	Kristin
Eltern	Godwin Ladell, Maschinenbauingenieur, Ingrid Ladell, Montessori-Grundschullehrerin
Schwester	Celia Ladell, Diplomingenieurin für Ton- und Bildtechnik
Geb.-datum	27.02.1972
1978-1991	MontessoriGrundschule und Gymnasium in Köln
14.06.1991	Abitur
1992-1994	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
1994-1997	Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität/Charité zu Berlin
29.03.1994	Physikum
23.03.1995	1. Staatsexamen
20.03.1998	2. Staatsexamen
1998/1999	Praktisches Jahr an der Medizinischen Fakultät Charité mit Wahlfach Pädiatrie, Chirurgie-Tertial am Red Cross Children`s Hospital und Groote Shuur Hospital in Kapstadt, Südafrika
25.05.1999	3. Staatsexamen
April 1997	Posterpräsentation: 'Was ist Leukozytoklasie?' auf dem Kongress der 'Society for Investigative Dermatology' in Washington, USA.
Seit 24.05.2000	Tätigkeit als AiP am Institut für med. Virologie der Universität Zürich

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass diese Dissertation von mir selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie enthält auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten. Die benutzten Hilfsmittel, sowie die Literatur habe ich vollständig angegeben.

Literatur

- 1 Abend M., Schmelz H.U., Kraft K., Rhein A.P., van Beuningen D., Sparwasser C. Intercomparison of Apoptosis morphology with active DNA cleavage on single *cells in vitro* and on testis tumors. *J. Pathol.* (1998) 185: 419-26.
- 2 Alderson M.R., Tough T.W., Davis-Smith T., Braddy S., Falk B., Schooley K.A., Goodwin R.G., Smith C.A., Ramsdell F., Lynch D.H. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* (1995) 181: 71-77.
- 3 Almendral J.M., Huebsch D., Blundell P.A., Macdonald-Bravo H., Bravo R. Cloning and sequence of the human nuclear protein cyclin: homology with DNA-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84: 1575-9.
- 4 Anderson C.L., Shen L., Eicher D.M., Wewers M.D., Gill J.K. Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *J. Exp. Med.* (1990) 171: 1333-45.
- 5 Argenbright L.W., Barton R.W. Interaction of leukocyte integrins with intercellular adhesion molecule 1 in the production of inflammatory vascular injury in vivo. *J. Clin. Invest.* (1992) 89: 259-72.
- 6 Arthus M. Injections répétées de sérum de cheval chez le lapin. *C R Seances Soc Biol Filiales* (1903) 55: 817.
- 7 Banno S., Tamada Y., Matsumoto Y., Ohashi M. Apoptotic cell death of neutrophils in development of skin lesions of patients with Anaphylactoid purpura. *J. Dermatol.* (1997) Vol.24: 94-99.
- 8 Barduagni S., Frezzolini A., Ferrant G.i, Papi M., De Pita O. In situ labelling of fragmented DNA in cutaneous necrotizing vasculitis. *J. Dermatol. Science* (1998) 17: 160-64.
- 9 Bessis M.C. *Death of a Cell*, 16-mm Film. New York, Swift Motion Picture Laboratories, 1958.
- 10 Brach M.A., de Vos S., Gruss H.-J., Herrmann F. Prolongation of Survival of Human Polymorphonuclear Neutrophils by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Caused By Inhibition of Programmed Cell Death. *Blood* (1992). Vol 80, No 11:2920-24.
- 11 Braun-Falco O., Plewig G., Wolff H.H.. *Dermatologie und Venerologie 4.*, vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage; Kapitel 22 Erkrankungen der Blutgefäße S.794-848, Kapitel 23 Hämorrhagische Diathesen S.849-886. Springer Verlag Berlin, Heidelberg (1996) Vasculitis allergica (Gougerot 1932, Rüter-Brandsma 1948) (Schönlein 1832, Henoch 1868)
- 12 Braverman I.M., Yen A. Demonstration of immune complexes in spontaneous and Histamin-induced lesions and in normal skin of patients with leukocytoclastic angiitis. *J. Invest. Dermatol.* (1975) 64: 105-112.
- 13 Bravo R., Frank R., Blundell P.A., Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* (1987) 326(6112): 515-7.
- 14 Callen J.P., Kallenberg C.G.M. The vasculitides: relationship of cutaneous vasculitis to systemic disease. In: Kater L, Baart de la Faille H, editors. *Multi-systemic auto-immune diseases: an integrated approach*. Amsterdam: Elsevier (1995) p.267-97.

- 15 Campanile G., Lotti T. Clinical aspects of cutaneous necrotizing vasculitis. *Int. Angiol.* (1995) 14: 151-61.
- 16 Claudy A.L. Diagnosis of cutaneous vasculitis. *Int. Angiol.* (1995) 14: 183-7.
- 17 Claudy A. Review article: Pathogenesis of leukocytoclastic vasculitis. *Eur. J. Dermatol.* (1998) 8: 75-79.
- 18 Cochrane C.G., Weigle W.O., Dixon F.J. The role of polymorphonuclear leukocytes in the initiation and cessation of the Arthus vasculitis. *J.Exp.Med.* (1959) 110: 481-94.
- 19 Cochrane C.G. Studies on localization of circulating antigen antibody complexes and other macromolecules in vessels. I. Structural studies. *J. Exp. Med.* (1963) 118: 489-502.
- 20 Cochrane C.G. Studies on localization of circulating antigen antibody complexes and other macromolecules in vessels. II. Pathogenetic and pharmacodynamic studies. *J. Exp. Med.* (1963) 118: 503-513.
- 21 Cochrane C.G. Mediators of the Arthus and related reactions. *Prog. Allergy* (1967) 11: 1-35.
- 22 Cochrane C.G., Muller-Eberhard H.J., Aikin B.S. Depletion of plasma complement in vivo by a protein of cobra venom: its effect on various immunologic reactions. *J. Immunol.* (1970) 105: 55-69.
- 23 Cochrane C.G. Mechanisms involved in the deposition of immune complexes in tissues. *J. Exp. Med.* (1971) 134: (Suppl) 75s-89s.
- 24 Cohen G.M., Sun X.M., Snowden R.T., Dinsdale D., Skilleter D.N. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.* (1992) 286 (Pt 2): 331-4.
- 25 Collins R.J., Harmon B.V., Gobe G.C., Kerr J.F. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int. J. Radiat. Biol.* (1992) 61(4): 451-3.
- 26 Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* (1992) 80: 2012-20.
- 27 Cordell J.L., Falini B., Erber W.N., et al. Immunoenzymatic Labeling of Monoclonal antibodies Using Immune Complexes of Alkaline Phosphatase and Monoclonal Anti-alkaline Phosphatase (APAAP Complexes). *J. Histochem. Cytochem.* (1984) 32:219-229.
- 28 Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J. Immunol.* (1995) 154:4719-25.
- 29 Cream J.J., Bryceson A.D.M., Ryder G. Disappearance of immunoglobulin and complement from the Arthus reaction and its relevance to the studies of vasculitis in man. *Br. J. Dermatol.* (1971) 84: 106-9.
- 30 Csernok E., Ernst M., Schmitt W., Bainton D.F., Gross W.L. Activated neutrophils express PR3 on their plasma membrane *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Exp. Immunol.* (1994) 95: 244-250.

- 31 Dairon M. Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* (1997) 15:203.
- 32 Debatin K.M.: Disturbances of the CD95 (APO-1/Fas) system in disorders of lymphohematopoietic cells. *Cell Death and Diff.* (1996) 3: 185-9.
- 33 de la Salle H., Galon J., Bausinger H., Spehner D., Bohbot A., Cohen J., Cazenave J.P., Fridman W.H., Sautes C., Hanau D. Soluble CD16/Fc gamma RIII induces maturation of dendritic cells and production of several cytokines including IL-12. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1997) 417: 345-52
- 34 Delia D., Aiello A., Soligo D., Fontanella E., Melani C., Pezzella F., Pierotti M.A., Della Porta G. bcl-2 proto-oncogene expression in normal and neoplastic human myeloid cells. *Blood* (1992) 79: 1291-8.
- 35 Dianzani U., Bragardo M., DiFranco D., Alliaudi C., Scagni P., Buonfiglio D., Redoglia V., Bonissoni S., Correr A., Dianzani I., Ramenghi U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* (1997) 89(8): 2871-9.
- 36 Dibbert B., Weber M., Nikolaizik W.H., Vogt P., Schöni M.H., Blaser K., Simon H.-U. Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: A general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *PNAS* (1999) vol.96 no.23; p13331-13335.
- 37 DiGiuseppe J.A., LeBeau P., Augenbraun J., Borowitz M.J. Multiparameter flow-cytometric analysis of bcl-2 and Fas expression in normal and neoplastic hematopoiesis. *Am-J-Clin-Pathol.* (1996) 106(3): 345-51
- 38 Dockrell D.H., Badley A.D., Algeciras-Schimmich A., et al. Activation-induced CD4+ T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4+ T cell count, and HIV plasma viral copy number. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (1999) 15: 1509-18.
- 39 Dransfield I., Buckle A.-M., Savill J.S., McDowall A., Haslett C., Hogg N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in expression of CD 16 (FcγRIII) expression. *J. Immunol.* (1994) 153: 1254-63
- 40 Druilhe A, Cai Z, Haile S, Chouaib S, Pretolani M. Fas-mediated apoptosis in cultured human eosinophils. *Blood.* 1996 Apr 1;87(7): 2822-30.
- 41 Ellis R.E., Yuan J., Horvitz H.R. Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* (1991) 7:663-682.
- 42 Enari M., Hase A., Nagata S. Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. *EMBO J.* (1995)14:5201-8.
- 43 Fadok V.A., Savill J.S., Haslett C., Bratton D.L., Doherty D.E., Campbell P.A., Henson P.M. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol.* (1992) 149(12): 4029-35.
- 44 Fadok V.A., Bratton D.L., Rose D.M., Pearson A., Ezekewitz R.A.B., Henson P.M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* (2000) 405: 85-90

- 45 Falk R.J., Terrell R.S., Charles L.A., Jennette J.C. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 4115-19.
- 46 Farace F., Mitjavila M.T., Betaieb A., Dokhelar M.C., Wiels J., Finale Y., Kieffer N., Breton-Gorius J., Vainchenker W., Tursz T. New hematopoietic differentiation antigens detected by anti-K562 monoclonal antibodies. Cancer Res. (1988) 48(20): 5759-65.
- 47 Fauci A.S., Haynes B.F., Katz P. The spectrum of vasculitis. Clinical, pathologic, immunologic, and therapeutic considerations. Ann. Intern. Med. (1978) 89: 660-676.
- 48 Fecho K., Cohen P.L. Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. J. Leukoc. Biol. (1998) 64(3): 373-83.
- 49 Findley H.W., Gu L., Yeager A.M., Zhou M. Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood (1997) 89(8): 2986-93.
- 50 Fleit H.B., Kuhnle M. Biochemical characterization of an Fc receptor purified from human neutrophils. J. Immunol. (1988) 140: 3120-5.
- 51 Frey T. Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems. Cytometry (1997) 28(3): 253-263.
- 52 Fritsch. Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas, Springer Verlag (1998) Seite 493-505.
- 53 Gamberale R., Giordano M., Trevani A.S., Andonegui G., Geffner J.R. Modulation of Human Neutrophils Apoptosis by Immune Complexes. 1998. J. Immunol. 161: 3666-74.
- 54 Gammon R. Leucocytoclastic vasculitis. Clin. Rheum. Dis. (1982) 8: 397-413.
- 55 Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. (1992) 119,3: 493-501.
- 56 Geffner J.R., Giordano M., Serebrinsky G., Isturiz M.A. Different activation pathways involved in antibody-dependent and immune-complexes-triggered cytotoxicity mediated by neutrophils. Clin. Exp. Immunol. (1988) 74(3): 471-6
- 57 Goeken J.A. Antineutrophil cytoplasmic and anti-endothelial cell antibodies: mechanisms for vasculitis. Curr. Opin. Dermatol. (1995) 1: 75.
- 58 Gräper L. Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung. Arch. Zellforsch. 1914, 12:373-94.
- 59 Grasl-Kraupp B., Ruttkay-Nedecky B., Koudelka H., Bukowska K., Bursch W., Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. Hepatology (1995) 21: 1465-146.
- 60 Griffith T.S., Yu X., Herndon J.M., Green D.R., Ferguson T.A. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. Immunity. (1996) 5(1): 7-16.

- 61 Grigg J.M., Savill J.S., Sarraf C., Haslett C., Silverman M.: Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs. *Lancet* (1991) 338:720-722.
- 62 Gross W.L., Csernok E. Immunodiagnostic and pathophysiologic aspects of antineutrophil cytoplasmic antibodies in vasculitis. *Curr. Op. Rheumatol.* (1995) 7: 11-9.
- 63 Grunwald M.H., Avinoach I., Amichai B., Halevy S.: Leukocytoclastic vasculitis: correlation between different histologic stages and direct immunofluorescence. *Int. J. Dermatol.* (1975) 64: 105-112.
- 64 Grunwald M.H., Shriker O., Halevy S., Alkan M., Levy R. Impaired neutrophil functions in patients with leukocytoclastic vasculitis. *Int. J. Dermatol.* (1997) 36: 509-513.
- 65 Hamasaki A., Sendo F., Nakayama K., Ishida N., Negishi I., Nakayama Ki., Hatakeyama S. Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J. Exp. Med.* (1998) 188: 1985-92.
- 66 Hanada M., Aime-Sempe C., Sato T., Reed J.C. Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax. *J. Biol. Chem.* (1995) 270: 11962-9.
- 67 Harper L., Savage C.O.S. Review Article: Pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. *J. Pathol.* (2000) 190: 349-59.
- 68 Haslett C., Savill J.S., Whyte M.K., Stern M., Dransfield I., Meagher L.C. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* (1994) 345(1313): 327-33.
- 69 Haynes B.F. Vasculitis. Pathogenic mechanisms of vessel damage, in *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. 2nd Edition. Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R. Eds. Raven Press, Ltd. New York. (1992) pp. 921.
- 70 Hazen P.G., Michel B. Management of necrotizing vasculitis with colchicine. Improvement in patients with cutaneous lesions and Behcet's syndrome. *Arch. Dermatol.* (1979) 115: 1303-6
- 71 Hockenbery D.M., Zutter M., Hickey W., Nahm M., Korsmeyer S.J. bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1991) 88: 6961-5.
- 72 Homburg C.H., de Haas M., von dem Borne A.E., Verhoeven A.J., Reutelingsperger C.P., Roos D. 1995. Human neutrophils lose their surface Fcγ₃ and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood.* (1995) 85: 532-40.
- 73 Hruban R.H., Kuhajda F.P., Mann R.B. Acute myelofibrosis. Immunohistochemical study of four cases and comparison with acute megakaryocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* (1987) 88: 578-88.
- 74 Hundt M., Schmidt R.E. The glycosylphosphatidylinositol-linked Fcγ₃ represents the dominant receptor structure for immune complex activation of neutrophils. *Eur. J. Immunol.* (1992) 22(3): 811-6.
- 75 Hurley J.V. Termination of Acute Inflammation. In: *Acute Inflammation* (ed J.V.Hurley) Chrchill Livingstone, London (1983) pp.109-117.

- 76 Ierino F.L., Powell M.S., McKenzie I.F.C, Hogarth P.M. Recombinant soluble human Fc γ RII: production, characterization, and inhibition of the Arthus reaction. *J. Exp. Med.* (1993) 178: 1617-28.
- 77 Iida K., Mornaghi R., Nussenzweig V. Complement receptor (CR1) deficiency in erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* (1982) 155: 1427-38.
- 78 Indik Z.K., Park J.G., Hunter S., Mantaring M., Schreiber A.D. Molecular dissection of Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *Immunol. Lett.* (1995) 44(2-3): 133-8.
- 79 Itho N., Yonehara S., Ishii A., Yonehara M., Mizushima S., Sameshima M., Hase A., Seto Y., Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Eur. J. Immunol.* (1991) 24:440-44.
- 80 Itho N., Tsujimoto Y., Nagata S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *J. Immunol.* (1993) 151: 621-627.
- 81 Iwai K., Miyawaki T., Takizawa T., Konno A., Ohta K., Yachie A., Seki H., Taniguchi N. Differential Expression of bcl-2 and Susceptibility to Anti-Fas-Mediated Cell Death in Peripheral Blood Lymphocytes, Monocytes and Neutrophils. *Blood* (1994) 84:1201-1208.
- 82 Jaattela M., Benedict M., Tewari M., Shayman J.A., Dixit V.M. Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells. *Oncogene* (1995) 10: 2297-2305.
- 83 Jenette J.C., Falk R.J., Andrassy K., Bacon P.A., Churg J., Gross W.L., Hagen E.C., Hoffman G.S., Hunder G.G., Kallenberg C.G.M., McCluskey R.T., Sinico R.A., Rees A.J., van Es LA, Waldherr R., Wiik A.: Nomenclature of systemic vasculitides. *Arthritis Rheum.* (1994) 37: 187-192.
- 84 Jimenez M.F., Watson R.W., Parodo J., Evans D., Foster D., Steinberg M., Rotstein O.D., Marshall J.C. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch. Surg.* (1997) 132(12): 1263-9; discussion 1269-70.
- 85 Jones J., Morgan B.P. Apoptosis is associated with reduced expression of complement regulatory molecules, adhesion molecules and other receptors on polymorphonuclear leucocytes: functional relevance and role in inflammation. *Immunology* (1995) 86(4): 651-60.
- 86 Jorizzo J.L., Solomon A.R., Zanolli M.D., Leshin B. Neutrophilic vascular reactions. *J. Am. Acad. Dermatol.* (1988) 19: 983-1005.
- 87 Jorizzo J.L. Classification of vasculitis. *J. Invest. Dermatol.* (1993) 100: 106-10.
- 88 Ju S., Panka D.J., Cui H., Ettinger R., El-Khatib M., Sherr D.H., Stranger B.Z., Marshak-Rothstein A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature (Lond.)* (1995) 373: 444-448.
- 89 Kagi D., Vignaux F., Ledermann B., Burki K., Depraetere V., Nagata S., Hengartner H., Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T-cell mediated cytotoxicity. *Science (Wash. DC)* (1994) 265: 528-530.

- 90 Kallenberg C.G.M, Brouwer E., Weening J.J., Cohen Tervaert J.W. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int.* (1994) 46: 1-15.
- 91 Kane D.J., Sarafian T.A., Anton R., Hahn H., Gralla E.B., Valentine J.S., Ord T., Bredesen D.E. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* (1993) 262: 1274-7.
- 92 Karasek M.A. Microvascular endothelial cell culture. *J. Invest. Dermatol.* (1989) 93: 33-38.
- 93 Katz S.I. Dapsone, in *Dermatology in General Medicine Vol II, Fourth Ed.*, Fitzpatrick, TB, Eisen AZ, Wolf K, Freedberg IM, Austen KF, Eds., McGraw-Hill, Inc., New York (1993) Chap. 233.
- 94 Kawana S. The membrane attack complex of complement alters the membrane integrity of cultured endothelial cells: a possible pathophysiology for immune complex vasculitis. *Acta. Dermatol. Venereol.* (1996) 76: 13-6.
- 95 Kerr J.F.R.: Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* (1971) 105: 13-20.
- 96 Kerr J.F.R., Wyllie A.H, Currie A.R. Apoptosis a basics biological phenmenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* (1972) 26: 239-57.
- 97 Kerr J.F.R, Harmon B.V. In: *Apoptosis I: the molecular basis of cell death.* (TomeiLD, Cope FO, eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1991) p.5-29.
- 98 Klebs E. *Die Allgemeine Pathologie. Zweiter Theil. Störungen des Baues und der Zusammensetzung.* Gustav Fischer Verlag, Jena (1889).
- 99 Knepper Nicolai B., Savill J., Brown S.B. Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases. *J. Biol. Chem.* (1998) 273: 30530-6.
- 100 Koenderman L., Hermans S.W., Capel P.J., van-de-Winkel J.G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces sequential activation and deactivation of binding via a low-affinity IgG Fc receptor, hFc gamma RII, on human eosinophils. *Blood* (1993) 81(9): 2413-9
- 101 Kolde G., Henseleit U., Rosenbach T. Programmed Cell Death in Cutaneous Immunopathology. In: Bos JD (Hersg) *The Skin Immune System.* CRC Press, Boca Raton-New York (1997) p. 327-338.
- 102 Korsmeyer S.J., Shutter J.R., Veis D.J., Merry D.E., Oltvai Z.N. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin. Cancer. Biol.* (1993) 4(6): 327-32
- 103 Krajewski K., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W., Reed J.C. Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein : residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* (1993) 53:4701-14.
- 104 Krajewski K., Bodrug S., Krajewska M., Shabaik A., Gasgoyne N., Berean K., Reed J.C. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. *Differential*

- regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death *in vivo*. *Am. J. Pathol.* (1995) 146: 1309-19.
- 105 Kurki P., Ogata K., Tan E.M. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* (1988) 109(1): 49-59
- 106 Lagasse E., Weissman I.L. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Neutrophils but Not Their Engulfment by Macrophages. *J. Exp. Med.* (1994) 179: 1047-52.
- 107 Le Deist F., Emile J.F., Rieux-Laucat F., Benkerrou M., Roberts I., Brousse N., Fischer A. Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet* (1996) 348(9029): 719-23.
- 108 Lee A., Whyte M.K., Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.* (1993) 54: 283-8.
- 109 Leibovich S.J., Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am. J. Pathol.* (1975) 78:71-100.
- 110 Leverkus M., Yaar M., Gilchrist B.A. Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp. Cell Res.* (1997) 232(2): 255-62.
- 111 Levine A.J., Momand J., Finlay C.A. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* (1991) 351: 453-6.
- 112 Liao G., Simon S.R. Temporal down-regulation of Fc gamma RIII expression and Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in human monocyte-derived macrophages induced by TNF-alpha and IL-1 beta. *J. Leukoc. Biol.* (1994) 55(6): 702-10.
- 113 Liles W.C., Klebanoff S.J., Regulation of Apoptosis in Neutrophils-Fas track to death? *J. Immunol.* (1995) 155: 3289-3291.
- 114 Liles C., Kiener P.A., Ledbetter J.A., Aruffo A., Klebanoff S. J. Differential Expression of Fas (CD95) and Fas Ligand on Normal Human Phagocytes: Implications for the Regulation of Apoptosis in Neutrophils. *J. Exp. Med.* (1996) 184 : 429-440.
- 115 Listman J.A., Wang Y., Castro J.E., Rimm I.J., Finn P.W., Perkins D.L. Detection of rare apoptotic T cells *in vivo*. *Cytometry* (1998) 33(3): 340-7.
- 116 Lockshin R.A., Williams C.M. Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect. Physiol.* (1964) 10: 643-649.
- 117 Lotti T. The management of systemic complications of vasculitis. In: Panconesi E, editor. *Dermatology in Europe*. Oxford: Blackwell Science Publications (1991) p. 330-2.
- 118 Lotti T., Comacchi C., Ghersetich I. Cutaneous necrotizing vasculitis. *Int. J. Dermatol.* (1996) 35: 457-74.
- 119 Lotti T., Ghersetich I., Comacchi C., Jorizzo J.L. Cutaneous small-vessel vasculitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* (1998) 39(5): 667-87.
- 120 Lowin B., Hahne M., Mattmann C., Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature (Lond.)* (1994) 370:650-52.

- 121 Lynch P.J. Vascular reactions. In: Schachner L.A., Hansen R.C., editors. Pediatric dermatology. New York: Churchill Livingstone (1988) p. 959-1014.
- 122 Mackel S.E., Jordon R.E. Leukocytoklastic vasculitis: a cutaneous expression of immune complex disease. *Arch. Dermatol.* (1982) 118: 296-301.
- 123 Majno G., Joris I. Review: Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *Am. J. Pathol.* (1995) 146: 3-15.
- 124 Malech H.D., Gallin J.I. Neutrophils in human diseases. *New Eng. J. Med.* (1988) 317: 687-92.
- 125 Martin D.A., Combadiere B., Hornung F., Jiang D., McFarland H., Siegel R., Trageser C., Wang J., Zheng L., Lenardo M.J. Molecular genetic studies in lymphocyte apoptosis and human autoimmunity. *Novartis. Found. Symp.* (1998) 215: 73-82; discussion 82-91
- 126 Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Susin S.A., Beutner G., Brdiczka D., Remy R., Xie-Z.H., Reed J.C., Kroemer G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* (1998) 187(8): 1261-71.
- 127 Mathews M.B., Bernstein R.M., Franza B.R. Jr., Garrels J.I. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* (1984) 309(5966): 374-6
- 128 Matsumoto K., Schleimer R.P., Saito H., Iikura Y., Bocher B.S. Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro. *Blood* (1995) 86(4): 1437-43.
- 129 Meagher L.C., Savill J.S., Baker A., Haslett C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of Thromboxane B2. *J. Leuk. Biol.* (1992) 52: 269-73.
- 130 Meikrantz W., Gisselbrecht S., Tam S.W., Schlegel R. Activation of cyclin A-dependent protein kinases during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 3754-8.
- 131 Memon S.D., Guy G.R., Tan Y.H. Involvement of a putative protein-tyrosine phosphatase and I kappa B-alpha serine phosphorylation in nuclear factor kappa B activation by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* (1995) 270:18881-7.
- 132 Meszaros A.J., Reichner J.S., Albina J.E. Macrophage phagocytosis of wound neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* (1999) 65: 35-42.
- 133 Micklem K., Rigney E., Cordell J., Simmons D., Stross P., Turley H., Seed B., Mason D. A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies. *Br. J. Haematol.* (1989) 73: 6-11.
- 134 Middelhoven P.J., Van-Buul J.D., Kleijer M., Roos D., Hordijk P.L. Actin polymerization induces shedding of Fc gammaRIIIb (CD16) from human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1999) 255(3): 568-74.
- 135 Miwa K., Asano M., Horai R., Iwakura Y., Nagata S., Suda T. Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat. Med.* (1998) 4(11): 1287-92.

- 136 Miyashita T., Reed J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* (1995) 80(2): 293-9.
- 137 Molica S., Mannella A., Dattilo A., Levato D., Iuliano F., Peta A., Consarino C., Magro S. Differential expression of BCL-2 oncoprotein and Fas antigen on normal peripheral blood and leukemic bone marrow cells. A flow cytometric analysis. *Haematologica* (1996) 81(4): 302-9
- 138 Monaghan P., Robertson D., Amos T.A., Amos S., Dyer M.J., Mason D.Y., Greaves M.F. Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* (1992) 40: 1819-25.
- 139 Moser R., Etter H., Oligati L., Fehr J. Neutrophil activation in response to immune complex-bearing endothelial cells depends on the functional cooperation of FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16). *J. Lab. Clin. Med.* (1995) 126: 588-96.
- 140 Moulding D.A., Quayle J.A., Hart C.A., Edwards S.W. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* (1998) 92(7): 2495-502.
- 141 Moulding D.A., Hart C.A., Edwards S.W. Regulation of neutrophil FcγRIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. *J. Leukoc. Biol.* (1999) Jun; 65(6): 875-82.
- 142 Muller Kubold A., Kallenberg C., Cohen Tervaert J. Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Br. J. Rheum.* (1998) 37: 901-7.
- 143 Nagata S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. *Adv. Immunol.* (1994) 57: 129-144.
- 144 Nagata S., Golstein P. The Fas death factor. *Science (Wash.DC)* (1995) 267:1449-1456.
- 145 Negoescu A., Lorimier P., Labat-Moleur F., Azoti L., Robert C., Guillermet C., Brambilla C., Brambilla E. TUNEL: Improvement and Evaluation of the Method for In Situ Apoptotic Cell Identification. *Biochemica Information* (1997) Nr. 101: 19-23.
- 146 Newman S.L., Henson J.E., Henson P.M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J. Exp. Med.* (1982) 156: 430-42.
- 147 Norman K.E., Moore K.I., McEver R.P., Ley K. Leukocyte rolling *in vivo* is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* (1995) 86: 4417-21.
- 148 Ogata K., Kurki P., Celis J.E., Nakamura R.M., Tan E.M. Monoclonal antibodies to a nuclear protein (PCNA/cyclin) associated with DNA replication. *Exp. Cell. Res.* (1987) 168: 475-86.
- 149 Ohta K, Iwai K, Kasahara Y, Taniguchi N, Krajewski S, Reed JC, Miyawaki T. Immunoblot analysis of cellular expression of Bcl-2 family proteins, Bcl2, Bax, Bcl-X and Mcl-1, in human peripheral blood and lymphoid tissues. *Int-Immunol.* (1995) 7(11): 1817-25.
- 150 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* (1993) 74: 609-19.

- 151 Osborne BA, Schwartz LM. Essential genes that regulate apoptosis. Trends Cell Biol (1994) 4: 394.
- 152 Oshimi-Y; Oda-S; Honda-Y; Nagata-S; Miyazaki-S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. J-Immunol. (1996) Oct 1; 157(7): 2909-15.
- 153 Ottonello-L; Tortolina-G; Amelotti-M; Dallegrì-F. Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. J-Immunol. (1999) 162: 3601-6.
- 154 Payne C.M., Glasser L., Tischler M.E., Wyckoff D., Cromey D., Fiederlein R., Bohnert O. Programmed cell death of the normal human neutrophil: an *in vitro* model of senescence. Microsc. Res. Tech. (1994) 28: 327-44.
- 155 Pender M.P. Activation-induced apoptosis of autoreactive and alloreactive T lymphocytes in the target organ as a major mechanism of tolerance. Immunol. Cell. Biol. (1999)77(3): 216-23.
- 156 Petit P.X., Susin S.A., Zamzami N., Mignotte B., Kroemer G. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. FEBS-Lett. (1996) 396(1): 7-13.
- 157 Pinching A.J., Rees A.J., Pussell B.A., Lockwood C.M., Mitchison R.S., Peters D.K. Relapses in Wegener's granulomatosis: the role of infection. Br. Med. J. (1980) 281: 836-8.
- 158 Pulford K.A.F, Rigney E.M., Micklem K.J. et al. KP1: a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. J. Clin. Pathol. (1989) 42: 414-21.
- 159 Pulford K.A.F, Sipos A., Cordell J.L., Stross W.P., Mason D.Y. Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. Int. Immunol. (1990) 2: 973-80.
- 160 Quinlan K.L., Olerud J., Armstrong C.A., Caughman S.W., Ansel J.C. Neuropeptides upregulate expression of adhesion molecules on human keratinocytes and dermal microvascular endothelial cells. J. Invest. Dermatol. (1997) 108: 551 (abstract)
- 161 Raff M.C. Review-Artikel: Social controls on cell survival and cell death. Nature (1992) 356: 397-400.
- 162 Rainger G., Fischer A., Nash G. Endothelial-borne platelet-activating factor and interleukin-8 rapidly immobilise rolling neutrophils. Am. J. Physiol. (1997) 272: H114-H122.
- 163 Ralston D., Marsh C., Lowe M., Wewers M. Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fcγ receptors. J. Clin. Invest. (1997) 100: 1416-24.
- 164 Ravetch J.V. Fc receptors: rubor redux. Cell (1994) 78: 553-60
- 165 Ravetch J.V. Fc receptors. Curr. Opin. Immunol. (1997) 9: 121-5.
- 166 Reed J.C., Jurgensmeier J.M., Matsuyama S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. Biochim. Biophys. Acta. (1998) 1366(1-2): 127-37.
- 167 Resnick A.H, Esterly N.B. Vasculitis in children. Int. J. Dermatol. (1985) 24:139-46

- 168 Reumaux D., Vosseveld P.J.M, Roos D., Verhoeven A.J. Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fcγreceptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood* (1995) 86: 3189-95.
- 169 Roitt I., Brostoff J., Male D. Immunology. Fourth Edition, Mosby (1996) Chapter 24, Hypersensitivity-Type III, 24.1-24.12.
- 170 Romeis Mikroskopische Technik, 17., neubearbeitete Auflage, Herausgeber: P.Böck. Urban & Schwarzenberg Verlag München-Wien-Baltimore (1989) 8: 2.5.1, S.235-36.
- 171 Russell S.W., Rosenau W., Lee J.C. Cytolysis induced by human lymphotoxin. Cinemicrographic and electron microscopic observations. *Am. J. Pathol.* (1972) 69: 103-18
- 172 Ryan T.J. Cutaneous vasculitis. In: Rook A, Wilkinson DS, Ebling FJG, editors. *Textbook of Dermatology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications (1992) p. 1893-61.
- 173 Ryan T.J. Cutaneous vasculitis. In: Champion R.H., Burton J.L., Burns D.A., Breathnach S.M. (Hersg) *Textbook of Dermatology*. Blackwell Science, London (1998) 2155-225.
- 174 Sais G., Vidaller A., Jucgla A., Concom E., Peyri J. Adhesion molecule expression and endothelial cell activation in cutaneous leukocytoclastic vasculitis. An immunohistologic and clinical study in 42 patients. *Arch. Derm.* (1997) 133: 443-50.
- 175 Salmon J.E., Brogle N.L., Edberg J.C., Kimberly R.P. Fc gamma receptor III induces actin polymerization in human neutrophils and primes phagocytosis mediated by Fc gamma receptor II. *J. Immunol.* (1991) 146(3): 997-1004.
- 176 Samlaska C.P., Winfield E.A. Pentoxifylline. *J. Am. Acad. Dermatol.* (1994) 30: 603-21.
- 177 Sams W.M., Thorne E.G., Small P., Mass M.F., McIntosh R.M., Stanford R.E. Review Article: Leukocytolytic Vasculitis. *Arch. Dermatol.* (1976) 112: 219-26.
- 178 Sams W.M. Jr. Necrotizing vasculitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* (1980) 3: 1-13.
- 179 Sams W.M.: Hypersensitivity angiitis. *J. Invest. Dermatol.* (1989) 93: 78-81.
- 180 Sanchez N.P., VanHale H.M., Su W.P.D. Clinical and histopathological spectrum of necrotizing vasculitis. *Arch. Dermatol.* (1985) 121:220-4.
- 181 Sanui H., Yoshida S.-I., Nomoto K., Ohhara R., Adachi Y. Peritoneal macrophages which phagocytose autologous polymorphonuclear leucocytes in guinea pigs. *Br. J. Pathol.* (1982) 63: 278-85.
- 182 Sato T., Hanada M., Bodrug S., Irie S., Iwana N., Boise L.H., Thompson C.B., Golemis E., Fong L., Wang H.G., Reed J.C. Interactions among members of the Bcl-2 protein family analysed with a yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 9238-42.
- 183 Savill J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M., Haslett, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. PCD in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J. Clin. Invest.* (1989) 83: 865-75.

- 184 Savill J.S., Henson P.M., Haslett C. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel 'charge sensitive' recognition mechanism. *J. Clin. Invest.* (1989) 84: 1518-27.
- 185 Savill J., Smith J., Sarraf C., Ren Y., Abbott F., Rees A. Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. *Kidney Int.* (1992) 42(4): 924-36.
- 186 Savill J.S. The fate of the neutrophil in vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* (1993) 93 (Suppl.1): 2-5.
- 187 Schifferli J.A., Ng Y.C, Peters D.K. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N. Engl. J. Med.* (1986) 315: 488-95.
- 188 Schifferli J.A., Saurat J.-H., Woodley D.T. Cutaneous vasculitis. In: Ruiz-Maldonado R, Parish LC, Beare JM, editors. *Textbook of pediatric dermatology*. Philadelphia: Grune & Stratton (1989) p. 654-61.
- 189 Schlossman S., Bloumsell W., Gilks W., et al. eds. In: Press. *Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. Oxford University Press, New York (1994).
- 190 Seino K., Iwabuchi K., Kayagaki N., Miyata R., Nagaoka I., Matsuzawa A., Fukao K., Yagita H., Okumura K. Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *J. Immunol.* (1998) 161(9): 4484-8.
- 191 Shi Y., Honma M., Koizumi F. Cutaneous allergic vasculitis: clinicopathological characterization and identification of apoptosis. *Pathol. Int.* (1998) 48(9): 705-16.
- 192 Smith J.A. Neutrophils, host defense and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* (1994) 56: 672-86.
- 193 Smith J.G Jr. Vasculitis. *J. Dermatol.* (1995) 22(11): 812-22.
- 194 Soddu S., Blandino G., Scardigli R., Coen S., Marchetti A., Rizzo M.G., Bossi G., Cimino L., Crescenzi M., Sacchi A.: Interference with p53 protein inhibits hematopoietic and muscle differentiation. *J. Cell. Biol.* (1996) 134(1): 193-204.
- 195 Soter N.A., Mihm M.C., Gigli I., Dvorak H.F., Austen K.F. Two Distinct Patterns in cutaneous Necrotizing Angiitis. *J. Invest. Dermatol.*(1976) 66: 344-350.
- 196 Soter N.A., Wolff S.M. Necrotizing vasculitis. In: Fitzpatrick T.B., Eisen A.Z., Wolff K., et al, editors. *Dermatology in general medicine*. New York: McGraw-Hill (1987) p. 1300-12.
- 197 Stadler R., Ruszczak Z. Therapeutic guidelines in vasculitidis. *Int. Angiol.* (1995) 14: 188-96.
- 198 Stalder T., Hahn S., Erb P. Fas antigen is the major target molecule for CD4⁺ T cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* (1994) 152: 1127-1133.
- 199 Stringer R.E., Hart C.A., Edwards S.W. Sodium butyrate delays neutrophil apoptosis: role of protein biosynthesis in neutrophil survival. *Br. J. Haematol.* (1996) 92(1): 169-75.
- 200 Suda T., Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* (1994) 179: 873-9.

- 201 Sunderkötter C., Steinbrink K., Henseleit U., Nashan D., Kolde G. Experimental models of leukocytoclastic vasculitis: adhesion molecules and immune deposits. *J. Invest. Dermatol.* (1994) 102, 589, (Abstract)
- 202 Sunderkötter C., Kolde G. Cutaneous vasculitis. In: Bos JD (Hersg) *The Skin Immune System*. CRC Press, Boca Raton-New York (1997) Kapitel 28, S. 479-488.
- 203 Swerlick R.A., Lawley T.J. Cutaneous vasculitis: its relationship to systemic disease. *Med. Clin. North. America.* (1989) 73: 1221-35.
- 204 Sylvestre D.L., Ravetch J.V. Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science* (1994) 265: 1095-8.
- 205 Szucs G., Kawai M., Kiss E., Csipo I., Szegedi G. Correlation of IgG Fc receptors on granulocytes with serum immune complex level in systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* (1995) 42(5): 577-80.
- 206 Takasaki Y., Fishwild D., Tan E.M. Characterization of proliferating cell nuclear antigen recognized by autoantibodies in lupus sera. *J. Exp. Med.* (1984) 159: 981-92.
- 207 Tamura A., Katsumata M., Greene M.I., Yui K. Inhibition of apoptosis and augmentation of lymphoproliferation in bcl-2 transgenic Fas/Fas ligand-defective mice. *Cell. Immunol.* (1996) 168(2): 220-8.
- 208 Tan E.M., Ogata K., Takasaki Y. PCNA/cyclin: a lupus antigen connected with DNA replication. *J-Rheumatol* (1987) Suppl 13: 89-96.
- 209 Tanaka M., Suda T., Takahashi T., Nagata S. Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* (1995) 14: 1129-35.
- 210 Thyresson H.N., McDuffie F.C., Schroeter A.L. C3b receptor in normal human skin. *J. Invest. Dermatol.* (1981) 77: 353-7.
- 211 Tosi M.F., Berger M. Functional differences between the 40 kDa and 50 to 70 kDa IgG Fc receptors on human neutrophils revealed by elastase treatment and antireceptor antibodies. *J. Immunol.* (1988) 141: 2097-103.
- 212 Trauth B.C., Keesey J. Cell Death. In: *Guide to Cell Proliferation and Apoptosis Methods*. Boehringer Mannheim (keine Angabe des Datums) S. 35, Tab. 7.
- 213 Trump B.F., Berezsky, Osorino Vargas. Cell death and the disease process. The role of calcium. In: *Cell death in biology and pathology* (ed. ID Bowen and RA Lockshin) Chapman and Hall, London (1981) p. 209.
- 214 Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E. Croce-CM Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* (1985) 228(4706): 1440-3.
- 215 Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes. Cells.* (1998) 3(11): 697-707.
- 216 Tsuyuki S., Bertrand C., Erard F., Trifilieff A., Tsuyuki J., Wesp M., Anderson G.P., Coyle A.J. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways. *J. Clin. Invest.* (1995) 96(6): 2924-31.

- 217 Van Der Vliet H.J., Wever P.C., Van Diepen F.N., Yong S.L., Ten-Berge I.J.: Quantification of Bax/Bcl-2 ratios in peripheral blood lymphocytes, monocytes and granulocytes and their relation to susceptibility to anti-Fas (anti-CD95)-induced apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* (1997) 110(2): 324-8.
- 218 Van de Winkel J.G.J, Capel P.J.A. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol. Today* (1993) 14: 215-21.
- 219 Vignaux F., Vivier E., Malissen B., Depraetere V., Nagata S., Golstein P. TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J. Exp. Med.* (1995) 181:781-6.
- 220 Ward C., Dransfield I., Chilvers E.R., Haslett C., Rossi A.G. Review Article: Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol. Sci.* (1999) 20: 503-9.
- 221 Watson R.W., O'Neill A., Brannigen A.E., Coffey R., Marshall J.C., Brady H.R., Fitzpatrick J.M. Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. *FEBS Lett.* (1999) 453(1-2): 67-71.
- 222 Weinmann P., Gaehtgens P., Walzog B. Bcl-XI- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3. *Blood* (1999) 93(9): 3106-15.
- 223 Weiss S.J. Tissue Destruction by neutrophils. *New Eng. J. Med.* (1989) 320: 365-75.
- 224 Whyte, M.K., Meagher, L.C., MacDermot, J., Haslett, C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.* (1993) 150: 5124-34.
- 225 Wigbels B., Krebs S., Sorg C., Kolde G., Luger T.A., Sunderkötter C. Sequence of events in human leukocytoclastic Vasculitis. Abstract 671, p.649, *J.Invest.Dermatol.* (1997) Vol 108, No 4
- 226 Winkelmann R.K., Ditto W.B. Cutaneous and visceral syndromes of necrotizing or 'allergic' angiitis: A study of 38 cases. *Medicine* (1964) 43: 59-89.
- 227 Witko-Sarsat V., Lesavre P., Lopez S., et al. A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* (1999) 10: 1224-33.
- 228 Witthaut R , Farhood A , Smith C.W., Jaeschke H. Complement and tumor necrosis factor-alpha contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia *in vivo*. *J. Leukoc. Biol.* (1994) 55: 105-11.
- 229 Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* (1980) 68: 251-306.
- 230 Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* (1993) 366: 701-4.
- 231 Xu H., Gonzalo J.A., St. Pierre Y., Williams I.R., Kupper T.S., Cotran R.S., Springer T.A., Gutierrez-Ramos J.C. Leukocytosis and resistance septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice . *J. Exp. Med.* (1994) 180: 95-109.
- 232 Zakeri Z.F., Quaglino D., Latham T., Lockshin R.A. Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB-J.* (1993) 7(5): 470-8.

- 233 Zamzami N., Susin S.A., Marchetti P., Hirsch T., Gomez-Monterrey I., Castedo M., Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis [see comments] *J. Exp. Med.* (1996) 183(4): 1533-44.
- 234 Zax R.H., Hodge S.J., Callen J.P. Cutaneous leukocytoclastic vasculitis. Serial histopathologic evaluation demonstrates the dynamic nature of the infiltrate. *Arch. Dermatol.* (1990) 126(1): 69-72.