

Aus der Klinik für Dermatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Homey

Rolle des Interleukin-31 in kutanen T-Zell-Lymphomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Annemarie Gutzeit

Düsseldorf
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Homey

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein

Zusammenfassung

Interleukin-31 (IL-31) ist ein in 2004 neu beschriebenes Interleukin der IL-6/gp130 Zytokin-Familie. Es handelt sich hierbei um ein hauptsächlich in T-Zellen gebildetes Zytokin, das seine Wirkung über einen heterodimeren Rezeptor, bestehend aus IL-31 Rezeptor-*alpha* (IL-31R α) und *oncostatin M-Rezeptor-beta* (OSMR β), entfaltet. Dieser Rezeptorheterodimer konnte bisher unter anderem auf kutanen nozizeptiven Fasern und speziellen Nervenfasern in dorsalen Ganglien nachgewiesen werden.

Die *Mycosis fungoides* (MF) und das *Sézary* Syndrom (SS) gehören zu den häufigsten kutanen T-Zell-Lymphomen (CTCL) vom Non-Hodgkin Typ mit niedriger Malignität.

Die MF wird in das Ekzem-, Plaque- und Tumorstadium unterteilt, während das SS ein aggressives, erythrodermisches und leukämisches kutanes T-Zelllymphom mit generalisierter Lymphadenopathie darstellt. Patienten, die an einem CTCL leiden, klagen oft über Juckreiz.

Da in verschiedenen Studien IL-31 in Zusammenhang mit der Entstehung von Pruritus gesetzt wird, untersucht diese Arbeit den Zusammenhang von IL-31 und der Ausprägung von Juckreiz in CTCLs. Hierzu wurde eine Gruppe aus Patienten mit MF und SS mit Juckreiz und ohne Juckreiz sowie gesunder Vergleichspersonen rekrutiert. Es erfolgte die Messung des IL-31 im Serum mittels ELISA und mit immunhistochemischer Färbungen in Hautproben sowie eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Untersuchung der IL-31 Expression und seines Rezeptorkomplexes. Aufgrund zunächst unspezifisch erhöhter, nicht repetierbarer IL-31 Spiegel in den ELISA Untersuchungen von *R&D Systems*, erfolgte die Durchführung eines zweiten ELISA-Verfahrens (Simoa™), welches sich durch eine optimierte Unterbindung unspezifischer Reaktionen durch heterophile Antikörper auszeichnet. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied der IL-31 Expression in CTCL-Proben verglichen mit den gesunden Vergleichspersonen. Auch in der Immunhistochemie und PCR-Untersuchung war keine vermehrte Expression von IL-31 bzw. seiner Rezeptorbestandteile in CTCL detektierbar.

In dieser Studie konnten keine signifikanten Ergebnisse gefunden werden, die eine Assoziation zu IL-31 Expression und der Entwicklung von Juckreiz oder der Schwere der Erkrankung beweisen. Weitere Untersuchungen, unter Berücksichtigung anderer möglicher Triggerfaktoren für Juckreiz, wie Substanz P und andere T_H-2 Zytokine, sind notwendig.

Abstract

Interleukin-31 (IL-31) is a in 2004 recovered interleukin of the IL-6/gp130 cytokine family. This mainly by T-cells produced interleukin develops its activating effects by a heterodimeric receptor, consisting of IL-31 receptor-alpha (IL-31R α) and *oncostatin M*-receptor-*beta* (OSMR β). This heterodimeric receptor has been detected on nociceptive nerve fibres and special nerve fibres on dorsal root ganglia.

Mycosis fungoides and *Sézary* syndrome are two of the most common cutaneous T-cell Lymphomas (CTCL) of the non-Hodgkin Type with low malignancy.

Mycosis fungoides is divided into Patch phase, Plaque phase and Tumor phase, while the *Sézary* syndrome is an aggressive, erythrodermic and leukemic cutaneous T-cell Lymphoma with generalised lymphadenopathy.

Patients with CTCL often suffer from pruritus. For different studies have shown an association between IL-31 and the development of pruritus, we investigate in this study the context of IL-31 and the development of pruritus in CTCLs. Therefore, we recruited a group of patients with *Mycosis fungoides and Sézary* syndrome with and without pruritus, as well as a healthy peer group.

IL-31 and its receptor components were examined in blood serum by ELISA and in skin biopsies by immunhistology and polymerase chain reaction (PCR).

Due to initially unspecific, not reproducible results in the ELISA of *R&D Systems*, a second testing with another ELISA (Simoa™) was implemented, while optimizing the interaction with heterophilic antibodies. In this experimental series, there was no significant result of IL-31 expression in CTCL in comparison to the healthy peer group detectable.

The results of the immunhistology and the PCR could not show any significant differences in IL-31 expression and respectively in the expression of the receptor components regarding CTCL.

In this study we could neither represent any significant results, proofing an association between IL-31 expression and the development of pruritus, nor a correlation of IL-31 levels to the severity of disease.

Further experimental research is necessary. Especially in consideration to other potentially triggers of pruritus like Substance P or other T_H-2 cytokines.

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
AEC	<i>3-Amino-9-Ethylcarbazole</i>
AK	Antikörper
AR	Allergische Rhinitis
°C	Grad Celsius
CA	Californien
CCL	CC-Chemokin Ligand
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNS	Komplementäre Desoxy-Ribonukleinsäure
cIL-31	<i>canine interleukin-31</i> , hündisches IL-31
CTCL	kutanen T-Zell-Lymphom
CXCL	CXC-Chemokin-Ligand
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxy-Ribonucleic-Acid (s. DNS)
DNAse	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	<i>deoxynucleoside triphosphate</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
DZ	Dendritische Zelle
EORTC	<i>European Organization of Research and Treatment of Cancer</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
G	gesundes Vergleichskollektiv
GH	gesunde Haut
gp	Glykoprotein
h	<i>human</i> , menschlich
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IIR	<i>Immunoglobulin Inhibiting Reagent</i>
IL	Interleukin
IL-31R α	Interleukin-31 Rezeptor alpha
ISCL	<i>International Society of Cutaneous Lymphoma</i>
JAK	Januskinase
LDH	Laktat Dehydrogenase
LOD	<i>Limit of detection</i> , Nachweisgrenze
LSS	<i>Leicester sign score</i>
m	männlich
MA	Massachusetts
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MF	Mycosis fungoides
min	Minute
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter
MMP	Matrixmetallopeptidase
MN	Minnesota
MO	Missouri
mRNS	<i>messenger-RNS</i>

MUC5AC	Mucin 5AC
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nm	Nanometer
OSMR β	<i>oncostatin M-receptor-beta</i>
p	<i>probability</i> , Wahrscheinlichkeit
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pg	Pikogramm
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PV	Psoriasis vulgaris
RF	Rheumafaktor
RNA	<i>ribonucleic-acid</i> (s. RNS)
RNAse	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion
RU	<i>relative units</i> , Relative Expression
s	Sekunde
SCORAD	SCORing Atopic Dermatitis
sil-2R	<i>Soluble interleukin-2 receptor</i>
SS	Sézary Syndrom
SSS	<i>Simple Scoring System</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Std.	Stunde(n)
TARC	<i>thymus and activation regulated chemokine</i>
T _H	T-Helferzelle
TIL	Tumor-infiltrierenden Lymphozyten
TM	<i>trade mark</i>
TNM	Tumor/ Nodus/ Metastasen
Trpf.	Tropfen
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoetin</i>
U	<i>Unit</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
VAS	visuellen Analogskala
vs	versus
w	weiblich
WA	Washington
WI	Wisconsin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Interleukin-31 (IL-31)	1
1.2 IL-31 assoziierte Erkrankungen	3
1.2.1 IL-31 und atopische Dermatitis	3
1.2.2 IL-31 und allergische Rhinitis	5
1.2.3 IL-31 und allergisches Asthma bronchiale	5
1.2.4 IL-31 und Prurigo nodularis	5
1.2.5 IL-31 und Psoriasis vulgaris	6
1.2.6 IL-31 und kutane T-Zell-Lymphome (CTCL)	6
1.2.7 Ziele der Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Patientenkollektiv	10
2.2 Statistik	12
2.3 ELISA	13
2.3.1 ELISA (R&D Systems)	13
2.3.2 Simoa™ ELISA (BMS-ZymoGenetics/ Quanterix)	13
2.4 Immunhistochemie (IHC) für Interleukin-31	14
2.4.1 Gefrierschnittkonservierung	14
2.4.2 Paraffin-Konservierung	14
2.4.3 IL-31 Färbung	14
2.5 Nukleinsäureanalyse	16
2.5.1 Homogenisierung	16
2.5.2 RNS Isolation	16
2.5.3 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	16
2.5.4 cDNS-Synthese	17

2.5.5 Quantitative <i>real time Polymerase chain reaction</i>	18
3. Ergebnisse	19
3.1 IL-31 Konzentration im ELISA-Verfahren	19
3.1.1 ELISA (<i>R&D Systems</i>)	19
3.1.2 Simoa™ ELISA (<i>BMS-ZymoGenetics/ Quanterix</i>).....	22
3.2 IL-31 Nachweis in der Immunhistochemie (IHC)	25
3.3 Detektion von IL-31, IL-31R α und OSMR β mittels PCR	29
4. Diskussion	33
4.1 IL-31 Nachweis mittels ELISA zeigt sich vielgestaltig	33
4.2 Histologisch weist IL-31 wenig Korrelation zu CTCL auf	36
4.3 IL-31 zeigt sich in der PCR bei AD erhöht, nicht aber in CTCL	39
4.4 Diskussion der heterogenen Nachweise von IL-31	40
4.5 Weitere potentielle Faktoren zur Entwicklung von Pruritus	42
4.6 Limitation und Interpretation der erworbenen Resultate	45

1. Einleitung

1.1 Interleukin-31 (IL-31)

Interleukin-31 (IL-31) wurde im Jahr 2004 erstmalig beschrieben [1]. Es handelt sich um ein bevorzugt in T_H2-Helferzellen gebildetes Zytokin mit vier Helices, das zu der Familie der IL-6/gp130 Zytokine gezählt wird [1].

IL-31 ist bei einer Reihe von entzündlichen Prozessen in der Haut beteiligt. Es induziert unter anderem diverse, mit der atopischen Dermatitis assoziierte Chemokine (CXCL8 (IL-8), CXCL1 (GRO), CCL7 (MCP-3), CXCL3, CCL13 und CCL15), pro-inflammatorische Zytokine (IL-6, IL-16 und IL-32), Matrixmetallopeptidasen (MMP) (MMP-1, MMP-3, MMP-25 und MMP-7) und hat Einfluss auf verschiedene Zelltypen, wie Keratinozyten und diverse Immunzellen, wie naive CD⁴⁺ T-Zellen [1] [2]. Seine aktivierende Wirkung auf STAT-1, -3, -5, MAPK und PI3K/AKT erfolgt über einen heterodimeren, JAK-Kinase assoziierten Rezeptor [1] [2]. Dieser Rezeptor setzt sich aus IL-31 Rezeptor-*alpha* (IL-31R α) und *oncostatin* M-Rezeptor-*beta* (OSMR β) zusammen und wird ebenfalls zu der IL-6/gp130 Familie gezählt [1]. Der IL-31R α komplexiert hierbei in einer kurzen und einer langen Form, wobei die kurze Isoform inhibierend und die lange Isoform aktivierend wirkt [3] [4].

IL-31R α und OSMR β konnten in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, darunter Gehirn, Haut (Keratinozyten, Fibroblasten, kutanen Schmerzfasern), Hoden, Knochenmark, Thymus und Trachea [1] [5-7]. Die IL-31R α Expression in dem PCR-Verfahren in der Studie von Dillon *et al.* zeigt sich hierbei absteigend im Hoden, Thymus und Haut [1]. Im Gegensatz hierzu ist OSMR β in der Trachea mit höchster Abundanz zu finden, es folgen Haut und Thymus [1].

Weiterhin werden beide Rezeptoruntereinheiten auf Nervenfasern dorsaler Ganglien gebildet [6].

Der Nachweis von IL-31R α [6] [7] und OSMR β auf diesem speziellen Subtyp nozizeptiver Neurone in dorsalen Ganglien [8] [9] hat besondere Bedeutung, da unmyelinisierte C-Fasern von primär sensorischen Neuronen und deren Zellkörper in dorsalen Ganglien für die Vermittlung von Juckreiz verantwortlich sind [10]. Es wird deshalb vermutet, dass IL-31 direkt in die Vermittlung des Juckreizempfindens in der Haut involviert ist, indem es die Aktivierung dieser sensorischen Neurone vermittelt [6] [9] [11]. Diese Kommunikation zwischen Immun- (IL-31 positive T_H2-

Helferzellen) und Nervensystem (C-Nervenfasern) via IL-31 [12] als ursächlicher pro-pruritogener Mechanismus ist im Hinblick auf kutane T-Zelllymphome beim Menschen ein wichtiger Forschungsansatz.

Bisherige Studien lassen bereits darauf schließen, dass IL-31 insbesondere im Zusammenhang mit Juckreiz eine bedeutende Rolle bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie der atopischen Dermatitis, allergischen Kontaktdermatitis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und allergischem Asthma, spielt [1] [2] [13].

1.2 IL-31 assoziierte Erkrankungen

1.2.1 IL-31 und atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die 10% bis 20% der Kinder und 2% der Erwachsenen betrifft [14]. Klinisch zeigen sich im Säuglingsalter an den Streckseiten und dem Gesicht, bei Kindern und Erwachsenen an den Beugen juckende Ekzeme.

Der überwiegend T_H2 gewichteten Erkrankung liegt eine polygenetische Prädisposition zu Grunde und ist mit einer kutanen Überempfindlichkeit auf umgebende Trigger-Faktoren und einer Inbalance des Immunsystems assoziiert [14].

In der AD werden Keratinozyten durch Allergene, mechanische Traumen, wie Kratzen, und/oder eine Kolonisation mit *Staphylokokkus aureus* dazu angeregt, *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), IL-25 und -33 zu produzieren [15]. TSLP stimuliert wiederum dendritische Zellen (DZ), welche sukzessiv CD4+ T-Helfer-Zellen aktivieren [15]. Daraufhin sezernieren diese T-Helfer Zellen IL -4, -5, -13 [16] und das hier untersuchte IL-31 [15].

Die ersten Erkenntnisse über die Rolle von IL-31 in der AD sind von Dillon *et al.* mittels genetisch veränderten Mäusen, die IL-31 über exprimieren, gewonnen worden [1]. Phänotypisch führt eine Überexpression des IL-31 in diesen Tieren zu Hautveränderungen, die makroskopisch wie auch histologisch der humanen AD ähneln und mit starkem Juckreiz einher gehen [1].

In einem weiteren Tiermodell von Takaoka *et al.* ließ sich die Schwere des Juckreizes mit der mRNA-Expression von IL-31 positiv korrelieren [13]. Schließlich zeigen Pathogen-besiedelte Juckreiz betroffene *Nc/Nga* Mäuse eine erhöhte IL-31 Expression in der Haut im Vergleich zu den pathogenfrei aufgezogenen *Nc/Nga* Mäusen ohne Juckreiz [13].

Auch in einem Versuch mit Hunden löste sowohl eine intradermale, subkutane als auch intravenöse IL-31 Injektion einen kurzzeitigen Juckreiz aus, während in der Placebogruppe kein Juckreiz festgestellt wurde [17]. Korrespondierend zeigte sich bei Hunden mit natürlich aufgetretener AD in 57% *canines* IL-31 (cIL-31) im Serum, während bei gesunden Tieren die Serumkonzentrationen unter der Nachweisgrenze

(cIL-31<13pg/ml) verblieben, so dass auch hier eine wichtige Rolle dieses Interleukins in juckenden Hautveränderungen vermutet wird [17].

In einem weiteren *in vivo* Experiment bei Javaneraffen zeigte eine intradermale, subkutane und intravenöse Applikation von *cynomolgus* IL-31 eine akuten Juckreiz, der mindestens 3 Stunden andauerte und mittels subkutaner Gabe eines monoklonalen IL-31 Antikörpers inhibiert werden konnte [18].

Untersuchungen zu IL-31 in atopischer Dermatitis beim Menschen wurden ebenfalls in mehreren Studien durchgeführt.

Dabei konnten signifikant erhöhte Serumspiegel von IL-31 sowohl bei Kindern [19] als auch bei Erwachsenen mit AD gefunden werden [20] [21]. Dabei gab es keinen Unterschied in den IL-31 Serumspiegeln zwischen der extrinsischen und intrinsischen Form der AD [22]. Die IL-31-Spiegel waren in beiden Formen erhöht [22].

Ebenso zeigte sich in beiden Verlaufsformen der AD sowie insgesamt ein signifikanter Zusammenhang zwischen IL-31 Serumspiegel und Schweregrad-Scores (LSS, SSS, SCORAD) [19] [20] [21] [22] [23].

In verschiedenen Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen dem Absinken des IL-31 Spiegels und klinischer Verbesserung der Symptome im Therapieverlauf beobachtet [19]. Jedoch konnte kein klarer Zusammenhang zwischen IL-31 und der Stärke des Juckreizes nachgewiesen werden [23].

Bei Patienten mit AD wurden im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Konzentrationen von IL-31 und IL-31RA ebenfalls in entzündlichen Hautbiopsien detektiert [6] [24].

Ferner wurden in läsionaler Haut von AD-Patienten T-Zellen beschrieben, die ausschließlich IL-31 und keine weiteren Interleukine (z.B. IL-13, IL-17 oder IL-22) produzierten [21].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass IL-31 in humanen Keratinozyten diverse Chemokine induziert, die mit der Entstehung atopischer Hautentzündung in Zusammenhang stehen [1] [25]. Sein vermehrtes Vorkommen in AD spricht daher für eine wichtige Rolle in der Pathogenese von chronischer Entzündung und Juckreiz [6].

1.2.2 IL-31 und allergische Rhinitis

Im Rahmen des atopischen Marsches haben Kleinkinder mit AD ein erhöhtes Risiko andere atopische Krankheiten wie eine allergische Rhinitis (AR) bis hin zum allergischen Asthma bronchiale im Verlauf des Lebens zu entwickeln [26]. Ein typisches Symptom der AR ist Juckreiz. Vor diesem Hintergrund ist die beobachtete Hochregulation des IL-31 und des IL-31R α in Biopsien der unteren Nasenmuschel von Personen mit AR im Vergleich zu nicht betroffenen Probanden wenig überraschend und scheint auch in der Hypersensibilisierung der Atemwege eine Rolle zu spielen [11] [27]. Zudem konnte eine IL-31 induzierte Expression des Hauptmucins (MUC5AC) in humanen Atemwegsepithelzellen nachgewiesen werden [27]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass IL-31 ebenfalls in der Schleimüberproduktion in allergisch bedingter, nasaler Entzündung involviert ist [27].

1.2.3 IL-31 und allergisches Asthma bronchiale

Bei Patienten mit einem allergischen Asthma wurde eine erhöhte IL-31 Expression in Pollen-antigen-stimulierten Zellen (PBMC) nachgewiesen, was mit einer vermehrten Sekretion von inflammatorischen Zytokinen des Lungenepithels einherging [28]. Zudem konnte bei Asthmapatienten ein erhöhter IL-31-Serumspiegel nachgewiesen werden, der auch mit der Schwere der Erkrankung korrelierte [29].

Zusätzlich wurde eine Hochregulation der entsprechenden IL-31-Rezeptortypen auf Lungenepithelzellen aus einem Tiermodell zur Hypersensibilisierung der Atemwege beobachtet [1]. In einer weiteren Studie zeigte sich, dass Typ II-Pneumozyten, primäres Bronchialepithel und A549-Zellen IL-31RA exprimieren und auf IL-31 mit STAT3-Aktivierung und Expression ihrer Zielantigene reagieren [28].

1.2.4 IL-31 und Prurigo nodularis

Die Prurigo nodularis gehört zu den entzündlichen Hauterkrankungen mit einem massiven Juckreiz auf der visuellen Analogskala (VAS) von 7,1 bis 8,8 [30] und damit verbundener signifikant reduzierter Lebensqualität der Betroffenen [6].

In der Arbeit von Sonkoly *et al.* zeigten sich bei Patienten mit Prurigo nodularis die höchsten IL-31 Konzentrationen [6]. Im Vergleich zu gesunder Haut wurde hier in läsionaler Haut von Prurigopatienten eine 50-fach höhere IL-31 mRNA und eine 4,5-mal höhere IL-31 Transkription gefunden [6].

Aufgrund dessen, dass Prurigo-Läsionen die höchsten IL-31 mRNA-Spiegel zeigten, wird die These unterstützt, dass IL-31 eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Juckreiz spielt [6].

1.2.5 IL-31 und Psoriasis vulgaris

Psoriasis ist ebenfalls eine entzündliche Hauterkrankung, die allerdings durch eine T_H1 - bzw. in neueren Studien beschriebenen T_H17 -Zellreaktion gekennzeichnet ist [2] [31] [32].

Im Gegensatz zu den T_H2 dominierten Erkrankungen (z.B. Atopische Dermatitis) wurde bisher noch kein signifikanter Einfluss von IL-31 in der Psoriasis vulgaris nachgewiesen [2] [6].

1.2.6 IL-31 und kutane T-Zell-Lymphome (CTCL)

Die *Mycosis fungoides* (MF) gehört zu den Non-Hodgkin-Lymphomen. Es handelt sich um ein niedrig malignes und primär kutanes T-Zell-Lymphom (CTCL) [33] [34]. Es stellt eine chronische Erkrankung dar und ist nicht kurativ zu behandeln [34].

Die MF ist unter den malignen Hautlymphomen mit einer Inzidenz von ca. 0,3-0,5/100000/Jahr das Häufigste und tritt in der Regel nach dem 40. Lebensjahr auf, wobei Männer bevorzugt erkranken [34]. Die Pathogenese ist bislang unklar [34].

Die Erkrankung besteht aus drei klinischen Phasen, die unterschiedliche Hautmanifestationen zeigen. Als erstes Stadium ist das prämykoides Stadium zu nennen, bei dem "unterschiedlich große, scharf begrenzte, runde, ovale, serpiginöse, bogig oder polyzyklisch begrenzte, wenig infiltrierte, entzündliche und pityriasiform oder psoriasiform schuppene Herde" auf der Haut zu finden sind [34]. Diese Entwicklung kann Jahrzehnte dauern und stabile Phasen aufweisen [34]. Der histologische Nachweis kann in diesem anfänglichen Stadium noch unspezifisch ausfallen, da es sich um einen präneoplastischen Zustand handelt [34].

Im zweiten Stadium, dem Plaque-Stadium, nimmt die Infiltration der Herde allmählich zu. Sie verschmelzen im Verlauf und haben ein entzündlich-rotes,

violettes oder bräunliches Erscheinungsbild, wobei teils auch nicht betroffene Areale in diesen Herden auftreten, die als *nappes claires* bezeichnet werden [34]. An den befallenen Stellen kann es auch zu Haarverlust kommen [34].

In den histologischen Befunden ist nun ein Epidermotropismus zu erkennen, der ein charakteristisches Zeichen der MF ist [34]. Unter Epidermotropismus versteht sich die Einwanderung atypischer Lymphozyten in die Epidermis [34]. Er zeigt sich besonders entlang der Reteleisten [34]. Neben dermalen-lymphozytären Infiltraten bilden sich umschriebene Ansammlungen von Lymphozyten in der Epidermis, die sogenannten "Pautrier-Mikroabzesse" [34]. Diese gelten ebenfalls als sehr typisch für die MF [34]. Zudem wandern auch einzelne Lymphozyten ein, die Kern- und Zellanomalien aufweisen, aber nur ein geringes Teilungspotential haben [34]. Meist dauert dieses Stadium zwei bis fünf Jahre an, ehe es in das Tumorstadium übergeht [34].

Von da an schreitet die Krankheit meist zügig fort und es werden zunehmend Lymphknoten, peripheres Blut, Knochenmark und innere Organe befallen [34]. Letal für die Patienten ist die Organmanifestation oder die durch eine Ulzeration eines Tumors bedingte Sepsis [34]. Zur Diagnose werden die Klinik, Histologie und Immunhistochemie herangezogen. Wiederholte Biopsien betroffener Bereiche dienen der Diagnosesicherung bzw. der Verlaufskontrolle [34]. Der Verlauf der MF ist im prämykoiden Stadium zunächst sehr mild und schränkt die Lebenserwartung nicht ein [34]. Beim infiltrativen Stadium beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung ungefähr fünf Jahre, beim Tumorstadium circa zwei Jahre [34].

Das *Sézary* Syndrom (SS) stellt ein aggressives, erythrodermisches und leukämisches kutanes T-Zell-Lymphom mit generalisierter Lymphadenopathie dar [34]. Klinisch zeigen sich generalisierte ekzematöse oder psoriasiforme Hautveränderungen bis hin zur Erythrodermie, die zur Hyperpigmentierung neigt (Melanoerythrodermie) [34]. Zudem geht die Erkrankung mit palmoplantaren Hyperkeratosen einher, sowie mit diffuser Alopezie und Onychodystrophie [34]. Das histologische Bild ähnelt der *Mycosis fungoides*, spezifisch sind jedoch die morphologisch charakteristischen, atypischen T-Zellen, die sogenannten *Sézary*-Zellen [34]. Sie stellen ein diagnostisches Kriterium der Erkrankung dar, so dass ab einem Wert von >1000 *Sézary*-Zellen/mm³ im peripheren Blut mit entsprechender Klinik die Diagnose eines *Sézary* Syndroms gestellt werden kann [34].

Das exakte *Staging* ist wie bei anderen malignen Lymphomen Voraussetzung für die Wahl der Therapie, die sich an den unterschiedlichen Phasen orientiert [34]. Aktueller Standard sind die Stadieneinteilung der *International Society of Cutaneous Lymphoma* (ISCL) und der *European Organization of Research and Treatment of Cancer* (EORTC).

Die Lebensqualität wird bei CTCLs oft von chronischem Juckreiz beeinflusst, der bei circa 88% der Erkrankung auftritt [35] [36]. Der Juckreiz ist sowohl häufiger als auch stärker in den fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung [36] [37]. Zudem wurde bei dem SS von den Patienten häufiger von Juckreiz berichtet als bei der MF [36] [38].

Der Weg des Juckreizes beginnt bei der Wahrnehmung in der Haut über primär-sensorische Neurone, deren Zellkörper in den Spinalganglien liegen [39]. Diese spezielle Subpopulation der unmyelinisierten C-Typ Neurone leitet das Signal dann weiter in das Hinterhorn des Rückenmarks [39].

Die klinische Herausforderung in der Therapie dieses Juckreizes liegt darin, dass er oft nicht auf Antihistaminika oder topische Glukokortikosteroide, die Standardtherapien gegen Juckreiz, anspricht [37]. Die Ätiologie dieses Juckreizes ist bislang nicht vollends geklärt [37].

Es gibt eine Reihe von Substanzen wie Opiode, die zur Analgesie bei malignen Erkrankungen eingesetzt werden und bei denen bekannt ist, dass sie über zentrale Mechanismen Juckreiz begünstigen [37]. Die Liste anderer potentiell Juckreiz induzierender Mediatoren ist lang (Substanz P, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-31 [37] [40], CCL1, CCL26, LDH, IgE, NGF [41]).

Da, wie oben erwähnt, IL-31R α in dorsalen Ganglien [6] [7] und OSMR β auf einem speziellen Subtyp nozizeptiver Neurone in dorsalen Ganglien nachgewiesen wurde [8] [9], ist der Nachweis von IL-31 in Serum und Hautbiopsien ein interessanter Ansatz für die Untersuchung von Juckreiz in CTCL.

In diesem Zusammenhang wird in der Studie von Ohmatsu *et al.* eine aufregulierte Konzentration von IL-31 in CTCL-Blutseren ($3,19 \pm 0,74$ pg/ml) im Vergleich zu gesunden Probanden beschrieben ($p < 0,05$), wobei die maximalen Werte dem Tumorstadium der CTCL zuzuordnen waren [42].

Grundlage dieser Studie waren 38 CTCL Patienten (MF 34, SS 4, $58,8 \pm 13,9$ Jahre) [42]. Im Plaquestadium befanden sich 22 Patienten, im Tumorstadium 11 Patienten und 5 Patienten zeigten eine Erythrodermie [42].

Insgesamt postuliert diese Studie, dass IL-31 mit der Krankheitsaktivität sowohl mit dem *Soluble interleukin-2 receptor* (sIL-2R)- und Laktatdehydrogenase (LDH)-Spiegel als auch mit der Juckreizausprägung korreliert [42].

Den Zusammenhang zwischen IL-31 Expression und Juckreiz bestärkt ebenfalls die Studie von Singer *et al.* [43]. Hier wurde ein Unterschied zu nicht-juckenden Verlaufsformen von CTCL gesehen, die nur minimale IL-31 Konzentrationen aufwiesen [43]. Eine weitere Studie von Cedeno-Laurent *et al.* beschreibt des Weiteren einen Zusammenhang zwischen abnehmendem Juckreiz unter Therapie und damit einhergehenden, regredienten IL-31 Serumspiegeln [44].

1.2.7 Ziele der Arbeit

Aufgrund des vermuteten Zusammenhangs von IL-31 und Juckreiz bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie der atopischen Dermatitis [1], allergischen Kontaktdermatitis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [2] und allergischem Asthma [1], stellt sich die Frage inwieweit IL-31 auch bei anderen pruriginösen Hauterkrankungen eine Rolle spielt.

In Hinblick auf CTCL wird in vorangegangenen Studien postuliert, dass IL-31 mit der Krankheitsaktivität [42] und dem Juckreiz [43] [44] assoziiert sein könnte.

Dies ist insbesondere daher interessant, da es CTCL-Patienten mit und ohne Ausprägung von Pruritus gibt.

Ziel dieser Arbeit ist es, das Vorliegen und die Höhe der Expression von IL-31 als ursächlichen pro-pruritogenen Mechanismus im Hinblick auf kutane T-Zelllymphome beim Menschen zu untersuchen. Hierzu soll die IL-31 Expression in CTCL mit und ohne Pruritus sowie bei gesunden Vergleichspersonen mittels ELISA von Serumproben, PCR und immunhistochemischen Methoden in Hautbiopsien detektiert werden. Zusätzlich wird die Stärke des Juckreizes mittels Juckreizscore in Zusammenhang mit der IL-31 Expression begutachtet. Ergänzend erfolgt die Betrachtung der IL-31 Expression in Assoziation zu den Krankheitsstadien.

2. Material/ Methodik

2.1 Patientenkollektiv

Die für diese Arbeit verwendeten Hautbiopsien und Blutseren wurden nach Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten entnommen und für diese Studie anonymisiert.

Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hat das hier durchgeführte Forschungsprojekt (Studiennummer: 2800) am 06.10.2006 beurteilt und gegenüber der Durchführung keine ethischen oder rechtlichen Bedenken festgestellt.

Es wurde ein Kollektiv von insgesamt 14 CTCL Patienten mit Juckreiz (CTCL*) (12 MF, 2 SS, w:m 7:7) und 16 CTCL Patienten ohne Juckreiz (CTCL**) (15 MF, 1 SS, w:m 1:15) rekrutiert.

Zudem wurden als Vergleichsgruppe aus dem Studienkollektiv „*IL-31 a new link between T cells, pruritus and atopicskin inflammation*“, Forschungslabor Prof. Dr. med. B. Homey, Hautklinik Düsseldorf, ein Patient mit Prurigo nodularis, 6 Patienten mit atopischer Dermatitis und 6 Patienten mit Psoriasis vulgaris sowie 29 gesunde Vergleichspersonen, davon 13 ohne atopische Diathese oder Allergien, ausgewählt. Des Weiteren wurden 27 gesunde Vergleichsproben für den Simoa™ ELISA (BMS-ZymoGenetics, WA, USA/ Quanterix, MA, USA) aus dem Probenbestand von ZymoGenetics (genehmigt vom *Institutional Review Board* (IRB)) zur Verfügung gestellt.

Das CTCL-Kollektiv wurde entsprechend der Kriterien der *International Society of Cutaneous Lymphoma* (ISCL) und der *European Organization of Research and Treatment of Cancer* (EORTC) und der TNM-Klassifikation eingeteilt (Abb. 1).

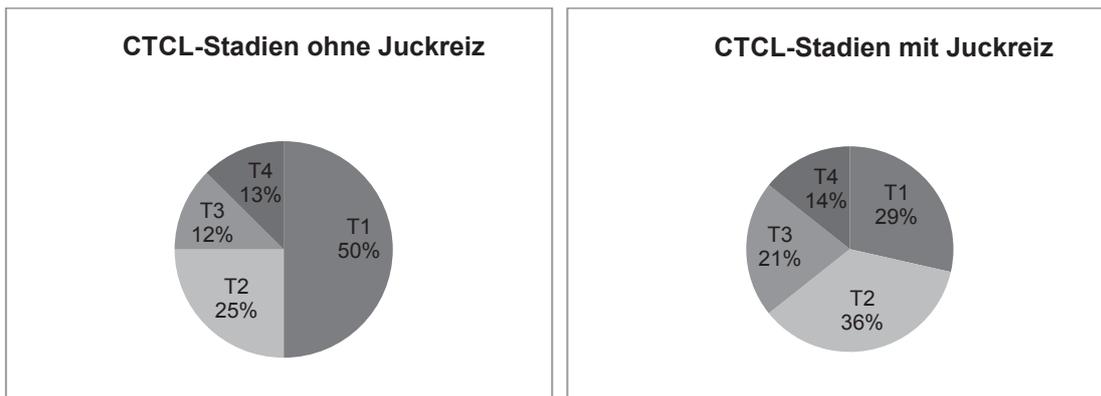


Abb. 1: **Prozentuale Stadienverteilung des CTCL-Kollektives**

Übersicht der Stadienverteilung innerhalb des CTCL Kollektives ohne Juckreiz (links) und des CTCL Kollektives mit Juckreiz (rechts) in Prozent gemäß TNM-Klassifikation

Von dem Kollektiv mit CTCL und Juckreiz konnte von 11 Patienten ein Juckreizscore zur Einschätzung der Juckreizstärke erhoben werden (Abb. 2). Hierbei handelt es sich um die visuelle Analogskala. Die Patienten geben das Juckreizempfinden in Zahlen an, wobei der Wert 0 keinen und 10 den vorstellbar stärksten Juckreiz beschreibt. Die Patienten wurden nach dem Juckreiz am Untersuchungstag, der schlimmsten bisher widerfahrenen (maximalen) Juckreizausprägung und der durchschnittliche Juckreizausprägung befragt.

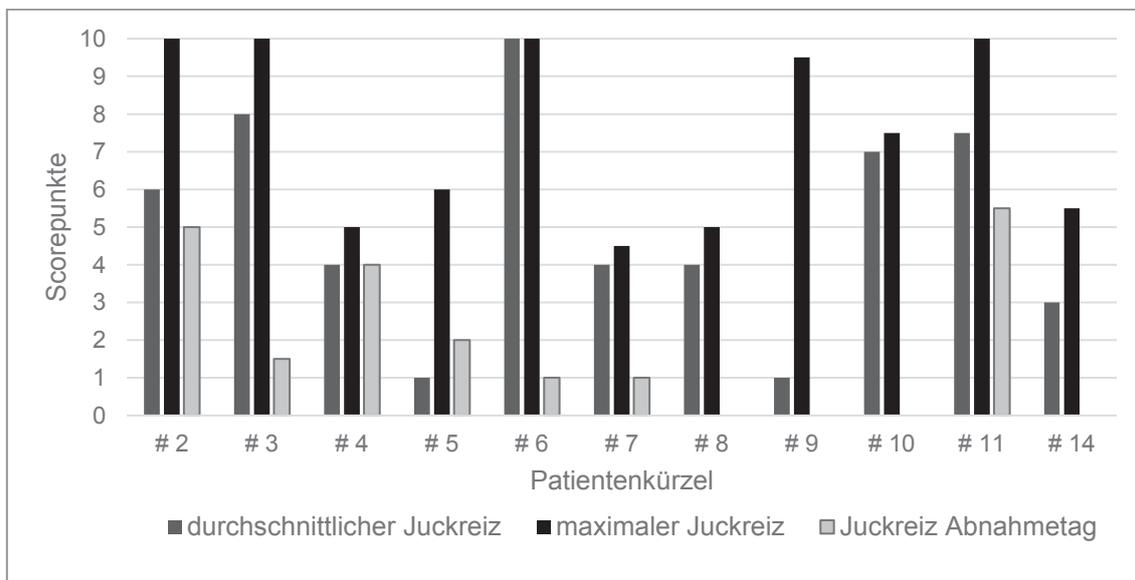


Abb.2: **Juckreizscore im CTCL-Kollektiv**

Übersicht der Juckreizausprägung mittels Scorepunkten von 0 (Minimum) bis 10 (Maximum) je Patient zu den Kriterien durchschnittlicher Juckreiz, maximaler Juckreiz und Juckreiz am Untersuchungstag

Dabei standen 5 Patienten (CTCL* #3, #5, #6, #10, #11) der CTCL Gruppe mit Juckreiz und 3 Patienten (CTCL** #4, #6, #16) der CTCL Gruppe ohne Juckreiz bis zu 8 Wochen vor der Blut- bzw. Probenentnahme unter systemischer Therapie (Lichttherapie bzw. systemische Glukokortikoide).

Zudem wurde anamnestisch eine atopische Diathese erfasst. Hierzu wurde die Anamnese bzgl. einer atopischen Dermatitis (AD), einer allergischen Rhinokonjunktivitis, eines allergischen Asthma bronchiale sowie Typ-I und Typ IV Sensibilisierungen erhoben.

2.2 Statistik

Die statistische Auswertung wurde von Prof. Dr. Holger Schwender, Lehrstuhl für Mathematische Optimierung, Fachgebiet für angewandte Statistik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt.

Als statistische Untersuchungsmethoden wurden der Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test, ChiQuadrat-Test, Fisher-Test, Spearmans Rangkorrelationskoeffizient und die Bonferroni Berechnung herangezogen.

2.3 ELISA

2.3.1 ELISA (*R&D Systems*)

Als Material für den ELISA von *R&D Systems* wurden Serumproben von 12 gesunden Patienten, 10 CTCL-Patienten mit Juckreiz und 9 CTCL-Patienten ohne Juckreiz gewählt.

Bei diesem ELISA-Verfahren handelte es sich um das "Human IL-31 DuoSet" (*R&D Systems*, MN, USA). Der Test wurde entsprechend der Herstellerhinweise vorbereitet und durchgeführt.

2.3.2 Simoa™ ELISA (*BMS-ZymoGenetics/ Quanterix*)

Der Simoa™ ELISA (*BMS-ZymoGenetics*, WA, USA/ *Quanterix*, MA, USA) wurde als zweites ELISA-Verfahren verwendet. Er wurde von *BMS-ZymoGenetics* (WA, USA) in Kooperation mit *Quanterix* (MA, USA) entwickelt und von der Arbeitsgruppe von Mark Maurer (*immuno-oncology discovery*, Bristol-Myers Squibb, WA, USA) durchgeführt.

Ziel war es hierbei, die Sensitivität des bisherigen IL-31 ELISA *kits* (LOD von 5-10pg/mL im Serum) zu verbessern. Es wurden die gleichen murinen Anti-humanen IL-31 Antikörper (*capture antibody clone* 294.154.5.6 (ZGI lot# E9286) und *detection antibody clone* 292.118.6.4 (biotinylated lotof E10988)) verwendet.

Die Präinkubation des Prüfserums mit dem Blocker für heterophile Antikörper, IIR, von der Firma Bioreclamation (Brüssel, Belgien) diente dazu, falsch positive Signale in den Serumproben zu unterdrücken.

Im ersten Schritt erfolgte die Markierung des Granulats mit Anti-IL-31 Antikörpern (*capture antibody*). Anschließend wurden die Seren unter Verwendung des IIR-Blockers mit dem vorbereiteten Granulat zusammengeführt. Zudem wurde eine IL-31-Standardprobe sowie drei Qualitätskontrollen mit 500pg/ml, 50pg/ml und 5pg/ml IL-31 angefertigt. Nach erfolgter Inkubation erfolgte die Zugabe von Anti-IL-31-Antikörpern (*detection antibody*). Nach wiederholter Einwirkung und Waschung erfolgte die Auslesung mit Hilfe der *Bio Plex Manager 4.1.1* Software.

2.4 Immunhistochemie (IHC) für Interleukin-31

2.4.1 Gefrierschnittkonservierung

Es wurden neun Proben humaner Haut ausgewählt. Dabei wurden 1 gesunde Hautprobe (periläsionale Haut aus Nachexzision), 4 Proben von CTCL-Patienten mit Juckreiz (läsionale Stellen), 2 Proben von CTCL-Patienten mit Juckreiz (nicht-läsionale Stellen) und 5 Proben von CTCL-Patienten ohne Juckreiz untersucht.

Diese Proben wurden bei -80°C gelagert und in flüssigem Stickstoff asserviert. Anschließend erfolgte die Bearbeitung zu Gefrierschnitten auf beschichteten Objektträgern (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland). Dabei wurde als Einbettungsmedium "*Tissue- Tek, O.C.T. Compound*" gewählt. Für die Färbung wurden die Gewebeschnitte in 4%-igem Formaldehyd 30 min lang bei Raumtemperatur fixiert.

2.4.2 Paraffin-Konservierung

Für die Paraffinkonservierung der Gewebeschnitte wurden 6 gesunde Hautproben (periläsionale Haut aus Nachexzisionen), 7 Proben von CTCL-Patienten mit Juckreiz und eine Prurigoprobe untersucht.

Diese Proben wurden im Wärmeschrank bei 70°C für 2 Std. auf den Objektträgern (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland) fixiert. Danach erfolgte eine Entparaffinierung über ein Bad in Xylen (2x 3 min), folgend in 100% Alkohol (3 min), folgend in 90% Alkohol (3 min), folgend in 50% Alkohol (3 min) und abschließend ein Abwaschen in destilliertem Wasser. Darauf wurden die Proben in einem Dampfdrucktopf in destilliertem Wasser für 5 min erhitzt und im Anschluss wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Es folgte eine Separierung mittels PAP-Kreisen.

2.4.3 IL-31 Färbung

Es folgte ein 3 minütiges PBS-Bad. Anschließend wurden die Objektträger in eine Lösung, die sich aus 0,6 % H₂O₂ in PBS zusammensetzte, gegeben und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Hierauf folgten zwei PBS-Bäder à 5 min.

Danach wurde die *Avidin blocking solution* von *VectorBlocking Kit* aufgeträufelt und 10 min bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Anschließend wurden die Proben

mit PBS abgewaschen und die *Biotin blocking solution* von *VectorBlocking Kit* für 10 min bei Raumtemperatur aufgegeben.

Nach dem erneuten Abwaschen mit PBS folgte das Aufträufeln des Antikörpergemisches beziehungsweise der Kontrolllösung, welche sich aus 8ug/ml *anti-human IL-31 AK* von *R&D Systems*, 1% Pferdeserum, 0,05% Triton X beziehungsweise 8ug/ml *Goat IgG* von *Jackson ImmunoRes*, 1% Pferdeserum, 0,05% Triton X zusammensetzte. Dies konnte über Nacht (20 Std.) bei 4°C einwirken.

Nach Abschluss des Einwirkens des ersten Antikörpers wurden drei PBS-Bäder à 5 min vollzogen. Dann wurde ein biotinylierter Zweitantikörper *antiGoat IgG* (*Vector, CA, USA*) in PBS in der Konzentration von 10ug/ml mit 0,05 % Triton X für 90 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Es folgten zwei PBS- Bäder à 5 Minuten.

Daraufhin wurde *Streptavidin HRP* von *DakoCytomation* in der Verdünnung 1:500 mit PBS bei Raumtemperatur für 40 min hinzugegeben und im Anschluss zwei PBS-Bäder à 5 min durchgeführt. Es folgte das Aufträufeln des *AEC substrate development* (*Vector, CA, USA*), welches aus 5 ml destilliertem Wasser, 2 Tropfen (Trpf.) Buffer, 3 Trpf. AEC und 2 Trpf. Peroxidase bestand. Die Objektträger wurden dann mit PBS abgewaschen und 2 Sekunden in filtriertes Hämatoxylin gegeben. Anschließend folgten 3 Bäder à 1 min mit Leitungswasser, ein Bad mit *Saturated lithiumcarbonate solution* für 15 Sekunden und 5 Wasserbäder für jeweils 1 min. Zum Schluss wurden die Schnitte mit *Aqua coverslip* fixiert.

Die Präparate wurden mittels des Mikroskops *Axioskop 40* (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) dargestellt und über die *Axiocam MRc* (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Bei dem zur Speicherung der Bilder verwendeten Computerprogramm handelte es sich um *Axiovision4* (Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

2.5 Nukleinsäureanalyse

Für die Durchführung dieser Testreihe wurden Proben von 6 CTCL-Patienten sowie jeweils 6 Patienten mit atopischer Dermatitis (AD), Psoriasis vulgaris (PV) und gesunder Haut (GH) ausgewählt. Die Nukleinsäureanalyse wurde gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt.

2.5.1. Homogenisierung

Um die Ribonukleinsäure (RNS) aus Hautbiopsien zu gewinnen, wurden die Gewebeproben in ein steriles 5 ml Polypropylen *Round Bottom Tube* (Falcon Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) mit 600 µl *RLT-Puffer* (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 1% β-Mercaptoethanol (Sigma, MO, USA) gegeben. Anschließend wurden die Proben mit einem Messeraufsatz des *Polytron* PT 2500 E (Kinematica AG, Littau, Schweiz) bei 30.000 Umdrehungen pro Minute homogenisiert. Zwischen den einzelnen Proben erfolgte eine Spülung des Messers mit DEPC-Wasser (Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) und 70%-igem Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland), um Verunreinigungen zu beseitigen. Die Proben wurden auf Eis zwischengelagert.

2.5.2 RNS Isolation

Das aus den Biopsien gewonnene Homogenisat wurde in eine *QIAshredder spincolumn* (Qiagen, Hilden, Deutschland) gefüllt. Das Biopolymer der *QIAshredder* (Qiagen, Hilden, Deutschland) erlaubte einen weiteren Aufschluss des Gewebes. Die Säulen wurden für 3 min bei 12.000 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Material wurde darauf in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) umgefüllt und erneut bei 12.000 Umdrehungen pro Minute für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die weitere RNS-Isolation erfolgte gemäß der Herstellerangaben mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland).

2.5.3 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Die Messung der RNS erfolgte über den *NanoDrop*[™] 2000 (Thermo Scientific,

MA, USA). Eine Menge von 1-1,5 µl der eluierten RNS wurde zur Bestimmung der RNS-Konzentration auf die Fotozelle gegeben. Die Messungen erfolgten bei 260 nm, 280 nm und 320 nm, wobei der Absorptionsbereich von 280 nm den Proteingehalt des Gemisches und der Absorptionsbereich von 320 nm die Streuung widerspiegelt. Das Verhältnis der Absorptionen im Bereich von 260 nm zu 280 nm diente als Indikator für die Reinheit der RNS und sollte zwischen 1,8 bis 2,1 liegen.

2.5.4 cDNS-Synthese

In diesem Schritt wurde mittels der reversen Transkriptase *Superscript II* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) die gewonnene RNS in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) zu cDNS (*complementary* Desoxyribonukleinsäure) umgeschrieben. Für die Synthese wurden bis zu 4 µg RNS eingesetzt.

Im ersten Schritt wurde zunächst ein DNase I-Verdau durchgeführt, um eine Kontamination mit genomischer DNS zu verringern. Dazu wurden ein Gemisch aus 1,5 µl First Strand Buffer (Invitrogen, CA, USA), 1 µl RNASin plus (40 U/µl) (Promega, WI, USA), 1 µl DNase I *recombinant* (Roche, Basel, Schweiz) und 2,5 µl DEPC-Wasser (Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) angefertigt.

Eine Menge von 6 µl dieses Gemisches wurden zu 10 µl RNS in einem PCR-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben und in einem Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der DNase durch 10 minütiges Erhitzen auf 70 °C. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNS auf 4 °C abgekühlt.

Für die Anlagerung der Primer zur reversen Transkription wurden 1 µl Oligo dT-Primer (0,5 µg/µl) (Invitrogen, CA, USA), 0,4 µl Random Hexamer Primer (0,5 µg/µl) (Promega, WI, USA) und 2,6 µl Wasser dem Gemisch hinzugegeben.

Die Inkubation erfolgte bei 70 °C für 10 min.

Zur cDNS-Synthese wurden anschließend 8 µl des Gemisches aus 4,5 µl 5x *first strand buffer* (Invitrogen, CA, USA), 1,5 µl dNTP (10 nM, Bioline USA Inc., MA, USA), 1 µl DTT (Invitrogen, CA, USA) und 1 µl RNasin Plus (40 U/µl) (Promega, WI, USA) dem Inkubat zugefügt und für zwei Minuten bei 42 °C einwirken gelassen.

Abschließend wurde 1 µl *Superscript* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 50 min bei 42 °C mit anschließender Deaktivierung der Transkriptasen bei 70°C für 10 min.

Im Anschluss wurde die cDNS auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Grundlage hierzu ist die gleichmäßige Umsetzung von RNS zu cDNS im Verhältnis 1:1 und die RNS-Konzentrationsmessung vor der RT-PCR.

Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.5.5 Quantitative *real time* Polymerase chain reaction

Die quantitative *real-time* Polymerase chain reaction (PCR) erfolgte in 96-Well-Reaktionsplatten (Applied Biosystems, Foster City, USA). Zur Durchführung der quantitativen *real time* PCR wurde die cDNS zunächst auf eine Konzentration von 2,5 ng/µl mit DEPC-Wasser (Carl Roth GMBH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 10 µl eingesetzt.

Zum Nachweis von Transkripten wurde das PCR-System SYBR™ *green* angewendet. Bei SYBR™ *green* handelt es sich um einen Farbstoff, der während des Umschreibens von cDNS in Doppelstrang-DNS unspezifisch eingebaut wird. In einem bestimmten Wellenlängenbereich beginnt dieser dann zu fluoreszieren.

Zu der verdünnten cDNS wurden 15 µl des Mastermixes aus 12,5 µl 2xPower SYBR™ *green* Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) und 2,5 µl genspezifischer Vorwärts – und Rückwärtsprimer Mix [2 µM] (Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, Deutschland) hinzugegeben.

Die cDNS wurde in mehreren Temperaturzyklen (50°C für 2 min, 95°C für 10 min, 40 Wiederholungen bei 95°C für 15 sec und abschließend bei 60°C für 1 Minute) amplifiziert. Die Positivkontrolle erfolgte jeweils mit 0,125 µl 18S RNS-spezifische Sonde und Primer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA).

Anschließend wurde die quantitative RT-PCR in dem AbiPrism7000 (Applied Biosystems Inc., Foster City, USA) durchgeführt.

Die Expression der Zielgene wurde in Relation zu der Expression des *housekeeping* Gens 18S (Applied Biosystems, Foster City, USA) mittels der Software Office Excel (Microsoft Ireland Operations Limited, Dublin, Irland) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in relativen Units (RU) zu dem Vergleichswert 18S angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 IL-31 Konzentration im ELISA-Verfahren

3.1.1 ELISA (R&D Systems)

Es zeigte sich bei dem hier durchgeführten ELISA die unten dargestellte Verteilung der IL-31 Werte (Abb. 3). Die Median-Werte liegen bei der gesunden Vergleichspopulation (G) und dem CTCL-Kollektiv mit Juckreiz beide bei 12.000 pg/ml, bei dem CTCL-Kollektiv ohne Juckreiz bei 6.000 pg/ml. Der Mittelwert lag in der Vergleichsgruppe bei 14.416,67 pg/ml und im CTCL-Kollektiv mit Juckreiz bei 14.082,8 pg/ml, bei dem CTCL-Kollektiv ohne Juckreiz bei 2.611,11 pg/ml. Der Median für das gesamte CTCL-Kollektiv befand sich bei 8.552,63 pg/ml, der Mittelwert bei 9.000 pg/ml.

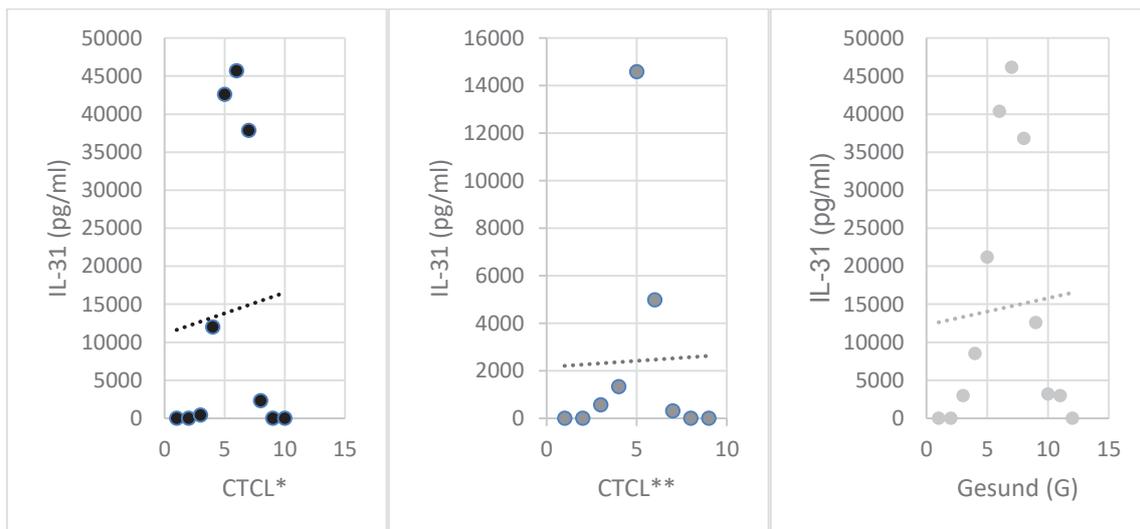


Abb.3: IL-31 Expression in den Patienten Kollektiven

Darstellung der IL-31 Expression in den Gruppen CTCL* mit Juckreiz, CTCL** ohne Juckreiz und G in dem ELISA (R&D Systems) von 04/2010 in pg/ml. In der X-Achse ist die Anzahl der Werte dargestellt. Der Trend wird mittels der Geraden verdeutlicht

Zur Validierung der erlangten Werte erfolgten zwei weitere Messungen mittels des ELISAs von R&D Systems mit der gleichen Serumprobe je Patient. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung (Abb.4) exemplarisch dargestellt.

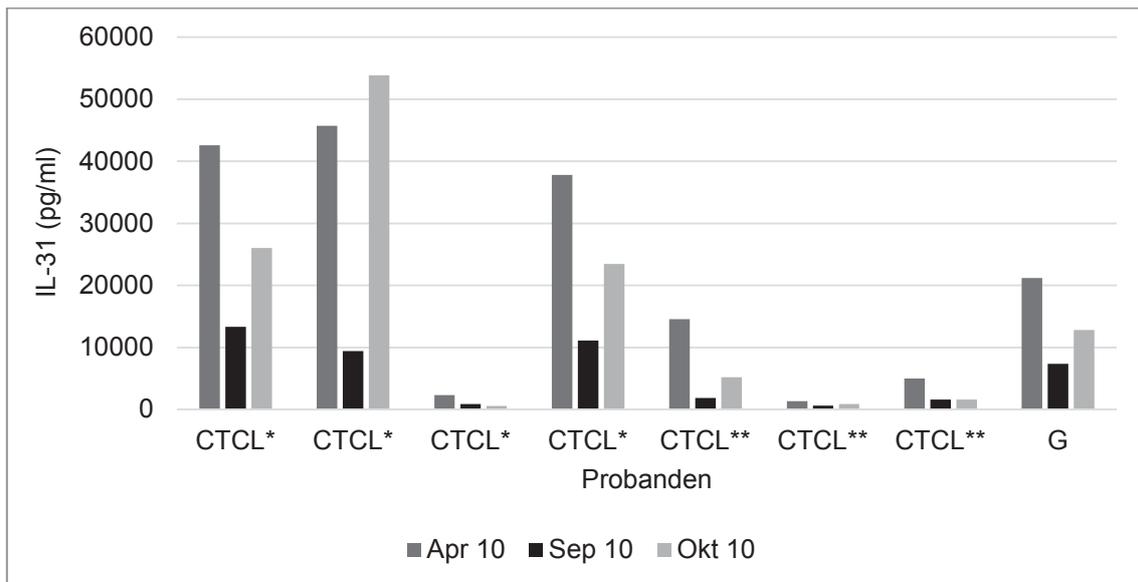


Abb. 4: **Probandenbezogene IL-31 Expression**

Exemplarische Darstellung der IL-31 Expression je Proband aus den verschiedenen Kollektiven (CTCL* mit Juckreiz, CTCL** ohne Juckreiz, G gesund) in der Durchführung 04/2010, 09/2010 und 10/2010 mittels ELISA von *R&D Systems*, Werte in pg/ml

Die Ergebnisse in drei unabhängig durchgeführten ELISA-Reihen waren nicht reproduzierbar.

Daher erfolgte der Vergleich der drei einzelnen Werte pro Patient. Zunächst wurden die Werte mittels eines zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests für gepaarte Stichproben überprüft (und auch die Werte unter der Nachweisgrenze, also Werte = 0 berücksichtigt). Es ergaben sich sehr niedrige nominale p-Werte, was in diesem Fall einen signifikanten Unterschied zwischen den Messungen darstellt (04/2010 vs. 09/2010: p-Wert = 0,00166, 04/2010 vs. 10/2010: p-Wert = 0,07556, 09/2010 vs. 10/2010: p-Wert = 0,05871).

Für alle drei Zeitpunkte wurde global mit einem Kruskal-Wallis-Test getestet, ob die Werte zwischen den Gruppen gleich sind. Global bedeutet hierbei, dass alle drei Gruppen (CTCL mit Juckreiz, CTCL ohne Juckreiz, G) in einem Test betrachtet wurden. Es zeigten sich folgende nominalen Werte: p-Wert 04/2010 = 0,2312, p-Wert 09/2010 = 0,1865, p-Wert 10/2010 = 0,1523. Dabei fiel bei allen Werten kein signifikanter Zusammenhang zwischen den ELISA-Ergebnissen auf.

Des Weiteren erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse mit den anamnestisch erhobenen Atopiekriterien. Exemplarisch ist hierzu die Korrelation der IL-31 Expression des ELISAs 04/2010 und der Atopiekriterien gezeigt (Abb. 5).

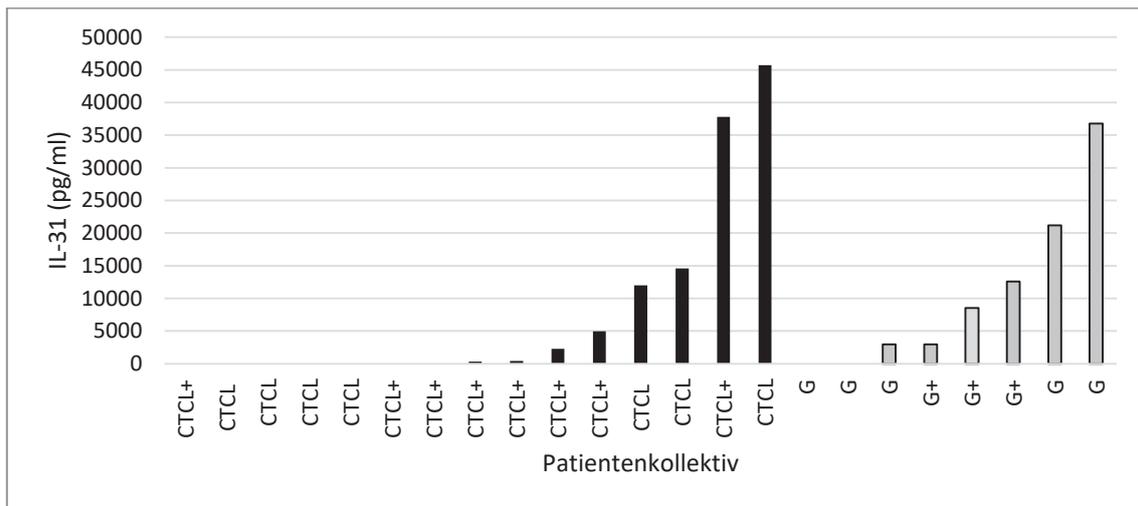


Abb. 5: Übersicht der ELISA-Ergebnisse unter Berücksichtigung von Atopie

Darstellung der IL-31 Expression nach aufsteigenden Werten mittels ELISA von *R&D Systems* aus der Durchführung von 04/2010 in pg/ml unter Berücksichtigung der anamnestischen Atopiekriterien (AD, allergische Rhinokonjunktivitis, allergisches Asthma und/ oder Allergien) in den Kollektiven CTCL und G. + steht für eine vorhandene Atopie

Hier wurde zuerst mit einem Fisher-Test überprüft, ob ein Unterschied zwischen Atopie „positiv“ und „negativ“ in der Anzahl an Werten oberhalb der Nachweisgrenze existiert. Es ergaben sich adjustierte p-Werte (mittels Bonferroni Berechnung) für 04/2010 von p-Wert= 0,5061, für 09/2010 von p-Wert= 0,0042 und für 10/2010 von p-Wert= 1.

Hierbei ist für die Testreihe im September und Oktober 2010 zu beachten, dass nur wenige Werte, insbesondere der gesunden Vergleichspersonen, vorlagen. Anschließend wurden daher die Werte oberhalb der Nachweisgrenze mit einem einseitigen Mann-Whitney-U-Test (einseitig, da die Vermutung bestand, dass die Werte höher sind, wenn eine Atopie vorliegt) überprüft. Es ergab sich ein nominaler p-Wert für 04/2010 von 0,1687, p-Wert für 09/2010 von 0,5714 und p-Wert für 10/2010 von 0,5714.

Der Vergleich zwischen dem Juckreizscore und der IL-31 Expression wird in Tabelle 1 im Vergleich zur ersten ELISA-Testreihe im April 2010 dargestellt.

Patient	Juckreizscore am Abnahmetag	ELISA (IL-31 in pg/ml)
CTCL #2	5	12008
CTCL #3	1,5	0
CTCL #4	4	0
CTCL #5	2	42592
CTCL #6	1	0
CTCL #7	1	405
CTCL #9	0	45705
CTCL #10	0	0
CTCL #11	5,5	2290
CTCL #14	0	37828

Tabelle 1: **Vergleich Juckreizscore und IL-31 Expression**

Patienten bezogener Juckreizscore (Werte von 0-10 Scorepunkten) des Abnahmetages verglichen mit den Ergebnissen des ELISAs (*R&D Systems*) von April 2010 in pg/ml.

3.1.2 Simoa™ ELISA (*BMS-ZymoGenetics/ Quanterix*)

Der Simoa™ ELISA (*BMS-ZymoGenetics, WA/ Quanterix, MA, USA*) zeigt die in Abb. 6 dargestellten Ergebnisse. Hierbei fiel eine IL-31 Expression über 0,1pg/ml ausschließlich in der Gruppe mit gesunden Probanden (G) auf.

Der Median für die gesunden Vergleichspersonen befand sich bei 0,0711 pg/ml, während dieser bei dem CTCL-Kollektiv bei 0,0067 pg/ml lag. Der Mittelwert lag bei den Serumproben der gesunden Probanden bei 0,087 pg/ml, bei den CTCL-Patienten bei 0,003 pg/ml. Zwischen CTCL mit Juckreiz (0,004 pg/ml) zu CTCL ohne Juckreiz (0,002 pg/ml) zeigten sich die Mittelwerte kaum divergierend.

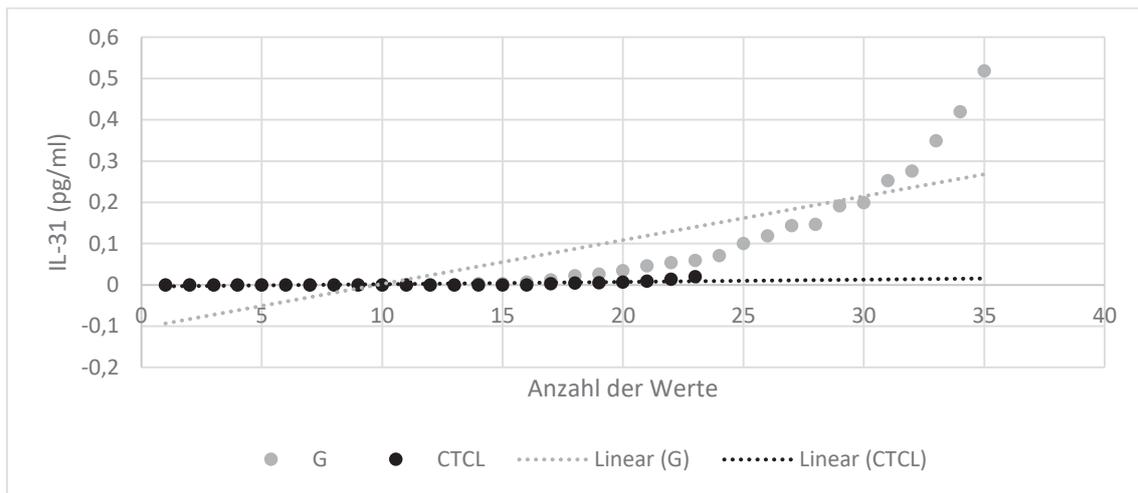


Abb. 6: IL-31 Expression mittels ELISA (Simoa™)

IL-31 Expression in gesunden Probanden (G) und kutanem T-Zell-Lymphom (CTCL) mittels des Simoa™ ELISA in pg/ml. Die Ergebnisse wurden nach aufsteigenden IL-31 Werten (pg/ml) von links nach rechts aufgeführt. Der Trend wird mittels der Geraden (Linear G bzw. Linear CTCL) dargestellt

Auch hier wurde die Korrelation der Werte in Hinblick auf die verschiedenen Gruppen (CTCL mit Juckreiz, CTCL ohne Juckreiz, G: Gesund) untersucht. Da die Gruppe CTCL ohne Juckreiz nur einen Wert > 0 aufwies, erfolgte die Testung mit einem zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test zwischen CTCL mit Juckreiz und G (nominaler p-Wert: 0,03304).

Da sich hier eine Differenz andeutete, wurde getestet, ob der Anteil der Werte, die unter der Nachweisgrenze liegen, in den Gruppen identisch ist. Zuerst global mittels ChiQuadrat-Test (nominal p-Wert: 0,012) und anschließend mittels Fisher-Test (nominal p-Wert: 0,008). Da sich hier ein Unterschied abzeichnete, wurde noch paarweise ein Fisher-Test durchgeführt. Dabei ergab sich bei dem Vergleich zwischen CTCL mit Juckreiz und ohne Juckreiz ein Wert von $p = 0,0886$, bei dem Vergleich von CTCL mit Juckreiz zu G ein Wert von $p = 0,3389$ und von CTCL ohne Juckreiz zu G ein Wert von $p = 0,00415$.

Der gemessene Unterschied liegt somit in der Gruppe CTCL ohne Juckreiz vs. G (adjustierter p-Wert mittels Bonferroni = 0,01245).

Es erfolgte mittels Korrelationstest (Spearman's Rangkorrelationskoeffizient) und unter Verwendung dieses Koeffizienten die Berechnung der Korrelation mit dem angegebenen Juckreizscore bei den vorhandenen Werten im CTCL Kollektiv. Dabei zeigte sich weder in dem Spearman's Rangkorrelationskoeffizient (durchschnittlicher Juckreiz: 0,3808, Juckreiz am Abnahmetag: -0,0591) noch in den nominalen p-Werten (durchschnittlicher Juckreiz: p-Wert= 0,2777, Juckreiz am

Abnahmetag: p-Wert= 0,8712) eine Signifikanz. Ebenso erfolgt wie bei dem ELISA von *R&D Systems*, auch hier die Korrelation der Höhe der Werte mit vorhandener Atopie. Es gab insgesamt sieben Werte oberhalb der Nachweisgrenze bei bekanntem Atopie-Status. Hier wurde zuerst mit einem Fisher-Test getestet, ob ein Unterschied zwischen Atopie „positiv“ und „negativ“ in der Anzahl an Werten oberhalb der Nachweisgrenze gegeben war. Der errechnete nominale p-Wert lag bei 1. Anschließend wurden nur die Werte oberhalb der Nachweisgrenze betrachtet und mit einem einseitigen Mann-Whitney-U-Test (einseitig, da hier die Vermutung ist, dass die Werte höher sind, wenn eine Atopie vorliegt) der p-Wert errechnet (nominaler p-Wert= 0,6857).

Bei der Betrachtung der Stadien mit der nachgewiesenen IL-31 Expression wurden die Stadien Ia und Ib zu I sowie die Stadien IIa und IIb zu II zusammengefasst und nur die Werte > 0 berücksichtigt, so dass Stadium I (3 Werte) und II (4 Werte) untersucht wurden.

In dem Fisher-Test zeigte sich ein Unterschied in den Anteilen der Werte oberhalb der Nachweisgrenze (nominaler p-Wert: 0,0207), so dass eine erweiterte Untersuchung mittels eines Mann-Whitney-U-Tests erfolgte. Hierbei zeigten die Werte größer 0 zwischen Stadium I und II (Stadium III hat nur einen Wert, der 0 ist und wurde deshalb nicht berücksichtigt) einen nominalen p-Wert von 0,8571 und damit keine Signifikanz.

3.2 IL-31 Nachweis in der Immunhistochemie (IHC)

Mittels immunhistochemischer Färbungen wurde untersucht, ob sich in kutanem Gewebe von CTCL-Patienten objektiverbare Unterschiede in der IL-31 Expression in Hinblick auf läsionale zu nicht-läsionalen Gewebe zeigen. Zudem wurden die Befunde mit Gewebeschnitten eines Patienten mit Prurigo nodularis, bei dem aufgrund des Pruritus ein vermehrter IL-31 Nachweis erwartet wurde, als auch mit einer gesunden Gewebeprobe, wo ein geringer IL-31 Nachweis vermutet wurde, verglichen.

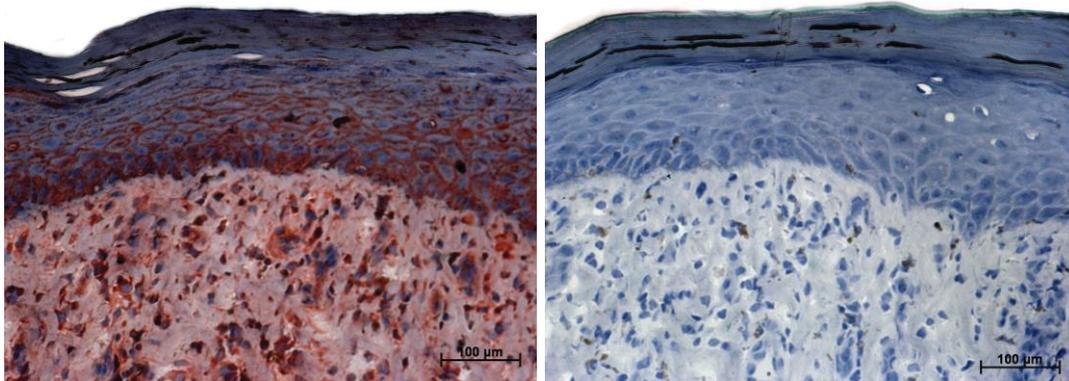


Abb. 7 (links) und 8 (rechts): **Vergleich der IL-31 Anfärbung in läsionaler MF**

Läsionale MF-Hautbiopsie mit Juckreiz mit IL-31-Färbung (links) und Isotypkontrolle der gleichen Biopsie (rechts), Gefrierschnittkonservierung, 200-fach vergrößert, Hämatoxylin-Färbung

In Abb. 7 ist die Färbung eines Probanden mit MF und Juckreiz dargestellt. Man erkennt eine mäßig starke Anfärbung der basalen Keratinozyten, die sich in den nachfolgenden Schichten zunehmend im interzellulären Raum darstellt. Des Weiteren ist eine kräftige Reaktivität der Fibroblasten in der Dermis bei mäßig starkem *Background* zu erkennen. Das Stratum corneum zeigte keine Anfärbung. Im Vergleich hierzu ist die Isotypkontrolle in Abb. 8 zu sehen. Das folgende Bild (Abb. 9) zeigt das non-läsionale Präparat desselben Probanden. Hier ist eine zytosolische Anfärbung im Bereich der Keratinozyten, Fibroblasten, als auch im Bereich der Endothelzellen der Gefäße zu erkennen. Es zeigt sich ein mäßiger *Background*.

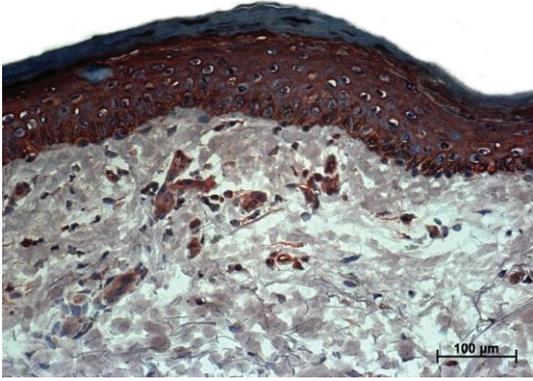


Abb. 9: IL-31 Anfärbung in non-läsionaler Haut

MF-Hautbiopsie mit Juckreiz mit IL-31-Färbung, non-läsional, Gefrierschnittkonservierung, 200-fach vergrößert, Hämatoxylin-Färbung

In Abb. 10 ist die Biopsie eines Probanden mit MF ohne Juckreiz zu sehen. Hier zeigt sich ebenfalls eine, wenn auch ab dem Stratum spinosum unvollständige, zytosolische Anfärbung der Keratinozyten sowie eine Anfärbung der Endothelzellen. Es bestand ein geringer *Background*.

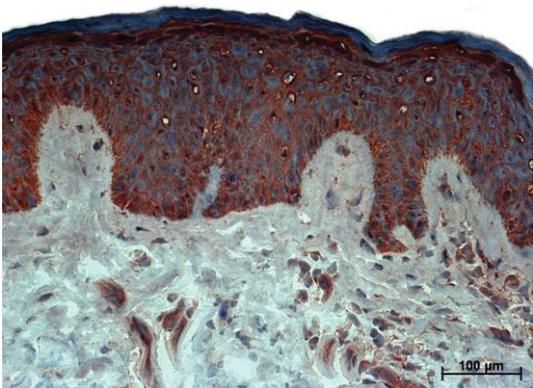


Abb. 10: IL-31 Anfärbung in nicht puriginöser MF-Biopsie

MF-Hautbiopsie ohne Juckreiz mit IL-31-Färbung, Gefrierschnittkonservierung, 200-fach vergrößert, Hämatoxylin-Färbung

Die Darstellung in Abb. 11 zeigte im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle (Abb. 12) eine schwache zytosolische Reaktion der Keratinozyten sowie der Endothelien. Im Vergleich hierzu stellte sich eine etwas kräftigere Anfärbung der Fibroblasten im dermalen Bindegewebe dar. Zudem ist in der Probe eine leichte Interfacedermatitis zu erkennen. Es bestand ein geringer *Background*.

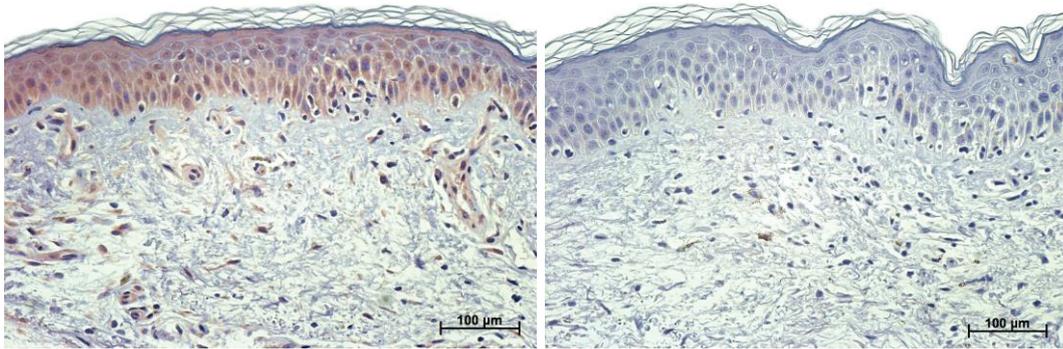


Abb. 11 (links) und 12 (rechts): **Vergleich der IL-31 Anfärbung in pruriginöser MF**
 MF-Hautbiopsie mit Juckreiz mit IL-31-Färbung links und MF-Hautbiopsie mit Juckreiz mit
 Isotypkontrolle rechts, Paraffinkonservierte Gewebeschnitte, 200-fach vergrößert, Hämatoxylin-
 Färbung

In Abb. 13 zeigt sich die Probe einer gesunden Vergleichsperson. Es lässt sich eine
 schwache Reaktivität der Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, jedoch
 ebenso des dermalen Bindegewebes erkennen.

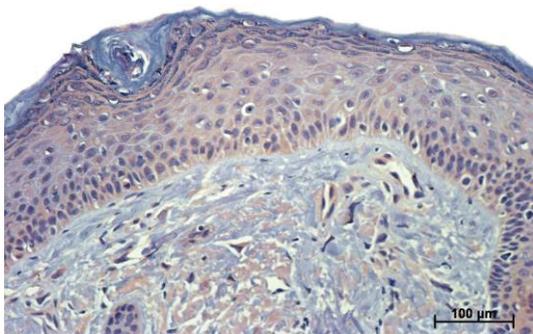


Abb. 13: **IL-31 Anfärbung in gesunder Haut**
 Gesunde Hautbiopsie mit IL-31-Färbung, Paraffinkonservierter Gewebeschnitt, 200-fach vergrößert,
 Hämatoxylin-Färbung

In Abb. 14 folgt die Probe des Prurigopatienten. Auch hier zeigt sich eine leichte
 Anfärbung der Keratinozyten und Fibroblasten. Ein Gefäßanschnitt ist in diesem
 Präparat nicht abgebildet.

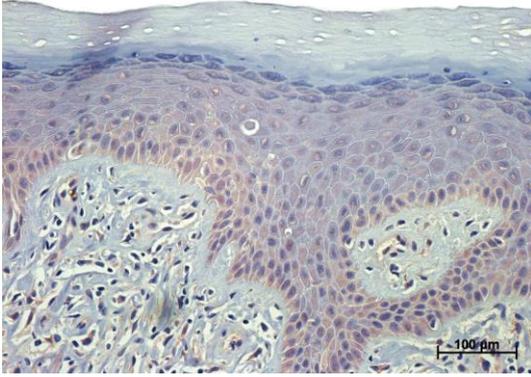


Abb. 14: **IL-31 Anfärbung in Prurigo nodularis**

Prurigo nodularis Hautbiopsie mit IL-31-Färbung, Paraffinkonservierter Gewebeschnitt, 200-fach vergrößert, Hämatoxylin-Färbung

Wie hier exemplarisch dargestellt, zeigen sich Unterschiede in der Farbintensität zwischen den CTCL-Proben und gesunder Haut, sowie der Prurigoprobe. Die angefärbten Strukturen in Epidermis und Dermis verhielten sich gleich gewichtet. Sowohl Keratinozyten und Fibroblasten als auch Endothelzellen der Gefäße wiesen eine Anfärbung des IL-31 auf.

Es fällt auf, dass die Dermis der MF und Prurigo-Probe sehr zellreich ist, so dass hier von entzündlichen Prozessen in der Hautprobe ausgegangen werden kann. Dies ist auch bei dem Vergleich der non-läsionalen zur läsionalen Probe zu erkennen (Abb. 7 und 9).

Eine Korrelation der IL-31 Anfärbung mit dem erhobenen Juckreizscore konnte in den vorliegenden Proben nicht gezogen werden.

3.3 Detektion von IL-31, IL-31R α und OSMR β mittels PCR

In der *real-time* PCR zeigte sich (Abb.15), dass bei zwei von insgesamt sechs CTCL-Proben Werte von 0,082 und 0,067 (RU) nachweisbar waren, während sich die restlichen Proben unterhalb der Nachweisgrenze befanden. In den sechs Proben der gesunden Vergleichsgruppe zeigte sich kein IL-31 Nachweis. Im erweiterten Vergleich mit Psoriasis vulgaris (PV) und atopischer Dermatitis (AD) ist zu erkennen, dass auch bei Psoriasis-Proben nur ein geringer Nachweis in einer von sechs Proben möglich war, während bei AD in fünf von sechs Proben IL-31 nachweisbar war und bis zu einem Wert von 1,265 relativen *Units* (RU) reichte (Abb.15).

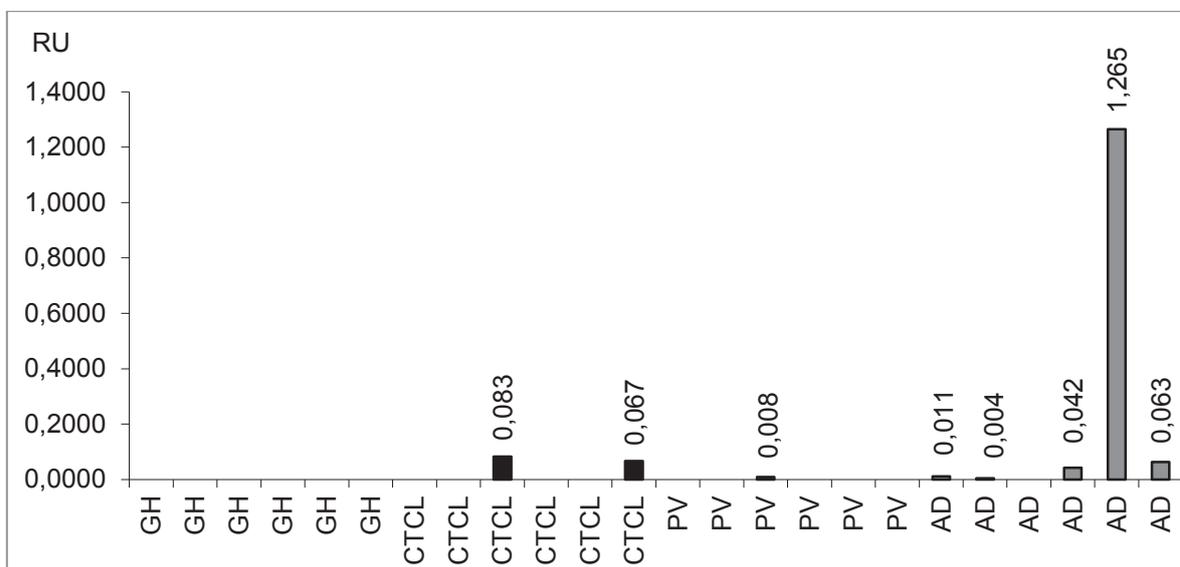


Abb. 15: **IL-31 Expression in der PCR**

IL-31 Expression in RU in den einzelnen Proben aus den Kollektiven gesunder Haut (GH), CTCL, PV und AD mittels *real-time* PCR

In dem PCR Verfahren zeigten sich IL-31 Werte von $>0,01$ RU bei 2 von 6 CTCL-Proben sowie bei 4 von 6 AD Proben. In der Gruppe der gesunden Haut, als auch bei PV waren keine Werte $> 0,01$ RU detektierbar.

Zudem wurde die Expression der IL-31 Rezeptor Untereinheiten OSMR β (Abb.16) und IL-31R α (Abb. 17) untersucht. Dies erfolgte ebenfalls in jeweils sechs Proben gesunder Haut, kutanem T-Zell-Lymphom, Psoriasis vulgaris und atopischer Dermatitis.

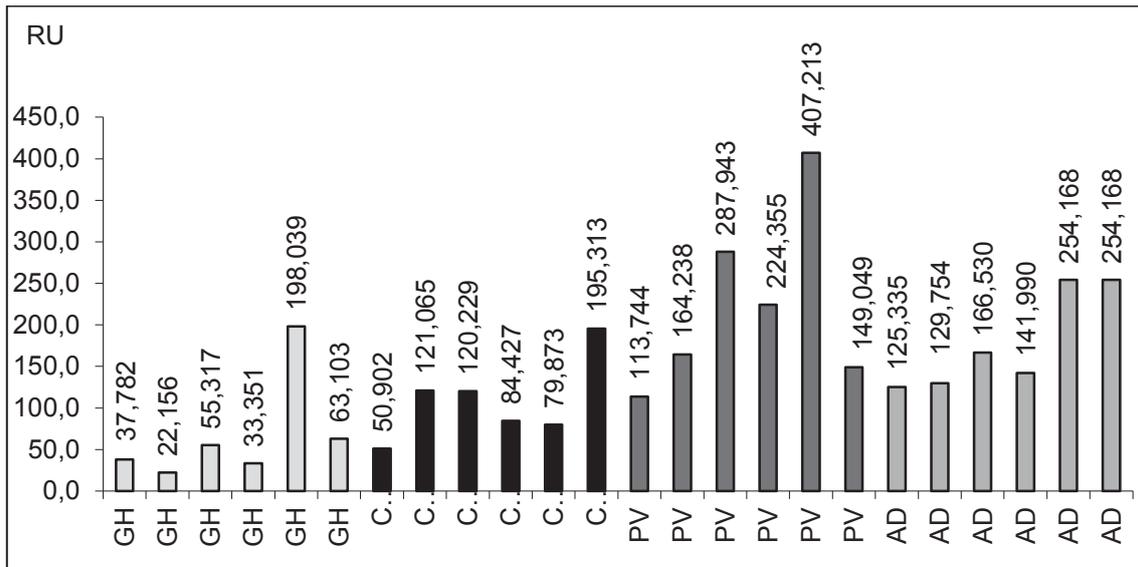


Abb. 16: **Nachweis des OSMRβ in der PCR**

OSMRβ Expression in RU in den einzelnen Proben aus den Kollektiven gesunde Haut (GH), CTCL, PV und AD, real-time PCR

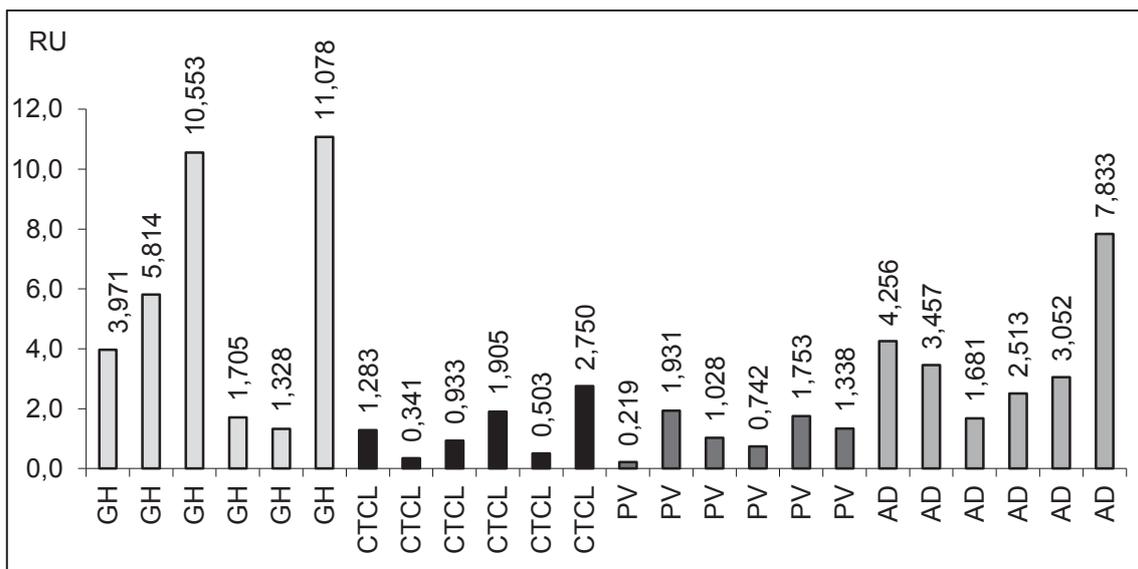


Abb. 17: **Nachweis des IL-31Rα in der PCR**

IL-31Rα Expression in RU in den einzelnen Proben aus den Kollektiven gesunde Haut (GH), CTCL, PV und AD, real-time PCR

Der OSMRβ wies Werte von 22,156 bis 407,213 RU in der Untersuchung auf. Hierbei konnten die höchsten Werte in der Gruppe PV (113,744 bis 407,213 RU) detektiert werden und danach abnehmend in AD (125,335 bis 254,168 RU), CTCL (50,902 bis 195,313 RU) und gesunder Haut (22,156 bis 198,039 RU). Die jeweiligen Mittelwerte lagen bei PV: 224,42, AD: 178,66, CTCL: 108,63 und GH: 68,29.

Beim IL-31R α konnte die höchste Konzentration in der Gruppe der gesunden Haut nachgewiesen werden, darauf in abnehmender Reihenfolge in AD, CTCL und PV.

Die jeweiligen Mittelwerte lagen bei PV: 1,17, AD: 3,8, CTCL: 1,29 und GH: 5,74.

Es erfolgte die statistische Beurteilung der Expression von IL-31, IL31-R α und OSMR β zwischen den Gruppen Gesund, CTCL, PV und AD. Bei allen Vergleichsgruppen außer AD waren nur wenige Werte von IL-31 über der Nachweisgrenze vorhanden (GH = 0, CTCL = 2, PV = 1). Deshalb wurde mittels Fisher-Test getestet, ob der Anteil an vorhandenen Werten sich zwischen den Gruppen unterscheidet. Hierbei ergab sich ein nominaler p-Wert von 0,022 und damit ein Unterschied zwischen den Gruppen.

Zur Aussage der IL-31R α -Expression wurde mit einem Kruskal-Wallis-Test ebenfalls getestet, ob es einen globalen Unterschied der Werte zwischen den Gruppen gibt (also, ob sich die Werte in mindestens einer der Gruppen von den Werten in den anderen Gruppen unterscheiden). Der nominale p-Wert war hier ebenfalls signifikant (p-Wert= 0,0105). Ebenso stellte sich dieselbe Untersuchung bei OSMR β dar (p-Wert= 0,00988).

Um genauere Aussagen darüber zu machen, in welcher der Gruppen sich der Unterschied zeigte, erfolgte für beide Rezeptoreinheiten eine weitere Analyse mittels Mann-Whitney-U- Test. Zur Überprüfung bei der IL-31 Expression waren für diese Untersuchung nicht ausreichend Werte >0 vorhanden.

Nach Adjustierung der Werte mittels Bonferroni blieb lediglich ein signifikanter p-Wert bei OSMR β zwischen PV und GH (p-Wert= 0,04545).

In CTCL ist der IL-31R α nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Hier wurde noch einmal in IL-31R α -SF (*Short-Form*) und -LF (*Long-Form*) in MF-Proben unterschieden (Abb. 18).

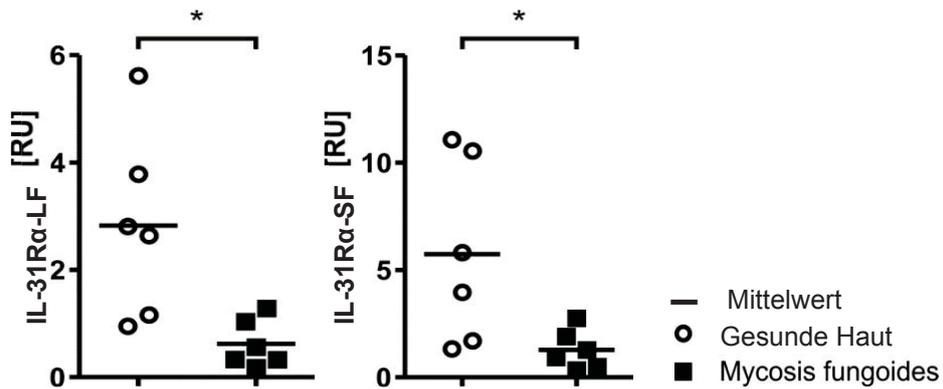


Abb. 18: **Expression der Untereinheiten des IL-31R α**

Darstellung der beiden Varianten des IL-31R α , IL-31R α -LF und IL-31R α -SF, in jeweils 6 Proben MF und gesunder Haut mittels real-time PCR in RU mit Darstellung des Mittelwertes

Bei der Untersuchung des IL-31R α -LF befanden sich die Werte der MF-Patienten im Bereich bis <2 RU und bei der Detektion des IL-31R α -SF im Bereich <5 RU, während in der Gruppe der gesunden Probanden beim IL-31R α -LF 4 von 6 Werten >2 RU und bezüglich des IL-31R α -SF 3 von 6 Proben >5 RU betragen.

Der Mittelwert der gesunden Haut lag sowohl bei IL-31R α -LF mit 1,8 (RU) als auch beim IL-31R α -SF mit 2,8 (RU) oberhalb des maximalen Wertes aus dem MF-Kollektiv.

4. Diskussion

IL-31 stellt sich insbesondere aufgrund des Nachweises seiner Rezeptorbestandteile auf nozizeptiven Neuronen als mögliche Verbindung zwischen Immunsystem und Nervensystem im Hinblick auf Pruritus dar [6-9] [12]. Aufgrund der Daten aus den Untersuchungen zu atopischer Dermatitis, wo erhöhte IL-31 Spiegel nachgewiesen [19] [22] und in Zusammenhang mit Krankheitsaktivität und –Stadium gebracht werden konnten [2, 19, 21-23], wird dieser Verdacht erhärtet und auch andere entzündliche Dermatosen und pruriginöse Erkrankungen, wie die CTCLs, rücken in den Fokus weiterer Untersuchungen. Ziel dieser Studie war es, die Bedeutung von IL-31 in Hinblick auf die Entwicklung und Stärke von Juckreiz in CTCL genauer zu untersuchen.

Betrachtet werden sollte hierzu der systemische Nachweis von IL-31, aber auch das lokale Vorkommen in non- und läsionaler Haut von CTCL-Patienten, um eine mögliche Differenz oder Kohärenz aufzuzeigen und deren Bedeutung in Hinblick auf die vorliegende Klinik des jeweiligen Probanden (Stadium, Juckreiz) zu interpretieren.

Hierzu wurden Serumproben von CTCL Patienten mit und ohne Juckreiz im Vergleich zu gesunden Probanden mittels ELISA untersucht. Darüber hinaus erfolgten immunhistochemische Untersuchungsverfahren sowie PCR Analysen an Probebiopsien.

4.1 IL-31 Nachweis mittels ELISA zeigt sich vielgestaltig

Die bisherigen Untersuchungen von IL-31 im Serum mittels ELISA zeigten bei Ohmatsu *et al.* unter Verwendung des ELISAs von Abnova (Taipai City, Taiwan) einen erhöhten Serumspiegel bei CTCL-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und sogar AD-Patienten und wurden aufgrund der Assoziation zu sIL-2R und LDH auch in Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität und einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium gesehen [42]. Im Gegensatz hierzu stehen die Resultate aus der Studie von Möbs *et al.*, in der kein signifikanter Zusammenhang zwischen IL-31 Expression bei MF oder SS Patienten gesehen werden konnte und ebenso kein Unterschied in den Stadien der Erkrankung [55]. Bezüglich des Zusammenhangs zu Pruritus zeigt die Studie von Cedeno-Laurent *et*

a). eine positive Korrelation zwischen Reduktion des Juckreizes und IL-31 Expression [44]. Diese Datenlage unterstützt die Studie von Singer *et al.* in der 14 von 26 CTCL-Patienten mit Juckreiz detektierbare IL-31 Serumspiegel hatten, während bei 13 von 14 CTCL-Patienten ohne Juckreiz kein IL-31 detektierbar war (Detektionsgrenze 7,8 pg/ml) [43]. Dem gegenüber stehen Studien, in denen sich kein Zusammenhang zwischen Juckreiz und IL-31 Serumspiegel zeigte [56] und der Unterschied in der IL-31 Expression zwischen den untersuchten Gruppen (stark, moderat, kein Juckreiz) nicht signifikant war ($p= 0,0587$) [55]. Jedoch fiel hier, anders als in den Untersuchungen dieser Arbeit, insgesamt ein erhöhter Serumspiegel zwischen CTCL-Proben und Proben der gesunden Vergleichspersonen auf [56], während die hier gewonnenen Daten einen leicht erhöhten Mittelwert der gesunden Probanden gegenüber dem CTCL-Kollektiv mit Juckreiz zeigten ($G= 14.416,67$ pg/ml zu CTCL mit Juckreiz= 14.082,8 pg/ml).

Da bei AD erhöhte IL-31 Spiegel nachgewiesen wurden [19] [22], erfolgte daher noch einmal die Unterteilung der gesunden als auch der CTCL-Patienten anhand der anamnestischen Angaben zur Atopie. Allerdings konnte auch unter Berücksichtigung dieses Kriteriums kein korrelierbarer Zusammenhang zu den erhöhten ELISA-Resultaten festgestellt werden.

Aufgrund dessen, dass ein erhöhter IL-31 Spiegel in einem gesunden Kollektiv nicht vorbeschrieben war, wurde in dieser Arbeit, trotz adäquater Durchführung des ELISAs auf Grundlage der Negativ- und Positiv-Kontrollen, eine Wiederholung der Testreihe mit den identischen Serumproben durchgeführt. Es zeigte sich darauf eine Wertedivergenz, die aber erneut keine signifikanten Ergebnisse bezüglich der Gruppen ergab und auch nicht repetierbar in der dritten Testwiederholung war.

Es stellte sich daher die Frage, ob hier abweichend von der bisherigen Studienlage ein erhöhtes IL-31 im gesunden Kollektiv detektiert wurde oder es bisher nicht berücksichtigte Einflussfaktoren für falsch positive Werte gab. Wie oben beschrieben, ergab sich nach Auswertung der atopischen Diathese anamnestisch keine Komorbidität der Probanden, die eine Erhöhung des IL-31 erklärte.

Insbesondere aufgrund der schwankenden Werte bei der Untersuchung der identischen Proben, blieb die Frage, ob eine Störquelle innerhalb des ELISAs für falsch positive Resultate vorgelegen haben könnte. Dabei entstand, insbesondere durch die vielen und stark positiven Resultate, der Verdacht auf eine Interaktion mit heterophilen Antikörpern (AK).

Heterophile Antikörper sind im menschlichen Serum enthaltene Immunglobuline, die ein falsch negatives, zumeist aber ein falsch positives Ergebnis von Immunoassays und damit auch von ELISA-Testungen hervorrufen können [45]. Dabei kann es sich um unspezifische AK handeln, die auf natürliche Weise durch die AK-Produktion anfallen, wie beispielsweise der Rheumafaktor (RF) oder um durch Tierkontakt oder über die Ernährung gebildete Anti-Tier-AK [46]. In der klinischen Chemie ist es daher ein stetes Bemühen, das Interagieren der heterophilen AK in Immunoassays und damit falsch positive Ergebnisse aufzudecken und zu reduzieren [47]. Die Effekte heterophiler AK sollen durch die Entwicklung inhibierender Substanzen, Fällung mittels Polyethylenglycol (PEG) [48], Verdrängung mit unspezifischen Tier-Immunglobulin oder Entfernung der Fc-Domäne durch abfangende Substanzen reduziert werden [49] [50].

Daher wurde ein verfeinertes Untersuchungsverfahren zur Detektion des IL-31 mittels des Simoa™ ELISAs (*BMS-ZymoGenetics*, WA, USA/ *Quanterix*, MA, USA) hinzugezogen. Zur Reduktion unerwünschter Interaktionen wurde hierbei das *Immunoglobulin Inhibiting Reagent* (ITT) verwendet. Es handelt sich dabei um einen heterophilen Antikörperblocker, der durch eine hohe Bindungsaffinität die heterophilen Antikörper bindet und dadurch ihren Einfluss auf das Detektionsergebnis minimiert. In diesem ELISA-Verfahren (*BMS-ZymoGenetics*, MA, USA) zeigten die CTCL-Proben kaum detektierbare Werte, dafür waren in der gesunden Vergleichspopulation 10 von 33 Proben über dem *cut-off* von 0,1 pg/ml. Insgesamt fielen nur geringe Detektionswerte von maximal 0,5814 pg/ml auf. Dies trifft auch auf die Proben zu, welche in dem ELISA von *R&D Systems* zuvor deutlich positive Werte aufwiesen (Tabelle 2).

Patient	Simoa™ ELISA	R&D Systems ELISA
CTCL #2	0	12008
CTCL #3	0,0031	0
CTCL #4	0	0
CTCL #5	0	42592
CTCL #6	0,0090	0
CTCL #7	0	405
CTCL #9	0,0054	45705
CTCL #10	0	0
CTCL #11	0,0132	2290

Tabelle 2: **Vergleich der ELISA Ergebnisse beider Testverfahren**

Patientenbezogener Vergleich der ELISA-Werte für IL-31 (pg/ml) im Vergleich Simoa™ ELISA und ELISA von R&D Systems (Werte von April 2010)

Es ist daher von einer effektiveren Blockierung vorhandener, heterophiler Antikörper auszugehen, so dass in dem verfeinerten Testverfahren von Simoa™ ELISA (*BMS-ZymoGenetics, WA, USA/ Quanterix, MA, USA*) mehr Antikörperreaktionen verhindert werden konnten und somit weniger falsch positive Ergebnisse auftraten.

4.2 Histologisch weist IL-31 wenig Korrelation zu CTCL auf

Bei der Betrachtung der Histologie wurde der Vergleich zwischen gesunder Haut und CTCL mit und ohne Juckreiz sowie der Vergleich zwischen non- und läsionalen Proben gezogen. Wohl wissend, dass aufgrund der geringen Probenzahl kein aussagekräftiger Vergleich zwischen den Gruppen gezogen werden kann, wurden die Proben als unterstützende Untersuchung zu IL-31 in den Geweben begutachtet und repräsentativ in dieser Arbeit gezeigt.

Exemplarisch konnte dargestellt werden, dass Unterschiede in der Farbintensität bei der Anfärbung des IL-31 zwischen den CTCL-Proben und gesunder Haut, sowie der Prurigoprobe bestanden. Jedoch zeigten sich die angefärbten Strukturen in Epidermis und Dermis vergleichbar. Keratinozyten und Fibroblasten wiesen eine Anfärbung des IL-31 auf. Ebenso die Endothelien kleiner, angeschnittener Gefäße wie auch das dermale Bindegewebe in der gesunden Vergleichsprobe fielen mit einer geringen Reaktivität auf, während im Bereich der Interface-Dermatitis in MF mit Juckreiz (Abb. 11) kein vermehrter Nachweis von IL-31 ersichtlich war. Zu beachten ist, dass bei der starken Anfärbung in der MF Probe bei Abb. 7 auch ein ausgeprägter *Background* im Bindegewebe zu erkennen war. Wird dieser

berücksichtigt, ist die Farbintensität vergleichbar mit den anderen CTCL-Proben und damit auch der non-läsionalen Gewebeprobe. Auch die Reaktivität der Endothelien und des Bindegewebes in der gesunden Vergleichsprobe war nicht sicher als spezifisch zu werten. Eine Expression von IL-31 in Endothelien kleiner Gefäße wurde bisher noch nicht beschrieben. Jedoch befindet sich an diesen Endothelien der IL-31 Rezeptor IL-31R α [51], so dass die Vermutung besteht, dass rezeptorgebundenes IL-31 durch den Antikörper detektiert wurde und die Anfärbung verursacht hat.

Eine weitere Frage entsteht bei dem Vergleich der Gefrierschnitt konservierten CTCL-Proben, da hier in MF mit Juckreiz (Abb. 7) bereits im Stratum basale und diskret in MF ohne Juckreiz (Abb. 10) im Stratum spinosum beginnend, eine unvollständige zytosolische Färbung zu erkennen war. In den nachfolgenden Schichten in Abb. 7 verlagert sich die Färbung zunehmend in den Interzellarraum. In wie weit für diesen Unterschied die Art der Konservierung des Materials oder Fixierung ursächlich sind oder es sich um Artefakte handelt, ist im Hinblick auf die geringe Anzahl vergleichbarer Proben nicht sicher zu eruieren. In den Paraffin konservierten Schnitten zeigte sich konstant eine zytosolische Färbung in den Keratinozyten.

Bisher wurde IL-31 in T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten nachgewiesen [1] [52].

Bereits in histologischen Untersuchung bei AD in der Studie von Nobbe *et al.* zeigte sich in der Immunhistochemie von IL-31 (*R&D Systems*, Abingdon, UK) und IL-31R α (*ZymoGenetics*, Seattle, USA) eine deutlich erhöhte Anfärbung in infiltrierenden Entzündungszellen [53]. Hierzu wurden mehrere Proben von Patienten mit AD, Alopecia areata, Pruritus sine materia, Prurigo nodularis (ohne atopische Diathese), Psoriasis vulgaris, MF (ohne Juckreiz) und SS (starker Juckreiz) vor Therapiebeginn entnommen und nach klassischem histologischen Bild vorselektiert [53]. Bis auf Pruritus sine materia (2) und Sézary Syndrom (4) wurden 5 Proben je Krankheitsbild untersucht [53]. Als gesunde Haut wurden, wie in der Vergleichsprobe unserer Studie, periläsionale Haut aus Nachexzisionen des Sicherheitsabstandes bei Hauttumoren genutzt, wobei die Anamnese zu Juckreiz und Hauterkrankungen leer war [53]. 87% der Proben waren positiv auf IL-31, wobei in der Epidermis keine zuverlässige Anfärbung von IL-31 gelang [53].

Auch hier zeigten sich, ähnlich wie in unseren Proben, besonders bei der Färbung mit dem IL-31-AK Probleme mit *Background* Reaktionen, die eine Beurteilung der Anfärbung erschwerten [53].

IL-31 zeigte sich hier besonders in infiltrierenden lymphatischen Zellen positiv, wobei eine dominierend zytoplasmatische Reaktion vorlag [53].

Verglichen mit allen oben benannten Dermatosen wurde lediglich bei AD ein signifikant erhöhter IL-31 Nachweis gefunden. Es war keine Assoziation zu anderen puriginösen Dermatosen, insbesondere nicht bei MF oder SS feststellbar [53].

Die Rezeptoruntereinheiten OSMR β und IL-31R α zeigten sich in Keratinozyten homogen mit <5% Immunreaktivität in allen untersuchten Gruppe ohne signifikanten Unterschied nachweisbar [53].

In der aktuellen Studie von Nattkemper hingegen wurden mittels Immunfluoreszenzfärbungen IL-31 und IL-31R α (Abcam, Bristol, UK) und OSMR β (Santa Cruz, Dallas, Texas) in der Epidermis betroffener Hautareale von CTCL-Patienten vermehrt nachgewiesen [54]. IL-31 zeigte sich dabei in der Epidermis und in dermalen Lymphozyteninfiltraten nachweisbar und bei CTCL signifikant erhöht, während in gesunder Haut eine deutlich geringer Anfärbung der Epidermis zu verzeichnen war und kaum bis gar keine Anfärbung dermal bestand [54]. Ebenso wurde hier ein Zusammenhang zwischen IL-31 Expression zu der angegebenen Juckreizstärke verzeichnet [54]. IL-31R α und OSMR β waren beide signifikant in CTCL mit Juckreiz nachweisbar [54]. Dabei waren die höchsten Messungen in CTCL mit moderatem bis starkem Juckreiz, darauf in CTCL mit mildem Juckreiz und in geringster Dichte in gesunder Haut epidermal und in infiltrierenden Lymphozyten nachweisbar [54].

Die epidermalen Schmerzfasern wurde ebenfalls untersucht und zeigten keinen Unterschied in den Gruppen [54]. Zudem wurde IL-31 nicht in der Nähe afferenter Nervenfasern detektiert [54]. Auch eine Assoziation zu den CTCL-Stadien wurde hier nicht gefunden [54]. Jedoch fehlt in dieser Studie die Untersuchung von CTCL Patienten ohne Juckreiz und es lagen im Vergleich zu dieser Studie eher fortgeschrittene Stadien (12 Stadium IV von 22 CTCL-Patienten) vor [54].

Insgesamt lassen sich die Resultate der hier durchgeführten Untersuchungen eher mit den Ergebnissen der Studie von Nobbe *et al.* in Einklang bringen. Auch in unseren Untersuchungen konnte eine Anfärbung von IL-31, unter anderem aber auch in Keratinozyten, gezeigt werden, jedoch spiegelten sich in den vorliegenden

Präparaten zwischen den Gruppen gesunde Haut, MF mit und MF ohne Juckreiz keine objektivierbaren, krankheitsspezifischen Unterschiede wider und es ist ebenfalls keine Korrelation der IL-31 Anfärbung mit dem erhobenen Juckreizscore festzustellen.

4.3 IL-31 zeigt sich in der PCR bei AD erhöht, nicht aber in CTCL

Der geringe IL-31 Nachweis setzte sich auch in den PCR Untersuchungen fort. Die Resultate der IL-31 Untersuchung der Biopsien wiesen lediglich zwei im Messbereich liegende Werten bei CTCL auf (0,083 RU und 0,067 RU). Die restlichen vier CTCL-Proben lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Ebenso zeigte sich keine Signifikanz bei der Expression der Rezeptorbestandteile. Die jeweiligen Mittelwerte für IL-31R α lagen bei CTCL bei 1,29 RU, wo hingegen der Wert in GH bei 5,74 RU lag. Die jeweiligen Mittelwerte lagen bei OSMR β für CTCL bei 108,63 RU und für GH bei 68,29 RU.

Es erfolgte die statistische Beurteilung der Expression von IL-31, IL31-R α und OSMR β zwischen den Gruppen Gesund, CTCL, PV und AD. Zunächst wurde überprüft, ob ein Unterschied zwischen den Gruppen vorliegt. Nachdem sich dies bestätigte, erfolgte anschließend die Untersuchung der als signifikant detektierten Unterschiede.

Bei der IL-31 Expression konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (p-Wert= 0,022). Aufgrund der hohen Anzahl positiver Ergebnisse des IL-31 in der Gruppe mit AD (5/6) im Vergleich zu den anderen Gruppen (GH = 0, MF = 2, PV = 1), ist der signifikante Nachweis allerdings in dem Kollektiv der AD und nicht in dem der CTCL zu sehen. Aufgrund der wenigen Werte oberhalb der Nachweisgrenze konnte in CTCL keine positive Korrelation festgestellt werden.

Bezüglich der Expression der Rezeptoruntereinheiten erfolgte die Testung eines globalen Unterschieds zunächst mittels Kruskal-Wallis-Test. Dieser zeigte sich in beiden Fällen signifikant.

Da sich ein Unterschied abzeichnete, wurde anschließend jede der Patientengruppen gegen die Kontroll-Gruppe (GH) mit einem zweiseitigem Mann-Whitney-Test getestet. Für die CTCL ergab sich ein signifikanter Unterschied bei IL-31R α , OSMR β war nicht signifikant. Allerdings ist unter Einbezug der Werte der Grund für den Unterschied der IL-31R α Detektion auf Seiten der Gruppe GH zu sehen, da in

der Gruppe der CTCL-Patienten kaum Werte detektierbar waren. Diese Arbeit interpretiert den statistischen Unterschied daher in Hinblick auf eine höhere IL-31R α Expression in der gesunden Population im Vergleich zu den CTCL Patienten.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in der Studie von Möbs *et al.*, die T-Zellen von CTCL Patienten untersuchte [55]. Weder IL-31 war hier erhöht, noch der IL-31R α [55]. Aber auch hier zeigte sich in einer anderen Studie wiederum ein signifikanter Zusammenhang zwischen IL-31 Reduktion und Juckreizabnahme bei CTCL Patienten (Stadium IIIB bis IV) [44] sowie in der Untersuchung von Singer *et al.*, in der IL-31 Spiegel von PBMCs von CTCL-Patienten signifikant erhöht zur gesunden Vergleichsgruppe waren und in Assoziation zum angegebenen Juckreizscore am Abnahmetag standen [43].

4.4 Diskussion der heterogenen Nachweise von IL-31

Zusammenfassend zeigt sich eine heterogene Studienlage bezüglich der Untersuchungen auf IL-31 sowohl mittels ELISA, als auch in der IHC und PCR.

Da in den hier durchgeführten Experimenten keine erhöhten Spiegel von IL-31 in kutanen T-Zell-Lymphomen gefunden werden konnten, besteht die Frage, wie dies mit den publizierten Daten zu vereinbaren ist, die eine Assoziation zu IL-31 Expression und CTCL beziehungsweise Juckreiz gesehen haben.

Es entstand die Vermutung, dass die unspezifischen Erhöhungen bei verschiedenen Patienten in dem ersten ELISA-Verfahren dieser Testreihe auf heterophile AK zurückzuführen waren und sich durch deren Ausschaltung im zweiten Verfahren falsch positive Ergebnisse deutlich reduzieren ließen. Einschränkend muss betont werden, dass jedoch kein direkter Nachweis heterophiler AK durchgeführt wurde. Nichtsdestotrotz besteht die Überlegung, ob auch in anderen Studien möglicherweise heterophile AK die Ergebnisse beeinflusst haben könnten. Diese Überlegung wird insbesondere dadurch interessant, da auch in der Studie von Cedeno-Laurent *et al.* [44], wo eine positive Korrelation zwischen Reduktion des Juckreizes und IL-31 Expression gesehen wird, ein IL-31-Antikörper von *R&D Systems* verwendet wurde. In der Untersuchung von Ohmatsu *et al.* wurde der ELISA von Abnova verwendet, der laut Herstellerinformation aber einen Bestandteil zur Hemmung heterophiler Antikörper besitzt [42].

In der Studie von Malek *et al.* [56] hingegen wurde der ELISA von Bender *MedSystems* GmbH (Wien, Österreich) verwendet und hier zeigte sich kein

Zusammenhang zwischen Juckreiz und IL-31 Serumspiegel. Wie bereits oben genannt, war aber insgesamt ein erhöhter Serumspiegel bei CTCL-Proben im Vergleich zu gesunden Vergleichspersonen festzustellen [56].

In einer weiteren Studie von Möbs *et al.* in der ein ELISA-Verfahren von *eBioscience* (Frankfurt, Germany), dem Bender *MedSystems* GmbH angehört, genutzt wurde, konnte ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang zwischen IL-31 Expression bei MF oder SS Patienten und ebenso kein Unterschied in den Stadien der Erkrankungen gesehen werden [55]. Hier waren auch weder die IL-31 mRNA Expression, noch die Rezeptoruntereinheiten (OSMR β und IL-31R α) in einer signifikant erhöhten Konzentration im Vergleich zu der Kontrollgruppe gesunder Probanden nachweisbar [55].

Relativierend ist anzumerken, dass zumindest nach Produktinformation des humanen IL-31 ELISAs (*eBioscience*, Frankfurt, Germany), auch dieser ELISA keinen Bestandteil zur Hemmung heterophiler Antikörper wie der Simoa™ ELISA enthält, so dass zumindest keine gezielte Unterbindung in Hinblick auf die Interaktion mit heterophilen Antikörpern vorliegt.

Bei Betrachtung der verschiedenen Studienergebnisse fallen des Weiteren unterschiedliche Serumspiegel des nachgewiesenen IL-31 beim Vergleich der Mittelwerte auf. Während in der Studie von Ohmatsu *et al.* IL-31 Werte von $0,94 \pm 0,28$ pg/ml (G) zu $3,19 \pm 0,74$ pg/ml (CTCL) vorlagen [42], wurden in den Untersuchungen von Singer *et al.* $11,47$ pg/ml (CTCL ohne Juckreiz) zu $88,32$ pg/ml (CTCL mit Juckreiz) nachgewiesen, womit ein mehr als dreifacher Wert bei Singer *et al.* vorliegt [43]. Die Werte von Ohmatsu *et al.* [42] sind eher vergleichbar mit den Ergebnissen von Malek *et al.* ($0,208$ pg/ml (G) zu $3,802$ pg/ml (CTCL gesamt), $3,680 \pm 0,462$ pg/ml (CTCL ohne Juckreiz) zu $3.714 \pm 0,495$ pg/ml (CTCL mit Juckreiz)) [56]. Es ist somit auch fraglich, wie diese Schwankungen von $3,19$ pg/ml bis zu $88,32$ pg/ml in den untersuchten CTCL-Kollektiven zu erklären sind und ob auch hier ein Zusammenhang zu dem jeweils verwendeten ELISA-Verfahren besteht.

Während bei AD eine vermehrte IL-31 Expression fast einheitlich beschrieben wird [6] [19-24], ist auch in der Untersuchung bei Prurigo nodularis eine Divergenz der Ergebnisse zu bemerken. Während Nobbe *et al.* in der IHC keinen Nachweis fanden, wurde bei Sonkoly *et al.* in Prurigo nodularis die höchste Expression beschrieben [6] [53]. Die Überlegung der Autoren in der Studie von Nobbe *et al.* ging dahin, dass durch die fehlende Berücksichtigung einer vorliegenden Atopie der

Prurigo-Patienten in der Untersuchung von Sonkoly *et al.* möglicherweise positive Ergebnisse zustande kamen, die nicht spezifisch der Prurigo-Erkrankung zuzuordnen waren [53]. Zwar wurde eine atopische Diathese in den gesunden Vergleichsgruppen zumeist berücksichtigt, jedoch nicht innerhalb der CTCL-Kollektive [42] [43] [44]. Somit ist dies auch in Hinsicht auf CTCL ein möglicher Aspekt für positive Resultate in der IL-31 Detektion. Des Weiteren ist zu beachten, dass in den Studien mit positiver IL-31 Korrelation zumeist fortgeschrittene Stadien untersucht wurden (Singer *et al.*: Stadium IIIA-IVA, Cendo-Laurent *et al.*: Stadium IIIB-IVA), während in denen ohne signifikanten Zusammenhang eher frühe Stadien im CTCL-Kollektiv vorlagen (Möbs *et al.*: IB=9, IIB=4, III=3, SS=19, Malek *et al.*: IA=21, IB=24, IIB=8, III=4, IV=5) [43] [44] [55] [56]. Eine Ausnahme stellt die Studie von Ohmatsu *et al.* (I= 21, II= 7, III=2, IV=8) dar, wo aber erst die Resultate von CTCL Stadium II einen signifikanten Unterschied zur gesunden Vergleichsgruppe zeigten [42].

Einen einheitlichen Nachweis über IL-31 in CTCL gibt es aktuell nicht und seine Bedeutung in der Entstehung von Juckreiz in CTCL scheint somit auch unter Berücksichtigung der oben genannten Studien nicht eindeutig.

4.5 Weitere potentielle Faktoren zur Entwicklung von Pruritus

Da IL-31 zumindest nicht alleinig für Pruritus verantwortlich zu machen ist, bleibt die Frage, welche Faktoren noch für die Entstehung von Juckreiz relevant sein könnten, insbesondere weitere Interleukine und Chemokine.

Im Hinblick auf die Interleukine wurden beispielsweise IL-4, -13 und -10 untersucht. Ein Tiermodell zeigte bei epidermal IL-4 exprimierenden Mäusen die Entwicklung von atopie-ähnlichen, juckenden Hautläsionen [57]. In einem weiteren Mausmodell zeigten Zhen und Koautoren auf, dass IL-13 zur Generierung und Unterhaltung einer T_H2-dominierten Hautentzündung im Sinne einer atopischen Dermatitis beiträgt [58].

Beim Menschen konnte die IL-10 Expression in Korrelation zu den MF-Stadien gesetzt werden, in dieser Studie wurde jedoch die Ausprägung von Juckreiz nicht untersucht [59].

Ein anderer Ansatz ist die Untersuchung von Juckreiz in MF und SS im Hinblick auf den *nerve growth factor* (NGF), *chemokine (C-C motif) ligand* (CCL) 1, -26, LDH

und IgE [41]. Hierbei zeigte sich eine Korrelation zwischen NGF und Juckreiz speziell bei SS, sowie CCL1, -26, LDH und IgE und Juckreiz allgemein in CTCL. Es wird sogar ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und den erhöhten Serumspiegeln von den Liganden CCL1 und -26 in CTCL vermutet [41].

NGF beeinflusst die Entwicklung des peripheren Nervensystems und die kutane Innervation und gilt als wichtiger Faktor in der Entwicklung von Pruritus [60]. Jedoch konnte z.B. in der AD kein Zusammenhang zwischen NGF und Juckreiz hergestellt werden [61].

CCL1 ist ein T_H2 -assoziiertes Chemokin, das sich bereits in der AD erhöht zeigte [62]. Seine Verbindung zu T_H2 -gewichteten Erkrankungen begründet sich durch den korrespondierenden Rezeptor, den Chemokinrezeptor (CCR) 8 [63], der nur von T_H2 -Zellen und nicht von T_H1 -Zellen gebildet wird [64].

CCL26 wurde in Hinblick auf Asthma untersucht und konnte als potentieller Biomarker für T_H2 -induziertes, eosinophiles Asthma eingestuft werden [65].

IgE weist ebenfalls eine T_H2 -Assoziation auf [66] und konnte in der AD mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert werden [67]. Bereits in der Vergangenheit zeigte es sich in CTCL erhöht [68], auch wenn in MF kein Zusammenhang zwischen Stadium oder Therapieerfolg gesehen werden konnte [69].

Fraglich ist, ob LDH in diesem Zusammenhang als Indikator für die Tumoraktivität im Sinne des Zellumsatzes zu interpretieren ist oder ob es einen spezifischen Zusammenhang zu Juckreiz gibt.

In einer Studie von Raap *et al.* wurde festgestellt, dass bei Atopikern eine Apoptosehemmende Wirkung und ein verlängertes Überleben bei eosinophilen Granulozyten durch Substanz P erfolgt [70]. In einer weiteren Arbeit zu verschiedenen Formen von Hautkrebs (166 Basalzellkarzinome, 146 Plattenepithelkarzinome, 27 Melanome) konnte der Grad der Entzündung und das Vorkommen von Eosinophilen in eine signifikante Assoziation zu Juckreiz gestellt werden [71]. Somit könnte Substanz P ebenfalls ein relevanter Trigger für Juckreiz sein [72]. Klinisch konnte in einem Fallbericht eine erfolgreiche antipuriginöse Therapie mittels Hemmung des Rezeptors für Substanz P durch den Neurokinin-1 Rezeptor Antagonisten Aprepitant bei einem frühen MF-Stadium gezeigt werden [73].

Auffällig ist bei all diesen Untersuchungen, dass es sich fast ausschließlich um T_H2 -assoziierte Parameter handelt.

Hierzu ist die Beobachtung interessant, dass in CTCL in der Vergangenheit eine T_H2 -Dominanz beschrieben wurde, die mit einer Unterdrückung der T_H1 -Immunantwort einhergeht [59] [68] [74] [75] [76] [77]. In einer älteren Studie von Saed zeigte sich dies in Hautproben von Sézary-Patienten mit erhöhtem Nachweis von IL-4, -5 und -10 [74]. In einer aktuelleren Studie wurden Zelllinien von CTCL-Patienten untersucht [78]. Dabei zeigten die CTCL-Zelllinien, die zu einem Großteil von Patienten mit fortgeschrittenen Stadien gewonnen wurden, erhöhte STAT6-Expressionen, welche wiederum mit T_H2 -Markern korrelierten, während hingegen STAT4- und T_H1 -Marker kaum oder gar nicht nachweisbar waren [78].

Allerdings findet sich in der MF, gerade in frühen Stadien (Patch-/ Plaquestadien), ein uneinheitliches Zytokinprofil [79] [80], in Hautbiopsien (Plaquestadien) wird sogar eher ein T_H1 -gewichtetes Zytokinprofil (IL-2, IFN- γ) beschrieben [74]. Als mögliche Erklärung wird vermutet, dass eine überschießende T_H1 -Antwort als Reaktion auf das T-Zell-Lymphom erfolgt, um dies über eine Immunantwort zu bekämpfen [81] [82]. Hierzu würde die Anwesenheit von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) in der Epidermis passen, welche nachweislich T_H1 -Zytokine exprimieren [75] [79]. In einer Studie zu leukämischen CTCL wurde eine T_H2 -Tendenz in den malignen T-Zellen zuletzt weiterhin unterstützt [76]. Auch benigne T-Zellen wiesen bei diesen Patienten eine erhöhte T_H2 -Tendenz und eine erniedrigte Produktion von T_H1 -Zytokinen auf [76]. Interessanterweise wurde beobachtet, dass diese aus dem Serum isolierten, benignen T-Zellen in vitro ein vermehrtes T_H1 -Profil zeigten, während T-Zellen von gesunden Spendern in Gegenwart der malignen T-Zellen ebenfalls eine reduzierte Expression von T_H1 -Zytokinen aufwiesen [76]. Durch Antikörper gegen IL-4 bzw. -13 konnte diese Suppression bei den gesunden Spenderzellen wieder aufgehoben werden [76]. Es wird hier, wie auch in weiteren Studien [59] [81], ein Überlebensvorteil der entarteten T-Zellen durch eine effiziente Hemmung der T_H1 -Antwort und damit Tumorbekämpfung vermutet, so dass eine globale T_H2 -Zytokindominanz erfolgt, welche auch Juckreiz begünstigt [76]. Daher wird z.B. in dieser Studie eine Reduktion der T_H2 -Zytokine und eine Stimulation der T_H1 -Antwort empfohlen, z.B. mittels IL-4 und IL-13 Antagonisten [76].

Die Frage ist, in wieweit dies signifikante Parameter für die Entwicklung und Stärke von Pruritus sind und in wie weit eine unspezifische Erhöhung von T_H2 -assoziierten Zytokinen und Liganden in CTCL ohnehin vorliegt.

Offen bleibt ebenso, ob es verschiedene, interindividuelle Konstellationen der IL-Expression gibt. Bereits in der Studie von Dummer *et al.* wurden ungleiche Ergebnisse erzielt [83]. Die Untersuchung erfolgt bei vier CTCL-Patienten in Stadium III-IV und zeigte bei allen einen Nachweis von IL-10, jedoch nur dreimal IL-5, zweimal IL-7 und -13 sowie in einem T-Zell Klon auch IL-2, -4 und IFN- γ [83]. In der Studie von Asadullah *et al.* zeigte sich in den Hautproben von MF-Patienten zwar eine mit dem Progress der Erkrankung assoziierte IFN- γ Reduktion, aber ein signifikanter Anstieg von IL-4 konnte nicht festgestellt werden [59].

Es ist daher die Vermutung möglich, dass ebenso eine heterogene Expression von IL-31 in kutanen T-Zell-Lymphomen vorliegt, so dass sich innerhalb der Kollektive deutliche interindividuelle Unterschiede zeigen.

4.6. Limitation und Interpretation der erworbenen Resultate

Die Ergebnisse aus ELISA, IHC und PCR zeigten in dieser Studie keinen signifikanten Nachweis von IL-31 in CTCL. Diese Daten decken sich nicht stringent mit bisher publizierten Ergebnissen, da sowohl Studien vorliegen, die keinen signifikanten Zusammenhang zwischen CTCL und Juckreiz gesehen haben [55] [56], als auch Untersuchungen, die eine positive Korrelation vermuten [42] [43] [44] [54].

Es ist bei den hier durchgeführten Untersuchungen zu beachten, dass in diesem Patientenkollektiv wenige fortgeschrittene Stadien (Std. I: 19, Std. II: 5, Std. III: 4, Std. IV: 2) enthalten waren, womit der Aspekt der unterschiedlichen IL-31 Expression in Abhängigkeit zu den untersuchten Stadien wieder an Bedeutung gewinnt.

Jedoch bleibt fraglich, wieso Patienten mit hohem Juckreiz-Score oder fortgeschrittenem Stadium kein oder kaum nachweisbares IL-31 in dem Simoa™ ELISA zeigten.

Darüber hinaus sollte berücksichtigt werden, dass in die Analyse keine therapienaiven Patienten eingeschlossen wurden und Patienten anteilig mittels Phototherapie und/ oder systemischer Glukokortikoide vorbehandelt waren.

Daher besteht zum Ersten die Vermutung, dass wegen der frühen Stadien noch nicht ausreichend T_H2-Zytokine produziert worden waren und zum Zweiten, dass während und auch nach erfolgreicher Therapie weniger Krankheitsaktivität bestand,

wodurch weniger T_H2-Zytokine vorlagen und damit auch weniger IL-31 im peripheren Blut nachweisbar war. Möglicherweise liegt in den Nachwirkungen einer erfolgreichen Lymphomtherapie auch ein Grund dafür, dass in der gesunden Vergleichspopulation sogar mehr nachweisbare IL-31 Konzentrationen bestimmt werden konnten als bei den CTCL-Patienten. Auch wenn sich weder in Bezug zu dem ELISA von *R&D Systems*, noch zu dem Simoa™ ELISA (*BMS-ZymoGenetics*, WA, USA/ *Quanterix*, MA, USA) ein Unterschied von Patienten unter Behandlung zu nicht unter Therapie stehenden Probanden zeigte.

Die Aussagekraft der hier gewonnenen Ergebnisse limitiert sich zudem durch die begrenzte Anzahl an CTCL-Patienten, so dass insgesamt nur ein kleines Patientenkollektiv zur Verfügung stand und nur begrenzt Probenbiopsien für die IHC und PCR gewonnen werden konnten.

Kritisch zu benennen ist die verhältnismäßig junge, gesunde Vergleichsgruppe bei dem ELISA von *R&D Systems* (Durchschnittsalter 35,5 Jahre), während bei dem folgenden ELISA, durch eine Erweiterung des Kollektivs, ein ausgewogenes Altersverhältnis vorlag (gesundes Kollektiv Durchschnittsalter 71,4 Jahre, Probanden von *BMS-ZymoGenetics*, WA, USA/ *Quanterix*, MA, USA zwischen 21-65 Jahre).

Durch die hinzugenommene Minimierung der Störquelle heterophiler Antikörper ist dem Simoa™ ELISA (*BMS-ZymoGenetics*, WA, USA/ *Quanterix*, MA, USA) abschließend mehr Aussagekraft zuzurechnen.

In weiterführenden Arbeiten sollte ein breiteres Spektrum an T_H2-assoziierten Zytokinen (wie IL-4, -13) mit einem größeren Patientenkollektiv und ausgeglichener Stadienverteilung untersucht werden.

Zusammenfassend konnten die hier durchgeführten Untersuchungen keine krankheitsrelevanten Serumkonzentrationen bestimmen, die eine objektivierbare Assoziation zwischen Interleukin-31 Expression und der Entstehung von Juckreiz bei *Mycosis fungoides* oder dem *Sézary*-Syndrom erkennen lassen.

Referenzen

1. Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S.R., et al., Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice, *Nat Immunol.*, 2004, Vol. 5, S. 752–760.
2. Cornelissen, C., Lüscher-Firzlaff, J., Baronb, J. M., Lüschera, B., Signaling by IL-31 and functional consequences, *European Journal of Cell Biology*, 2012, Vol. 91, S. 552–566.
3. Dreuw, A., Radtke, S., Pflanz, S., Lippok, B. E., Heinrich, P. C., Hermanns, H. M., Characterization of the signaling capacities of the novel gp130-like Cytokine Receptor, *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, Vol. 279, S. 36112–36120.
4. Diveu, C., Lagrue Lak-Hal, A.-H., Froger, J., Ravon, E., Grimaud, L., Predominant expression of the long isoform of GP130-like (GPL) receptor is required for interleukin-31 signaling, *Eur. Cytokine Netw.*, 2004, Vol. 15, S. 291–302.
5. Tanaka, A., Arita, K., Lai-Cheong, J. E., Palisson, F., Hide, M., McGrath, J. A., New insight into mechanisms of pruritus from molecular studies on familial primary localized cutaneous amyloidosis, *British Journal of Dermatology*, 2009, Vol. 161, S. 1217–1224.
6. Sonkoly, E., Muller, A., Lauerma, A. I., Pivarcsi, A., Soto, H., Kemeny, L., Alenius, H., Dieu-Nosjean, M.-C., Meller, S., Rieker, J., Steinhoff, M., Hoffmann, T. K., Ruzicka, T., Zlotnik, A., Homey, B., IL-31: A new link between Tcells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.*, 2006, Vol. 117, S. 411–417.
7. Kato, A., Fujii, E., Watanabe, T., Takashima, Y., Matsushita, H., Furuhashi, T., Morita, A. Distribution of IL-31 and its receptor expressing cells in skin of atopic dermatitis, *Journal of Dermatological Science*, 2014, Vol. 74, S. 229–235.
8. Tamura, S., Morikawa Y., Miyajima A., Senba, E. Expression of oncostatin M receptor β in a specific subset of nociceptive sensory neurons, *European Journal of Neuroscience*, 2003, Vol. 17, S. 2287–2298.
9. Usoskin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnerberg, P., Lou, D., Hjerling-Leffler, J., Haeggström, J., Kharchenko, O., Karechenko, P. V., Linnarsson, S., Ernfors, P., Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing, *Nature Neuroscience*, 2015, Vol. 18, S. 145–153.
10. Yosipovitch, G., Greaves, M.W., Schmelz, M., Itch, *The Lancet*, 2003, Vol. 361, S. 690–694.
11. Zhang, Q., Putheti, P., Zhou, Q., Liu, Q., Gao, W., Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2008, Vol. 19, S. 347–356.
12. Steinhoff, M., Bienenstock, J., Schmelz, M., Maurer, M., Wei, E., Biro, T., Neurophysiological, Neuroimmunological, and Neuroendocrine Basis of Pruritus, *Journal of Investigative Dermatology*, 2006, Vol. 126, S. 1705–1718.
13. Takaoka, A., Arai, I., Sugimoto, M., Honma, Y., Futaki, N., Nakamura, A., Nakaike, S., Expression of IL-31 gene transcripts in NC/Nga mice with atopic dermatitis, *European Journal of Pharmacology*, 2005, Vol. 516, S. 180–181.
14. Ong, P. Y., Leung, D. Y. M., Immune Dysregulation in atopic Dermatitis, *Current Allergy and Asthma Reports*, 2006, Vol. 6, S. 384–389.
15. Carmi-Levy, I., Homey, B., Soumelis, V., A Modular View of Cytokine Networks in Atopic Dermatitis, *Clinic Rev Allerg Immunol*, 2011, Vol. 41, S. 245–253.
16. Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., et al., Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP, *Nature Immunology*, 2002, Vol. 3, S. 673–680.

17. Gonzales, A. J., Humphrey, W. R., Messamore, J. E., Fleck, T. J., Fici, G. J., Shelly, J. A., Teel, J. F., Bammert, G. F., Dunham, S. A., Fuller, T. E., McCall, R. B., Interleukin-31: its role in canine puritus and naturally occurring canine atopic dermatitis, *Veterinary Dermatology*, 2013, Vol. 24, S. 48-e12.
18. Lewis, K. E., Holdren, M. S., Maurer, M. F., Underwood, S., Meengs, B., Julien, S. H., Byrnes-Blake, K. A., Freeman, J. A., Bukowski, T. R., Wolf, A. C., Hamacher, N. B., Rixon, M. W., Dillon, S. R., Interleukin (IL) 31 induces in cynomolgus monkeys a rapid and intense itch response that can be inhibited by an IL-31 neutralizing antibody, *JEADV*, 2017, Vol.31, S. 142–150.
19. Ezzat, M. H. M., Hasan, Z. E., Shaheen, K. Y. A., Serum measurement of interleukin-31 (IL-31) in paediatric atopic dermatitis: elevated levels correlate with severity scoring, *JEADV*, 2011, Vol. 25, S. 334–339.
20. Neis, M. M., Peters, B., Dreuw, A., Wenzel, J., Bieber, T., Mauch, C., et al., Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis, *J Allergy Clin Immunol.*, 2006, Vol. 118, S. 930-937.
21. Szegedi, K., Kremer, A. E., Kezic, S., Teunissen, M. B. M., Bos, J. D., Luiten, R. M., Res, P. C., Middelkamp-Hup, M. A., Increased frequencies of IL-31-producing T cells are found in chronic atopic dermatitis skin, *Experimental Dermatology*, 2012, Vol. 21, S. 431–436.
22. Raap, U., Wichmann, K., Bruder, M., Stander, S., Wedi, B., Kapp, A., et al., Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol.*, 2008, Vol. 122, S. 421–423.
23. Sokolowska-Wojdylo, M., Glen, J., Zablotna, M., Rebala, K., Sikorska, M., Florek, A., Trzeciak, M., Baranska-Rybak, W., Malek, M., Nedoszytko, B., Association of distinct IL-31 polymorphisms with pruritus and severity of atopic dermatitis, *JEADV*, 2013, Vol. 27, S. 658–664.
24. Bilsborough, J., Leung DY., Maurer M., Howell M., Boguniewicz M., Yao L., et al., IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigenpositive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis, *J Allergy Clin Immunol.*, 2006, Vol. 117, S. 418–425.
25. Cheung, P. F.-Y., Wong, C.-K., Wing-Yin Ho, A. Hu, S., Chen, D.-P., Wai-Kei Lam, C., Activation of human eosinophils and epidermal keratinocytes by Th2 cytokine IL-31: implication for the immunopathogenesis of atopic dermatitis, *International Immunology*, 2010, Vol. 22, S. 453–467.
26. Spergel, J.M., From atopic dermatitis to asthma: the atopic march, *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 2010, Vol. 105, S. 99–106.
27. Shah, S. A., Ishinaga, H., Hou, B., Okana, M., Takeuchi, K., Effects of Interleukin-31 on MUC5AC Gene Expression in Nasal Allergic Inflammation, *Pharmacology*, 2013, Vol. 91, S. 158–164.
28. Chattopadhyay, S., Tracy E., Liang, P., Robledo, O., Rose-John, S., Baumann, H., Interleukin-31 and oncostatin-M mediate distinct signaling reactions and response patterns in lung epithelial cells, *Journal of Biological Chemistry*, 2007, Vol. 282, S. 3014–3026.
29. Lei, Z., Liu, G., Huang, Q., Lv, M., Zu, R., Zhang, G.-M., Feng, Z.-H., Huang, B., SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma, *Allergy*, 2008, Vol. 63, S. 327–332.
30. Zeidler, C., Ständer, S. Therapie der Prurigo nodularis. *Hautarzt*, 2014, Ausgabe 8, S. 709–713.

31. van Beelen, A. J., Teunissen, M. B. M., Kapsenberg, M. L., de Jong, E. C., Interleukin-17 in inflammatory skin disorders, *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 2007, Vol. 7, S. 374–381.
32. Asarch, A., Barak, O., Loo, D. S., Gottlieb, A. B., Th17 cells: A new paradigm for cutaneous inflammation, *Journal of Dermatological Treatment*, 2008, Vol. 19, S. 259–266.
33. Ku, L.-S., Lo, K.-K., Mycosis fungoides - a retrospective study of 40 cases in Hong Kong, *International Journal of Dermatology*, 2005, Vol. 44, S. 215–220.
34. Kempf, W., Burg, G., *Maligne Lymphome der Haut*, Springer-Verlag, 2005, S. 1366-1386.
35. Demierre, M.-F., Gan, S., Jones, J., Miller, D. R., Significant Impact of Cutaneous T cell Lymphoma on Patients' Quality of Life: results of a 2005 National Cutaneous Lymphoma Foundation Survey, *Cancer*, 2006, Vol. 107, S. 2504–2511.
36. Alok, V., Duvic M., Prevalence and severity of pruritus in cutaneous T cell lymphoma, *International Journal of Dermatology*, 2012, Vol. 51, S. 930–934.
37. Ahern, K., Gilmore, E.-S., Poligone, B., Pruritus in cutaneous T-cell lymphoma: A review, *J Am Acad Dermatol*, Vol. 67, 2012, S. 760–768.
38. Sampogna, F., Frontani, M., Baliva, G., Lombardo, G. A., Alvetreti, G., Di Pietro, C., Tabolli, S., Russo, G., Abeni, D., Quality of life and psychological distress in patients with cutaneous lymphoma, *British Journal of Dermatology*, 2009, Vol. 160, S. 815–822.
39. Schmelz, M., Schmidt R., Bickel A., Handwerker H.O., Torebjörk, H.E., Specific C-receptors for Itch in Human Skin, *The Journal of Neuroscience*, 1997, Vol. 17, S. 8003–8008.
40. Ständer, S., Steinhoff, M., Schmelz, M., Weisshaar, E., Metzger, D., Luger, T., Neurophysiology of Pruritus - cutaneous Elicitation of Itch, *Arch Dermatol.*, 2003, Vol. 139, S. 1463–1470.
41. Suga, H., Sugaya, M., Miyagaki, T., Ohmatsu, H., Fujita, H., Kagami, S., Asano, Y., Tada, Y., Kadono, T., Sato, S., Association of Nerve Growth Factor, Chemokine (C-C motif) Ligands and Immunoglobulin E with Pruritus in Cutaneous T-cell Lymphoma, *Acta Derm Venereol.*, 2013, Vol. 93, S. 144–149.
42. Ohmatsu, H., Sugaya, M., Suga, H., Morimura, S., Miyagaki, T., Kai, H., Kagami, S., Fujita, H., Asano, Y., Tada, Y., Kadono, T., Sato, S., Serum IL-31 Levels are Increased in Patients with Cutaneous T-cell Lymphoma, *Acta Derm Venereol.*, 2012, Vol. 92, S. 282–283.
43. Singer, E. M., Shin, D. B., Nattkemper, L. A., Benoit, B. M., Klein, R. S., Didigu, C. A., Loren, A. W., Dentchev, T., Wysocka, M., Yosipovitch, G., Rook, A. H., IL-31 Is Produced by the Malignant T-Cell Population in Cutaneous T-Cell Lymphoma and Correlates with CTCL Pruritus, *Journal of Investigative Dermatology*, 2013, Vol. 133, S. 2783–2785.
44. Cedeno-Laurent, F., Singer, E. S., Wysocka, M., Benoit, B. M., Vittorio, C. C., Kim, E. J., Yosipovitch, G., Rook, A. H., Improved pruritus correlates with lower levels of IL-31 in CTCL patients under different therapeutic modalities, *Clinical Immunology*, 2015, Vol. 158, S. 1–7.
45. Levinson, S. S., Miller, J. J. Towards a better understanding of heterophile (and the like) antibody interference with modern immunoassays, *Clinica Chimica Acta*, 2002, Vol. 325, S. 1–15.
46. DeForge, L. E., Loyet, K. M., Delarosa, D., Chinn, J., Zamanian, F., Chuntharapai, A., Lee, J., Hass, P., Wei, N., Townsend, M. J., Wang, J., Wong, W. L. T., Evaluation of heterophilic antibody blocking agents in reducing false positive interference in immunoassay for IL-17AA, IL-17FF and IL-17AF, *Journal of Immunological Methods*, 2010, Vol. 362, S. 70–81.
47. Bjerner, J., Borner, O.P., Nustad, K., The war on heterophilic antibody interference, *Clinical Chemistry*, 2005, Vol. 51, S. 9–11.

48. Primus, F.J., Kelley, E.A., Hansen, H.J., "Sandwich"-type immunoassay of carcinoembryonic antigen in patients receiving murine monoclonal antibodies for diagnosis and therapy, *Clin Chem.*, 1988, Vol. 34, S. 261–264.
49. Bjerner, J., Nustad, K., Norum, L. F., Olsen, K.H., Børmer, O. P., *Immunometric Assay Interference: Incidence and Prevention*, *Clinical Chemistry*, 2002, Vol. 48, S. 613–621.
50. Vaidya, H. C., Beatty, B. G., Eliminating interference from heterophilic antibodies in a two-site immunoassay for creatine kinase MB by using F(ab')₂ conjugate and polyclonal mouse IgG, *Clin Chem.*, 1992, Vol. 38, S. 1737–1742.
51. Feld, M., Shpacovitch, V. M., Fastrich, M., Cevikbas, F., Steinhoff, M., Interferon- γ induces upregulation and activation of the interleukin-31 receptor in human dermal microvascular endothelial cells, *Experimental Dermatology*, 2010, Vol. 19, S. 921–923.
52. Cornelissen, C., Brans, R., Czaja, K., Skazik, C., Marquardt, Y., Zwadlo-Klarwasser, G., Kim, A., Bickers, D. R., Duscher-Firzlaff, J., Luscher, B., Baron, J. M., Ultraviolet B (UVB) radiation and reactive oxygen species (ROS) modulate IL-31 expression in T-lymphocytes, monocytes and dendritic cells, *British Journal of Dermatology*, 2011, Vol. 165, S. 966–975.
53. Nobbe, S., Dziunycz, P., Mühleisen, B., Bilsborough, J., Dillon, S. R., French, L. E., Hofbauer, G. F. L., IL-31 Expression by Inflammatory Cells is Preferentially Elevated in Atopic Dermatitis, *Acta Derm Venereol.*, 2012, Vol. 92, S. 24–28.
54. Nattkemper, L. A., Martinez-Escala, M.-E., Gelman, A. B., Singer, E. M., Rook, A. H., Guitart, J., Yosipovitch, G., Cutaneous T-cell Lymphoma and Pruritus: The Expression of IL-31 and its Receptors in the Skin, *Acta Derm Venereol.*, 2016, Vol. 96, S. 894–898.
55. Möbs, M., Gryzik, S., Haidar, A., Humme, D., Beyer, M., Vandersee, S., Analysis of the IL-31 pathway in Mycosis fungoides and Sézary syndrome, *Arch Dermatol Res.*, 2015, Vol. 307, S. 479–485.
56. Malek, M., Glen, J., Rebalá, K., Kowalczyk, A., Sobjanek, M., Nowicki, R., Ruckemann-Dziurdzinska, K., Sokolowska-Wojdyło, M., IL-31 Does not Correlate to Pruritus Related to Early Stage Cutaneous T-cell Lymphomas but is involved in Pathogenesis of the Disease, *Acta Derm Venereol.*, 2015, Vol. 95, S. 283–288.
57. Chan, L. S., Robinson, N., Luting, X., Expression of Interleukin-4 in the Epidermis of Transgenic Mice Results in a Pruritic Inflammatory Skin Disease: An Experimental Animal Model to Study Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 2001, Vol.117, S. 977–983.
58. Zheng, T., Oh, M. H., Oh, S. Y., Schroeder, J. T., Glick, A. B., Zhu, Z., Transgenic Expression of Interleukin-13 in the Skin Induces a Pruritic Dermatitis and Skin Remodeling, *Journal of Investigative Dermatology*, 2009, Vol. 129, S. 742–751.
59. Asadullah, K., Döcke, W.-D., Haeußler, A., Sterry, W., Volk, H.-D., Progression of Mycosis Fungoides Is Associated with Increasing Cutaneous Expression of Interleukin-10 mRNA, *The Journal for Investigative Dermatology*, 1996, Vol. 107, S. 833–837.
60. Mollanazar, N. K., Smith, P. K., Yosipovitch, G., Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis: Getting the Itch Out?, *Clinic Rev Allerg Immunol.*, 2016, Vol. 51, S. 263-292
61. Papoiu, A. D. P., Wang, H., Nattkemper, L., Tey, H. L., Ishiujji, Y., Chan, Y.-H., Schmelz, M., Yosipovitch, G., A study of serum concentrations and dermal levels of NGF in atopic dermatitis and healthy subjects, *Neuropeptides*, 2011, Vol. 45, S. 417–422.
62. Gombert, M., Dieu-Nosjean, M.-C., Winterberg, F., Bunemann, E., Kubitzka, R. C., Da Cunha, L., Haahtela, A., Lehtimäki, S., Müller, A., Rieker, J., Meller, S., Pivarcsi, A., Koreck, A., Fridman, W.-H., Zentgraf, H.-W., Pavenstadt, H., Amara, A., Caux, C., Kemeny, L., Alenius, H., Lauerma,

- A., Ruzicka, T., Zlotnik, A., Homey, B., CCL1-CCR8 Interactions: An Axis Mediating the Recruitment of T Cells and Langerhans-Type Dendritic Cells to Sites of Atopic Skin Inflammation, *The Journal of Immunology*, 2005, Vol. 174, S. 5082–5091.
63. Goya, I., Gutiérrez, J., Varona, R., Kremer, L., Zaballos, A., Márquez, G., Identification of CCR8 as the Specific Receptor for the Human b-Chemokine I-309: Cloning and Molecular Characterization of Murine CCR8 as the Receptor for TCA-3, *J Immunol.*, 1998, Vol. 160, S. 1975–1981.
 64. Zingoni, A., Soto, H., Hedrick, J. A., Stoppacciaro, A., Storlazzi, C. T., Sinigaglia, F., D'Ambrosio, D., O'Garra, A., Robinson, D., Rocchi, M., Santoni, A., Zlotnik, A., Napolitano, M., Cutting Edge: The Chemokine Receptor CCR8 Is Preferentially Expressed in Th2 But Not Th1 Cells, *J Immunol*, 1998, Vol. 161, S. 547–551.
 65. Zissler, U. M., Esser-von Bieren, J., Jakwerth, C. A., Chaker, A. M., Schmidt-Weber, C. B., Current and future biomarkers in allergic asthma, *Allergy*, 2016, Vol. 71, S. 475-494.
 66. Romagnani S., Human T_H1 and T_H2 subsets: doubt no more, *Immunology Today*, 1991, Vol. 12, S. 256–257.
 67. Laske, N., Niggemann, B., Does the severity of atopic dermatitis correlate with serum IgE levels?, *Pediatric Allergy and Immunology*, 2004, Vol. 15, S. 86–88.
 68. Vowels, B. R., Cassin, M., Vonderheid, E.C., Rook, A. H., Aberrant Cytokine Production By Sezary Syndrome Patients: Cytokine Secretion Pattern Resembles Murine Th2 Cells, *The Journal of Investigative Dermatology*, 1992, Vol. 99, S. 90–94.
 69. Molin, L., Thomsen, K., Volden, G., Serum IgE in mycosis fungoides, *British Medical Journal*, April 1978, S. 920–921.
 70. Raap, M., Rüdric, U., Ständer, S., Gehring, M., Kapp, A. and Raap, U., Substance P activates human eosinophils, *Experimental Dermatology*, 2015, Vol. 24, S. 557–559.
 71. Yosipovitch, G., Mills, K. C., Nattkemper, L. A., Feneran, A., Tey, H. L., Lowenthal, B. M., Pearce, D. J., Williford, P. M., Sanguenza, O. P., D'Agostino, R. B., Association of pain and itch with depth of invasion and inflammatory cell constitution in skin cancer: Results of a large clinicopathologic study, *JAMA Dermatol.*, 2014, Vol. 150, S. 1160–1166.
 72. Carstens, E., Akiyama, T., Misery, L. Itch: Mechanisms and Treatment, Chapter 8, *Pruritus in Cutaneous T-Cell Lymphomas*, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2014.
 73. Gallo, D.-J., Planelles, C. A., Barrios, M.L., Anguita, M. J.F., Enriquez, J. M., Mateos, M. E. R., Treatment of pruritus in early-stage hypopigmented mycosis fungoides with aprepitant, *Dermatologic Therapy*, 2014, Vol. 27, S. 178–182.
 74. Saed, G., Fivenson, D. P., Naidu, Y., Nickoloff, B. J., Mycosis Fungoides Exhibits a Th1-Type Cell-Mediated Cytokine Profile Whereas Sezary Syndrome Expresses a Th2-Type Profile, *The Journal of Investigative Dermatology*, 1994, Vol. 103, S. 29–33.
 75. Bagot, M., Nikolova, M., Schirm-Chabanette, F., Wechsler, J., Boumsell, L., Bensussan, A., Crosstalk between Tumor T Lymphocytes and Reactive T Lymphocytes in Cutaneous T Cell Lymphomas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001, Vol. 941, S. 31–38.
 76. Guenova, E., Watanabe, R., Teague, J.-E., Desimone, J.-A., Jiang, Y., Dowiatshahi, M., Gehad, A., Schlapbach, C., Schaeckel, K., Rook, A.-H., Tawa, M., Fisher, D.-C., Kupper, T.-S., Clark, R.-A., Th2 cytokines from malignant cells suppress Th1 responses and enforce a global Th2 bias in leukemic cutaneous T cell lymphoma, *Clin Cancer Res.*, 2013, Vol. 19, S. 3755–3763.
 77. Hahtola, S., Tuomela, S., Elo, L., Häkkinen, T., Karenko, L., Nedoszytko, B., Heikkilä, H., Saarialho-Kere, U., Roszkiewicz, J., Aittokallio, T., Lahesmaa, R., Rankim A., Th1 Response and

- Cytotoxicity Genes Are Down-Regulated in Cutaneous T-Cell Lymphoma, *Clinical Cancer Research*, 2006, Vol. 12, S. 4812–4821.
78. Litvinov, I. V., Cordeiro, B., Fredholm, S., Odum, N., Zargham, H., Huang, Y., Zhou, Y., Pehr, K., Kupper, T.-S., Woetmann, A., Sasseville, D., Analysis of STAT4 expression in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) patients and patient-derived cell lines, *Cell Cycle*, 2014, Vol.13, S. 2975–2982.
 79. Harwix, S., Zachmann, K., Neumann, C., T-cell clones from early-stage cutaneous T-cell lymphoma show no polarized Th-1 or Th-2 cytokine profile, *Arch Dermatol Res.*, 2000, Vol. 292, S. 1–8.
 80. Tracey, L., Villuendas, R., Dotor, A. M., Spiteri, I., Ortiz, P., Garcia, J. F., Rodriguez Peralto, J. L., Lawler, M., Piris, M. A., Mycosis fungoides shows concurrent deregulation of multiple genes involved in the TNF signaling pathway: an expression profile study, *Blood*, 2003, Vol. 102, S. 1042–1050.
 81. Kim, E. J., Hess, S., Richardson, S. K., Newton, S., Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *Journal of Clinical Investigation*, 2005, Vol. 115, S. 798–812.
 82. Rook, A. H., Vowels, B.R., Jaworsky, C., Singh, A., Lessin, S.T., The immunopathogenesis of cutaneous T cell lymphoma; abnormal cytokine production by Sezary T cells, *Arch Dermatol.*, 1993, Vol. 129, S. 486–489.
 83. Dummer, R., Heald, P. W., Nestle, F. O., Ludwig, E., Laine, E., Hemmi, S., Burg, G., Sézary Syndrome T-cell Clones Display T-Helper 2 Cytokines and Express the Accessory Factor-I (Interferon-gamma Receptor beta-Chain), *Blood*, 1996, Vol. 88, S. 1383-1389.

Danksagung

Zur Entstehung dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, denen ich an dieser Stelle danken möchte:

Herrn Prof. Dr. Bernhard Homey für die Vergabe des Promotionsthemas und der abschließenden Beurteilung.

Erich Bünemann, Robert Kubitzka, Ulrike Wiesner und dem gesamten Team des Labors für die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungsverfahren und für die lehrreichen Gespräche als auch die stete Hilfe bei organisatorischen Fragen.

Den Krankenschwestern der Lichtabteilung für die Unterstützung bei der Rekrutierung der Probanden.

Meinem ehemaligen Chefarzt für die Rückendeckung zur Fertigstellung dieser Arbeit, sowie insbesondere meinen Oberärzten für die entscheidende Kritik und die guten Ratschläge.

Zudem möchte ich dem Freundes- und Familienkreis einen großen Dank für das fachfremde und damit schwierige Probelesen und für die stete Unterstützung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit aussprechen.