

Aus dem Institut für Pathologie
Sektion für Hämatopathologie und Lymphknotenregister
(Leiter: Prof. Dr. med. W. Klapper)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER EXPRESSION VON
HUMANEM BETA-DEFENSIN-2 UND DES INFLAMMATORISCHEN
INFILTRATES IN ENTZÜNDLICHEN DERMATOSEN ZUR
ABGRENZUNG GEGENÜBER DER PSORIASIS VULGARIS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

THORSTEN RENKEN

aus Wilhelmshaven

Kiel 2014

Referent: Prof. Dr. Wolfram Klapper, Institut für Pathologie

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Ehrhardt Proksch, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung	1
1.2 Bedeutung der Psoriasis	2
1.3 Psoriasis: Einteilung und Morphologie.....	3
1.4 Histologie der Psoriasis	4
1.5 Antimikrobielle Peptide / Humanes Beta-Defensin-2 (HBD-2).....	5
1.6 T-Zell Markierung im entzündlichen Infiltrat verschiedener Dermatitiden	7
1.7 Ziel der Arbeit	8
2. Materialien und Methoden	9
2.1 Reagenzien / Chemikalien / Firmen	9
2.2 Spüllösungen	11
2.3 Verdünnung der Primärantikörper	11
2.4 Färbemethode	11
2.5 Procedere der immunhistochemischen Färbung	12
2.6 Färbeprotokoll der Immunfärbung	13
2.7 Methodik / Aufbau der Arbeit	14
2.7.1 Gewebeproben	14
2.7.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	15
3. Ergebnisse	17
3.1 HBD-2 Färbung Stratum corneum	17
3.2 HBD-2 Färbung extracornealer Zellschichten der Epidermis und Dermis	20
3.3 CD1a Färbung der Epidermis	22
3.4 CD1a Färbung der Dermis	23
3.5 CD8 Färbung der Epidermis und Dermis	24

Inhaltsverzeichnis

3.6	Fox P3 Färbung der Epidermis und Dermis	26
3.7	PD1 Färbung der Epidermis und Dermis	28
4.	Diskussion	29
4.1	Bedeutung der T-Zellen und des humanen β -Defensin-2 für die Psoriasis vulgaris	29
4.2	Analyse und Interpretation der Detektion von humanem β -Defensin-2 in verschiedenen entzündlichen Dermatosen	31
4.3	Analyse und Interpretation der T-Zell-Markierung im entzündlichen Infiltrat verschiedener Dermatitisiden	33
5.	Zusammenfassung / Ausblick	37
6.	Literaturverzeichnis	39
	Danksagung	49
	Lebenslauf	50

1. Einleitung

1.1 Einführung

Eine typische Psoriasis vulgaris ist klinisch und histologisch gut definiert (vgl. AWMF S3 Leitlinie 2011). Für den dermatologischen Spezialisten ist die Diagnose einer Psoriasis bei langjähriger Erfahrung kein wesentliches Problem. Hier weisen in der Regel das klinische Erscheinungsbild der Primäreffloreszenz, das Verteilungsmuster sowie Minimalmanifestationen den Weg (Gollnick H. und Bonnekoh B. 2001). Dennoch ergeben sich im Hinblick auf atypische Lokalisationen, den Subtyp, den Verlauf oder bei nicht vollständig entwickelten histologischen Zeichen (Frühstadien) gelegentlich Schwierigkeiten das Krankheitsbild von anderen Dermatosen abzugrenzen (Gollnick H. und Bonnekoh B. 2001). Beispielsweise kann die Psoriasis vulgaris einem seborrhoischen Ekzem zum Verwechseln ähnlich sehen (Sönnichsen N. 1999). In ausgeprägter Form oder in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium mit Befall der Prädilektionsstellen wie Hautregionen an den Knien, Ellenbogen, am behaarten Kopf und der Sakralregion sowie der Rima ani (Moll I. 2010; Schubert C. und Rudolph P. 2009; Böcker W. et al. 2012) kann die Psoriasis vulgaris normalerweise auf den ersten Blick erkannt und dementsprechend behandelt werden (Sönnichsen N. 1999). Neben dem Ekzem und seiner Subtypen sind die wichtigsten Differentialdiagnosen der Psoriasis vulgaris die Dermatophytose (Tinea), Lichen ruber, das kutane T-Zell-Lymphom, die Parapsoriasis sowie die Pityriasis inklusive aller Subtypen (Gollnick H. und Bonnekoh B. 2001; Moll I. 2010). Es erweist sich als problematisch zur korrekten Diagnose zu gelangen, wenn in Einzelfällen insbesondere in Frühstadien wenig krankheitsspezifische Merkmale vorliegen. Die richtige Diagnosefindung hat nicht nur eine therapeutische Relevanz sondern ist auch im Hinblick auf den erkrankungsindividuellen Verlauf von großer Bedeutung. Bei einer vom klinischen Erscheinungsbild nicht eindeutigen Zuordnung hilft in der Regel eine konventionell histologische Untersuchung (Gollnick H. und Bonnekoh B. 2001); (vgl. Histologie der Psoriasis im Einleitungsteil unter 1.4). In den meisten Fällen kann die Psoriasis vulgaris so sicher erkannt und eine gerichtete Therapie initiiert werden. Sind aber dennoch Zweifel an der richtigen Diagnose aufzeigbar, werden Zusatzuntersuchungen wie beispielsweise eine PAS-Färbung (periodic acid schiff) durch Nachweis von Hyphen oder Pseudomyzelien zum vergleichenden Ausschluss kutaner Pilzkrankungen (Tinea) notwendig (Schubert C. und Rudolph P. 2009; Gollnick H. und Bonnekoh B. 2001). Insgesamt stellt sich jedoch die Frage nach einer weiteren Methode welche sich zur differentialdiagnostischen Zuordnung der Psoriasis vulgaris eignet.

Ein Unterscheidungskriterium wäre möglicherweise in der Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrates verschiedener Dermatitiden in Abgrenzung zur Psoriasis vulgaris zu sehen. Da es sich laut Leitlinie bei der Psoriasis vulgaris um eine T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankung handelt (vgl. AWMF S3 Leitlinie: Therapie der Psoriasis vulgaris. Einleitung: Pathogenese S. 13 Fassung 2011), ist die Betrachtung der T-Lymphozyten im inflammatorisch veränderten Gewebe im Vergleich mit anderen entzündlichen Dermatosen ein differentialdiagnostisch erfolgversprechender Ansatz. Ein weiterer Ansatz könnte in der Detektion eines antimikrobiellen Peptids, namentlich dem humanen β -Defensin-2 (hBD-2) liegen. Besagtes Peptid konnte 1997 von Harder et al. aus einer Psoriasisishautläsion isoliert und charakterisiert werden. Dem Funktionsprinzip nach fungiert das humane β -Defensin-2 als antimikrobielles Peptid im Sinne eines chemischen Abwehrschildes wie ein körpereigenes Antibiotikum (Harder J. et al. 1997; Ganz T. et al. 1985). Da das hBD-2 in erheblichem Maße mit immunhistochemischen Färbemethoden in einer Psoriasisishautläsion nachgewiesen werden kann und Jansen et al. das im Serum bestimmte humane β -Defensin-2 als möglicherweise nützlichen Surrogatmarker zur Beurteilung der Krankheitsaktivität der Psoriasis beschrieb (Jansen P.A.M. et al. 2009), war die Überlegung analog hierzu differentialdiagnostisch die Psoriasis vulgaris über die Detektion von hBD-2 in verschiedenartigen Hautläsionen nachzuweisen.

Die Idee und somit der Ursprung dieser Arbeit war es die Möglichkeit der Nutzung eines immunhistochemischen Verfahrens zur Abgrenzung der Psoriasis vulgaris gegenüber anderen entzündlichen Hauterkrankungen zu untersuchen.

1.2 Bedeutung der Psoriasis

Mit einer Prävalenz von etwa 2% in den westlichen Ländern präsentiert sich die Psoriasis als häufige, chronisch entzündliche oder akut exanthematische, nicht infektiöse Hauterkrankung (Nevitt G.J. und Hutchinson P.E. 1996). Weltweit gesehen weist die Erkrankung in Bezug auf deren Häufung in ethnischen Bevölkerungsgruppen sowie nach geographischer Lage erhebliche Unterschiede auf (Schön M.P. und Boehnke W.H. 2005).

Der Anteil der Psoriasispatienten in deutschen dermatologischen Kliniken beträgt etwa 6-8% (Gollnick H. und Bonnekoh B. 2001). In Deutschland sind etwa 1,6 Millionen Menschen betroffen und bei über 90% dieser Patienten verläuft die Erkrankung chronisch (Nevitt G.J. und Hutchinson P.E. 1996).

Für Betroffene bedeutet die Psoriasis häufig eine jahrelange Beeinträchtigung mit teilweise erheblicher physischer oder psychosozialer Stigmatisierung (Krüger G. et al. 2001). Auch sozioökonomisch mit Krankheitskosten von ca. 2.866 Euro pro Patient und Jahr (Berger K. et al. 2005) kommt der Psoriasis, nicht zuletzt aufgrund ihrer chronischen Verlaufsform, eine große Bedeutung zu (Krüger G. et al. 2001; Mrowietz U. und Reich K. 2011).

Insgesamt besteht eine hohe individuelle sowie gesellschaftspolitische Krankheitslast, da neben der kutanen Manifestation des Leidens noch erhebliche Komorbiditäten assoziiert sind. Es zeigt sich, dass von Psoriasis betroffene Patienten ca. 2fach häufiger an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung leiden und auch metabolische Veränderungen im Sinne von Fettstoffwechselstörungen, Adipositas, Hypertonie und Diabetes mellitus bei diesen Patienten deutlich häufiger vorkommen (Henseler T. und Christophers E. 1995; Mrowietz U. et al. 2006; Gisondi P. et al. 2007; Sommer D.M. et al. 2006; Christophers E. 2007). Etwa 20% der Psoriasispatienten entwickeln im Verlauf ihrer medizinischen Geschichte eine erkrankungsassoziierte Psoriasisarthritis (Reich K. et al. 2009).

Des Weiteren wird angenommen, dass der, die Erkrankung verursachende Inflammationsprozess, die Entstehung kardiovaskulärer Pathologien beispielsweise einen Apoplex oder einen Myokardinfarkt begünstigt (Ludwig R.J. et al. 2007; Mallbris L. et al. 2004; Gelfand J.M. et al. 2006). Nicht zuletzt scheint auch eine Korrelation der Psoriasis zu psychischen Störungen zu bestehen (Schmitt J. und Ford D.E. 2010).

Die möglichst frühzeitige und vor allem korrekte Diagnose der Psoriasis ist somit von sehr hoher Relevanz. Darüber hinaus stellt die optimale Versorgung von Patienten mit Psoriasis ein zentrales Anliegen der Deutschen Dermatologen Gesellschaft und des Bundesverbands deutscher Dermatologen dar (Mrowietz U. und Reich K. 2011).

1.3 Psoriasis: Einteilung und Morphologie

Nach dem klinischen Bild wird die Psoriasis in verschiedene Formen unterteilt (Gollnick H. und Bonnekoh B. 2001; Moll I. 2010; Schubert C. und Rudolph P. 2009). Hierbei wird hauptsächlich die Plaque-Typ Psoriasis, die sogenannte Psoriasis vulgaris als chronisch stationärer oder akut exanthematischer Typ, von der pustulösen Form abgegrenzt. Des Weiteren lässt sich hiervon noch die Psoriasis inversa, ohne die typischen Prädilektionsstellen mit Auftreten in den Gelenkbeugen, sowie die Psoriasis intertriginosa mit Befall der Hautfalten z.B. submammär, axillär sowie der Analfalte und die Psoriasis arthropathica mit Gelenkbeteiligung unterscheiden.

Die Psoriasis ist je nach Erscheinungsbild der Effloreszenzen in eine ringförmige (*P. anulare*) eine landkartenartige (*P. geographica*) und eine gewundene (*P. gyrata*) Form untergliedert.

Eine ältere Einteilung (siehe auch AWMF S3 Leitlinie: Therapie der Psoriasis. Einleitung: Epidemiologie und Begleiterkrankungen S. 12 Fassung 2011) unterschied die Psoriasis nach dem Zeitpunkt der Erstmanifestation, wobei sich der Typ 1 Psoriatiker („early onset psoriasis“) mit unter 40 Lebensjahren, positiver Familienanamnese sowie einer Tendenz zum schwereren Krankheitsverlauf von einem Typ 2 Psoriatiker („late onset psoriasis“) mit einer Erstmanifestation jenseits des 40. Lebensjahres und negativer Familienanamnese sowie in der Regel leichterem Verlauf abgrenzte (Henseler T. und Christophers E. 1985).

Morphologisch tritt die Psoriasis mit scharf begrenzten erythrosquamösen Plaques in Erscheinung.

Aufgrund des deutlich häufigeren Auftretens des Psoriasis vulgaris Typs im Patientenkollektiv und der besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien wurde für die vorliegende Arbeit diese Erscheinungsform der Psoriasis betrachtet.

Zur Schweregradbestimmung der Erkrankung wird bevorzugt das PASI (**P**soriasis **A**rea and **S**everity **I**ndex) Beurteilungsverfahren genutzt. Hierbei erfolgt die Einteilung der Erkrankung nach Schweregrad und Ausdehnung auf verschiedenen Körperregionen als Prozentangabe. Weitere Einteilungen werden mit dem **B**ody **S**urface **I**ndex (BSA) sowie einem Index für die krankheitsspezifische Lebensqualität (DLQI) vorgenommen (vgl. AWMF S3 Leitlinie: Therapie der Psoriasis. Einleitung: Definition des Schweregrads der Psoriasis vulgaris S. 15 Fassung 2011; Mrowietz U. et al. 2010).

1.4 Histologie der Psoriasis

Der feingewebliche Aufbau einer Psoriasisläsion weist vor allem in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung ein typisches Muster auf. Hierbei zeigt sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung eine abnorme Keratinozytenproliferation mit konsekutiver Verdickung der Hornschicht (parakeratotische Hyperkeratose) sowie eine Akanthose (Verdickung der gesamten Epidermis).

Gleichzeitig finden sich z.T. birnenförmig aufgetriebene Reteleisten mit hochgezogenen Papillen des Korioms. Darüber hinaus weisen die Papillen ein ausgeprägtes Ödem mit geschlängelten und dilatierten Kapillaren im Papillarkörper (Toussaint S. und Kamino H. 1997) als Ausdruck der Angiogenese auf. Eine deutliche Reduktion oder ein Fehlen des Stratum granulosum ist ebenfalls kennzeichnend für eine psoriatische Plaque-Effloreszenz.

1. Einleitung

Letztlich sind innerhalb der parakeratotischen Schichten noch Ansammlungen neutrophiler Granulozyten als sog. Munro-Mikroabszesse aufzeigbar. Das folgende Bildbeispiel (Abb.1) einer Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbten Psoriasisishautläsion illustriert sehr gut die Histologie der Psoriasis, insbesondere zeigt sich hier die parakeratotische Hyperkeratose sowie die Akanthose sehr eindrücklich.

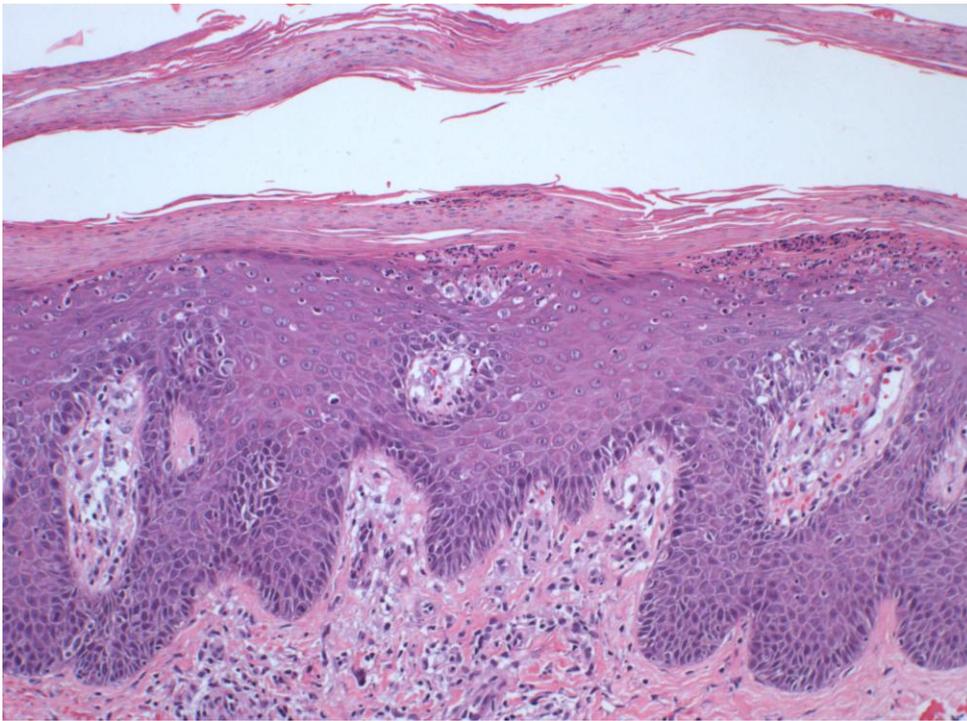


Abb. 1) Darstellung einer HE gefärbten Psoriasis vulgaris Hautprobe mittels 10facher Objektivvergrößerung

1.5 Antimikrobielle Peptide / Humanes Beta-Defensin-2 (HBD-2)

Zum Schutz vor potentiell pathogenen äußeren Einflüssen war schon früh klar, dass neben einer physikalischen Barriere an inneren und äußeren Grenzflächen des Körpers noch weitere immunmodulatorische Wirkmechanismen gegenüber Mikroorganismen greifen mussten (Weinberg A.N. und Swartz M.N. 2003).

Man stellte sich die Frage, warum trotz bakterieller Besiedlung der Haut mit nahezu 10^5 Mikroorganismen pro cm^2 und einem relativ guten Entwicklungsmilieu für diese Organismen es zu keiner Hautinfektion kam (Harder J. und Schröder J.M. 2005; Fitzpatrick T.B. et al. 1993). Von Pflanzen und Insekten, also mehrzelligen Organismen ohne erworbene Immunität, war eine Art von epitheliale chemischen Abwehrschild als angeborene Immunität gegenüber potentiellen Pathogenen bekannt (Harder J. et al. 1997).

1. Einleitung

1987 konnte Zasloff eine antibakteriell wirksame, von Froschhaut sezernierte, Substanz nachweisen, welche einen Schutz gegen Bakterien und Pilzen generieren konnte (Zasloff M. 1987). Spätere Studien wiesen darauf hin, dass Säuger ebenfalls in der Lage sind ihre kutanen Oberflächen durch ein angeborenes Immunsystem zu schützen (Harder J. und Schröder J.M. 2005). Ursächlich hierfür ist offenbar die Fähigkeit von Epithelzellen chemische Abwehrstoffe zu produzieren (Boman H. G. 2000).

Inzwischen ist ein Großteil der Bausteine dieses chemischen „Abwehrschildes“ bekannt. Wie beschrieben hatte sich herausgestellt, dass Mehrzeller in der Lage sind „körpereigene Antibiotika“ zu produzieren. Diese Proteine werden als antimikrobielle Proteine oder Peptide (AMP) bezeichnet (Ganz T. und Lehrer R.I. 1998; Zasloff M. 2002; Boman HG 2003). In Bezug auf die Psoriasis vulgaris ist schon seit 1978 bekannt, dass Patienten, die an dieser Erkrankung leiden, trotz ihrer multiplen Hautläsionen nicht häufiger von Hautinfektionen betroffen sind als Gesunde (Singh G. und Rao D.J. 1978; Henseler T. und Christophers E. 1995). Singh und Rao konnten ebenfalls nachweisen, dass quantitativ nicht läsionale Psoriasis-Haut deutlich mehr Bakterienstämme aufweist und Plaques hingegen signifikant weniger (Singh G. und Rao D.J. 1978). Dementsprechend wurde für die Psoriasis angenommen, dass zu Psoriasis neigende Personen weniger unter Hautinfektionen leiden, weil sie antimikrobielle Proteine besitzen (Moll I. 2005). Und tatsächlich konnten in der Psoriasis-Haut antimikrobielle Peptide nachgewiesen werden. Hiervon wurden in den letzten Jahren besonders das Cathelicidin, die β -Defensine und das S 100 Protein untersucht (Morizane S. und Gallo L.R. 2012). Für diese Arbeit wurde der Fokus auf die β -Defensine, im Speziellen das humane β -Defensin-2 gelegt. HBD-2 findet man unter normalen Umständen in gesunder Haut nicht oder nur in einem geringen Ausmaß (Schröder J.M. und Harder J. 1999). Bei Störungen der Hautbarriere oder chronischer Inflammation wie bei der Psoriasis vulgaris lässt sich das hBD-2 jedoch deutlich nachweisen (de Jong G.J. et al. 2005; Harder J. et al. 1997). Das humane β -Defensin-2 zeigt einen hohen Effekt in der Bekämpfung gram-negativer Bakterien, wie beispielsweise E.coli oder Pseudomonas aeruginosa. Candida albicans wird ebenfalls effektiv bekämpft (Harder J. et al. 1997; Hiratsuka T. et al. 1998; Singh et al. 1998; Gallo R.L. und Huttner K.M. 1998). In hohen Konzentrationen wirkt das hBD-2 bakteriostatisch auf den gram-positiven Staphylokokkus aureus (Harder J. et al. 1997). Das hBD-2 ist ein kleines cysteinreiches kationisches Peptid aus 43 Aminosäuren und gehört wie beschrieben zur Klasse der humanen β -Defensine (Harder J. und Schröder J.M. 2005). Es ist das erste Defensin welches auf transskriptioneller Ebene als Antwort auf einen Mikroorganismenkontakt reguliert wird (Harder J. et al. 1997). Des Weiteren ist es als erstes

menschliches Defensin induzierbar. Die effektivsten Stimuli zur Induktion von hBD-2 werden endogen durch in der Psoriasisishaut enthaltener, proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-1 γ , IL-1 β , IFN- γ und TNF- α oder durch exogene Stimuli wie durch Bakterien und Pilze generiert (Harder J. et al. 1997; Wada A. et al. 1999; Huh W.K. et al. 2002; Chung W.O. und Dale B.A. 2004; Proud D. et al. 2004; Sorensen O.E. et al. 2005). TNF- α und IFN- γ sind massiv in Psoriasisläsionen aufzeigbar und induzieren die Expression von hBD-2 in Keratinozyten (Lehmann J. et al. 2002; McDermott A.M. et al. 2003; Nomura I. et al. 2003). Weitere Induktoren des hBD-2 sind das Th 17-, das IL-17 A- und das IL-22-Zytokin (Kao C.Y. et al. 2004; Wolk K. et al. 2004; Liang S.C. et al. 2006). Auf subzellulärer Ebene ist das humane β -Defensin-2 in den Lamellenkörpern der Keratinozyten im Stratum spinosum der Epidermis vorzufinden (Oren A. et al. 2003).

Aufgrund der Induzierbarkeit und des hohen Vorkommens des hBD-2 in der Psoriasisishaut eignet sich dieses Peptid zur Untersuchung eines möglichen Unterscheidungskriteriums der verschiedenen Dermatitiden.

1.6 T-Zell Markierung im entzündlichen Infiltrat verschiedener Dermatitiden

Der für die Psoriasispathogenese postulierte und unter anderen durch Prinz J.C. 2001 im Clinical and Experimental Dermatology beschriebene T-Zell vermittelte immunologische Pathomechanismus der Psoriasis-Entstehung bot den Ansatz in der immunhistochemischen Färbung der Hautproben die T-Zell Markierung zu untersuchen (Prinz J.C. 2001). Hierfür wurden mittels eines antigen-antikörper-basierten Färbeverfahrens verschiedene T-Lymphozyten-Marker detektiert und somit der Anteil der T-Zellen im inflammatorisch veränderten Gewebe der untersuchten Proben bestimmt. Anhand der CD1a, der CD8, der Fox P3 und der PD1 Färbung wollten wir einen möglichen Unterschied der Dermatitiden durch Betrachtung des entzündlichen Infiltrats der einzelnen Hauterkrankungen aufzeigen.

CD1a (Cluster of Differentiation 1a) ist ein Glykoprotein, welches an der Antigenpräsentation von Lipiden und Glykolipiden z.B. mikrobieller Antigene zu T-Zellen beteiligt ist (Brigl M. und Brenner M.B. 2004). Anhand der Färbung dieses Proteins lassen sich dendritische Zellen bestimmen.

CD8 (Cluster of Differentiation 8) ist ein in die Zellmembran von zytotoxischen T-Zellen integriertes Molekül, mit dessen Hilfe der T-Zell Rezeptor den MHC-I-Komplex auf körpereigenen Zellen erkennt. Werden fremde Peptide z.B. virale- oder mutierte Peptide erkannt, so folgt die Zerstörung dieser peptidassoziierten Zelle.

Das Forkhead-Box-Protein P3 (Fox P3) stimuliert als Transkriptionsfaktor die Expression von Proteinen welche von regulatorischen T-Zellen benötigt werden (Kim J.M. und Rudensky A. 2006). Für den Nachweis von nativen und peripher entstandenen regulatorischen T-Zellen eignet sich das Fox P3 Protein als spezifischer Marker gut.

Bei dem PD1 Protein (programmed cell death 1 protein) handelt es sich um ein Zelloberflächenprotein welches auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen exprimiert wird und dort die T-Zell Antwort negativ beeinflusst (Agata Y. et al. 1996). Mit Anfärbung dieses Proteins können follikuläre T-Helfer-Zellen dargestellt werden.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel war es folgende zentralen Fragestellungen zu untersuchen und eine Erklärungshypothese aufzuzeigen.

Fragestellung:

- a) Lässt sich die Expression von hBD-2 in entzündlichen Dermatosen nachweisen und zur Differentialdiagnose dieser Erkrankungen heranziehen?
- b) Wie unterscheiden sich die entzündlichen Infiltrate kutaner Dermatosen im Hinblick auf spezifische T-Zell-Populationen und lässt sich durch Detektion dieser Zellarten die Psoriasis besser von anderen Dermatosen abgrenzen?

2. Materialien und Methoden

2.1 Reagenzien / Chemikalien / Firmen

Monoklonaler Maus-Antikörper für β -Defensin-2 (aa 4-41)	Acris Antibodies, Hiddenhausen Best. Nr.: AM02221PU-N
Monoklonaler Maus-Antikörper für CD1a Novocastra	Leica Biosystems, Newcastle Best. Nr.: NCL-CD1a-235
Monoklonaler Maus-Antikörper für CD8	DAKO, Hamburg Best. Nr.: M7103
Monoklonaler Maus-Antikörper für PD1	Abcam, Cambridge Best. Nr.: ab 52587-100
Monoklonaler Maus-Antikörper für Fox P3	Abcam, Cambridge Best. Nr.: ab 20034
Sekundärantikörper Histofine: Simple Stain MAX PO (Multi)Universal Immuno-peroxidase Anti-Mouse and -Rabbit	Medac, Hamburg
Sekundärantikörper Zytocem Plus HRP Polymer System	Zytomed Systems, Berlin Best. Nr.: POLHRP-100
Post-Block-Reagenz	Zytomed Systems, Berlin Best. Nr.: POLHRP-100
DAB (Diaminobenzidin) Substrat Puffer	DAKO, Hamburg Best. Nr.: K3468
Hämalaun nach Meyer	Merck, Berlin/Darmstadt
Methanol H ₂ O ₂	Merck, Berlin/Darmstadt
Tris-Base	Sigma-Aldrich, St. Louis Best. Nr.: 93349

2. Materialien und Methoden

Tris HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis Best. Nr.: T5941
NaCl	Merck, Berlin/Darmstadt
Tween 20	Merck, Berlin/Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Berlin/Darmstadt
NaOH	Merck, Berlin/Darmstadt
EDTA (Titrplex III)	Merck, Berlin/Darmstadt
Xyolol	Merck, Berlin/Darmstadt
Antibody Diluent	Ventana, Arizona Best. Nr.: 251-018
LCS (Liquid Coverslip)	Ventana, Arizona Best. Nr.: 650-010
Enhanced alkaline phosphatase red	Ventana, Arizona Best. Nr.: 800-031
Verdünnungslösung Hama-Elisa VIR-DIL	Medac, Hamburg Best. Nr.: 100204002

2.2 Spüllösungen

Tris-Waschpuffer

9,0 g Tris-Base

68,5 g Tris-HCL

87,8 g NaCl

auf 10 Liter Aqua dest. und 5 ml Tween 20

Citratpuffer 10 mM: pH 6

10,5 g Zitronensäure-Monohydrat mit ca. 65 ml NaOH (2N) in 5 Liter Aqua dest. auf einen pH von 6 titrieren

EDTA-Puffer 10mM: pH 8

18,6 g EDTA (Titriplex III) mit ca. 22 ml NaOH (2N) in 5 Liter Aqua dest. auf einen pH von 8 titrieren

2.3 Verdünnung der Primärantikörper

Der monoklonale, das hBD-2 detektierende Maus-Antikörper wird in einem Verhältnis von 1:100 in einer Antibody-Diluent Lösung verdünnt.

Die Verdünnung der Antikörper für CD8 (1:200), CD1a (1:10), PD1 (1:50) und Fox P3 (1:50) erfolgt im Probenverdünnungspuffer des Hama-Elisa-Kits der Firma Medac, Hamburg. Dieser Puffer enthält PBS, Tween und BSA mit einem pH zwischen 7,2 und 7,4. Die genannten Verdünnungen weisen jeweils in ihrem Verdünnungsverhältnis eine maximale Färbeintensität bei minimaler Hintergrundfärbung auf. Man spricht hier von einem maximalen Signal-Rausch-Verhältnis (Boenisch T. 2003).

2.4 Färbemethode

Als Färbemethode wurde die 2-Schritt bzw. 3-Schritt (PD1) indirekte Methode gewählt, wobei ein unkonjugierter (unmarkierter) Primärantikörper an das Antigen bindet und anschließend ein enzymmarkierter, gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper aufgetragen wird. Dieser kann dann mittels einer Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht werden. Diese Methode wurde aufgrund ihrer hohen Sensitivität genutzt, da wahrscheinlich mehrere Sekundärantikörper mit verschiedenen

Epitopen des Primärantikörpers reagieren und somit das Signal verstärkt wird (Boenisch T. 2003).

2.5 Procedere der immunhistochemischen Färbung

Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms wurden zuvor in Formalin fixierte und in Paraffin gegossene Hautproben in einzelne Schnitte einer Schichtdicke von 1-2µm vorbereitet. Anschließend wurden die Paraffinschnitte auf beschichtete Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen) verbracht und für eine Nacht bei 37-42°C im Brutschrank getrocknet. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Objektträger für mindestens 10 Minuten in ein Lösungsmittel (Xylol) gegeben. Die folgenden Färbeschritte wurden in wässrigen Lösungen durchgeführt, so dass hierzu die Proben mittels einer absteigenden Alkoholreihe (3x in 100% danach 2x in 96% und abschließend 1x in 70%) gespült und so dem Wasser zugeführt (rehydratisiert) wurden.

Zur Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch die probeneigene, endogene Peroxidase erfolgte eine Blockung derselben indem die Präparate für 10 Minuten in eine Methanol H₂O₂ Lösung gegeben wurden. Die Antigenbindungsstellen, die sogenannten Epitope, können durch die Formalinfixierung verändert werden, wobei es zu einer Veränderung der Struktur im Sinne einer Konformationsänderung kommen kann oder das Fixativ die Bildung chemischer Quervernetzungen der Proteine induziert. Hierbei können die Veränderungen innerhalb desselben Proteins als intramolekulare Cross-Links oder auch zwischen verschiedenen Proteinen als intermolekulare Cross-Links erfolgen. Die Folge kann ein vollständiger oder partieller Verlust der Immunreaktivität des Antigens sein. Dieser Vorgang wird als Antigen-Maskierung bezeichnet (Key M. 2003). Für formalinsensitive Gewebsantigene war es also wichtig eine Antigendemaskierung (Epitop-Retrieval) durchzuführen und somit die Immunreaktivität dieser formalinfixierten Gewebe zu verbessern. Hierzu wurden die Proben für 3 Minuten in Citratpuffer pH 6 in einem Dampfkochtopf gekocht (Cattoretti G. und Suurmeijer A.J.H. 1994). Für die Fox P3 Färbung wurde die Vorbehandlung nicht im Citratpuffer sondern im EDTA Puffer mit einem pH 8 durchgeführt.

Der Antigendemaskierung folgend schloß sich ein Spülen der Proben mit Wasser und dann in Tris-Waschpuffer an. Nun wurden die Gewebeproben für eine Stunde mit 100µl des primären Antikörpers inkubiert. Dieser Schritt erfolgte auf einer Glassplatte bei Zimmertemperatur. Anschließend Spülung der Proben mit Tris-Waschpuffer und 3 malig mit Leitungswasser.

Verblieb der Gewebe im Waschpuffer. 100µl des sekundären Antikörpers, welcher für diese Färbezwecke zwingend HRP (Horse Radish Peroxidase) konjugiert sein muss, wurden nun für 30 Minuten aufgetragen. Bei der PD1 Färbung wurde vor dem Auftragen des Sekundärantikörpers eine Post-Block-Reagenz für 20 Minuten als Verstärkungsreagenz aufgetragen, weshalb man hier von der 3-Schritt indirekten Methode spricht. Wieder schloß sich ein Spülen in Tris-Waschpuffer und 3 malig in Leitungswasser an. Erneut Verblieb der Objektträger im Waschpuffer in Hellendahl-Küvetten. Die Visualisierung erfolgte über eine Enzym-Substrat-Reaktion wobei eine Diaminobenzidin-Substrat-Chromogenlösung (DAB) für 5-7 Minuten aufgetragen wurde, welche dann eine enzymatische Reaktion mit der Peroxidase des Sekundärantikörpers einging. Hierbei bildete sich am Ort der Bindung des Primärantikörpers ein Farbniederschlag der wiederum unter dem Lichtmikroskop sichtbar war (vgl. Gebrauchsanweisung Zytocem-Plus HRP Polymer-Kit, Zytomed Systems). Für die hBD-2 Färbung wurde das Enhanced Alkaline Phosphatase Red KIT als Detektionssystem genutzt. Spülung mit Wasser. Mit einer zweiten Färbung wurde nun ein Kontrasteffekt erzielt. Dies wurde durch eine Gegenfärbung, mit Hämalaun nach Mayer für 3-5 Minuten, erreicht. Dabei kam es durch die anschließende Spülung mit Leitungswasser zu einer Blaufärbung der Zellkerne und somit zu einem höheren Kontrast. Die Proben wurden dann für 10 Minuten im Wasser in den Hellendahl-Küvetten belassen. Aus den Präparaten wurde nun das Wasser mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder entzogen. Abschließend wurden die Proben erneut in Xylol gespült und mit Pertex eingedeckelt.

Das für die hBD-2 Färbung genutzte LCS (Liquid Coverslip) bildet als Eindecklösung eine Barriere zwischen wässrigen Reagenzien und Luft und diene somit der Verhinderung der Evaporation. Aus diesem Grund eignete sich diese Lösung, da sie eine stabile wässrige Umgebung erzeugt, für den hier genutzten Färbeautomaten.

2.6 Färbeprotokoll der Immunfärbung

- 1) Paraffinschnitte werden auf beschichteten Objektträgern für eine Nacht bei 37- 42 C° im Brutschrank getrocknet
- 2) 10 Minuten in Xylol
- 3) 3x Spülen in Xylol
- 4) Absteigende Alkoholreihe 3x 100%, 2x 96%, 1x 70%
- 5) Blocken der endogenen Peroxidase
- 6) Demaskierung der Antigene

- 7) Spülen in Leitungswasser und anschließend in Tris-Waschpuffer stellen
- 8) 1 Stunde 100 µl des primären Antikörpers
- 9) Tris-Waschpuffer, 3x Spülen in Leitungswasser, Tris-Waschpuffer
- 10) 30 Minuten 100µl des sekundären Antikörpers (HRP konjugiert)
- 11) Tris-Waschpuffer, 3x Spülen in Leitungswasser, Tris-Waschpuffer
- 12) 5-7 Minuten 100µl Dako-DAB
- 13) Spülen in Leitungswasser
- 14) 3-5 Minuten Hämalun nach Mayer (Verdünnung 1:4)
- 15) Spülen in Leitungswasser
- 16) 10 Minuten im Wasser stehen lassen
- 17) Aufsteigende Alkoholreihe 1x 70%, 2x 96%, 3x 100%, 2x in 100% Alkohol/Xylol (Konzentration 1:1)
- 18) 4x Spülen in Xylol und mit Pertex eindeckeln

2.7 Methodik / Aufbau der Arbeit

2.7.1 Gewebeproben

Für diese Arbeit wurden Hautproben von 140 Patienten mit verschiedenen entzündlichen Dermatosen untersucht. Der Probeneingang erfolgte innerhalb von etwa 4 Jahren (2006-2009) von niedergelassenen Hautärzten aus dem nordwestdeutschen Raum. Die Diagnosen wurden von einem erfahrenen Fachexperten für Dermatopathologie mithilfe der klassischen Histologie am Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitt unter Berücksichtigung der klinischen Präsentation gestellt.

Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten in vollständig anonymisierter Form und damit in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Verwendung von Archivmaterial in der Pathologie.

Nach entsprechender, unter 2.5 beschriebener Vorbereitung, wurden die Hautpräparate zunächst histologisch und anschließend immunhistochemisch beurteilt. Hierzu wurden die Proben gefärbt und folgend unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena) in einer 4er, 10er, 20er und 40er Objektivvergrößerung betrachtet. Anschließend wurde im inflammatorisch veränderten Gewebe ein repräsentatives Areal bestimmt in dem unter Mithilfe eines Mikroskoprasters 100 Lymphozyten ausgezählt wurden. Somit war eine Prozentangabe als Verhältnis der markierten zu nicht markierten T-Lymphozyten möglich. Bei der hBD-2

Färbung erfolgte eine Zuordnung über die Färbeintensität als Ausdruck der Anzahl positiv getesteter Hautzellen.

2.7.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Zur Einteilung der verschiedenen Färbungen wurden mehrstufige Wertungssysteme (Scores) zugrunde gelegt. Untersucht wurde die β -Defensin-2 Expression im Stratum corneum und getrennt davon betrachtet in den weiteren Zellschichten der Epidermis sowie der Dermis. Nun folgte eine Score-Zuordnung von 0-3 wobei der Score 0 keine hBD-2 Detektion im Gewebe beschrieb und der Score 3 eine hohe, deutliche und spezifische β -Defensin-2 Färbung anzeigte. Der Score 1 und 2 beschrieb jeweils aufsteigend die Zwischenformen mit wenig und mittelgradiger hBD-2 Expression. Bei der CD1a Färbung erfolgte die Score-Zuordnung ebenfalls semiquantitativ wobei eine Wertung von 1 keine oder wenig Expression beschrieb und die Wertung 2 und 3 eine mäßige bzw. hohe Expression angab. Bei der PD1-Detektion wurde ein 3 stufiges Wertungssystem in Prozentangabe genutzt. Hierbei erfolgte eine Einteilung in 0-10%, 10-50% und über 50% spezifisch gefärbter PD1 positiver Lymphozyten. Für die CD8 und Fox P3 Einteilung wurden wieder in einem repräsentativen Areal 100 Lymphozyten manuell ausgezählt und diese dann als markierte (positive) und nichtmarkierte (negative) Lymphozyten in Prozent angegeben. Somit nutzten wir ein 2, 3 und 4 stufiges Wertungssystem zur Illustration der Ergebnisse. Die ermittelten Werte wurden zum besseren Vergleich in Tabellenlisten aufgenommen, so dass anschließend die im Ergebnisteil angegebenen Diagramme erstellt werden konnten.

Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse (Tabellen und Diagramme) dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2000 erstellt. Das Bildmaterial konnte mit dem Lichtmikroskop/Kamerasystem (Colorview soft imaging System) und dem Fotoprogramm (analy SIS® Five, Digital imaging solutions) erstellt werden.

Die Literaturrecherche erfolgte über die lokale Datenbank der Universitätsbibliothek der Christian-Albrechts-Universität Kiel, der Universitätsbibliothek der Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg sowie Internetrecherche über www.medline.de und www.pubmed.com. Die verschiedenen Subtypen der entzündlichen Hauterkrankungen wurden auch aufgrund fehlender Unterschiede in der immunhistochemischen Färbung dieser Untersuchungen unter der jeweiligen Hauptgruppe wie Ekzem, Pityriasis oder Tinea subsummiert. Um eine direkte Korrelation der hBD-2 Expression und der Diagnose einer Psoriasis vulgaris aufzeigen zu

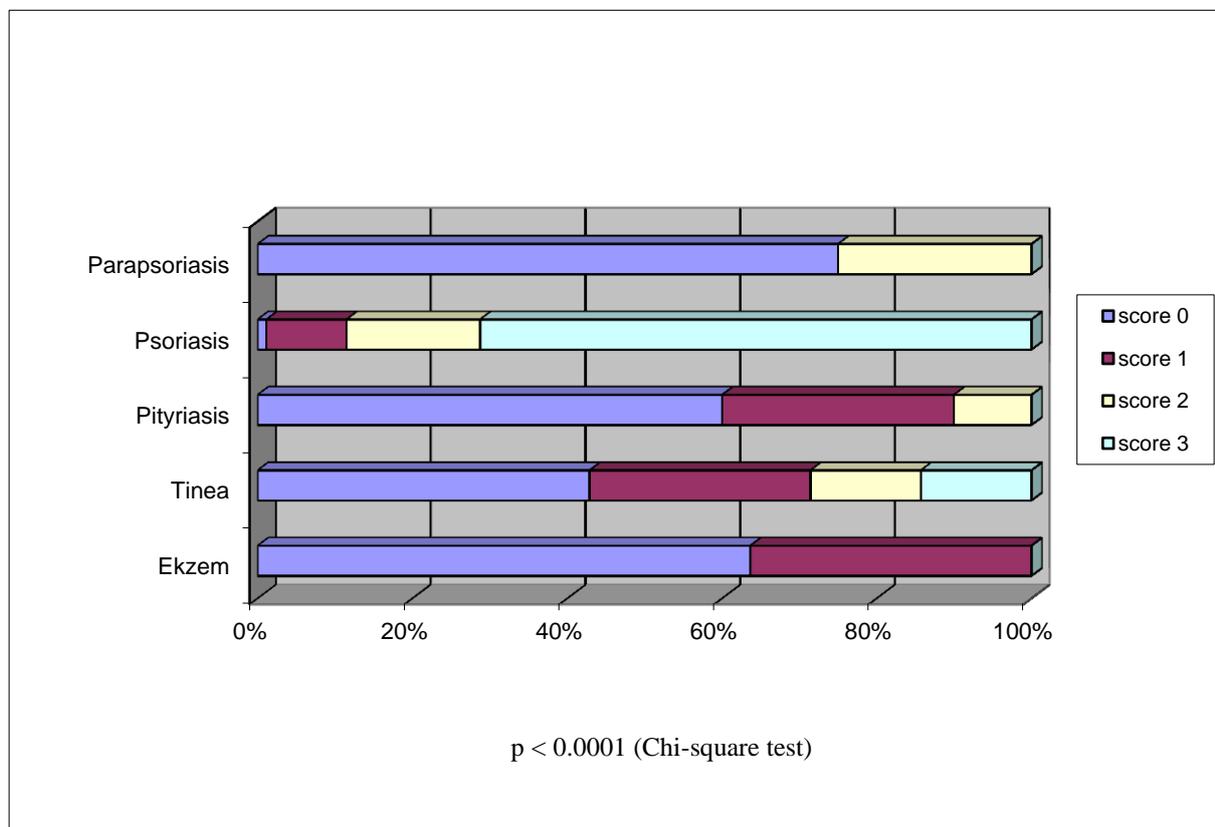
2. Materialien und Methoden

können wurden für diese Arbeit nur Psoriasispräparate verwandt, welche durch einen Fachexperten für Dermatopathologie im konventionell histologischen Bild zweifelsfrei als Psoriasis vulgaris beschrieben wurden. Einer Fehlinterpretation aufgrund eines Diagnosewechsels nach immunhistochemischer Färbung wurde somit vorgebeugt.

3. Ergebnisse

3.1. HBD-2 Färbung Stratum corneum

Bei der Bewertung der Färbearalyse wurde die Hornschicht (Stratum corneum) getrennt von den anderen subcorneal gelegenen Schichten der Epidermis und Dermis betrachtet.



Grafik 1) Immunhistochemische hBD-2 Detektion im Stratum corneum

Psoriasis vulgaris (n = 86), Ekzem (n = 20), Pityriasis (n = 10), Tinea (n = 7) und Parapsoriasis (n = 4).

Der höchste Score 3, also die deutlichste hBD-2 Expression, zeigt sich bei über 70% der an einer Psoriasis vulgaris leidenden Patienten wohingegen der Score 0 mit 1,15% einen erheblich geringeren Teil der Psoriasispatienten einnimmt.

Der Score 3 läßt sich bei diesen Färbungen einzig nur noch bei der Tinea mit 14,28% aufzeigen. Anhand der Grafik wird deutlich, dass das Ekzem, die Tinea und die Pityriasis sowie die Parapsoriasis jeweils den größten Anteil im Score 0 (keine Antigenmarkierung des hBD-2 Peptids) aufzeigen. Diese Expressionsbewertung kann, wie in der Grafik eindeutig zu sehen ist, bei der Psoriasis nur in 1,15% der Fälle nachgewiesen werden. Im direkten

3. Ergebnisse

Vergleich der Psoriasis mit dem Ekzem kann hier ebenfalls ein deutlicher Unterschied dargestellt werden, da der Score 2 bei den getesteten Ekzempatienten ebenfalls nicht erreicht wird. Wenig hBD-2 Expression (Score 1) zeigt sich sowohl beim Ekzem als auch bei der Pityriasis und der Tinea, allerdings auch bei 17,24% der bewerteten Psoriasisfälle.

Im Folgenden ist ein histologisches Bildbeispiel nach antigen-antikörperbasierter β -Defensin-2 Färbung dargestellt.

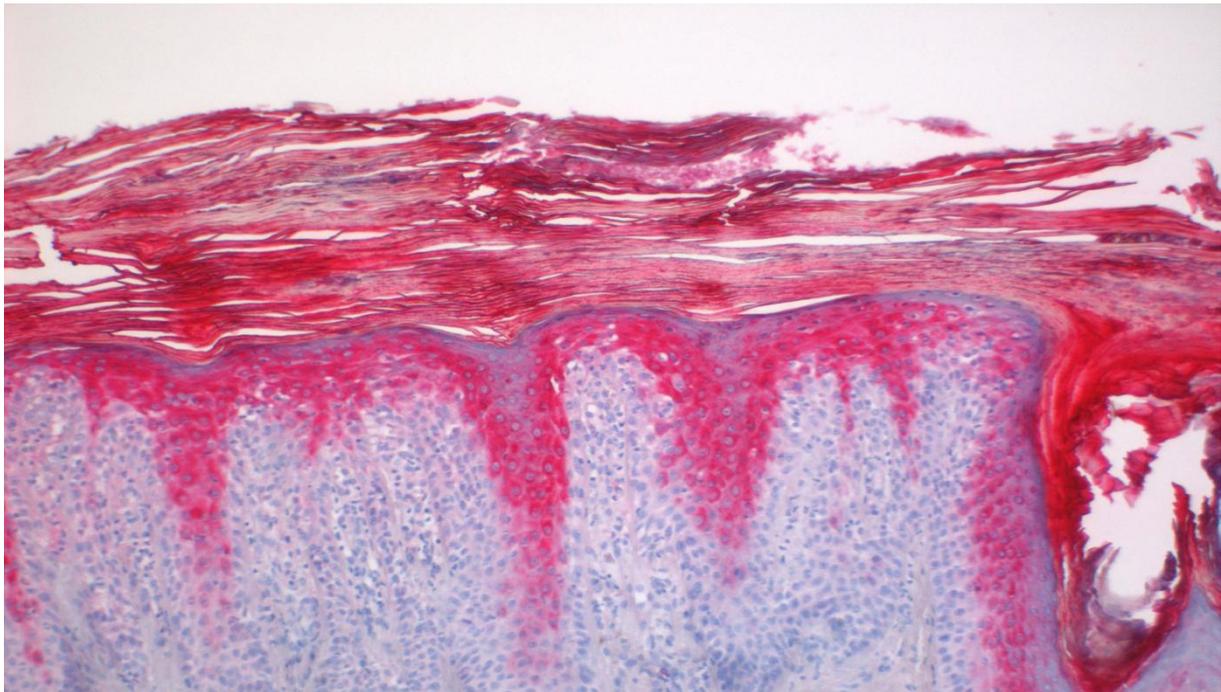


Abb. 2) Darstellung einer Psoriasisläsion in der hBD-2 Färbung und 10facher Objektivvergrößerung. Dieses Bild wurde im Score 3 (starke Expression) beurteilt.

Histologisch zeigt sich eine für die Psoriasis vulgaris charakteristische Hyperproliferation der Hornschicht (Hyperkeratose). Des Weiteren ist hier auch eine Akanthose im Sinne einer Verdickung der gesamten Epidermis dargestellt. Diese Veränderungen sind typisch allerdings nicht pathognomonisch für die Psoriasis vulgaris.

Eindeutig ist eine spezifische Anfärbung des Stratum corneums erkennbar.

Diese Hautprobenfärbung wurde mit dem Score 3, also der deutlichsten hBD-2 Detektion, skaliert.

3. Ergebnisse

Im Gegensatz hierzu zeigt in der gleichen Färbung das im folgenden dargestellte Ekzem ein vollkommen anderes Färbeverhalten.

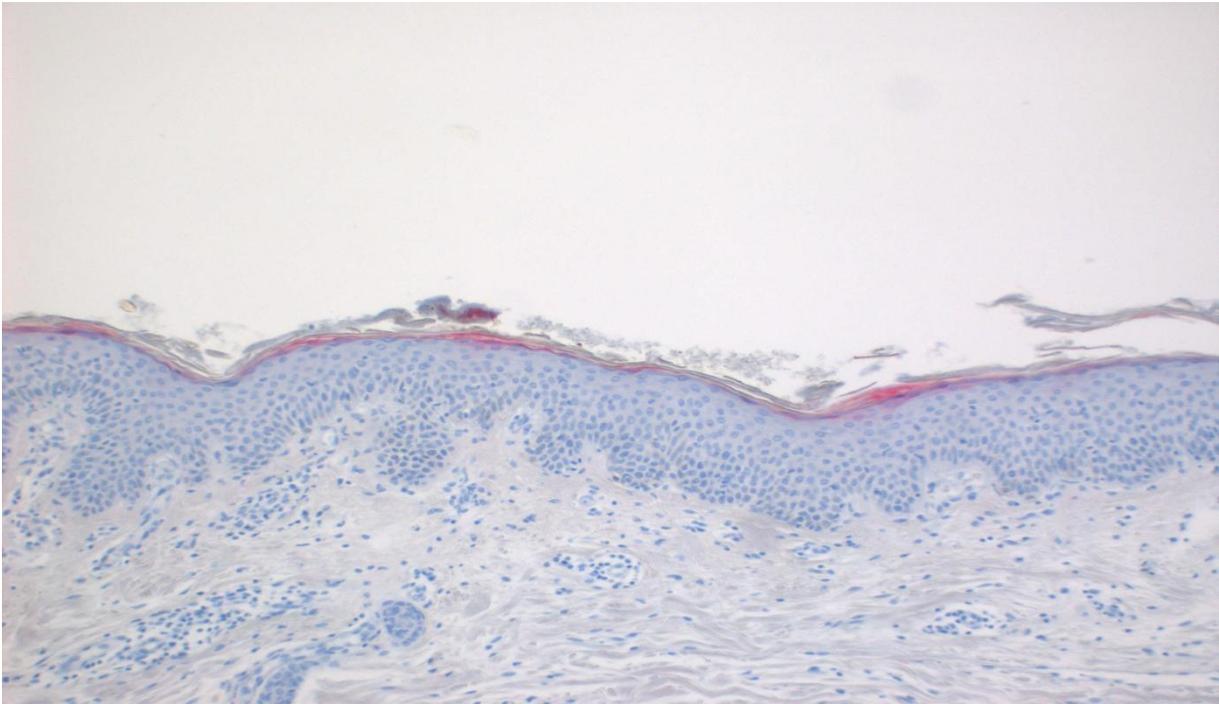
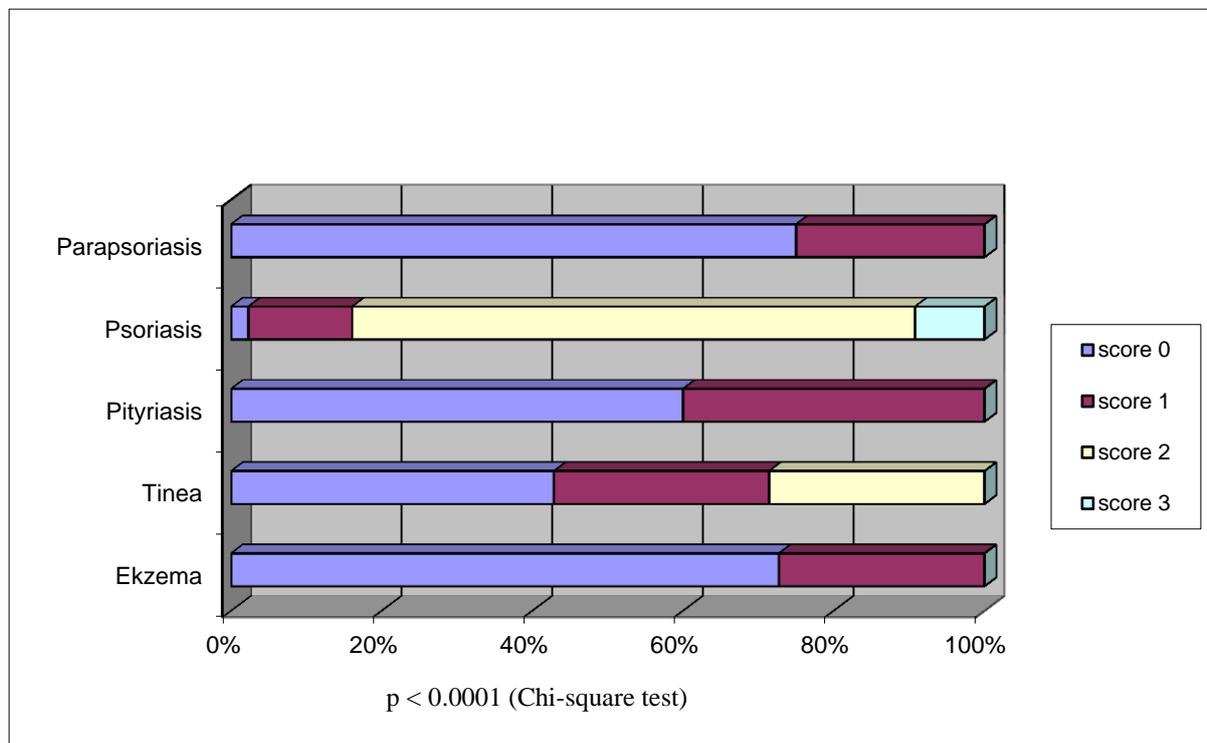


Abb. 3) Immunhistochemische hBD-2 Detektion in einer Ekzemhautprobe (10fache Objektivvergrößerung)

Das dargestellte Ekzem weist im Stratum corneum eine lediglich leichtgradige, unspezifische Anfärbung auf. Weitere subcorneale Zellschichten zeigen in dieser Darstellung in Abgrenzung zu der immunhistochemischen hBD-2 Detektion in der Psoriasis vulgaris keine Anfärbung. Dieses Bild wurde im Skalierungssystem mit dem Score 1 bewertet.

3.2 HBD-2 Färbung extracornealer Zellschichten der Epidermis und Dermis

In Anlehnung an die in der Grafik 1 dargestellte hBD-2 Expressionsbewertung der Hornschicht wurde zur Illustration der Färbeergebnisse der subcornealen Schichten ebenfalls ein 4 stufiges Skalierungssystem genutzt.



Grafik 2) Immunhistochemische hBD-2 Detektion der subcorneal gelegenen Zellschichten der Epidermis und Dermis

Psoriasis vulgaris (n = 78), Ekzem (n = 22), Pityriasis (n = 10), Tinea (n = 7) und Parapsoriasis (n = 4).

Es ist ersichtlich, dass der höchste Score 3 mit 9,2 % der Fälle ausschließlich, wenn auch im geringeren Ausmaß als bei der Stratum corneum Betrachtung, allein von Psoriasispatienten erreicht wird. Des Weiteren zeigt die Psoriasisuntersuchungsreihe als Einzige den Hauptanteil im Score 2 also die mittlere Anzahl der mittels der hBD-2 Färbung detektierten Peptide (vgl. Abb. 3). Ähnlich wie schon bei der Hornschichtfärbung zeigt sich auch hier die Tinea im Score 2 positiv. Mit Ausnahme der Tinea weisen die anderen getesteten Dermatitiden erneut den größten Anteil im Score 0 auf, d.h. hier wird mit der β -Defensin-2 Färbung kein hBD-2 detektiert.

3. Ergebnisse

Der Score 1, also wenig hBD-2 Expression, zeigt sich bei der Pityriasis mit 40% am deutlichsten, wobei die Psoriasis vulgaris von den gefärbten Hautproben in diesem Score 1 den kleinsten Anteil einnimmt. Der Score 0 zeigt sich bei der Psoriasis vulgaris nicht. Die für die Psoriasis vulgaris in dieser Untersuchung beschriebenen Prozentangaben beziehen sich auf die Färbung der subcorneal gelegenen Zellschichten der Epidermis. Eine hBD-2 Detektion im Bereich der Dermis ist nicht aufzeigbar.

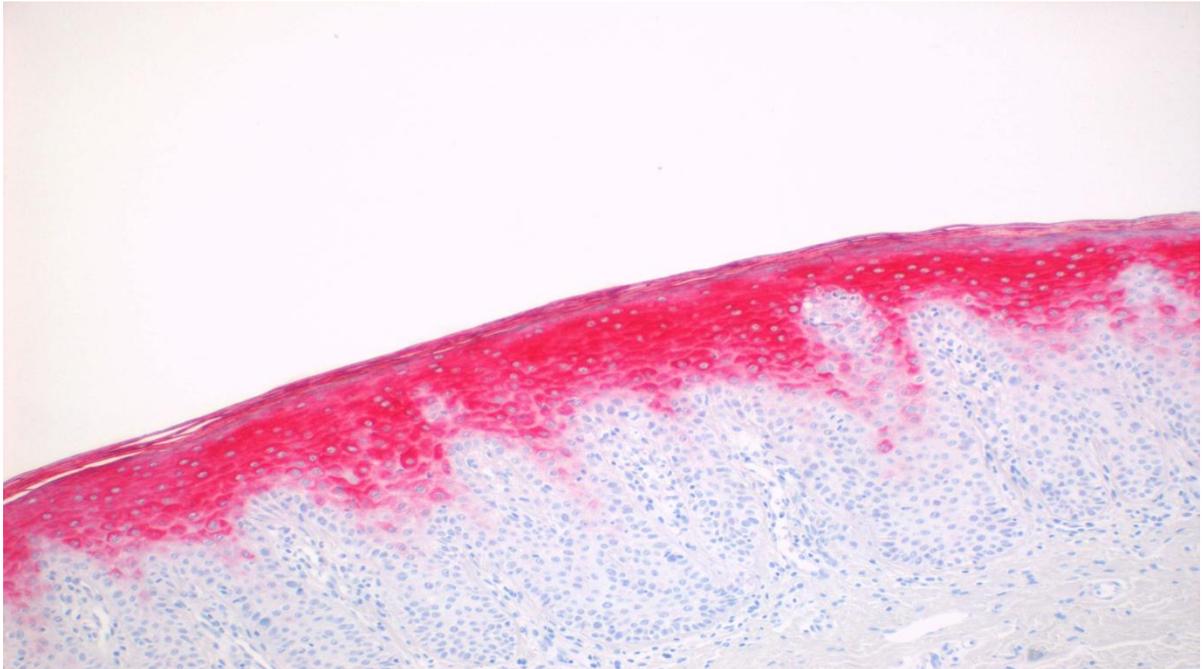


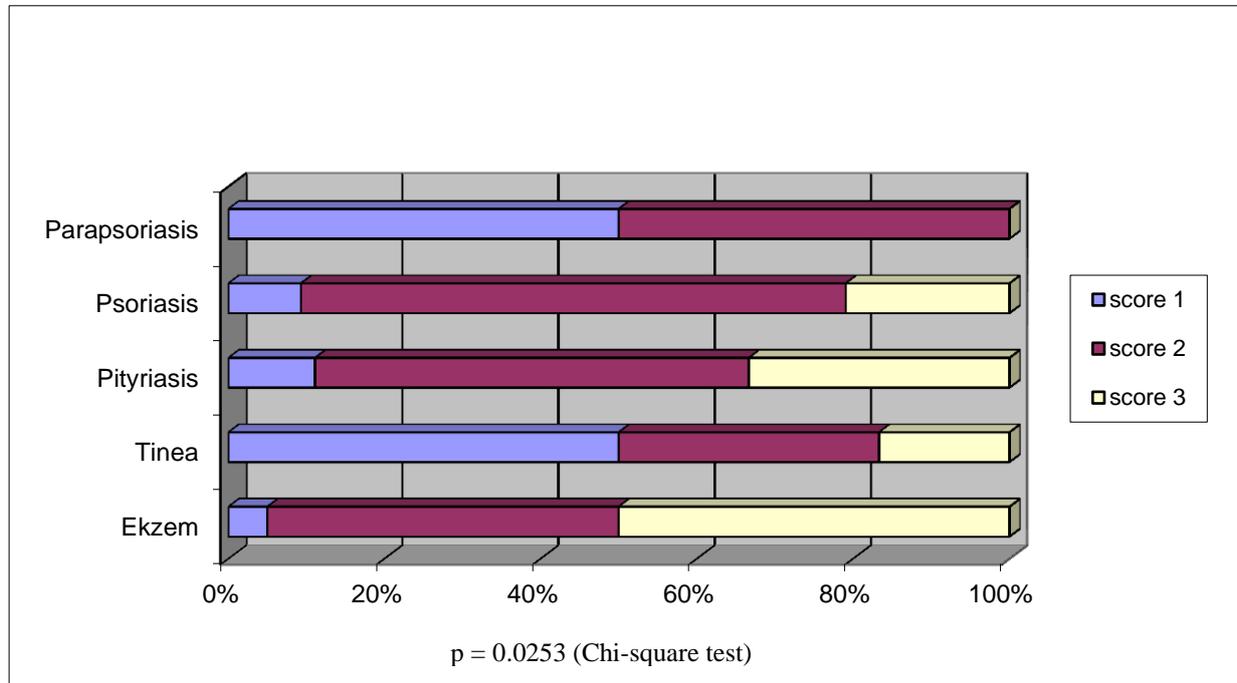
Abb. 4) Immunhistochemische hBD-2 Detektion in einer Psoriasis vulgaris Hautprobe.

In der hier dargestellten Abbildung einer mit dem 10fach Objektiv vergrößerten Psoriasis histologie zeigt sich eindrücklich neben der Hornschichtfärbung auch die subcorneale Detektion von hBD-2.

Trotz spezifischer Färbung der Epidermis ist im Bereich der Dermis keine β -Defensin-2 Expression zu beobachten.

3.3 CD1a Färbung der Epidermis

Mit der CD1a Färbung lassen sich dendritische Zellen im inflammatorisch veränderten Gewebe markieren.

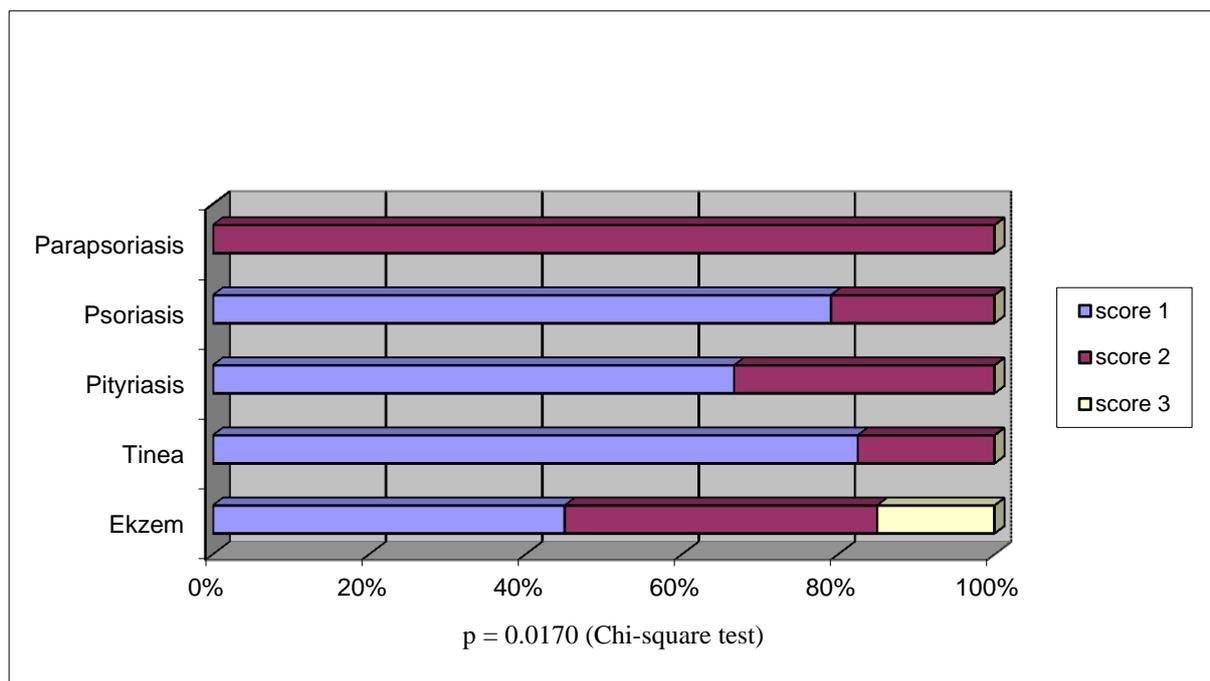


Grafik 3) Detektion CD1a positiver Zellen in der Epidermis von Hautproben verschiedener Dermatitiden

Psoriasis vulgaris (n = 43), Ekzem (n = 20), Pityriasis (n = 9), Tinea (n = 6) und Parapsoriasis (n = 2).

Die Psoriasis und die Pityriasis präsentieren sich bei dieser CD1a Färbung morphologisch ähnlich. Es ist das stärkste Färbeverhalten im Score 2 und ein Abfall im Score 3 bei Beiden zu beobachten. Die Tinea weist eine fallende Tendenz vom Score 1 bis 3 auf und das Ekzem zeigt sich im Score 2 und 3 in einem Verhältnis von 50% zu 50% wobei nur sehr wenige Fälle im Score 1 detektiert werden.

3.4 CD1a Färbung der Dermis



Grafik 4) Detektion CD1a positiver Zellen in der Dermis von Hautproben verschiedener Dermatitiden.

Psoriasis vulgaris (n = 43), Ekzem (n = 20), Pityriasis (n = 9), Tinea (n = 6) und Parapsoriasis (n = 2).

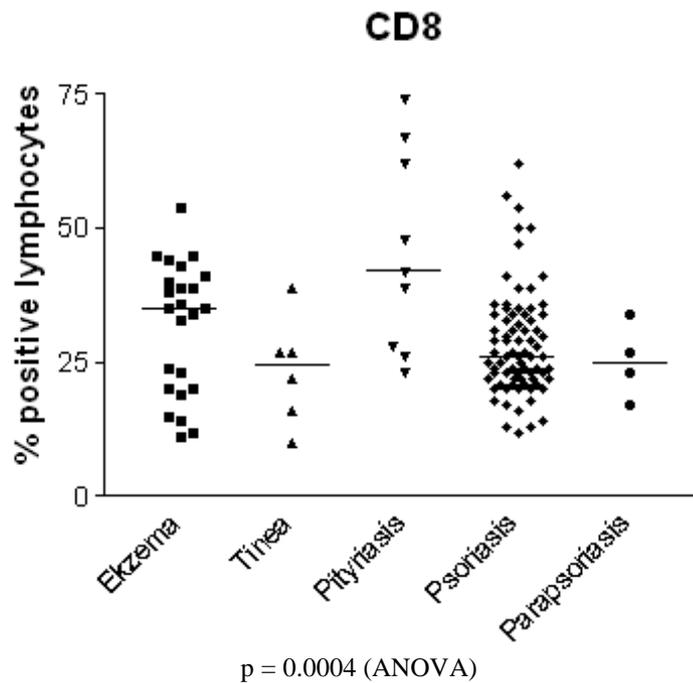
Setzt man den Score 2 mit dem Score 1 in Beziehung so bilden sich die Psoriasis, die Pityriasis und die Tinea in einem Verhältnis von 1:3 bzw. 1:4 ab. Die höchste Wertung wird von diesen Erkrankungen nicht erreicht.

Das Ekzem weist im Score 1 und 2 ein Verhältnis von 1:1 auf, wobei das Ekzem auch im höchsten Score vertreten ist.

Die Parapsoriasis zeigt sich zwar gänzlich im Score 2, dies ist aber mit einer Probenanzahl von n = 2 für unsere Untersuchung ohne Aussagekraft.

3.5 CD8 Färbung der Epidermis und Dermis

Die CD8 Färbung dient der Darstellung von zytotoxischen T-Zellen



Grafik 5) Punktdiagramm: CD8 positive Lymphozyten in prozentualer Angabe in Hautproben verschiedener Dermatitis

Trotz einer hohen Streubreite der CD8 positiven Lymphozyten bei diesen verschiedenen Hauterkrankungen zeigt sich nach jeweiliger Mittelwertbestimmung doch ein signifikanter Unterschied. Deutlich lässt sich dies beim Ekzem vergleichend mit der Psoriasis vulgaris aufzeigen. Während die Ekzemproben bei der CD8 Detektion im Mittel bei 36% liegen ist der bei den Psoriasis vulgaris Proben ermittelte Wert ca. 10% darunter angesiedelt. Ein noch größerer Unterschied zeigt sich im Vergleich der Pityriasis mit der Psoriasis vulgaris. Zur quantitativen Abgrenzung der Tinea oder der Parapsoriasis eignet sich die CD8 Färbung nicht.

3. Ergebnisse

Beispielhaft an der folgenden Abbildung sind die mit einem CD8 markierenden Antikörper gefärbten Lymphozyten im entzündlichen Infiltrat eines Ekzems zu sehen.

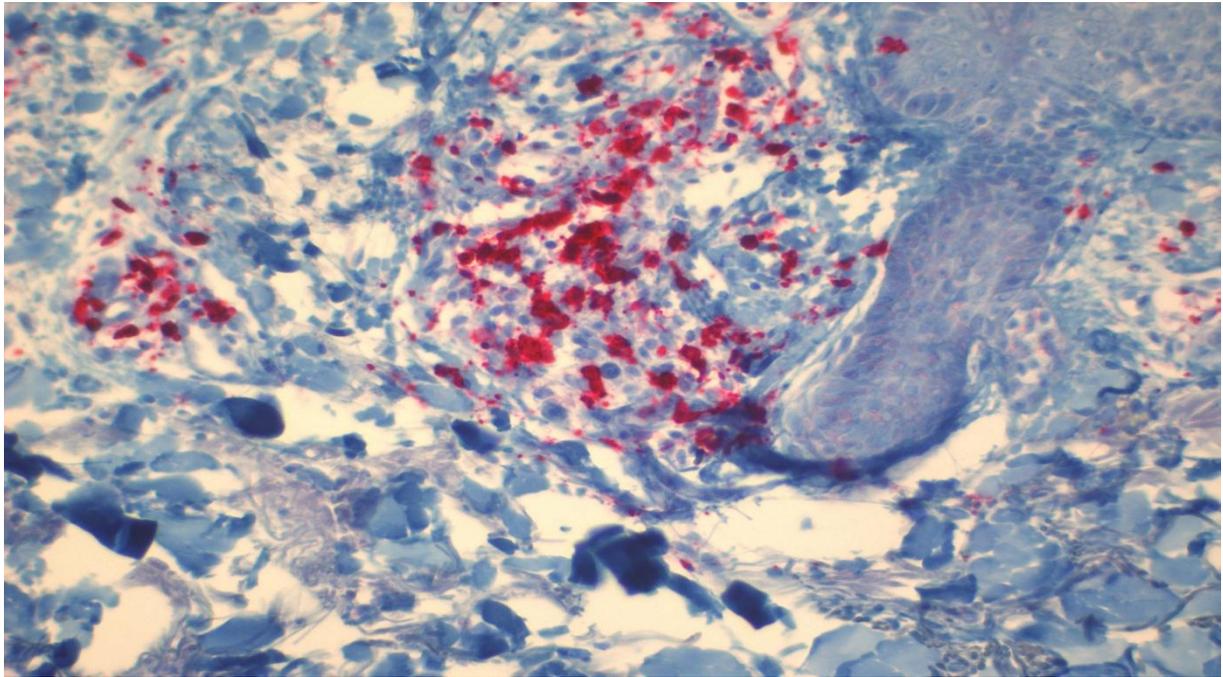
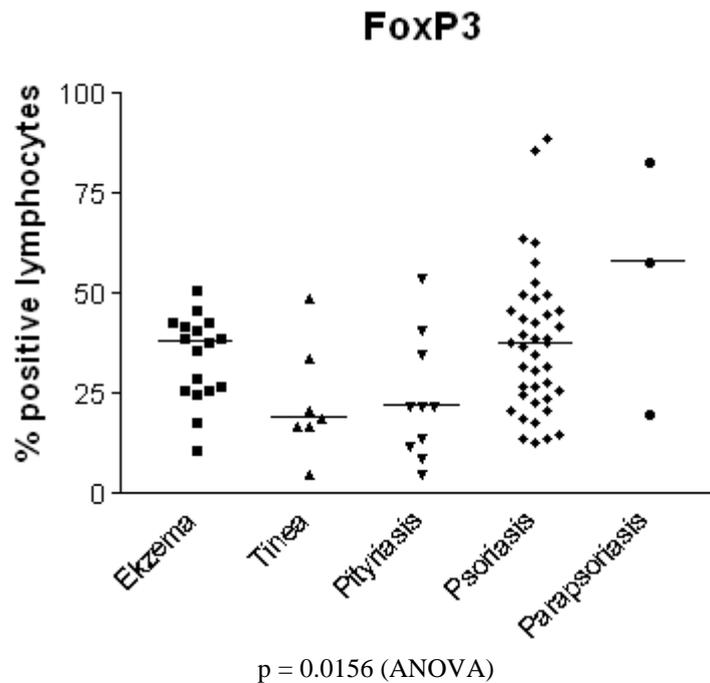


Abb. 5) Abbildung eines Ekzems in der CD8 Färbung mittels einer 20fachen Objektivvergrößerung

3.6 Fox P3 Färbung der Epidermis und Dermis

Das Forkhead-Box-Protein P3 (Fox P3) gilt als Marker zur Darstellung von regulatorischen T-Zellen.



Grafik 6) Punktdiagramm: Fox P3 positive Lymphozyten in prozentualer Angabe in Hautproben verschiedener Dermatitis

Auch hier zeigt sich eine deutliche Streubreite der einzelnen Zuordnungen nach der Zahl positiv und negativ beurteilter Lymphozyten. Obwohl, wie eindeutig zu sehen ist, eine Abgrenzung der einzelnen Erkrankung mittels der Fox P3 Färbung nicht möglich erscheint, sind doch im Mittelwert des Kollektivs der jeweiligen Dermatitis deutliche Unterschiede darstellbar. Während sich bei den getesteten Ekzem- und Psoriasisfällen in etwa der gleiche Mittelwert bestimmen lässt, weisen jeweils die Tinea und die Pityriasis einen ähnlichen aber im Vergleich mit den anderen zuvor genannten Hauterkrankungen um nahezu 10% niedrigeren Mittelwert auf. Interessant ist der Vergleich der CD8 und der Fox P3 Färbung. Hier zeigt beispielsweise die Pityriasis in Bezug auf deren Mittelwert ein sich um über 20 Prozentpunkte unterscheidendes Färbeverhalten auf. Letztlich ist eine Diagnosezuordnung nach alleiniger CD8 oder Fox P3 Betrachtung aufgrund der hohen Streubreite nicht möglich.

3. Ergebnisse

Wie schon bei der CD8 Färbung ließ sich auch mit der antikörperbasierten Fox P3 Detektion keine Markierung im Epidermisbereich aufzeigen.

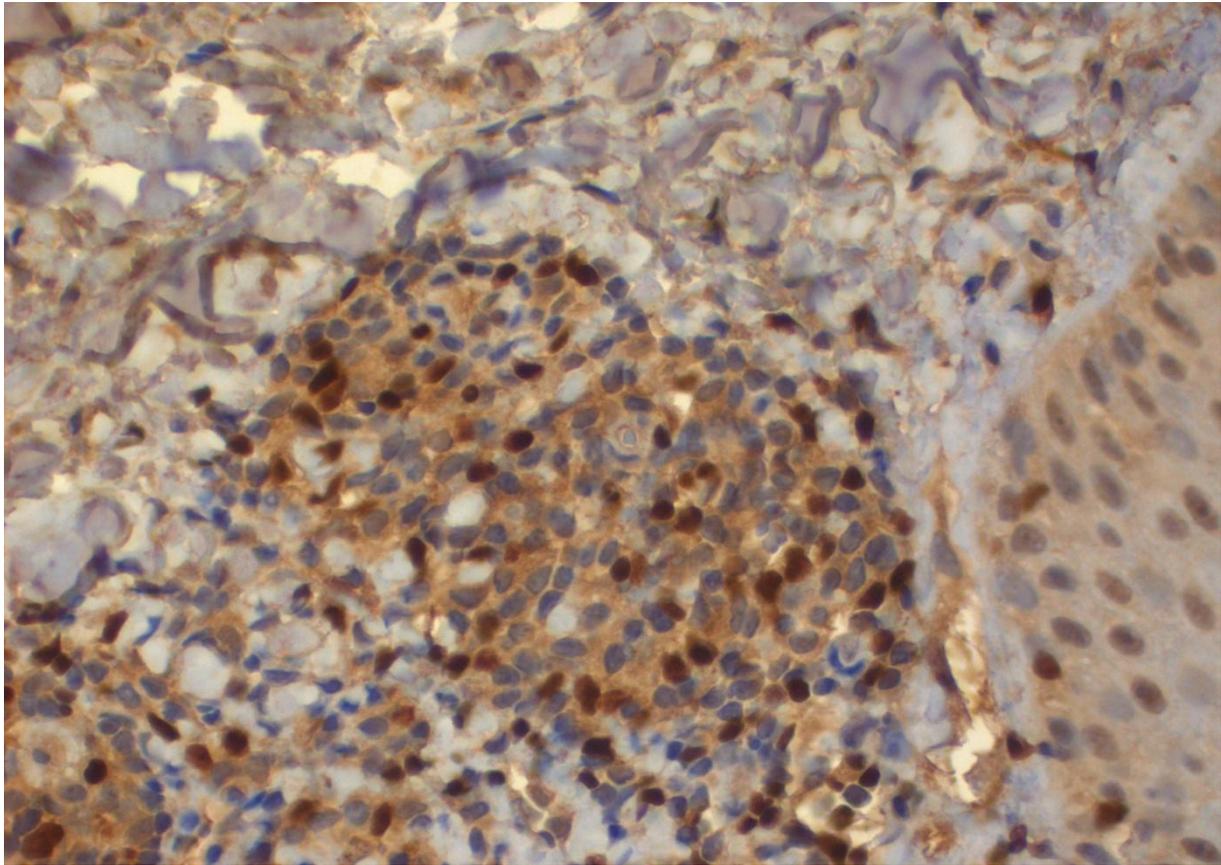


Abb. 6) Färbeverhalten der Dermis einer Psoriasishautprobe nach Fox P3 Markierung.

Das Forkhead-Box-Protein P3 (Fox P3) ist spezifisch für native und peripher entstandene regulatorische T-Zellen. Da es sich bei dem Fox P3 Protein um einen Transskriptionsfaktor handelt, kann man in der Abbildung 6 die markierten Zellkerne der als positiv beurteilten Lymphozyten sehen.

Beispielhaft ist hier ein repräsentatives Areal dargestellt in dem mit Hilfe des Lichtmikroskops in einer 40er Vergrößerung markierte und nichtmarkierte Lymphozyten ausgezählt und daraufhin jeweilige Zuordnungen getroffen wurden.

3.7 PD1 Färbung der Epidermis und Dermis

PD1 Markierung zur Darstellung follikulärer T-Helfer-Zellen.

Für die PD1 Detektion wurden Ekzem (n = 20), Tinea (n = 7), Pityriasis (n = 10), Psoriasis (n = 43) und Parapsoriasis (n = 3) Hautproben gefärbt.

Lediglich 5 Fälle ließen sich in der 10% - 50% Stufe einsortieren, wohingegen sämtliche anderen Proben in der 0% - 10% Markierungsgruppe färbe positiver Lymphozyten eingeordnet wurden. Für die über 50% Gruppe war kein Fall aufzeigbar. Insgesamt muss man hier postulieren, dass sich das PD1 Markierungsverhalten als differentialdiagnostisches Unterscheidungsmerkmal verschiedener Dermatitisiden aufgrund des ähnlichen Färbeverhaltens nicht eignet.

4. Diskussion

4.1 Bedeutung der T-Zellen und des humanen β -Defensins-2 für die Psoriasis vulgaris

Für den immunhistochemisch differentialdiagnostischen Nachweis einer Psoriasis vulgaris war es zunächst notwendig die Ätiopathologie dieser Erkrankung zu beleuchten. Neben genetischen und anderen Faktoren, welche auch derzeit noch nicht abschließend geklärt sind, die einen Einfluss auf die Entwicklung psoriatischer Läsionen haben, weisen zahlreiche Daten in den letzten Jahren darauf hin, dass diese komplexe Hautveränderung eine primäre T-Zell medierte Immunpathogenese darstellt (Lebwohl M. 2003; Schön M.P. und Boehnke W.H. 2005; Campalani E. und Barker J.N.W.N. 2005; vgl. AWMF S3 Leitlinie: Therapie der Psoriasis vulgaris. Einleitung: Pathogenese S. 13 Fassung 2011). Differenzierter betrachtet scheinen hier T-Zell Subpopulationen wie beispielsweise Th 22, Th 1 und Th 17 sowie Zytokine z.B. IL 22 und IL 20 eine pathogenetisch wichtige Rolle zu spielen (Sabat R. und Wolk K. 2011).

Für zahlreiche endo- und exogene Triggerfaktoren wird ebenfalls ein Mitwirken an der Entwicklung dieser Erkrankung postuliert (Christophers E. et al. 2003; Prinz J.C. 2004). Weitere Hinweise auf den Einfluss der T-Zellen bei der Entstehung psoriatischer Hautveränderungen wurden bereits 1979 publiziert. Damals konnte man einen erkrankungsmildernden Effekt von Ciclosporin A, einem T-Zell-spezifischen immunsuppressiven Medikament, auf die Psoriasis nachweisen (Mueller W. und Hermann B. 1979; Griffiths C.E. et al. 1986; Ellis C.N. et al. 1986). Später wurde durch die therapeutische Wirksamkeit von z.B. FK 506, monoklonalen anti- CD3 und anti- CD4 Antikörpern oder dem T-Zell selektiven Toxin DAB 389 IL-2 der Effekt von T-Zell supprimierenden Substanzen auf die Psoriasis Erkrankung bestätigt und somit die zentrale Rolle der T-Zellen in der Psoriasispathogenese untermauert (Michel G. et al. 1996; Weinshenker B.G. et al. 1989; Prinz J.C. et al. 1991; Nicolas J.F. et al. 1991; Gottlieb S.L. et al. 1995).

Mit dem Wissen, dass T-Zellen die Hauptprotagonisten in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris sind (Prinz J.C. 2001), lag die Vermutung nahe diese Erkrankung immunhistologisch mit einem T-Zell-markierenden Antikörper detektieren zu können und möglicherweise so von anderen Dermatitiden zu unterscheiden .

Auf dieser Grundlage konnte die initiale Fragestellung dieser Arbeit, wie sich die entzündlichen Infiltrate kutaner Dermatosen im Hinblick auf spezifische T-Zell-Populationen unterscheiden, beleuchtet werden, indem die Zusammensetzung des inflammatorischen

Infiltrates in Bezug auf eine T-Zell Markierung anhand der CD1a-, der CD8-, der Fox P3- und der PD1- Färbung der untersuchten Dermatitis verglichen wurde. Des Weiteren konnte eine Aussage über eine Abgrenzung der Psoriasis vulgaris von anderen Dermatitis nach Betrachtung des inflammatorischen Infiltrates getroffen werden. Da im Probenkollektiv aber ausschließlich inflammatorisch verändertes, kutanes Gewebe zur Verfügung stand und der Fragestellung folgend nur entzündliche Hautläsionen voneinander unterschieden werden sollten, war prinzipiell von einer Einwanderung immunmodulatorischer T-Zellen in allen Proben auszugehen. Deshalb wurde nach einer Eigenschaft gesucht, die nach Möglichkeit nur die Psoriasis vulgaris besaß und die diese Erkrankung a priori von anderen Dermatitis abgrenzte.

Vergleichend mit anderen an Hautinfektionen leidenden Menschen traten bei Psoriasispatienten kutane Superinfektionen in deutlich geringerem Maß auf als erwartet. (Henseler T. und Christophers E. 1995). Hierfür verantwortlich waren unter Anderem die von der Psoriasis Haut produzierten antimikrobiellen Peptide, insbesondere das von Harder et al. 1997 aus entzündlich veränderter Psoriasis Haut extrahierte humane β -Defensin-2 (hBD-2) (Harder J. et al. 1997). Gesunde Haut bewahrt im Gegensatz zur Psoriasis Haut keine oder nur geringe Mengen des hBD-2 Peptids auf (Schröder J.M. und Harder J. 1999). Immunhistochemisch ist es mit einem monoklonalen Antikörper (Monoclonal Antibody to beta-Defensin 2 (aa 4-41) von Acris Antibodies GmbH) in einem antigen-antikörperbasierten Färbeverfahren möglich spezifisch hBD-2 produzierende Zellen zu markieren. Auf dieser Basis war es möglich der weiteren Fragestellung der Arbeit, ob sich die Expression von hBD-2 in entzündlichen Dermatosen nachweisen und zur Differentialdiagnose dieser Erkrankungen heranziehen lässt, nachzugehen.

Da bei Mykosen ebenfalls eine Expression von hBD-2 gesehen werden konnte (Harder J. et al. 1997), ist es nicht verwunderlich auch hier eine Anfärbung der in der PAS Färbung als Tinea diagnostizierten Fälle zu sehen.

Bei isolierter Dermisbetrachtung kann ein Unterscheidungsnachweis mit der hBD-2 Färbung nicht erfolgen, da dieses Protein in den Keratinozyten der Epidermis vorkommt (Oren A. et al. 2003; Seo SJ. et al. 2001) und somit im Dermisbereich nicht identifizierbar ist (vgl. Abb. 4 im Ergebnisteil unter 3.2). Deshalb suchten wir im Dermisbereich eher nach einer auf die T-Zell-Markierung basierenden Unterscheidungsmöglichkeit.

4.2 Analyse und Interpretation der Detektion von humanem β -Defensin-2 in verschiedenen entzündlichen Dermatosen

In normaler Haut ist die Immunreaktivität des hBD-2 in den obersten kutanen Schichten am höchsten (Ali R.S. et al. 2001). Das hBD-2 wird als Antwort auf einen entzündlichen Stimulus in Keratinozyten produziert, so dass es in höherer Konzentration in psoriatischen Hautschuppen aufzufinden ist (Ong P.Y. et al. 2002; Kanda N. et al. 2011). Die größten Mengen des hBD-2 Peptids sind in höher differenzierten Keratinozyten in den terminalen Hautschichten gelegen um einen ersten chemischen Schutzwall gegen eindringende Mikroorganismen zu generieren (Harder J. et al. 2005). Auf subzellulärer Ebene ist das hBD-2 in den Lamellenkörpern stimulierter Keratinozyten im Stratum spinosum der Epidermis vorzufinden (Oren A. et al. 2003). Mit den genannten Färbeverfahren konnte immunhistochemisch eine hBD-2 Expression in entzündlichen Hauterkrankungen und mit deutlichster Ausprägung bei der Psoriasis vulgaris beobachtet werden (siehe Abb. 2 im Ergebnisteil). Das hBD-2 konnte also in inflammatorisch veränderten Dermatosen nachgewiesen werden und somit konnte auch der erste Teil der Fragestellung dieser Arbeit beantwortet werden. Nun folgend galt es die Möglichkeit zu untersuchen mittels der hBD-2 Detektion ein Unterscheidungsmerkmal etablieren zu können. Eine entsprechende Vergleichsstudie zur hBD-2 basierten Differenzierung verschiedener Dermatosen in Abgrenzung zur Psoriasis vulgaris war derzeit nicht publiziert. Tatsächlich konnten anhand der Färbeanalyse der hBD-2 Expression in den verschiedenen entzündlich veränderten Geweben Unterschiede festgestellt werden. In Bezug auf die im Ergebnisteil unter 3.1 dargestellte Grafik war mit der hBD-2 Detektion ganz eindeutig ein erhebliches Differenzierungsmerkmal zwischen diesen einzelnen entzündlichen Dermatosen aufzeigbar. Bei über 70% der an Psoriasis vulgaris leidenden Patienten des Probenkollektivs erfolgte die Zuordnung im höchsten Score, wies also die höchste hBD-2 Expression auf, wohingegen dieser Score mit Ausnahme der Tinea von keiner anderen getesteten Hauterkrankung erreicht wurde. Bei Pilzkrankungen war eine vermehrte hBD-2 Ausschüttung beschrieben, was wahrscheinlich an der Integritätsstörung der Keratinozytenbarriere und einer diesbezüglichen Defensinmehrproduktion liegt (de Jongh G.J. et al. 2005). Dieser Effekt konnte bei der durch *Trichophyton rubrum* ausgelösten Tinea corporis sowie bei einer durch *Candida albicans* hervorgerufenen Hautinfektion beobachtet werden (Harder J. et al. 1997; Hiratsuka T. et al. 1998; Singh et al. 1998; Gallo R.L. und Huttner K.M. 1998). Pilzinfektionen scheinen also die Produktion von humanem- β -Defensin-2 in den Keratinozyten inflammatorisch veränderter

4. Diskussion

Haut zu induzieren. Harder et al. konnten dies am Beispiel der durch hBD-2 effektiv getöteten *Candida-albicans* Stämme weiter untermauern (Harder J. et al. 1997). Wenn man also postuliert, dass Pilzkrankungen eine erhöhte hBD-2 Expression hervorrufen, wundert es nicht, dass bei den getesteten und als Mykosen diagnostizierten Hautproben ebenfalls in einigen Fällen der höchste Score erreicht wurde. Im Zweifelsfall sollte ergänzend zur hBD-2 Färbung zum Ausschluß einer pilzbedingten kutanen Inflammation noch eine PAS-Färbung und damit eine Pilzsporendarstellung erfolgen (Schubert C. und Rudolph P. 2009; Gollnick H. und Bonnekoh B. 2001). Wie oben beschrieben weist auch gesunde Haut in geringem Maß Defensine auf (Ali R.S. et al. 2001), was eine Erklärung dafür sein könnte, dass die Pityriasis, das Ekzem und die Parapsoriasis ebenfalls im Score 1 und 2 in einigen Fällen positiv getestet wurden. In 1,15 % der immunhistochemisch gefärbten und konventionell histologisch als Psoriasis vulgaris diagnostizierten Fälle zeigte sich keine β -Defensin-2 Detektion. Letztlich ließ sich nicht eindeutig klären, ob dieses Fehlen einer hBD-2 Expression einem trotz Kontrolluntersuchung inkorrekten Färbeprozedere oder einem atypischen Gewebeverhalten entstammt. Möglicherweise könnte dieser Wert, obwohl die Diagnosen von einem Fachexperten unter Berücksichtigung der klinischen Ausprägung gestellt wurden, auch in einer Fehldeutung der Histologie begründet sein. Trotz einer relativ eindeutigen differentialdiagnostischen Zuordnung der Psoriasis vulgaris bei einer hBD-2 Expression im höchsten Score erweist sich die Abgrenzung dieser Erkrankung gegenüber den anderen entzündlichen Dermatosen bei einer β -Defensin-2 Detektion im Score 1 und 2 als schwierig. Hier wird ein „Follow up“ benötigt, um im Verlauf eine eventuell erkrankungsspezifischere Ausprägung oder ein Ansprechen auf eine ex juvantibus durchgeführte Therapie aufzuzeigen um somit die Verdachtsdiagnose bestätigen oder verwerfen zu können. Die in den Untersuchungen gezeigten Erkrankungen die mit einer starken Hyperkeratose einhergingen (Psoriasis, Tinea), wiesen auch die stärksten Färbungen auf. In Anlehnung hieran könnte die Detektion von hBD-2 eventuell auch zur Markierung von Hautläsionen, die durch eine abnorme Keratinozytenproliferation charakterisiert sind, genutzt werden. Die Grafik 2 zeigt Ergebnisse der hBD-2 Färbung der subcorneal gelegenen Schichten der Epidermis. Hier weist das Stratum basale der Psoriasisishaut wie das Stratum spinosum, Granulosum und Lucidum eine, wenn auch in geringerem Ausmaß im Vergleich zum Stratum corneum, deutliche Expression des humanen β -Defensins-2 auf. Wie bereits durch die hBD-2 Färbung des Stratum corneums vermutet zeigt sich auch hier die Tinea-Erkrankung in einem hohen Score positiv.

Da wie beschrieben das hBD-2 in Keratinozyten produziert wird (Oren A. et al. 2003; Seo SJ. et al. 2001) war eine Detektion in den epidermalen Schichten zu erwarten. Immunhistochemisch ließ sich in der Dermis kein hBD-2 aufzeigen, was vermuten lässt, dass ein entsprechendes Epitop für den monoklonalen Antikörper fehlt. Somit scheinen die Zellen der Dermis nicht in der Lage zu sein humanes β -Defensin-2 zu produzieren oder es zu exprimieren.

Sollte mittels einer β -Defensin-2 Färbung in den subcornealen Schichten der Epidermis die höchste Scorezuordnung erreicht werden, so ist im vergleichenden Ausschluß der getesteten Dermatitiden von der Diagnose einer Psoriasis vulgaris auszugehen. Noch wahrscheinlicher wird die Psoriasis-Diagnose wenn, den Analysen folgend, in sowohl der hBD-2 Färbung des Stratum corneums als auch der Färbung der subcornealen Schichten der höchste Score erreicht wird. Anhand dieser Daten lässt sich somit bezüglich der hBD-2 Detektion im Score 3 eine eindeutige Tendenz zur Psoriasis aufzeigen. Diagnostisch schwieriger wird eine Differenzierung der entzündlichen Hauterkrankungen wenn sie mit der hBD-2 Färbung im Score 0 oder 1 detektiert werden. Hier lässt sich im Probenkollektiv in jeder der getesteten Hautläsionen eine positive Detektion darstellen, so dass man diesbezüglich keine Aussage zur Unterscheidung treffen kann. Wenn man allerdings den 2,3 % im Score 0 gesehenen Psoriasisfällen die 72,73 % im Score 0 zugeordneten Ekzemfälle gegenüberstellt, wird hier ein eindeutiger Unterschied nach immunhistochemischer Färbung klar. Die Ursache der im Score 0 gelegenen Psoriasis-Hautproben kann, wie bereits beschrieben, in einer konventionell histologischen Fehldiagnose oder einer letztlich nicht geklärten fehlenden hBD-2 Produktion der Keratinozyten dieser Proben begründet sein.

Ähnlich wie Aydin et al. sowie Metha S. et al. histologische Differenzierungskriterien (Aydin O. et al. 2008; Metha S. et al. 2009) zur Abgrenzung der Psoriasis von anderen Dermatitiden beschrieben und Kamsteeg M. et al. auf molekularer Ebene (Kamsteeg M. et al. 2009) Unterscheidungsmerkmale darstellten, konnte hier mit der humanen β -Defensin-2 Färbung immunhistochemisch die Psoriasis vulgaris insbesondere von dem Ekzem abgegrenzt werden.

4.3 Analyse und Interpretation der T-Zell-Makierung im entzündlichen Infiltrat verschiedener Dermatitiden

Mit der CD1a Färbung lassen sich Langerhanszellen detektieren. Langerhanszellen sind dendritische Zellen die in allen Schichten der Epidermis und dort hauptsächlich im Stratum spinosum vorkommen (Young B. und Heath J.W. 2000). Die Expression der CD1 Proteine außerhalb des Thymus kann durch eine Infektion ausgelöst werden (Murphy K. et al. 2009).

CD1a Moleküle binden an Lipid- und Glykolipidantigene und präsentieren diese so den T-Zellen (Murphy K. et al. 2009; Brigl M. und Brenner M.B. 2004). Die CD1a Färbung eignet sich somit als T-Zell Marker für diese Arbeit gut, da dendritische Zellen erstens bevorzugt in der Epidermis lokalisiert sind und zweitens eine zentrale Rolle bei der Entwicklung inflammatorischer Läsionen wie bei der Psoriasis spielen (Steinman R. M. 2012). Bei den CD1a Untersuchungen wurde das entzündliche Infiltrat in der Epidermis und im Bereich der Dermis getrennt voneinander beurteilt um gegebenenfalls auch hier Unterscheidungen treffen zu können.

Wie in der Grafik 3 und 4 ersichtlich (Grafik 3 und 4 im Ergebnisteil unter 3.3 und 3.4) lassen sich bei isolierter Betrachtung der CD1a Färbung der Epidermis die verschiedenen Dermatitis in alle 3 Scores einordnen. Dementsprechend ist hier eine Abgrenzung einer einzelnen entzündlichen Erkrankung von den anderen Hautläsionen schwierig. Dennoch zeigen sich bei einer isolierten Betrachtung der Epidermisfärbung Tendenzen, die einen zusätzlichen Hinweis für die differentialdiagnostische Eingrenzung einer bestimmten Erkrankung geben können. Da beispielsweise trotz geringerer Fallzahl der Ekzempatienten ($n = 20$) im Vergleich zu den Psoriasispatienten ($n = 43$) der Score 3 deutlich häufiger detektiert wurde, ist bei einer Score 3 Eingruppierung die Wahrscheinlichkeit einer Ekzemdiagnose deutlich höher. Sollte die gleiche Probe dann in der hBD-2 Färbung der Epidermis und Dermis nur gering oder gar nicht detektiert werden, ist nach den hier aufgeführten Untersuchungen eine Psoriasis-Diagnose, auch wenn makroskopisch Zweifel bestehen, nahezu ausgeschlossen.

Die Wahrscheinlichkeit ein Ekzem in einer Hautläsion zu diagnostizieren erhöht sich weiter wenn man bei der Dermisbetrachtung einer CD1a Färbung ebenfalls den höchsten Score 3 aufzeigen kann. Die Pityriasis und die Psoriasis zeigen in sowohl der Epidermis- als auch der Dermis-Färbung ein vergleichbares Verhalten mit jeweils in der Epidermisfärbung dem größten Anteil in Score 2 und vergleichbar dem kleinsten Anteil im Score 1. Die Tinea und das Ekzem hingegen weisen in den Färbungen der verschiedenen Hautschichten ein unterschiedliches Detektionsmuster auf, so dass beispielsweise bei einem gleichen Score in der Epidermisfärbung und in der Dermisfärbung eher eine Psoriasis oder eine Pityriasis in Frage kommt, während ein unterschiedliches Färbeverhalten eher an ein Ekzem oder eine Tinea denken lassen. Ausnahme hiervon ist wie beschrieben die ähnliche Detektion im höchsten Score, da hier eher von einem Ekzem auszugehen ist. Ein sicheres Unterscheidungskriterium stellt die alleinige CD1a Färbung nach diesen Untersuchungen nicht dar. Dennoch kann sie als Bestandteil kombinierter Färbungen zur Diagnosefindung

beitragen. Für die Parapsoriasis war aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 2$) bei der CD1a Färbung keine wegweisende Aussage möglich.

Wie bei Sabat R. und Wolk K. und bei Guttman-Yassky E. et al. beschrieben, spielen Zytokine wie beispielsweise das IL-17, IL-20 und das IL-22 in der Pathogenese der Psoriasis eine Schlüsselrolle (Sabat R. und Wolk K. 2011; Guttman-Yassky E. et al. 2011). Weitere auch hBD-2 induzierende proinflammatorische Zytokine IL-1 γ , IL-1 β , IFN- γ , TNF- α sowie das IL-17 Zytokin sind ebenfalls in der Entstehung einer Psoriasisläsion involviert (Lehmann J. et al. 2002; McDermott A.M. et al. 2003; Nomura I. et al. 2003). Eine wichtige Quelle dieser Zytokine stellen CD8 positive T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) in Hautläsionen dar (Hijnen D. et al. 2013). CD8 positive T-Zellen kann man also im inflammatorischen Infiltrat und in Psoriasisläsionen identifizieren. Für die CD8 Färbung ist somit die potentielle Möglichkeit gegeben die Psoriasis vulgaris von anderen entzündlichen Dermatosen abzugrenzen, weshalb sich die CD8 Detektion zur Beantwortung der Fragestellung der Arbeit eignet.

Das Punktdiagramm der CD8 Färbung der Epidermis und Dermis (siehe Grafik 5 im Ergebnisteil unter 3.5) weist eine hohe Streubreite der einzelnen gefärbten Hautläsionen auf. Hier scheint im Einzelfall bei isolierter CD8 Detektion keine Differenzierung zwischen den verschiedenen Dermatitisden möglich zu sein. In Bezug auf die Mittelwerte der Anzahl der detektierten T-Lymphozyten in den Hautläsionen zeigt sich allerdings doch ein nicht unwesentlicher Unterschied, während im Mittel die Ekzempben bei 36% detektierter T-Lymphozyten in einem repräsentativen Hautareal der jeweiligen Erkrankung liegen, weisen die Psoriasisproben ein 10% darunter liegendes gemitteltes Ergebnis auf. Weitere Untersuchungen mit einer noch höheren Fallzahl könnten diese Differenz voraussichtlich noch eindeutiger darstellen. Hier könnte sich möglicherweise auch ein Trend bezüglich der in dieser Untersuchung gesehenen Pityriasis-Erkennung bestätigen lassen. Denn vergleicht man beispielsweise die Mittelwerte der T-Zell-Detektion in der Pityriasis mit denen der Tinea Färbung so ist die Wahrscheinlichkeit der Pityriasis-Diagnose bei einer hohen Anzahl mit einem CD8 Antikörper erkannten Lymphozyten höher als die Diagnose einer Tinea. Somit könnte sich die CD8 Färbung als Baustein zur Diagnosefindung eignen. Zur Abgrenzung der Psoriasis vulgaris von der Tinea oder der Parapsoriasis sowie der Tinea von der Parapsoriasis eignet sich die CD8 Färbung aufgrund der fehlenden Mittelwertsunterschiede nach diesen Erhebungen nicht.

4. Diskussion

Bei CD18 Knockout-Mäusen mit einem Mangel an regulatorischen T-Zellen entwickelten sich Merkmale einer Psoriasis (Wang H. et al. 2008). Zudem konnten in Psoriasisläsionen Mängel in der Suppressionsfunktion regulatorischer T-Zellen gesehen werden (Sugiyama H. et al. 2005). Der Nachweis regulatorischer T-Zellen gelingt durch die immunhistochemische Detektion des Forkhead Box Proteins P3 (Fox P3). Bei dem Fox P3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der die funktionelle Aktivität regulatorischer T-Zellen kontrolliert (Böcker W. et al. 2012). In normaler Haut sind Fox P3 positive Zellen selten. In Proben der Psoriasis vulgaris, der Mycosis fungoides oder einer ekzematösen Dermatitis zeigt sich eine große Anzahl an Fox P3 positiven Zellen (Fujimura T. et al. 2008). Die Eignung der Fox P3 Markierung zum Nachweis von regulatorischen T-Zellen war für die Fragestellung dieser Arbeit eindeutig gegeben.

Diesen Untersuchungen zufolge weist die Fox P3 Färbung ähnlich wie bei dem Nachweis der zytotoxischen T-Zellen in der Epidermis und Dermis eine hohe Streuung der Anzahl der durch den jeweiligen Antikörper erkannten Lymphozyten auf (vgl. Grafik 6 im Ergebnisteil unter 3.6). Aber auch hier zeigten sich nach Bestimmung der Mittelwerte der einzelnen Hauterkrankungen erhebliche Unterschiede. Das Ekzem und die Psoriasis präsentierten sich in Bezug auf deren Mittelwert bei der Fox P3 Färbung ähnlich. Hiervon ließen sich die Pityriasis und die Tinea bei einem gemittelten, deutlich darunter liegenden Wert abgrenzen. Insgesamt scheint wiederum die alleinige Fox P3 Analyse keine für die Dermatitisunterscheidung geeignete Methode zu sein, dennoch kann Sie als Teil einer kombinierten Untersuchung einen Beitrag zur Differentialdiagnostik leisten.

Hinweisgebend zur Diagnoseeingrenzung wäre im Weiteren der Vergleich der Ergebnisse der Fox P3 und der CD8 Färbung. Hier sind beispielsweise bei Betrachtung der Pityriasis in den beiden verschiedenen Färbungen deutlich unterschiedlich gemittelte prozentuale Markierungsmuster aufzeigbar, wohingegen das Ekzem und die Tinea sowohl in der CD8 als auch in der Fox P3 Färbung einen ähnlichen Prozentsatz positiv detektierter T-Lymphozyten aufweisen.

Zur Darstellung follikulärer T-Helferzellen im entzündlichen Infiltrat wurde eine PD1 Färbung durchgeführt. Bei dem PD1 (programmed cell death 1 protein) handelt es sich um einen Rezeptor auf T-Zellen, der bei Bindung seiner Liganden PD L1 und PD L2 die Signalübertragung vom Antigenrezeptor hemmt (Agata Y. et al. 1996; Murphy K. et al. 2009). Leider eignet sich, wie im Ergebnisteil unter 3.7 beschrieben, die PD1 Detektion zur

4. Diskussion

differentialdiagnostischen Abgrenzung der Psoriasis vulgaris von den anderen Dermatitiden aufgrund mangelnder ersichtlicher Unterschiede im entzündlichen Infiltrat der einzelnen Erkrankungen nach PD1 Färbung nicht.

5. Zusammenfassung / Ausblick

Die Psoriasis vulgaris ist eine häufige, inflammatorische Hauterkrankung mit charakteristischen histologischen Veränderungen wie z.B. einer abnormalen epidermalen Proliferation oder der Infiltration von Zellen des Immunsystems wie neutrophile Granulozyten und T-Zellen (Nestle F.O. et al. 2009). Bestehen trotz spezifischer histologischer Merkmale dennoch Zweifel an der richtigen Diagnose und sind im Vergleich mit anderen entzündlichen Dermatosen nur wenige Unterscheidungskriterien vorhanden, so kann im Fall einer Fehldiagnose die erkrankungsindividuelle Therapie erfolglos bleiben. Insgesamt stellt sich daher die Frage nach einer weiterführenden Differenzierungsmöglichkeit. Da die Psoriasis vulgaris sowohl durch die Einwanderung von T-Lymphozyten als auch durch die Produktion von antimikrobiellen Peptiden charakterisiert ist, sollte über deren immunhistochemischen Nachweis ein mögliches Unterscheidungskriterium zu anderen Dermatitiden untersucht werden. Anhand der Hautläsionsproben von 140 unter einer Psoriasis vulgaris oder einer psoriasisähnlichen Dermatitis leidenden Patienten konnten mit Hilfe antigen-/antikörperbasierter immunhistochemischer Analyseverfahren Unterschiede im Färbeverhalten der Psoriasis vulgaris im Vergleich mit anderen entzündlichen Hauterkrankungen dargestellt werden. Spezieller wurden die inflammatorisch veränderten kutanen Proben mit einem humanen β -Defensin-2 (hBD-2) markierenden Antikörper gefärbt und anschließend mikroskopisch analysiert. Des Weiteren sind beschriebene Hautexzidate mit T-Zell erkennenden Antikörpern gefärbt und folgend auf Unterschiede hin untersucht worden. Für die Detektion der T-Zell Subpopulationen führten wir eine CD1a-, eine CD8-, eine Fox P3- und eine PD1 Färbung durch. Die beispielhaft von der Psoriasis vulgaris zu unterscheidenden Erkrankungen waren neben dem Ekzem noch die Pityriasis, die Parapsoriasis und die Tinea. Zur Illustration der Färbeergebnisse wurden Score-Systeme genutzt mit deren Hilfe sich semiquantitativ entweder die Detektion der T-Zellen oder die Detektion des hBD-2 darstellen ließ.

Mit den jeweiligen Scores ließen sich Relationsgrafiken anfertigen mit denen die einzelnen Erkrankungen aufgrund ihres Färbeverhaltens in Beziehung gesetzt werden konnten. Die präsentierten Ergebnisse illustrieren die Möglichkeiten und Limitierungen der immunhistochemischen Analysen für die diagnostische Abgrenzung der Psoriasis vulgaris von anderen entzündlichen Hautläsionen. Es konnte gezeigt werden, dass das humane β -Defensin-2 im inflammatorisch veränderten Gewebe immunhistochemisch detektierbar ist

und darüber hinaus zur Abgrenzung insbesondere gegenüber dem Ekzem eine hohe Differenzierungspotenz aufweist.

In Bezug auf die Markierung der T-Zell-Populationen der unterschiedlichen entzündlichen Hautläsionen zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede. Bei einer allerdings sehr hohen Streubreite der Ergebnisse kann eine isolierte Untersuchung beispielsweise nur der Fox P3 positiven Zellen kein Unterscheidungskriterium darstellen. Die Kombination der einzelnen Untersuchungen könnte jedoch einen erheblichen Beitrag zur Diagnoseeingrenzung leisten. Ob tatsächlich immer zweifelsfrei die Psoriasis vulgaris mit diesen Färbeverfahren detektiert werden kann, wird sich zeigen wenn die immunhistochemischen Verfahren in der Praxis an einem größeren Patientenkollektiv genutzt werden und ein entsprechendes "Follow up" erfolgt. Wenn sich die Ergebnisse dieser Arbeit dabei bestätigen, könnten diese Analysen künftig als Zusatzkriterium neben der konventionell histologischen Aufarbeitung der kutanen Läsionen zur Differentialdiagnostik und Diagnosebestätigung der Psoriasis vulgaris einen erheblichen Beitrag leisten.

6. Literaturverzeichnis

Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. Int Immunol **8**(5): 765-72

Ali RS, Falconer A, Ikram M, Bissett CE, Cerio R, Quinn AG (2001). Expression of the peptide antibiotics human beta defensin-1 and human beta defensin-2 in normal human skin. J Invest Dermatol **117**:106–11

AWMF S3 Leitlinie: Therapie der Psoriasis vulgaris. Fassung 2011

Aydin O, Engin B et al. (2008). "Non-pustular palmoplantar psoriasis: is histologic differentiation from eczematous dermatitis possible?" J Cutan Pathol **35**(2): 169-73

Berger K, Ehlken B, Kugland B, Augustin M (2005). Cost-of-illness in patients with moderate and severe chronic psoriasis vulgaris in Germany. J Dtsch Dermatol Ges. **2005** **3**: 511-8

Böcker W, Denk H, Heitz PH U, Höfler G, Kreipe HH, Moch H (2012). Pathologie **5**. Auflage: 100; 834; 835

Boenisch T (2003). Antikörperverdünnung. Handbuch Immunchemische Färbung **3**. Auflage: 14-15

Boman HG (2000). Innate immunity and the normal microflora. Immunol Rev **173**: 5-16

Boman HG (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. J Intern Med **254**: 197-215

Brigl M, Brenner MB (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. Annual Review of Immunology Vol. **22**: 817-90

6. Literaturverzeichnis

Campalani E, Barker JNWN (2005). The Clinical Genetics of Psoriasis. Current Genomics **6**: 51-60

Cattoretti G, Suurmeijer AJH (1994). Adv Anatomic Pathol **2**: 2-9

Christophers E (2007). Comorbidities in psoriasis. Clinics in Dermatology **25**: 529-534

Christophers E, Mrowietz U, Sterry W (2003). Psoriasis. Oxford: Blackwell Publishing Ltd Vol. **2**: 13-8

Chung WO, Dale BA (2004). Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. Infect Immun **72**: 352-8

De Jongh GJ, Zeeuwen PL, Kucharekova M, Pfundt R, van der Valk PG, Blokx W, Dogan A, Hiemstra PS, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J (2005). High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. Journal of investigative Dermatology **125**: 1163-73

Ellis CN, Gorsulowsky DC, Hamilton TA (1986). Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. JAMA **256**: 3110-16

Fitzpatrick TB, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF (1993). Dermatology in general medicine, McGraw-Hill, New York

Fujimura T, Okuyama R, Ito Y, Aiba S (2008). Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. Br J Dermatol. **158**(6):1256-63

Gallo RL, Huttner KM (1998). Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. J Invest Dermatol **111**: 739-43

6. Literaturverzeichnis

Ganz T (2003). Defensins: antimicrobial peptides of the innate immunity. Nat Rev Immunol **3**: 710-720

Ganz T, Lehrer RI (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. Curr Opin Immunol **10**: 41-44

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SSL, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J Clin Invest **76**: 1427-35

Gelfand JM, Neimann AL, Shin DB, Wang X, Margolis DJ, Troxel AB (2006). Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. JAMA **296**: 1735-41

Gisoni P, Tessari G, Conti A, Piaserico S, Schianchi S, Peserico A, Giannetti A, Girolomoni G (2007). Prevalence of metabolic syndrome in patients with psoriasis: a hospital based case control study. British Journal of Dermatology **157**: 68-73

Gollnick H, Bonnekoh B (2001). Psoriasis-Pathogenese, Klinik und Therapie. UNI-MED **2001**: 33

Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R et al. (1995). Response of psoriasis to a lymphocyte selective toxin (DAB 389 IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. Nature Med **1**: 442-7

Griffiths CE, Powles AV, Leonard JN, Fry L, Baker BS, Valdimarsson H (1986). Clearance of psoriasis with low dose cyclosporin. Br Med J (Clin Res Ed) **293**: 731-732

Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG (2011). Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis-Part II: Immune cell subsets and therapeutic concepts. J Allergy Clin Immunol **127**: 1420-32

Harder J, Bartels J, Christophers JM (1997). A peptide antibiotic from human skin. Nature **387**: 861

6. Literaturverzeichnis

- Harder J, Schröder JM (2005). A promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. Journal of Leucocyte Biology Vol. **77**: 476-478
- Harder J, Schröder JM (2005). Mechanisms of Epithelial Defense. Chem Immunol Allergy. Basel, Karger, Vol. **86**: 22-41
- Henseler T, Christophers E (1985). Psoriasis of early onset: Characterization of two types of psoriasis vulgaris. J Am Acad Dermatol **13**: 450-56
- Henseler T, Christophers E (1995). Disease concomitance in psoriasis. J Am Acad Dermatol **32**: 982-6
- Hijnen D, Knol EF, Gent YY, Giovannone B, Beijin SJ, Kupper TS, Bruijnzeel-Koomen CA, Clark RA (2013). CD8(+) T cells in the lesional skin of atopic dermatitis and psoriasis patients are an important source of IFN- γ , IL-13, IL-17 and IL-22. J Invest Dermatol **133**(4): 973-9
- Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chino N, Matsukura S (1998). Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. Biochem Biophys Res Commun **249**: 943-7
- Huh WK, Oono T, Shirafuji Y, Akiyama H, Arata J, Sakaguchi M, Huh NH, Iwatsuki K (2002). Dynamic alteration of human beta-defensin 2 localization from cytoplasm to intercellular space in psoriatic skin. J Mol Med **80**: 678–684
- Jansen PAM, Rodijk-Olthuis D, Hollox EJ, Kamsteeg M, Tjabringa GS, De Jongh GJ, Van Vlijmen-Willems IMJJ, Bergboer JGM, Van Rossum MM, De Jong E MGJ, Den Heijer M, Evers AWM, Bergers M, Armour JAL, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J (2009). β -Defensin-2 as a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin. Journal Plos one Vol. **4**: 4725

Kamsteeg M, Jansen PAM, van Vlijman-Willems IMJJ, van Erp PEJ, Rodijk-Olthuis D, van der Valk PG, Feuth T, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk (2009). Molecular diagnostics of psoriasis, atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis. Br J Dermatol **162**: 568-78

Kanda N, Kamata M, Tada Y, Ishikawa T, Sato S, Watanabe S (2011). Human β -defensin-2 enhances IFN- γ and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells. J Leukoc Biol **89**(6): 935-44

Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW, Wu R (2004). IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. J Immunol **173**: 3482-91

Key M (2003). Antigendemaskierung. Handbuch Immunchemische Färbemethoden **3**. Auflage: 30-33

Kim JM, Rudensky A (2006). The role of the transcription factor Fox P3 in the development of regulatory T cells. Immunol Rev **212**: 86-98

Krüger G, Koo J, Lebwohl M, Menter A, Stern RS, Rolstad T (2001). The impact of psoriasis on quality of life: Results of a 1998 National Psoriasis Foundation patient membership survey. Arch Dermatol **137**: 208-4

Lebwohl M (2003). Psoriasis. Lancet **261**: 1197-204

Lehmann J, Retz M, Harder J, Krams M, Kellner U, Hartmann J, Hohgrawe K, Raffenberg U, Gerber M, Loch T, Weichert-Jacobsen K, Stockle M (2002). Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. BMC Infect Dis **2**: 20

Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP et al. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. J Exp Med **203**: 2271-79

6. Literaturverzeichnis

Ludwig RJ, Herzog C, Rostock A, Ochsendorf FR, Zollner TM, Thaci D, Kaufmann R, Vogl TJ, Boehnke WH (2007). Psoriasis: a possible risk factor for development of coronary artery calcification. Br J Dermatol **156** (2): 271-6

Mallbris L, Akre O, Granath F, Yin L, Lindelöf B, Ekbom A, Stahle-Bäckdahl M (2004). Increased risk for cardiovascular mortality in psoriasis inpatients but not in outpatients. Eur J Epidemiol **19**: 225-30

McDermott AM, Redfern RL, Zhang B, Pei Y, Huang L, Proske RJ (2003). Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1beta stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci **44**: 1859-65

Metha S, Singal A, Singh N, Bhattacharya SN (2009). A study of clinicohistopathological correlation in patients of psoriasis and psoriasiform dermatitis. Indian J Dermatol Venereol Leprol **75**: 100

Michel G, Kemeny L, Homey B, Ruzicka T (1996). FK506 in the treatment of inflammatory skin disease: promises and perspectives. Immunol Today 1996 **17**: 106–8

Moll I (2005). Duale Reihe Dermatologie. Thieme, Stuttgart **6**. Auflage

Moll I (2010). Duale Reihe Dermatologie. Thieme, Stuttgart **7**. Auflage: 365-374

Morizane S, Gallo LR (2012). Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis. Journal of Dermatology **39**: 225-230

Mrowietz U, Elder JT, Barker J (2006). The importance of disease associations and concomitant therapy for the long-term management of psoriasis patients. Archives of Dermatological Research **298**: 309-19

6. Literaturverzeichnis

Mrowietz U, Kragballe K, Reich K, Spuls P, Griffiths CE, Nast A, Franke J, Antoniou C, Arenberger P, Balieva F, Bylaite M, Correia O, Dauden E, Gisondi P, Iversen L, Kemeny L, Lahfa M, Nijsten T, Rantanen T, Reich A, Rosenbach T, Segaert S, Smith C, Talme T, Volc Platzer B, Yawalkar N (2010). Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. Archives of Dermatological Research.

Mrowietz U, Reich K (2011). Therapie der Psoriasis. AWMF S3 Leitlinie Fassung **2011**: 11-12

Mueller W, Hermann B (1979). Cyclosporin A for psoriasis. N Engl J Med **301**: 555

Murphy K, Travers P, Walport M et al. (2009). Janeway/Immunologie 7. Auflage: 266-67; 306; 543

Nestle FO, Kaplan DH, Barker J (2009). Psoriasis. N Engl J Med **361**: 496-509

Nevitt GJ, Hutchinson PE (1996). Psoriasis in the community: prevalence, severity and patients beliefs and attitudes towards the disease. Br J Dermatol **135**: 533-537

Nicolas JF, Chamchick N, Thivolet J et al. (1991). CD4 antibody treatment of severe psoriasis. Lancet **338**: 321

Nomura I, Goleva E, Howell MD et al. (2003). Cytokine milieu of atopic dermatitis as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. J Immunol **171**: 3262–69

Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strichland I, Boguniewicz M, Ganz T et al. (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. N Eng J Med **347**: 1151-60

Oren A, Ganz T, Liu L, Meerloo T (2003). In human epidermis, beta-defensin 2 is packaged in lamellar bodies. Exp Mol Pathol **74**: 180–182

Prinz JC (2001). Clinical and Experimental Dermatology **24**: 291-295

Prinz JC (2004). Neues zur Pathogenese der Psoriasis. JDDG **6**: 448-57

Prinz JC, Braun-Falco O, Meurer M et al. (1991). Chimeric CD4 monoclonal antibody in the treatment of generalized pustular psoriasis. Lancet **338**: 320–1

Proud D, Sanders SP, Wiehler S (2004). Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both in vitro and in vivo. J Immunol **172**: 4637-45

Reich K, Kruger K, Mossner R, Augustin M (2009). Epidemiology and clinical pattern of psoriatic arthritis in Germany: a prospective interdisciplinary epidemiological study of 1511 patients with plaque-type psoriasis. Br J Dermatol **160**: 1040-7

Sabat R, Wolk K (2011). Research in practice: IL 22 and IL 20 : significance for epithelial homeostasis and psoriasis pathogenesis. Journal of the German Society of Dermatology **9**: 518-523

Schmitt J, Ford DE (2010). Psoriasis is independently associated with psychiatric morbidity and adverse cardiovascular risk factors, but not with cardiovascular events in a population based sample. Journal of the European Academy of Dermatology Venereology **24**: 885-92

Schön MP, Boehnke WH (2005). Psoriasis. N J E M **352**: 1899-912

Schröder JM, Harder J (1999). Human beta-defensin-2. Int J Biochem Cell Biol **31**: 645-651

Schubert C und Rudolf P aus Klöppel G, Kreipe HH, Remmele W (2009). Pathologie **3**. Auflage: 639-41; 679; 683

Seo SJ, Ahn SW, Hong CK, Ro BI (2001). Expressions of beta-defensins in human keratinocyte cell lines. J Dermatol Sci **27**:183-91

6. Literaturverzeichnis

Singh G, Rao DJ (1978). Bacteriology of psoriatic plaques. Dermatologica **157**: 21-27

Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, Greenberg EP, Valore EV, Welsh MJ, Ganz T, Tack BF, McCray PB (1998). Production of beta-defensins by human airway epithelia. Proc Natl Acad Sci USA **95**: 14961-6

Sommer DM, Jenisch S, Suchan M, Christophers E, Weichenthal M (2006). Increased prevalence of the metabolic syndrome in patients with moderate to severe psoriasis. Archives of Dermatological Research **298**: 321-8

Sönnichsen N (1999). Psoriasis an untypischen Stellen - und wie man sie erkennt. Ärztliche Praxis Dermatologie 1-2

Sorensen OE, Thapa DR, Rosenthal A, Liu L, Roberts AA, Ganz T (2005). Differential Regulation of beta-Defensin Expression in Human Skin by Microbial Stimuli. J Immunol **174**: 4870-9

Steinman RM (2012). Decisions about dendritic cells: past, present, and future. Annu Rev Immunol **30**:1-22

Sugiyama H, Gyluai R, Toichi E et al. (2005). Dysfunctional blood and target tissue CD4+ CD25 high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. J Immunol **174**: 164

Toussaint S, Kamino H (1997). Psoriasis. Lever`s Histopathology of the skin 165-63

Wada A, Mori N, Oishi K, Hojo H, Nakahara Y, Hamanaka Y, Nagashima M, Sekine I, Ogushi K, Niidome T, Nagatake T, Moss J, Hirayama T (1999). Induction of human beta-defensin-2 mRNA expression by Helicobacter pylori in human gastric cell line MKN45 cells on cag pathogenicity island. Biochem Biophys Res Commun **263**: 770-4

6. Literaturverzeichnis

Wang H, Peters T, Sindrilaru A et al. (2008). TGF-beta-dependent suppressive function of Tregs requires wild-type levels of CD18 in a mouse model of psoriasis. J Clin Invest **118**: 2629

Weinberg AN, Swartz MN (2003). Bacterial diseases with cutaneous involvement. In: Fitzpatrick TB, Wolff K, Eisen AZ, Freedberg IM, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI (Hrsg.). Dermatology in general medicine, McGraw Hill, New York

Weinshenker BG, Bass BH, Ebers GC, Rice GP (1989). Remission of psoriatic lesions with muromonab-CD3 (orthoclone OKT3) treatment. J Am Acad Dermatol **20**: 1132-3

Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. Immunity **21**: 241-54

Young B, Heath JW (2000). Wether`s Functional Histology. Churchill Livingstone **4**: 162

Zasloff M (1987). Malignins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms and partial cDNA sequence of a precursor. Proc Natl Acad Sci USA **84**: 5449-53

Zasloff M (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature **415**: 389-395

Danksagung

Ein großer Dank gilt allen an dieser Promotionsschrift beteiligten Mitarbeitern der Hämatopathologie und des Lymphknotenregisters Kiel. Im Besonderen:

Prof. Dr. W. Klapper, der mir allzeit kompetent helfend zur Seite stand und ohne den diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre.

Prof. Dr. Dr. h.c. R. Parwaresch † für den Einstieg in die Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens.

Frau M. Hauberg, die mir zu Beginn erhebliche Hilfe zum Verständnis der immunhistochemischen Färbungen leistete.

Frau H. Jacobsen für die Unterstützung und so manche aufmunternde Worte.

Frau C. Mäder, die beharrlich immer wieder auf ein Vorankommen der Arbeit drängte.

Frau C. Botz von Drahten für die hervorragende Zusammenarbeit, die guten Färbungen der Präparate und die Hilfe zur Erstellung des Materialien- und Methodenteils.

Des Weiteren danke ich:

PD. Dr. Dr. C. Schubert † für die Vergabe des Promotionsthemas und die initiale Betreuung sowie die zur Verfügungstellung des Hautprobenmaterials.

Frau Dr. med. C. Hartig und dem Team des dermatohistologischen Labors Buchholz in der Nordheide für die freundliche Unterstützung.

Prof. Dr. R.-P. Henke, der mir freundlicherweise eine Abbildung anfertigte.

Meiner Ehefrau Dr. Christina Valeska Gerdes-Renken danke ich für das Korrekturlesen und die Formatierung der Arbeit sowie die sehr wichtige emotionale Unterstützung.

Großen Dank schulde ich nicht zuletzt vor allem den Personen, die mich seit Beginn der ursprünglichen Arbeit im Jahr 2004 begleiteten und mir trotz der Verzögerung, bedingt durch den Tod von Prof. Dr. Parwaresch und PD. Dr. Dr. C. Schubert sowie der Aufnahme meiner ärztlichen Tätigkeit in der Viszeralchirurgie in Oldenburg, bis zur Fertigstellung dieser Arbeit zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Renken, Thorsten

Anschrift: Dwaschweg 252
26133 Oldenburg

Geburtsdatum: 28.08.1976

Geburtsort: Wilhelmshaven

Familienstand: verheiratet

Eltern: Frau Anneliese Renken, Kauffrau und Herr Wilhelm Renken†,
Kfz – Mechaniker

Ausbildung:

1983 - 1987 Grundschule Hinrichsfehn/ Wiesmoor

1987 - 1989 Orientierungsstufe Wiesmoor

1989 - 1993 Realschule Wiesmoor

1993 - 1996 Gymnasiale Oberstufe an der integrierten Gesamtschule Aurich

1996 - 1997 Zivildienst (Wohnheim für Behinderte in Wiesmoor)

1997 - 1999 Magisterstudium für Anglistik und Politik an der Carl von Ossietzky
Universität zu Oldenburg

1999 – 2000 Ausbildung zum medizinisch technischen Assistenten an der
Medizinischen Hochschule Hannover

2000-2007 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu
Kiel

Seit 2007 Weiterbildungsassistent der Universitätsklinik für Allgemein- und
Viszeralchirurgie am Klinikum Oldenburg