

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. Thomas Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Expression antimikrobieller Peptide in der
Synovialis der Psoriasis-Arthritis, bei
rheumatoider Arthritis und Osteoarthrose
sowie in der Haut der Psoriasis

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

Vorgelegt von
Henrike Edith Tessie Bierkarre, geb. Kosfeld
aus Westerland/Sylt

Kiel 2015

Referent: Prof. Dr. med. Regine Gläser, Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie

Koreferent: Prof. Dr. med. Deike Varoga, MVZ Orthopädie und Chirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 24. November 2016

Zum Druck genehmigt Kiel, den 23. Juli 2016

Gez. Prof. Dr. med. Johann Roider

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	9
2. Material und Methoden	11
2.1. Material.....	11
Verwendete Chemikalien.....	11
Puffer für die Immunhistochemie	11
Tris-Base-Saline(TBS)-Puffer (Waschpuffer).....	11
Citratpuffer	12
Verwendete Antikörper und Kits	12
Verwendete Antikörper.....	13
Verwendete Kits.....	15
Verwendete Isotypkontrollen.....	15
2.2. Methoden	16
Immunhistochemie.....	16
Herkunft des Untersuchungsgutes.....	16
Herstellung der Schnittpräparate.....	16
Grundlagen der Immunhistochemie	16
Avidin-Biotin-Komplex(ABC)-Methode	17
Ablauf der Immunhistochemie-Färbung.....	18
Kontrollen.....	20
Beurteilung der Hautpräparate.....	21
Beurteilung der Synovialispräparate.....	23
Gesichtsfeldauszählung	23
Synovitis-Score.....	24
Statistik.....	26
Der exakte Fishertest.....	26
3. Ergebnisse	27
3.1. Immunhistochemie Gelenke	27
Psoriasis-Arthritis (PsA)	27
S100 A8, S100 A9, HNP1-3 und LL-37.....	27
Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und hBD-3	28
Rheumatoide Arthritis (RA)	31

S100 A8, S100 A9 und HNP1-3	31
Psoriasin, RNase 7, hBD-2, hBD-3 und LL-37	31
Osteoarthrose (OA)	34
S100 A9, HNP1-3	34
S100 A8, LL-37, Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und hBD-3	34
Gesunde Synovialis.....	35
S100 A8, S100 A9, HNP1-3 und hBD-3.....	35
Psoriasin, RNase 7, hBD-2, LL-37	36
3.2. Ergebnisse Haut	38
Immunhistochemie Psoriasis vulgaris	38
S100 A8, S100 A9	38
HNP1-3 und LL-37	40
Psoriasin (S100 A7) und RNase 7.....	42
hBD-2 und hBD-3	44
3.3. Vergleich der Immunreaktivität von AMP in Gelenk-proben mittels Fishertest	46
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	47
4. Diskussion	49
4.1. Methoden	49
Untersuchungsmethoden.....	49
Beurteilung der Hautproben	50
Beurteilung der Gelenkproben.....	51
4.2. Ergebnisse Gelenke.....	51
Psoriasis-Arthritis (PsA)	51
Rheumatoide Arthritis (RA)	53
Osteoarthrose (OA)	55
Gesunde Synovialis.....	57
4.3. Therapien der Patienten.....	58
4.4. Vergleich der Gelenkerkrankungen.....	59
AMP-Expression in der Membrana synovialis	60
S100 A8 und A9.....	60
HNP1-3	61
LL-37.....	63
4.5. Ergebnisse Haut	64
S100 A8 und S100 A9	64
HNP1-3 und LL-37	66

Psoriasin und RNase 7	67
hBD-2 und hBD-3	68
4.6. Vergleich Haut – Gelenk.....	69
4.7. Zusammenfassung und Ausblick.....	71
Literaturverzeichnis	76
Danksagung	82
Lebenslauf.....	83
Veröffentlichungen.....	84

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>engl. avidin-biotin-complex, Avidin-Biotin-Komplex</i>
AK	Antikörper
AMP	Antimikrobielle(s) Peptid(e)
Aqua dest.	<i>lat. aqua destillata, destilliertes Wasser</i>
AZ	Aktenzeichen
biot.	biotinyliert
BSA	Bovines Serumalbumin
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$	Natriumcitrat tribasisch Dihydrat
$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Citronensäure Monohydrat
CRP	C-reaktives Protein
DMARD	<i>engl. disease modifying anti-rheumatic drug, eine Gruppe antirheumatischer Medikamente</i>
E. coli	<i>Escherichia coli, Gram-negatives Bakterium</i>
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
et al.	<i>lat. et alii, und andere</i>
Ges.	Gesamt
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
hBD	humanes β -Defensin
HCl	Salzsäure
HNP	humane(s) neutrophile(s) Peptid(e)/Defensin(e)
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
JNK	C-jun N-terminale Kinase
l	Liter
LL-37	humanes Cathelicidin (37 Aminosäuren lang, beginnend mit Leucin-Leucin)
M	molar
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase

mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	<i>lat. minutum</i> , Minute(n)
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NSAID	<i>engl. non-steroidal anti-inflammatory drug</i> , nicht-steroidale antiinflammatorische Medikamente
OA	Osteoarthrose
PASI	<i>engl. psoriasis area and severity index</i> , ein Score zur Bewertung der Krankheitsaktivität der Psoriasis
PsA	Psoriasis-Arthritis
PsV	Psoriasis vulgaris
RA	rheumatoide Arthritis, syn. chronische Polyarthritits
RNase	Ribonuklease
sec	<i>lat. secundo</i> , Sekunde(n)
SELDI-TOF-MS	<i>engl. Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry</i> , eine Methode der Massen-Spektrometrie
TBS	<i>engl. tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>engl. toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	<i>engl. volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
w/v	<i>engl. weight per volume</i> , Masse pro Volumen

1. Einleitung

Psoriasis wird nach dem heutigen Kenntnisstand nicht mehr nur als eine Erkrankung der Haut, sondern als chronisch inflammatorische Systemerkrankung angesehen. Die Komorbidität der Psoriasis umfasst dabei mehrere Erkrankungen, u.a. Krankheiten des metabolischen Syndroms, Herz-Kreislauserkrankungen, chronisch-entzündliche Darm-erkrankungen, psychische Erkrankungen und die Psoriasis-Arthritis (PsA). Von den Patienten mit Psoriasis an der Haut entwickeln in Deutschland ungefähr 30% eine PsA (Henes et al. 2014). Die PsA entwickelt sich dabei in der Regel erst nach den Hautveränderungen, weshalb viele Patienten bereits jahrelang in dermatologischer Betreuung sind, wenn sie arthritische Beschwerden entwickeln (Mease et al. 2014). Da eine zusätzliche PsA die Patienten deutlich stärker einschränkt als ein alleiniger Befall der Haut (Reich et al. 2009), ist es von höchster Wichtigkeit, die PsA möglichst frühzeitig zu diagnostizieren, um die Behandlung anschließend rasch beginnen zu können. Um dies zu ermöglichen, ist die Erforschung der Pathogenese beider Entitäten essenziell – welche Unterschiede gibt es zwischen der Psoriasis an der Haut und der Psoriasis am Gelenk? Welche Faktoren führen neben der Dermatose zur Arthritis? Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede sowie Gemeinsamkeiten zwischen der Psoriasis an der Haut und der Psoriasis am Gelenk in der Expression antimikrobieller Peptide (AMP) herauszufinden.

Als AMP bezeichnet man eine große Gruppe von endogenen Proteinen, die von vielen Epithelzellen und spezialisierten Zellen des angeborenen Immunsystems gebildet werden können. Evolutionsbiologisch betrachtet sind AMP sehr alte Moleküle, die sich sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen finden. Je nach Wirkspektrum können sie bakterizid, viruzid oder fungizid wirken und ermöglichen Epithelien so einen wirksamen Schutz vor deren Umwelt (Harder et al. 2007). Sie sind hoch aktiv und können bereits in Konzentrationen im nano- oder mikromolaren Bereich wirksam werden (Zasloff 2002).

Die menschliche Haut produziert konstitutiv AMP, um sich vor invadierenden Mikroorganismen zu schützen und um ihre bakterielle Normalflora zu regulieren (Braff et al. 2005). Dabei sind AMP nicht nur in gesunder Haut detektierbar, sondern auch in der

Haut verschiedener Erkrankungen wie der Psoriasis (Harder et al. 2005). In der barrieregestörten Haut der Psoriasisläsionen sind AMP stark induziert und schützen die Haut äußerst wirksam vor Bakterien – so wirksam, dass Psoriasisläsionen seltener infiziert werden als gesunde Haut (Henseler et al. 1995). Diese klinische Beobachtung führte 1997 schließlich zur Isolation des ersten antimikrobiellen Peptides aus menschlicher Haut: dem humanen β -Defensin *hBD-2* (Harder et al. 1997). Seitdem wurden weitere AMP aus psoriatischer Haut isoliert (Harder und Schröder 2005).

Doch AMP wirken nicht nur antimikrobiell, sondern haben weitere Funktionen: Sie können chemotaktisch auf Zellen des erworbenen Immunsystems wirken und verstärken somit die Immunantwort (Yang et al. 2004). Gegenstand aktueller Forschung ist die Rolle der AMP in der Pathogenese verschiedenster Krankheiten wie der Psoriasis. Beispielsweise wird hier dem Cathelicidin *LL-37* und dem β -Defensin *hBD-2* mit ihrer Aktivierung plasmazytoider dendritischer Zellen ein wichtiger Beitrag zum Fortschreiten der Pathogenese der Psoriasis zugeschrieben (Vergleich 4.5. HNP1-3 und LL-37, S. 66, und 4.5. hBD-2 und hBD-3, S. 68).

So stellte sich für die vorliegende Arbeit die Frage, inwiefern die AMP, die in der Haut von Psoriasisläsionen stark induziert sind, auch in der Synovialis der Psoriasis-Arthritis exprimiert werden – wie unterscheidet sich die AMP-Expression psoriatischer Synovialis von der psoriatischer Haut, wo gibt es Gemeinsamkeiten? Insgesamt 8 AMP – *Psoriasis (S100 A7)*, *Ribonuklease 7 (RNase 7)*, die humanen β -Defensine *hBD-2* und *hBD-3*, das Cathelicidin *LL-37*, *S100 A8 (Calgranulin A)*, *S100 A9 (Calgranulin B)* und die humanen α -Defensine *HNP1-3 (humane neutrophile Peptide 1-3)*– wurden ausgewählt und immunhistochemisch in Proben von Psoriasis vulgaris (läsionale und nicht-läsionale Haut von Psoriasispatienten sowie gesunde Kontrollen), Psoriasis-Arthritis (PsA), rheumatoider Arthritis (RA), Osteoarthrose (OA) und gesunder Synovialis untersucht. Neben dem Vergleich der Psoriasis an der Haut mit der Psoriasis am Gelenk wurden durch die Auswahl von Proben anderer Gelenkentitäten weitere Vergleiche möglich: Der der PsA mit der RA – zweier hochgradiger Synovialitiden, der der PsA mit der OA (einer niedriggradigen Synovialitis) und der Vergleich mit gesunden Kontrollen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Verwendete Chemikalien

Aqua dest.	DeltaSelect GmbH, München; institutseigener Autoklav
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 \cdot H_2O$	Merck, Darmstadt
$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Merck, Darmstadt
H_2O_2	Merck, Darmstadt
Ethanol	BÜFA, Hude-Altmoorhausen
Eukitt	Kindler, Freiburg
Hämalaun	Merck, Darmstadt
HCl	Sigma, Steinheim
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Tris/HCl	Sigma, Steinheim
Tween® 20	Sigma, Steinheim
Xylolersatz	Vogler, Giessen

Puffer für die Immunhistochemie

Tris-Base-Saline(TBS)-Puffer (Waschpuffer)

Der TBS-Puffer wurde zunächst als 10-fach-Konzentrat hergestellt, autoklaviert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Hieraus wurde zur Verwendung die einfache Lösung hergestellt, der pH-Wert auf 7,4 – 7,6 mit HCl oder NaOH eingestellt und anschließend 0,05 % (v/v) Tween® 20 zugesetzt.

TBS-Puffer (einfache Lösung):

8,763 g NaCl

7,88 g Tris/HCl

6,5 ml NaOH

ad 1.000 ml Aqua dest.

Citratpuffer

Für den Citratpuffer wurden zunächst die Stammlösungen A und B getrennt hergestellt, autoklaviert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

Citrat-Puffer 0,01 M:

- Stammlösung A:

21,01 g 0,1 M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$

ad 1.000 ml Aqua dest.

- Stammlösung B:

29,4 g 0,1 M $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$

ad 1.000 ml Aqua dest.

Zur Verwendung wurden die beiden Lösungen dann in folgendem Verhältnis gemischt:

- 27 ml Stammlösung A + 123 ml Stammlösung B

ad 1.500 ml Aqua dest.

- pH 6,0 mit HCl oder NaOH eingestellt

Verwendete Antikörper und Kits

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper gegen *Psoriasin* und *RNase 7* waren am Institut für Dermatologie der Universitätsklinik Kiel hergestellt worden und lagen zu Beginn der Arbeit bereits vor. Die Antikörper gegen die anderen AMP wurden von unten genannten Herstellern bezogen.

Zur Herstellung wurden zunächst Versuchstiere mit dem gewünschten Antigen immunisiert. Anschließend wurde für die Herstellung polyklonaler Antikörper Serum gewonnen, das die gesuchten Antikörper enthielt. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper wurde den Tieren die Milz entnommen, um die antikörperproduzierenden Plasmazellen zu gewinnen. Diese produzierten anschließend in Kultur die Antikörper,

die aus den Zellüberständen isoliert wurden. Eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Gläser, Harder et al. 2005.

Verwendete Antikörper

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antikörper	Psoriasis AB2	Anti-Maus biot.
Art	Monoklonal	Polyklonal
Spezies	Maus	Kaninchen
Verdünnung	1 : 8000	1 : 200
Arbeitskonzentration	1,25 µg/ml	6 µg/ml
Katalognummer	-	E 0354
Hersteller	Dermatologie Kiel	DakoCytomation Glostrup, Dänemark

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antikörper	RNase 7	Anti-Ziege biot.
Klonalität	Polyklonal	Polyklonal
Spezies	Ziege	Kaninchen
Verdünnung	1 : 400	1 : 500
Arbeitskonzentration	26 µg/ml	2,8 µg/ml
Katalognummer	-	305-066-045
Hersteller	Dermatologie Kiel	Jackson Immuno Research West Grove, U.S.A.

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antikörper	hBD-2	Anti-Ziege biot.
Klonalität	Polyklonal	Polyklonal
Spezies	Ziege	Kaninchen
Verdünnung	1 : 500	1 : 500
Arbeitskonzentration	1 µg/ml	2,8 µg/ml
Katalognummer	C-500P1-61	305-066-045
Hersteller	Pepto Tech Cell Concepts, D-Umkirch	Jackson Immuno Research West Grove, U.S.A.

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antikörper	hBD-3	Anti-Kaninchen biot.
Klonalität	Polyklonal	Polyklonal
Spezies	Kaninchen	Schwein
Verdünnung	1 : 500	1 : 300
Arbeitskonzentration	0,001 µg/µl	2,93 µg/ml
Katalognummer	C-500P2-41L	E 0431
Hersteller	Pepto Tech Cell Concepts, D-Umkirch	DakoCytomation Glostrup, Dänemark

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antikörper	LL-37	Anti-Kaninchen biot.
Klonalität	Polyklonal	Polyklonal
Spezies	Kaninchen	Schwein
Verdünnung	1 : 150	1 : 300
Arbeitskonzentration	0,006 µg/µl	2,93 µg/ml
Katalognummer	PA-LL37100	E 0431
Hersteller	Innovagen Lund, Schweden	DakoCytomation Glostrup, Dänemark

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antikörper	S100 A8	Anti-Maus biot.
Klonalität	Monoklonal	Polyklonal
Spezies	Maus	Kaninchen
Verdünnung	1 : 100	1 : 200
Arbeitskonzentration	2 µg/ml	6 µg/ml
Katalognummer	BM4029	E 0354
Hersteller	Acris Antibodies San Diego, U.S.A.	DakoCytomation Glostrup, Dänemark

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antikörper	S100 A9	Anti-Maus biot.
Klonalität	Monoklonal	Polyklonal
Spezies	Maus	Kaninchen
Verdünnung	1 : 100	1: 200
Arbeitskonzentration	1 µg/ml	6 µg/ml
Katalognummer	ab24111	E 0354
Hersteller	Abcam Cambridge, U.K.	DakoCytomation Glostrup, Dänemark

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antikörper	HNP1-3	Anti-Maus biot.
Klonalität	Monoklonal	Polyklonal
Spezies	Maus	Kaninchen
Verdünnung	1 : 200	1 : 200
Arbeitskonzentration	1 µg/ml	6 µg/ml
Katalognummer	HNP103	E 0354
Hersteller	BioLogo D-Kronshagen	DakoCytomation Glostrup, Dänemark

Verwendete Kits

- Vectastain® ABC Peroxidase Kit Elite PK-6100 Standard Vector, Burlingame, U.S.A.
- Vector® NovaRED™ Peroxidase Substrate Kit SK-4800 Vector, Burlingame, U.S.A.

Verwendete Isotypkontrollen

	Isotypkontrolle Maus	Isotypkontrolle Kaninchen	Isotypkontrolle Ziege
Verdünnung	wie Primärantikörper	wie Primärantikörper	wie Primärantikörper
Herstellerkonzentration	0,1 mg/ml	15 mg/ml	15 mg/ml
Katalognummer	X 0943	X 0936	26-787-278030
Hersteller	DakoCytomation Glostrup, Dänemark	DakoCytomation Glostrup, Dänemark	GenWay Biotech San Diego, U.S.A.

2.2. Methoden

Immunhistochemie

Herkunft des Untersuchungsgutes

Insgesamt wurden 27 Synovialis- und 12 Hautpräparate untersucht. Es wurden Hautbiopsien von 4 unbehandelten Patienten mit Psoriasis vulgaris gewonnen: Von jedem Patienten jeweils eine Probe aus einer Psoriasisläsion und eine Probe aus einer makroskopisch gesunden Hautpartie gleicher Lokalisation. Zusätzlich wurden aus dem histologischen Archiv der Dermatologie Kiel 4 Präparate von hautgesunden Patienten herausgesucht, die den Psoriasispatienten in Alter, Geschlecht und Körperlokalisierung der Biopsie entsprachen. Die Kontrollproben stammten aus nicht betroffenen Rändern von Nävuszellnävus-Exzisionen. Für alle Biopsien lag ein positives Ethikvotum vor (Kiel AZ A 104/06).

Die Synovialispräparate erhielten wir zum einen von Prof. Dennis McGonagle aus Leeds, U.K. Diese Proben wurden arthroskopisch gewonnen. Zehn Präparate stammten von Patienten mit Psoriasis-Arthritis, vier von Patienten mit Osteoarthrose und acht von Patienten mit rheumatoider Arthritis.

Von Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe aus Aachen wurden fünf weitere Synovialispräparate gelenkgesunder Kontrollen zur Verfügung gestellt.

Sämtliche Gewebeproben wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

Herstellung der Schnittpräparate

Von den in 4%-igem Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms 5-7 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden zur Entfaltung auf ein 45°C warmes Wasserbad gelegt und dann auf silanisierte Objektträger aufgezogen. Danach wurden die Präparate an der Luft getrocknet und in Präparatekästen aufbewahrt.

Grundlagen der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie stellt eine Methode dar, mit der über spezifische Antikörper gesuchte Antigene innerhalb eines histologischen Präparates detektiert werden können

(Coons 1941). Es kann zwischen direkter und indirekter immunhistochemischer Färbung gewählt werden. Bei der direkten Methode bindet an das Antigen nur ein Antikörper, der selbst mit einem Farbstoff markiert ist. Bei der indirekten Immunhistochemie führen mehrere Antikörper zur Färbung: ein primärer, der gegen das Antigen gerichtet ist, und ein sekundärer, der gegen den primären gerichtet ist. An den sekundären Antikörper ist ein Farbstoff oder ein Enzym, das ein Substrat zu einem Farbstoff umsetzt, gekoppelt. Dies ist beispielsweise der Fall bei der unten beschriebenen Avidin-Biotin-Komplex-Methode (Hsu et al. 1981).

Eine wichtige Voraussetzung für die immunhistochemische Detektion von Antigenen ist, dass diese für die spezifischen Antikörper zugänglich sind. Die Fixierung des Gewebes mit Formalin kann zur Maskierung der Antigene führen: Durch Quervernetzungen in Form von Aldehydverbindungen zwischen Proteinen können Antikörper gegebenenfalls nicht mehr binden (Werner et al. 2000). Diese Quervernetzungen sind jedoch teilweise reversibel und mithilfe verschiedener Demaskierungsmethoden können die Antigene wieder freigelegt werden (Shi et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Hitzedemaskierung in Citratpuffer mit einem Dampfgerät gewählt (Namimatsu et al. 2005). Um ein Abschwimmen der Präparate von den Objektträgern während der Hitzedemaskierung zu verhindern, wurden silanisierte Objektträger verwendet, die durch positive Ladungen auf ihrer Oberfläche kovalente Bindungen mit den Geweben eingegangen und so ein Abschwimmen verhinderten.

Avidin-Biotin-Komplex(ABC)-Methode

Die ABC-Methode ist eine besondere Form der indirekten Immunhistochemie (Hsu, Raine et al. 1981). Hier bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. An das Vitamin Biotin bindet das Glykoprotein Avidin, das eine besondere Affinität zum Biotin hat und insgesamt 4 Bindungsstellen für dieses besitzt. An die anderen Bindungsstellen kann das biotinylierte Enzym binden, das letztendlich sein Substrat in einen Farbstoff umwandelt. Durch die vielen Bindungsstellen können sich große Komplexe bilden, wodurch das Signal verstärkt wird. In dieser Arbeit wurde als Enzym Peroxidase gewählt.

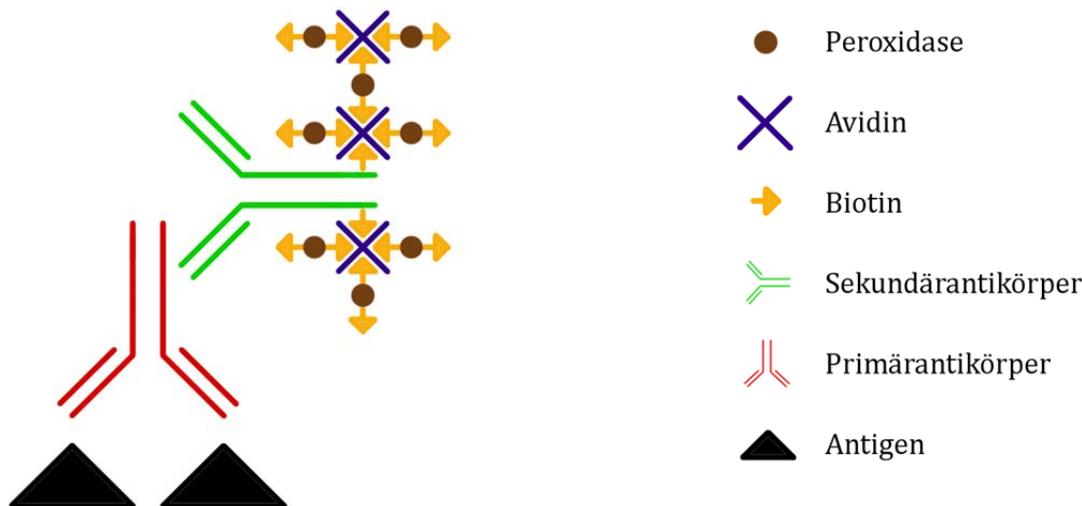


Abbildung 1: Schematische Darstellung Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Ablauf der Immunhistochemie-Färbung

Zunächst wurden die Schnitte im Trockenschrank bei 63°C für eine Stunde getrocknet, um unter dem Schnitt verbliebenes Wasser abzutrocknen, welches zur Zerstörung des Präparates während der Hitzedemaskierung führen könnte. Anschließend wurde in Xylolersatz das Paraffin entfernt, zweimal je 10 min. Dann wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert:

100% Ethanol	2 x 2 min
96% Ethanol	2 x 2 min
80% Ethanol	1 x 2 min
70% Ethanol	1 x 2 min
Aqua dest.	1 x 10 min

Tabelle 1: absteigende Alkoholreihe

Im Anschluss wurden die Proben im Dampfgerar demaskiert. Dabei wurden die Schnitte 20 min lang in Citratpuffer gekocht und kühlten danach 45 min im Citratpuffer ab. Darauf folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mithilfe von 3%-igem Wasserstoffperoxid in Aqua dest. für 10 min. Um diese Blockierungslösung zu entfernen, wurden die Schnitte anschließend kurz in Aqua dest. und dann für 5 min in TBS und Tween (im Folgenden als „Waschpuffer“ bezeichnet) gewaschen. Der Waschpuffer wurde mit Labortüchern vorsichtig von den Rändern abgesaugt. Die Schnitte wurden

mit einem Fettstift eingekreist, um bei den nachfolgenden Schritten die entsprechenden Lösungen während der Inkubation auf den Präparaten zu halten.

Anschließend wurden die Präparate blockiert, um elektrostatische Ladungen der Proteine im Untersuchungsgut abzusättigen, die später zu unspezifischen Antikörperbindungen führen könnten. Hierzu wurde TBS mit 12% BSA oder Normalserum aus dem Kaninchen, falls der 1. Antikörper nicht vom Kaninchen stammte, verwendet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Falls Kaninchen-Normalserum verwendet wurde, ging man davon aus, dass das nicht-immunisierte Kaninchen keine spezifischen Antikörper gegen das gesuchte humane Antigen gebildet hatte.

Folgend wurde die Blockierungslösung abgeschüttelt und der 1. Antikörper aufgetragen, der für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert wurde.

Danach wurden die Präparate zweimal für je 3 min mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper vom Präparat zu entfernen, wobei die Negativkontrollen getrennt gewaschen wurden. Anschließend wurde der 2. Antikörper aufgebracht, der für 30 min bei Raumtemperatur inkubierte.

Erneut wurde mit Waschpuffer zweimal je 3 min gewaschen, bevor der AB-Komplex aufgetragen wurde. Hierfür wurden zuvor 10 µl der Avidinlösung mit 10 µl der Biotin-Peroxidase-Lösung (Vectastain® ABC Peroxidase Kit Elite PK-6100 Standard, Vector, Burlingame, U.S.A.) in 1000µl TBS-Puffer zusammengebracht, um innerhalb von 30 min bei Raumtemperatur aneinander zu binden und den AB-Komplex zu bilden.

Anschließend wurde dreimal je 3 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde das Peroxidase-Substrat aufgetragen und 4 min in dunkler Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde das Vector® NovaRED™ Peroxidase Substrate Kit SK-4800 (Vector, Burlingame, U.S.A.) verwendet und die Lösung unmittelbar vorher in Aqua dest. angesetzt (37,5 µl Lösung A + 25 µl Lösung B + 25 µl Lösung C + 25 µl Lösung D + 2,5 ml Aqua dest.).

Die Präparate wurden anschließend 10 min in Waschpuffer gewaschen, kurz in Aqua dest. getaucht und mit Hämalaun gegengefärbt. Hierzu wurde 30%iges Hämalaun in Aqua dest. hergestellt, in das die Schnitte 30 sec getaucht wurden. Danach wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser 7 min lang gebläut.

Folgend wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und zweimal je 2 min in Xylolersatz getaucht. Abschließend wurden sie mit Eukitt® eingedeckt.

Kontrollen

Um die Spezifität der Antikörper gegenüber dem gesuchten Antigen sicherzustellen, wurden bei den Färbungen jeweils 3 Kontrollen mitgefärbt. Hierfür wurden Proben verwendet, von denen zuvor sichergestellt worden war, dass sie das gesuchte Antigen enthalten:

Psoriasin (S100 A7), RNase 7	Gesunde Haut
hBD-2, hBD-3, S100 A8, S100 A9	Psoriasis vulgaris
LL-37	Wundrand
HNP1-3	Verruca vulgaris

Tabelle 2: Kontrollen zum Nachweis der einzelnen AMP

Es wurde in jeder Serie eine Positivkontrolle gefärbt, die alle Schritte des Protokolls durchlief und am Ende an den spezifischen Lokalisationen eindeutige Immunreaktivität zeigen sollte.

Die Negativkontrolle wurde bis auf den 1. Antikörper genau behandelt wie alle anderen Präparate. Während die Präparate mit dem 1. Antikörper inkubierten, wurde die Negativkontrolle in der Blockierungslösung belassen und anschließend getrennt mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurde sie wieder mit den anderen Präparaten zusammen behandelt. Am Ende sollte die Negativkontrolle keinerlei Immunreaktivität zeigen und so beweisen, dass die Färbung allein auf dem 1. Antikörper beruhte und keine unspezifischen Reaktionen stattfanden.

Um die Spezifität des Primärantikörpers zu dokumentieren, wurde zusätzlich eine Isotypkontrolle verwendet. Während der Inkubationszeit des 1. Antikörpers wurde auf die Isotypkontrolle ein unspezifischer Kontrollantikörper aufgebracht, der aus dem gleichen Tier stammte wie der spezifische Primärantikörper. Da der Antikörper der Isotypkontrolle jedoch nicht an spezifische Antigene binden konnte, wurde er im folgenden Schritt mit dem Waschpuffer abgewaschen. So konnte auch der Sekundärantikörper im nächsten Schritt nicht binden und die Präparate blieben letztendlich negativ. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass die Färbung auf der spezifischen Affinität des Primärantikörpers zum Antigen beruhte.

Beurteilung der Hautpräparate

Die Präparate wurden nach der Färbung im Lichtmikroskop auf Immunreaktivität untersucht. Zur Beurteilung wurde dazu ein Score benutzt, der die Expression der antimikrobiellen Peptide in den jeweiligen Epidermisschichten beschreibt. Hier ist anzumerken, dass bei Psoriasis aufgrund der Parakeratose per definitionem kein Stratum granulosum existiert. Zur Vergleichbarkeit mit den Kontrollproben wurden die subcornealen Schichten der Psoriasispräparate bei der Beurteilung als Stratum granulosum klassifiziert. Es wurden 0-4 Punkte nach folgenden Kriterien vergeben:

0	Keinerlei Immunreaktivität
1	Immunreaktivität im Stratum corneum
2	Immunreaktivität in Stratum corneum und granulosum
3	Immunreaktivität in Stratum corneum, granulosum und spinosum
4	Immunreaktivität in gesamter Epidermis

Table 3: Score zur Beurteilung der Epidermis

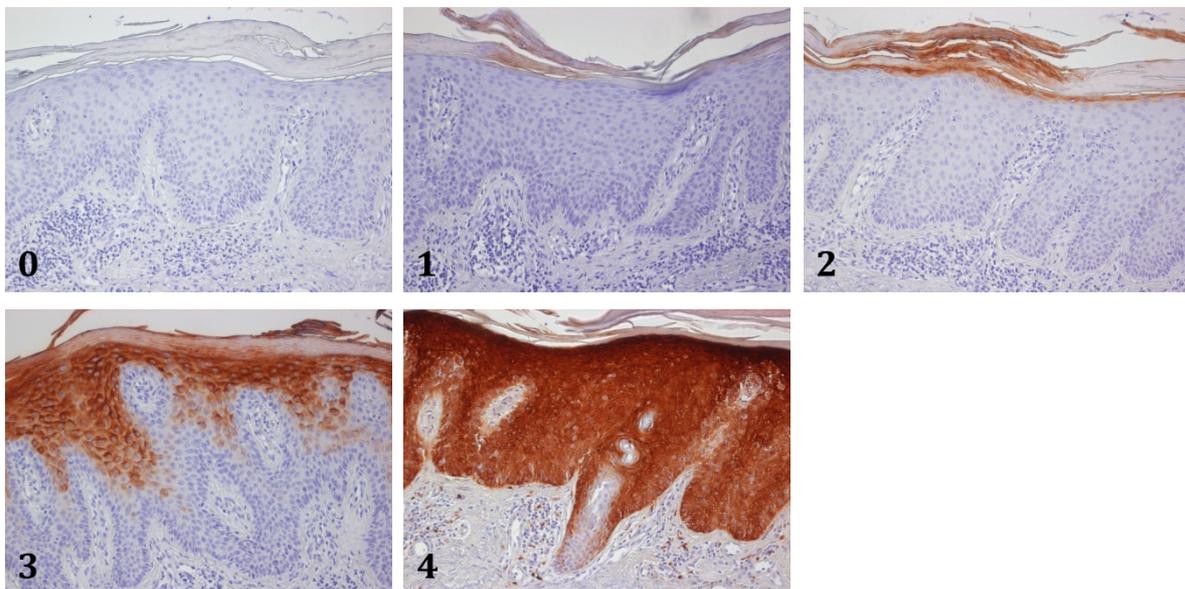


Abbildung 2: Beispiele für Epidermisscore, 10x vergrößerte läsionale Psoriasis (0 – keine Immunreaktivität; 1 – Immunreaktivität nur Stratum corneum; 2 – Immunreaktivität Stratum corneum und subcorneal (entsprechend Stratum granulosum); 3 – Immunreaktivität Stratum corneum, subcorneal (entsprechend Stratum granulosum) und Stratum spinosum; 4 – Immunreaktivität in gesamter Epidermis)

Des Weiteren wurde das dermale Stroma hinsichtlich der Immunreaktivität bewertet. Hier wurde beurteilt, inwiefern z.B. eingewanderte Leukozyten positiv gefärbt waren: Es wurde zwischen leichter, mittlerer und starker Immunreaktivität unterschieden.

Leichte Immunreaktivität bedeutete, dass nur einzelne Zellen gefärbt waren und die Färbung eher schwach war. Eine starke Immunreaktivität hingegen bedeutete eine starke Färbung vieler Zellen. Waren mäßig viele Zellen mittelgradig kräftig gefärbt, wurde dies als mittlere Immunreaktivität eingestuft.

+	Leichte Immunreaktivität
++	Mittlere Immunreaktivität
+++	Starke Immunreaktivität

Tabelle 4: Score für Leukozyten in der Dermis

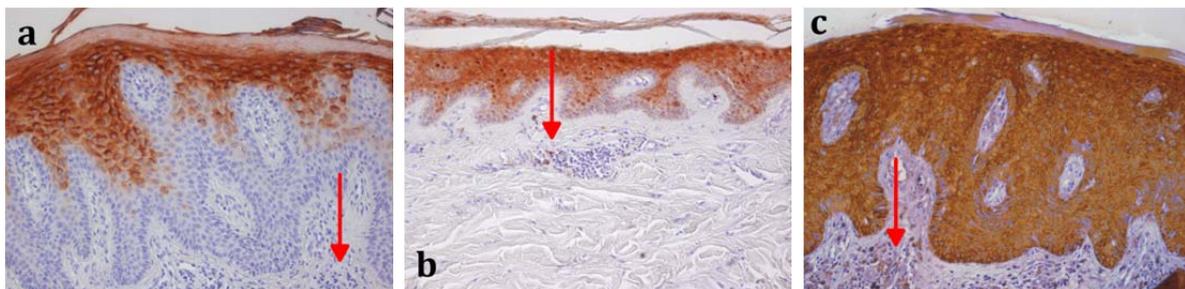


Abbildung 3: Immunreaktivität am Beispiel läsionaler Psoriasis, rote Pfeile markieren dermale Infiltrate (a: negative Dermis, b: positive Dermis +, c: positive Dermis +++)

Beurteilung der Synovialispräparate

Die Präparate wurden nach der Färbung im Lichtmikroskop auf Immunreaktivität untersucht. Die Untersucher waren dabei verblindet, d.h. sie kannten die Diagnosen der Patienten, von denen die Proben stammten, nicht. 3 verschiedene Muster der Färbung wurden beurteilt:

1. Immunreaktivität in Synoviozyten der Membrana synovialis
2. Immunreaktivität in eingewanderten Leukozyten im Synovialstroma
3. Immunreaktivität in Leukozyten, die in Blutgefäßen zu erkennen waren

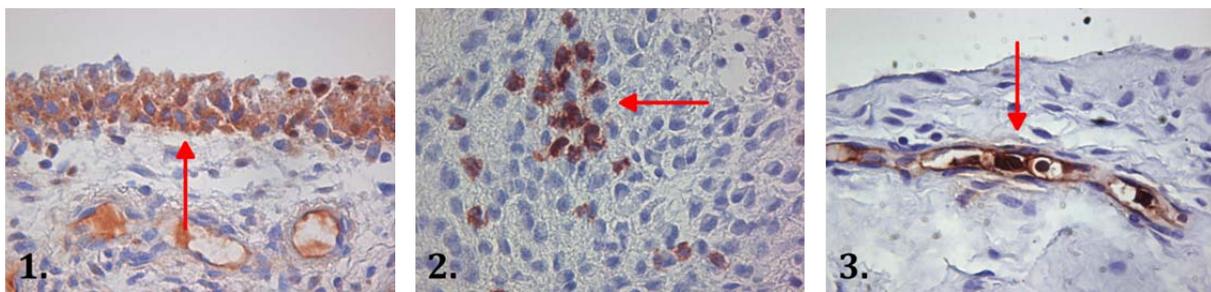


Abbildung 4: Beurteilung der Immunreaktivität der Synovialispräparate (1.: Immunreaktivität in Synoviozyten, 2.: Immunreaktivität in eingewanderten Leukozyten im Synovialstroma, 3.: Immunreaktivität in Leukozyten in Blutgefäßen)

Die Immunreaktivität in Synoviozyten wurde mithilfe einer Gesichtsfeldauszählung weiter quantifiziert, die im Folgenden beschrieben ist.

Gesichtsfeldauszählung

Um quantitative Aussagen über die Immunreaktivität der Membrana synovialis machen zu können, wurden Synoviozyten nach positiv und negativ unterschieden und bei 100-facher Vergrößerung 10 Gesichtsfelder pro Präparat ausgezählt. Eine Zelle wurde als positiv gewertet, wenn ihr Zytoplasma positiv gefärbt war. Gezählt wurden die Zellen oberhalb der Basalmembran. Falls die Membrana synovialis entzündungsbedingt breiter als ein Gesichtsfeld war, wurde das gesamte Gesichtsfeld ausgezählt.

Jeder Untersucher wählte 10 repräsentative Gesichtsfelder pro Präparat zur Beurteilung aus. Über die Zahlen der positiven Synoviozyten und die Gesamtzahlen konnten so die prozentualen Anteile der positiven Zellen in der Membrana synovialis ermittelt werden. Die Methode wurde von zwei unabhängigen Untersuchern durchgeführt.

Im folgenden Bild ist exemplarisch ein Gesichtsfeld bei 100facher Vergrößerung zu sehen mit den Markierungen für **P=positiv** und **N=negativ**. Die Basalmembran ist als schwarze Linie gekennzeichnet. Es befinden sich 34 positive und 10 negative Synoviozyten in diesem Gesichtsfeld, woraus sich eine Gesamtzahl von 44 ergibt und damit ein prozentualer Anteil der positiven Synoviozyten von $34/44=77,3\%$.

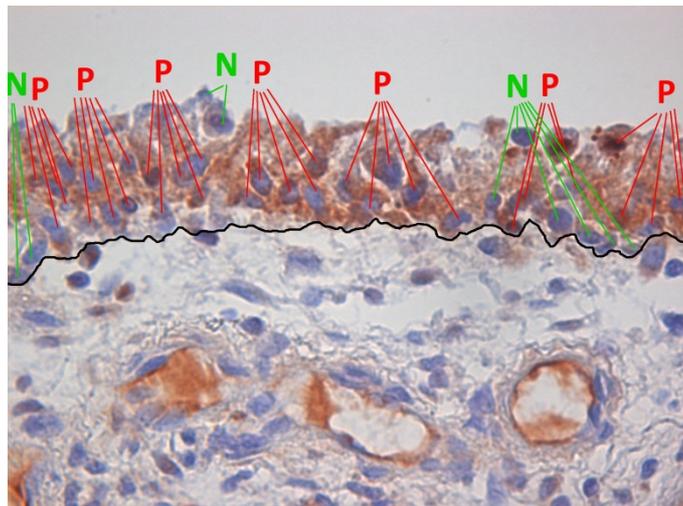


Abbildung 5: Gesichtsfeldauszählung am Beispiel rheumatoider Arthritis

Synovitis-Score

Um die Entzündung in der Synovialis in jedem Präparat zu quantifizieren und damit vergleichbar machen zu können, wurden die Präparate mithilfe eines Synovitis-Scores (Krenn et al. 2006) beurteilt. Es wurde jedes Präparat mit Hämalaun gefärbt und mithilfe eines Lichtmikroskopes von einem unabhängigen Untersucher verblindet untersucht. Folgende 3 Kategorien wurden dabei beurteilt:

1. Anzahl der Synoviozytenschichten in der Membrana synovialis
2. Dichte residenter Zellen (Fibroblasten, Fibrozyten, Endothelzellen, Makrophagen) im Synovialstroma
3. Vorhandensein eingewanderter Leukozyten (Lymphozyten, Plasmazellen)

Jede Kategorie wurde mit 0-3 Punkten bewertet (siehe Tabelle 5) und die Punkte addiert. Die Punktesummen wurden wie folgt eingeteilt: 0-1 – keine Synovitis, 2-4 – leichtgradige Synovitis, 5-9 – hochgradige Synovitis.

Kategorie	Punkte	Bewertung
Synoviozyten- schichten	0	Synoviozyten bilden eine Zellschicht
	1	Synoviozyten bilden 2-3 Zellschichten
	2	4-5 Zellschichten, darunter neben den Synoviozyten einige multinukleäre Zellen
	3	> 5 Zellschichten, ggf. ulzeriert, infiltriert mit multinukleären Zellen
Dichte residenter Synovialstroma- zellen	0	normale Dichte residenter Zellen
	1	leicht erhöhte Dichte residenter Zellen
	2	moderat erhöhte Dichte residenter Zellen, ggf. multinukleäre Zellen
	3	stark erhöhte Dichte residenter Zellen, ggf. multinukleäre Riesenzellen, Pannus und/oder rheumatoide Granulome
Vorhandensein eingewanderter Leukozyten	0	keine Lymphozyten oder Plasmazellen
	1	wenige Lymphozyten oder Plasmazellen, v.a. perivaskulär lokalisiert
	2	mehrere Lymphozyten und Plasmazellen, teilweise Follikelbildung
	3	starke inflammatorische Infiltrierung, mehrere große Follikel

Table 5: Beurteilung von Synovialispräparaten mittels Synovitisscore (3 Kategorien, die mit jeweils 0-3 Punkten bewertet werden, die Summe der Punkte wird folgendermaßen eingeteilt: 0-1 Punkt – keine Synovitis, 2-4 Punkte – leichtgradige Synovitis, 5-9 Punkte – hochgradige Synovitis)

Statistik

Der exakte Fishertest

Der Test nach Fisher eignet sich zur Untersuchung auf statistische Signifikanz bei binären Daten in voneinander unabhängigen Stichproben. Er wurde von Ronald A. Fisher und Frank Yates für die Vierfeldertafel entwickelt, d.h. für zwei voneinander unabhängige Variablen, die beide nur 2 mögliche Merkmalsausprägungen annehmen können (Fisher et al. 1948). In der vorliegenden Arbeit wurde der Fishertest für die Untersuchung der Gelenkproben verwendet. Da insgesamt 4 voneinander unabhängige Stichproben existierten (Psoriasis-Arthritis, Rheumatoide Arthritis, Osteoarthrose und gesunde Synovialis), wurde ein modifizierter exakter Fishertest angewendet (Clarkson 1993). Ziel der Untersuchung war es, eine mögliche statistische Signifikanz zwischen den 4 Diagnosen zu untersuchen. Dazu wurden die immunreaktiven AMP *hBD-3*, *LL-37*, *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* in jeweils 3 Gruppen eingeteilt analog zur Beurteilung der Synovialisproben:

1. Membrana synovialis
2. Eingewanderte Leukozyten im Synovialisstroma
3. Leukozyten in Blutgefäßen der Synovialis

So ergaben sich aus 5 antimikrobiellen Peptiden à 3 Gruppen insgesamt 15 Gruppen mit je 27 Synovialispräparaten der 4 verschiedenen Diagnosen. Für alle 15 Gruppen wurde mittels des modifizierten exakten Fishertests der p-Wert für die jeweilige Gruppe ermittelt. Dazu wurden die Präparate tabellarisch aufgelistet und bei jedem Präparat zwischen positiv (1) und negativ (0) unterschieden (eine Berücksichtigung der prozentualen Gesichtsfeldauszählung der Membrana synovialis war somit nicht möglich). Mithilfe des Programms „R“ konnte dann über die Tabellen für jede der 15 Gruppen der jeweilige p-Wert errechnet werden (R-Core-Team 2013).

3. Ergebnisse

3.1. Immunhistochemie Gelenke

Insgesamt wurden 27 arthroskopisch gewonnene Synovialisbiopsien immunhistochemisch aufgearbeitet: 10 Proben von Patienten mit Psoriasis-Arthritis, 8 von Patienten mit rheumatoider Arthritis, 4 von Patienten mit Osteoarthrose und 5 von gelenkgesunden Patienten aus Routinearthroskopien.

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden 3 Aspekte beurteilt: 1. Immunreaktivität in Synoviozyten der Membrana synovialis, 2. Immunreaktivität in Leukozyten im Synovialstroma, 3. Immunreaktivität in Leukozyten in Blutgefäßen. Um die Immunreaktivität der Synoviozyten zu quantifizieren, wurden die positiven und negativen Synoviozyten ausgezählt und der Anteil der positiven Synoviozyten an der Gesamtzahl ausgerechnet. Bei der Immunreaktivität der Leukozyten im Synovialstroma und in Blutgefäßen wurde zwischen positiv (in den Tabellen „+“) und negativ (in den Tabellen „-“) unterschieden.

Psoriasis-Arthritis (PsA)

S100 A8, S100 A9, HNP1-3 und LL-37

Eine Expression von *S100 A8* und *S100 A9* wurde in 7 von 10 PsA-Proben identifiziert. Die Immunreaktivität war vor allem in Leukozyten im Synovialstroma zu finden, die, der Morphologie und der Zelldichte in diesen Arealen nach zu urteilen, im Rahmen der Entzündung eingewandert waren. Einige positive Leukozyten fanden sich auch in Gefäßen und zeigten eine positive Färbung ihres Zytoplasmas und des sie umgebenden Serums. In einem Präparat zeigte sich außerdem eine Induktion von sowohl *S100 A8* als auch *S100 A9* in der Membrana synovialis. Hier produzierten durchschnittlich 31% der Zellen *S100 A8* und 14% *S100 A9*. Nach Verteilung und Morphologie handelte es sich hierbei um Synoviozyten.

HNP1-3 wurden in 8 von 10 Präparaten nachgewiesen. Die positiven Zellen waren vor allem Leukozyten im Synovialstroma und in Blutgefäßen. Viele dieser Leukozyten waren Granulozyten (durch die Morphologie mit dem typischen septierten Zellkern identifiziert), die eine besonders hohe Immunreaktivität in ihrem Zytosol und auch in dem sie umgebenden Extrazellularraum zeigten. In einem Präparat konnte außerdem eine *HNP1-3*-Expression in Synoviozyten gezeigt werden mit durchschnittlich 25% positiven Zellen.

LL-37 war, im Vergleich zu den bisher genannten AMP, eher schwach nachweisbar und konnte in vereinzelt Leukozyten in 2 von 10 Präparaten identifiziert werden. In der Membrana synovialis zeigte sich keine *LL-37*-Expression.

Die Gesamtpunktezahlen der Synovitiscores, die für jede Biopsie beurteilt wurden, reichten von 0 (keine Synovitis) bis 6 (hochgradige Synovitis).

Von 7 PsA-Patienten lagen Informationen zu medikamentösen Therapien zum Zeitpunkt der Biopsie vor. Alle Patienten erhielten NSAID („non-steroidal antiinflammatory drugs“), 3 erhielten DMARD („disease-modifying antirheumatic drugs“) und ein Patient systemisch Kortikosteroide.

Psoriasis, RNase 7, hBD-2 und hBD-3

Die Präparate zeigten keinerlei Immunreaktivität für das S100-Protein *Psoriasis (S100 A7)*, die Ribonuklease *RNase 7* und die humanen β -Defensine *hBD-2* und *hBD-3*. Weder in der Membrana synovialis, noch in Stroma oder Blutgefäßen konnten positive Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde in der Psoriasis-Arthritis eine hohe Immunreaktivität gegenüber *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP 1-3* nachgewiesen, die bei 2 Patienten auch eine Produktion dieser antimikrobiellen Peptide in der Membrana synovialis durch Synoviozyten einschloss. Des Weiteren wurde eine leichte Positivität für *LL-37* im Synovialstroma gefunden. *Psoriasis*, *RNase 7*, *hBD-2* und *hBD-3* konnten hingegen nicht nachgewiesen werden.

#	S100 A8			S100 A9			HNP1-3			LL-37			Synovitisscore				CRP	Therapie		
	Sy	St	G	Sy	St	G	Sy	St	G	Sy	St	G	E	R	I	Ges.		S	D	N
1	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	1	0	2	x	x	x	x
2	0	-	-	0	+	-	0,25	+	-	0	-	-	1	2	2	5	28	-	Su	+
3	0	-	+	0	+	+	0	+	+	0	-	-	1	3	0	4	x	+	x	+
4	0		-	0	-	+	0	+	+	0	-	-	1	0	0	1	7	-	Su	+
5	0,31	+	+	0,14	+	+	0	+	+	0	+	+	2	3	1	6	29	-	-	+
6	0	-	-	0	+	-	0	+	-	0	-	-	1	0	1	2	73	x	x	x
7	0	-	+	0	-	+	0	-	+	0	+	-	0	0	0	0	x	x	x	+
8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	2	1	4	x	x	x	+
9	0	-	-	0	-	+	0	+	+	0	-	-	1	1	1	3	x	x	x	x
10	0	-	-	0	-	-	0	+	-	0	-	-	0	0	0	0	<5	-	M,Su	+

Tabelle 6: Immunreaktivität gegenüber S100 A8, S100 A9, HNP1-3 und LL-37 in PsA: Sy – positive Synoviozyten in Prozent der Gesamtsynoviozytenzahl; St – Immunreaktivität in eingewanderten Leukozyten im Synovialstroma: positive Zellen zu detektieren (+) oder nicht (-); G – Immunreaktivität in Leukozyten in Blutgefäßen: positive Zellen zu detektieren (+) oder nicht (-); Synovitisscore (E – Anzahl der Zellschichten in Membrana synovialis, R – Dichte residenter Zellen im Synovialstroma, I – Anzahl infiltrierter Zellen im Synovialstroma, Ges. – Synovitisscore gesamt); CRP (C-reaktives Protein) im Blut in mg/l; Therapie der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie: S – systemische Kortikosteroide, D – DMARD (disease-modifying anti-rheumatic drugs), N – NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs), Su – Sulfasalazin, M – Methotrexat, x – keine Information in der Patientenakte vorhanden

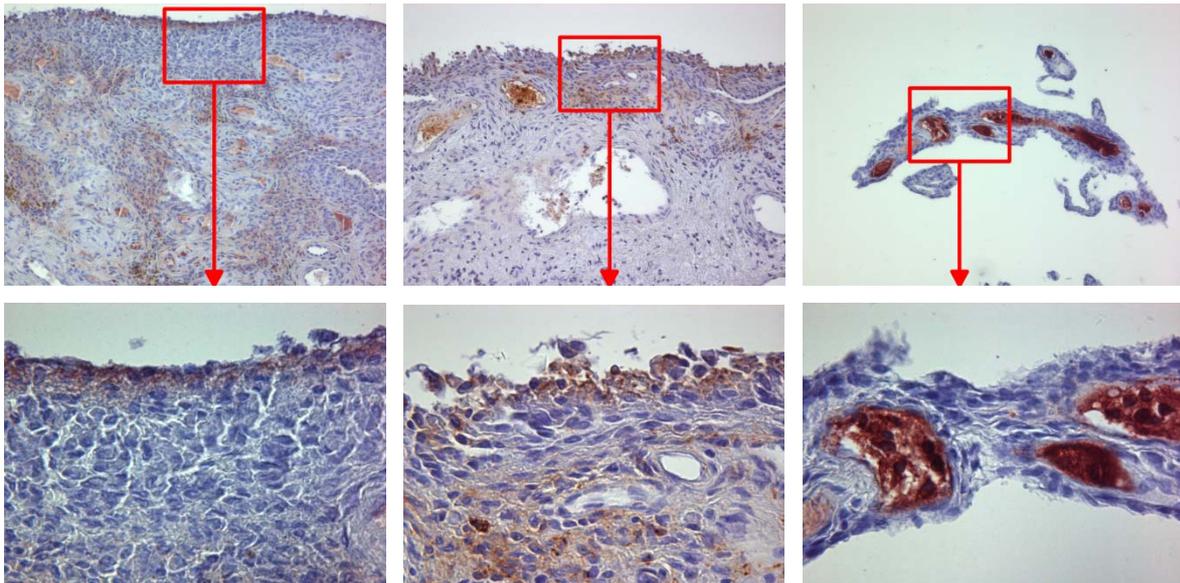


Abbildung 6: Immunreaktivität gegenüber S100 A8 und S100 A9 in Psoriasis-Arthritis (links: S100 A8 in Präparat 5 - Synovialis und Stroma positiv; Mitte: S100 A9 in Präparat 5 - Synovialis und Stroma positiv; rechts: S100 A9 in Präparat 4 - Leukozyten in Blutgefäßen positiv), Vergrößerungen jeweils 10x in oberer Reihe und 40x in unterer Reihe, die die jeweiligen Ausschnitte der roten Boxen zeigt

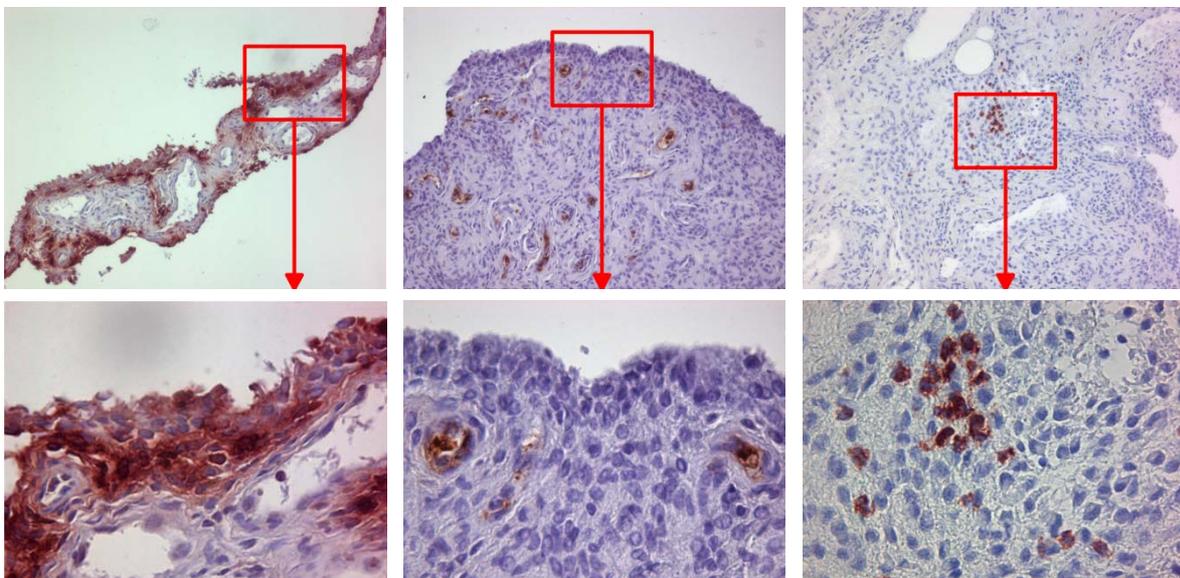


Abbildung 7: Immunreaktivität gegenüber HNP1-3 und LL-37 in Psoriasis-Arthritis (links: HNP1-3 in Präparat 2 - Synovialis positiv; Mitte: HNP1-3 in Präparat 3 - Stroma und Blutgefäße positiv; rechts: LL-37 in Präparat 5 - Stroma positiv), Vergrößerungen jeweils 10x in oberer Reihe und 40x in unterer Reihe, die die jeweiligen Ausschnitte der roten Boxen zeigt

Rheumatoide Arthritis (RA)

S100 A8, S100 A9 und HNP1-3

S100 A8 konnte in 2 der 8 Präparate nachgewiesen werden. In einer Biopsie konnte neben der Immunreaktivität eingewanderter Leukozyten im Synovialstroma eine *S100-A8*-Expression in der Membrana synovialis detektiert werden mit 65% *S100-A8*-positiven Synoviozyten.

Das gleiche Präparat zeigte Immunreaktivität gegenüber *S100 A9* in der Membrana synovialis mit durchschnittlich 34% *S100-A9*-positiven Zellen. *S100 A9* wurde ebenfalls in 2 von 8 RA-Präparaten nachgewiesen.

In insgesamt 5 von 8 Präparaten konnte Immunreaktivität gegenüber *HNP1-3* nachgewiesen werden. Vor allem im Synovialstroma exprimierten eingewanderte Leukozyten *HNP1-3* und in einem Präparat zeigte sich zusätzlich eine Expression in Synoviozyten mit einem durchschnittlichen Anteil der positiven Synoviozyten von 55%.

Die Gesamtpunktezahlen der Synovitiscores, die für jede Biopsie beurteilt wurden, reichten von 0 (keine Synovitis) bis 5 (hochgradige Synovitis). Von 6 Patienten aus der Gruppe der RA lagen Daten zu ihren Therapien vor. 5 erhielten zum Zeitpunkt der Biopsie DMARD („disease-modifying antirheumatic drugs“), 4 NSAID („non-steroidal antiinflammatory drugs“) und 4 systemisch Kortikosteroide.

Psoriasis, RNase 7, hBD-2, hBD-3 und LL-37

In den vorliegenden Präparaten der RA konnte keine Immunreaktivität gegenüber *Psoriasis*, *RNase 7*, *hBD-2*, *hBD-3* und *LL-37* nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde in den Präparaten der rheumatoiden Arthritis Immunreaktivität gegenüber *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* identifiziert, die bei einem Patient auch eine Expression der drei AMP in Synoviozyten einschloss. *Psoriasis*, *RNase 7*, *hBD-2*, *hBD-3* und *LL-37* wurden hingegen nicht nachgewiesen.

#	S100 A8			S100 A9			HNP1-3			Synovitisscore				CRP	Therapie		
	Sy	St	G	Sy	St	G	Sy	St	G	E	R	I	Ges.		S	D	N
1	0	-	-	0	-	-	0	+	-	0	0	0	0	x	x	x	x
2	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	1	0	2	x	x	x	x
3	0	-	-	0	-	-	0	+	+	0	2	1	3	57	-	-	+
4	0	-	-	0	+	-	0	+	-	2	2	1	5	29	-	M	+
5	0	-	+	0	-	-	0	-	+	0	0	0	0	11	+	M	-
6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	1	0	2	55	+	M	+
7	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	2	2	4	5	+	M	+
8	0,65	+	+	0,34	+	+	0,55	+	+	1	2	0	3	33	+	M	-

Tabelle 7: Immunreaktivität gegenüber S100 A8, S100 A9 und HNP1-3 in RA: Sy – positive Synoviozyten in Prozent der Gesamtsynoviozytenzahl; St – Immunreaktivität in eingewanderten Leukozyten im Synovialstroma: positive Zellen zu detektieren (+) oder nicht (-); G – Immunreaktivität in Leukozyten in Blutgefäßen: positive Zellen zu detektieren (+) oder nicht (-); Synovitisscore (E – Anzahl der Zellschichten in Membrana synovialis, R – Dichte residenter Zellen im Synovialstroma, I – Anzahl infiltrierter Zellen im Synovialstroma, Ges. – Synovitisscore gesamt); CRP (C-reaktives Protein) im Blut in mg/l; Therapie der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie: S – systemische Kortikosteroide, D – DMARD (disease-modifying anti-rheumatic drugs), N – NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs), M – Methotrexat, , x – keine Information in der Patientenakte vorhanden

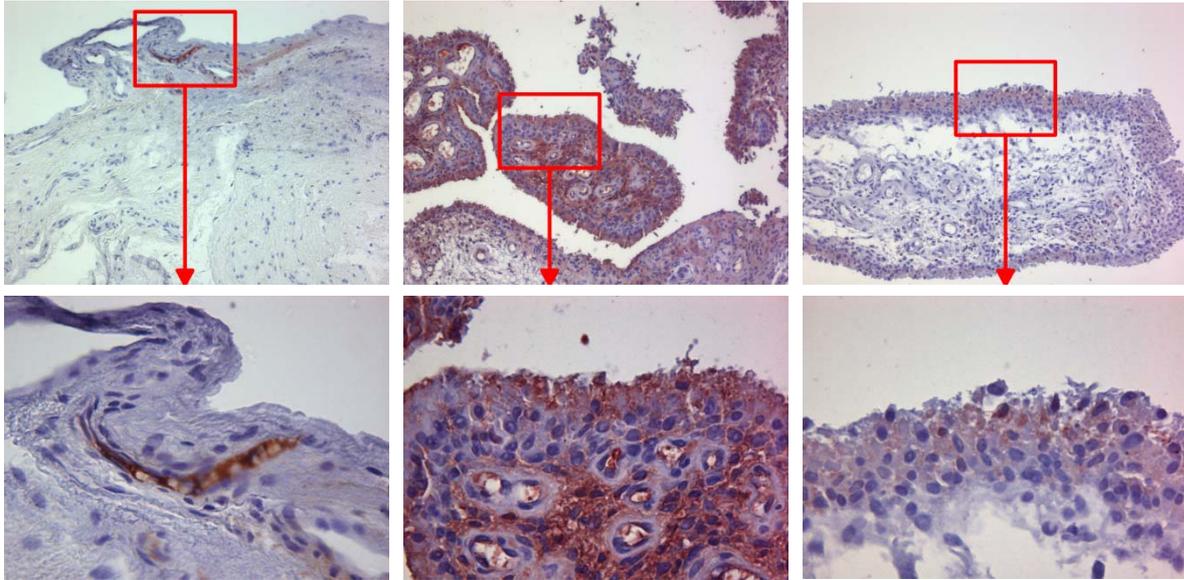


Abbildung 8: Immunreaktivität gegenüber S100 A8 und S100 A9 in rheumatoider Arthritis (links: S100 A8 in Präparat 5 – Leukozyten in Blutgefäßen positiv; Mitte: S100 A8 in Präparat 8 – Synovialis und Stroma positiv; rechts: S100 A9 in Präparat 8 – Synovialis und Stroma positiv), Vergrößerungen jeweils 10x in oberer Reihe und 40x in unterer Reihe, die die jeweiligen Ausschnitte der roten Boxen zeigt

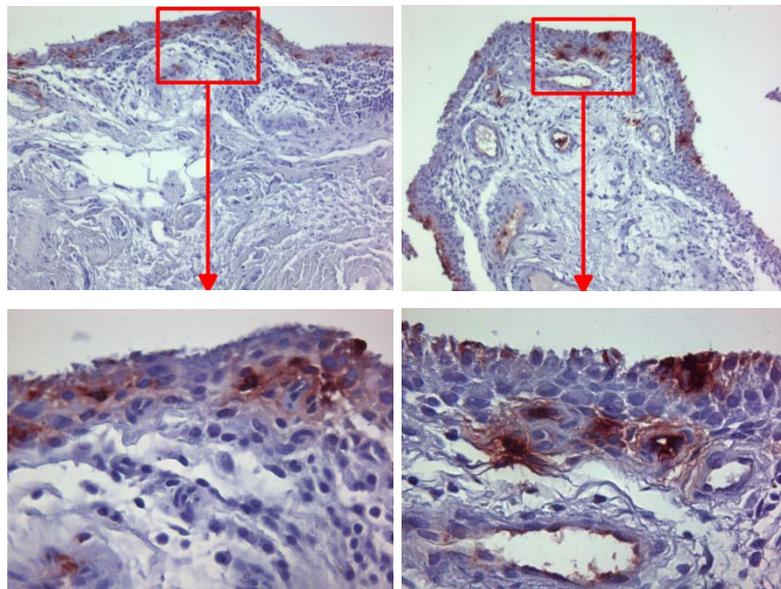


Abbildung 9: Immunreaktivität gegenüber HNP1-3 in rheumatoider Arthritis (links: HNP1-3 in Präparat 4 – Stroma positiv; rechts: HNP1-3 in Präparat 8 – Synovialis und Stroma positiv), Vergrößerungen jeweils 10x in oberer Reihe und 40x in unterer Reihe, die die jeweiligen Ausschnitte der roten Boxen zeigt

Osteoarthrose (OA)

S100 A9, HNP1-3

Eine Expression von *S100 A9* und *HNP1-3* konnte in allen 4 Präparaten identifiziert werden. Die Immunreaktivität war jedoch nur in eingewanderten Leukozyten im Synovialstroma oder in Leukozyten in Blutgefäßen zu detektieren, die Membrana synovialis blieb in allen Präparaten negativ.

Die Gesamtpunktezahlen der Synovitisscores, die für jede Biopsie beurteilt wurden, reichten von 0 (keine Synovitis) bis 5 (hochgradige Synovitis). Ein OA-Patient erhielt NSAID („non-steroidal antiinflammatory drugs“) zum Zeitpunkt der Biopsie.

S100 A8, LL-37, Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und hBD-3

In den vorliegenden Präparaten der OA konnte keinerlei Immunreaktivität gegenüber *S100 A8*, *LL-37*, *Psoriasin*, *RNase 7*, *hBD-2* und *hBD-3* nachgewiesen werden.

#	<i>S100 A9</i>			<i>HNP1-3</i>			Synovitisscore				CRP	Therapie		
	Sy	St	G	Sy	St	G	E	R	I	Ges.		S	D	N
1	0	-	+	0	-	+	0	0	0	0	<5	x	x	+
2	0	-	+	0	+	-	1	1	0	2	8,7	-	-	-
3	0	+	-	0	+	-	2	2	1	5	<5	-	-	-
4	0	-	+	0	+	+	1	1	0	0	<5	x	x	x

Tabelle 8: Immunreaktivität gegenüber *S100 A9* und *HNP1-3* in OA: Sy – positive Synoviozyten in Prozent der Gesamtsynoviozytenzahl; St – Immunreaktivität in eingewanderten Leukozyten im Synovialstroma: positive Zellen zu detektieren (+) oder nicht (-); G – Immunreaktivität in Leukozyten in Blutgefäßen: positive Zellen zu detektieren (+) oder nicht (-); Synovitisscore (E – Anzahl der Zellschichten in Membrana synovialis, R – Dichte residenter Zellen im Synovialstroma, I – Anzahl infiltrierter Zellen im Synovialstroma, Ges. – Synovitisscore gesamt); CRP (C-reaktives Protein) im Blut in mg/l; Therapie der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie: S – systemische Kortikosteroide, D – DMARD (disease-modifying anti-rheumatic drugs), N – NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs), x – keine Information in der Patientenakte vorhanden

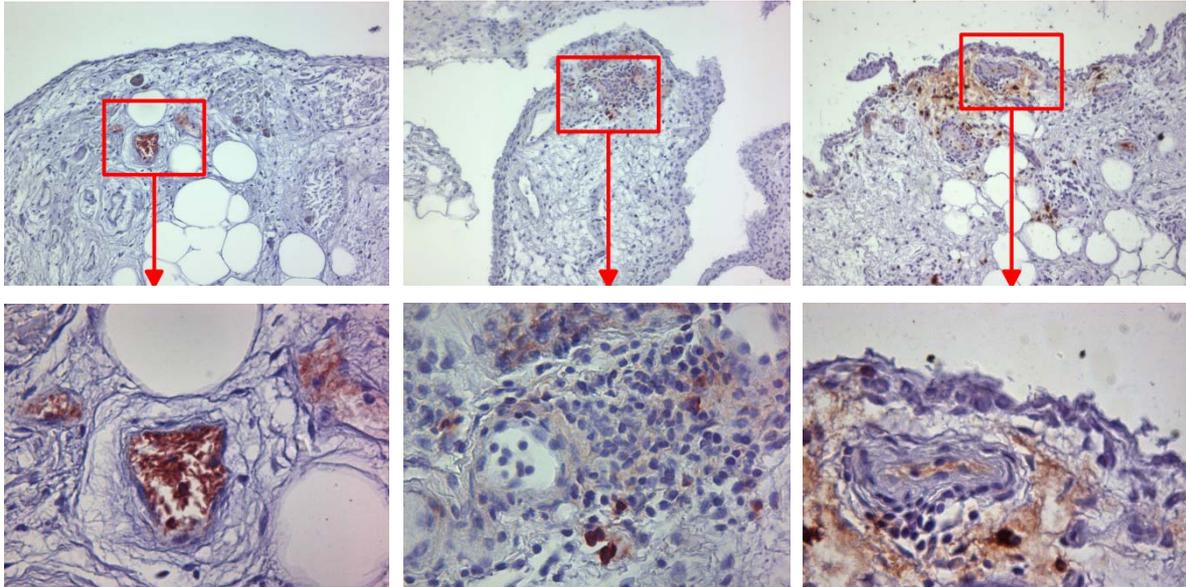


Abbildung 10: Immunreaktivität gegenüber *S100 A9* und *HNP1-3* bei Osteoarthrose (links: *S100 A9* in Präparat 2 – Blutgefäße positiv; Mitte: *S100 A9* in Präparat 3 - Stroma positiv; rechts: *HNP1-3* in Präparat 3, Stroma positiv), Vergrößerungen jeweils 10x in oberer Reihe und 40x in unterer Reihe, die die jeweiligen Ausschnitte der roten Boxen zeigt

Insgesamt konnte bei Osteoarthrose lediglich im Synovialstroma Immunreaktivität gegenüber *S100 A9* und *HNP1-3* gezeigt werden. Die Membrana synovialis blieb gänzlich negativ. Immunreaktivität gegenüber *S100 A8*, *LL-37*, *Psoriasin*, *RNase 7*, *hBD-2* und *hBD-3* war nicht zu detektieren.

Gesunde Synovialis

S100 A8, S100 A9, HNP1-3 und hBD-3

S100 A8 wurde in 1 von 5 gesunden Synovialispräparaten gefunden. Immunreaktivität zeigten Leukozyten im Synovialstroma sowie die Membrana synovialis mit durchschnittlich 16% positiven Zellen.

In einem anderen Präparat zeigte sich Immunreaktivität für *S100 A9* im Synovialstroma in eingewanderten Leukozyten. In der Membrana synovialis konnten jedoch keine *S100-A9*-positiven Zellen identifiziert werden.

HNP1-3 konnten in 3 von 5 Präparaten nachgewiesen werden. Hier zeigten sich einzelne positive Leukozyten im Synovialstroma und in Blutgefäßen. *HNP1-3*-positive Synoviozyten konnten in keinem Präparat gefunden werden.

In 1 von 5 Präparaten zeigten sich für *hBD-3* positive Zellen in Blutgefäßen. Die Membrana synovialis zeigte keine Immunreaktivität.

Psoriasis, RNase 7, hBD-2, LL-37

In den vorliegenden Präparaten der gesunden Synovialis konnte keine Immunreaktivität für *Psoriasis*, *RNase 7*, *hBD-2* und *LL-37* nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte damit in gesunder Synovialis Immunreaktivität gegenüber *S100 A8*, *S100 A9*, *HNP1-3* und *hBD-3* nachgewiesen werden, wobei Synoviozyten in der Membrana synovialis nur in einem Präparat für *S100 A8* positiv waren. *Psoriasis*, *RNase 7*, *hBD-2* und *LL-37* wurden nicht nachgewiesen.

#	<i>S100 A8</i>			<i>S100 A9</i>			<i>HNP1-3</i>			<i>hBD-3</i>			<i>Synovitisscore</i>				<i>CRP</i>	<i>Therapie</i>		
	Sy	St	G	Sy	St	G	Sy	St	G	Sy	St	G	E	R	I	Ges.		S	D	N
1	0	-	-	0	-	-	0	+	-	0	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
2	0,16	+	-	0	-	-	0	+	+	0	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
3	0	-	-	0	+	+	0	+	+	0	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x
5	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	+	-	-	-	-	x	x	x	x

Tabelle 9: Immunreaktivität gegenüber *S100 A8*, *S100 A9*, *HNP1-3* und *hBD-3* in gesunder Synovialis: Sy – positive Synoviozyten in Prozent der Gesamtsynoviozytenzahl; St – Immunreaktivität in eingewanderten Leukozyten im Synovialstroma: positive Zellen zu detektieren (+) oder nicht (-); G – Immunreaktivität in Leukozyten in Blutgefäßen: positive Zellen zu detektieren (+) oder nicht (-); *Synovitisscore* (E – Anzahl der Zellschichten in Membrana synovialis, R – Dichte residenter Zellen im Synovialstroma, I – Anzahl infiltrierter Zellen im Synovialstroma, Ges. – *Synovitisscore* gesamt); *CRP* (C-reaktives Protein) im Blut in mg/l; Therapie der Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie (S – systemische Steroide, D – DMARD (disease-modifying anti-rheumatic drugs), N – NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs)), x – keine Information in der Patientenakte vorhanden

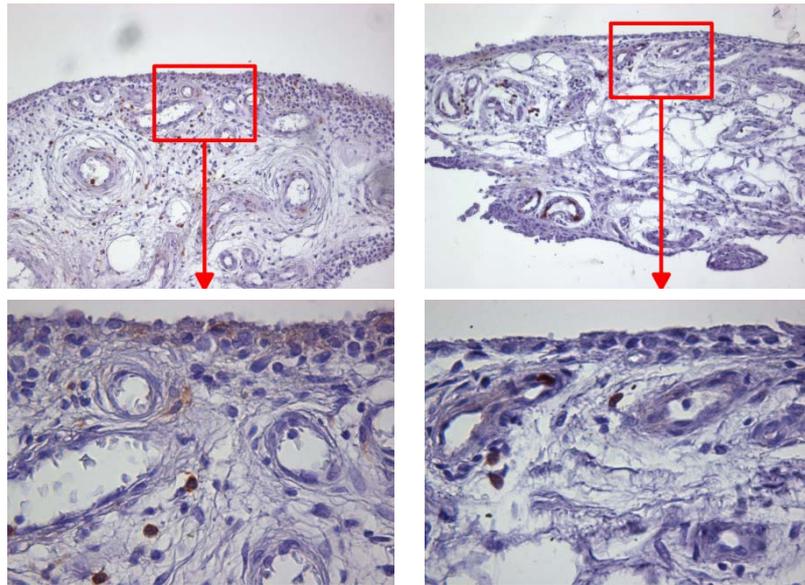


Abbildung 11: Immunreaktivität gegenüber S100 A8 und S100 A9 in gesunder Synovialis (links: S100 A8 in Präparat 2 - Synovialis und Stroma positiv; rechts: S100 A9 in Präparat 3 - Leukozyten in Stroma und Blutgefäßen positiv), Vergrößerungen jeweils 10x in oberer Reihe und 40x in unterer Reihe, die den jeweiligen Ausschnitt der roten Box zeigt

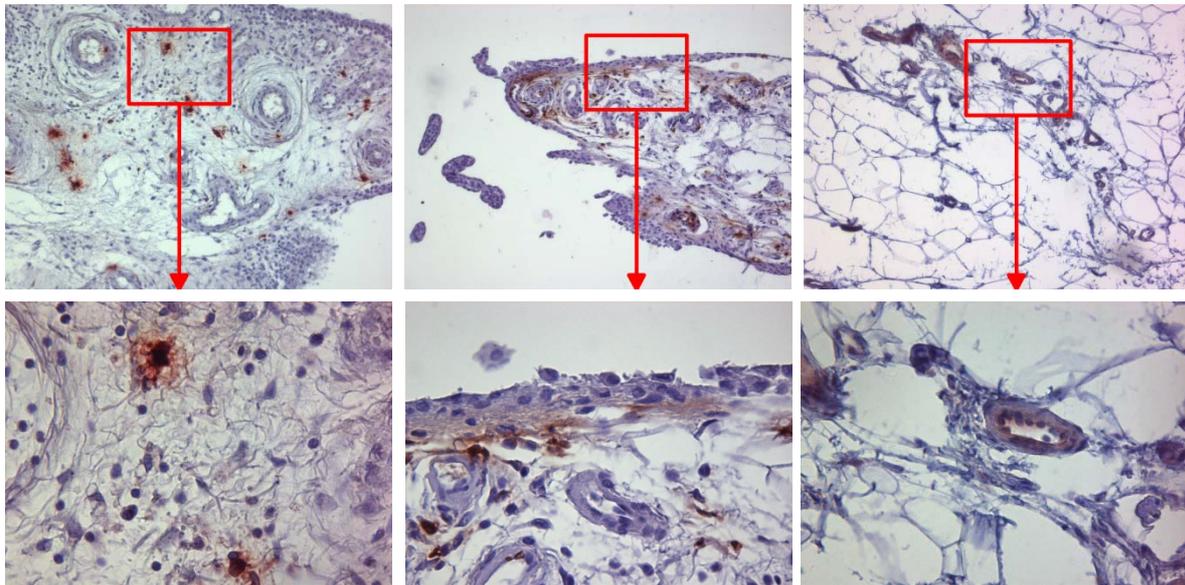


Abbildung 12: Immunreaktivität in gesunder Synovialis gegenüber HNP1-3 und hBD-3 in gesunder Synovialis (links: HNP1-3 in Präparat 2 - Stroma und Gefäße positiv; Mitte: HNP1-3 in Präparat 3 - Stroma und Gefäße positiv; rechts: hBD-3 in Präparat 5 - Gefäße positiv), Vergrößerungen jeweils 10x in oberer Reihe und 40x in unterer Reihe, die die jeweiligen Ausschnitte der roten Boxen zeigt

3.2. Ergebnisse Haut

Immunhistochemie Psoriasis vulgaris

S100 A8, S100 A9

S100 A8 wurde in allen Epidermisschichten sowie in der Dermis stark exprimiert. Die Epidermisscores betragen im Mittelwert 4 in sowohl läsionaler Psoriasis-Haut als auch in nicht-läsionaler Psoriasis sowie den gesunden Kontrollen.

Für *S100 A9* zeigte sich eine höhere Immunreaktivität in der läsionalen Haut der Psoriasis-Patienten im Vergleich zu den anderen Proben. Der Mittelwert der Epidermisscores betrug in Psoriasis-Läsionen 3,5, in den Proben der nicht-läsionalen Psoriasis-Haut und den gesunden Kontrollen lagen die Scores bei durchschnittlich 2,25 bzw. 2,5.

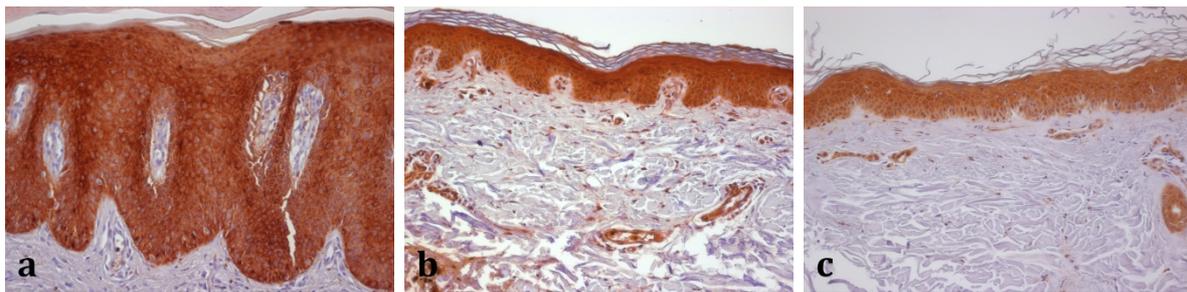


Abbildung 13: Expression von *S100 A8* in läsionaler Psoriasis-Haut (a) und nicht-läsionaler Psoriasis-Haut (b) von Patient P3 sowie in der gesunden Kontrolle K3 (c), Vergrößerung jeweils 10x

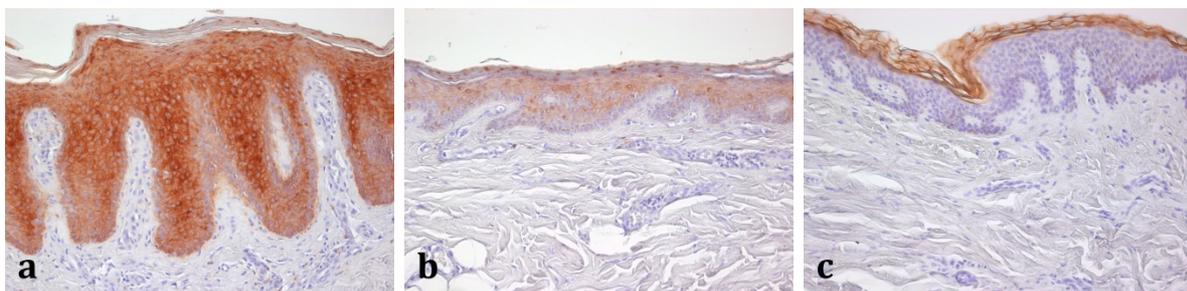


Abbildung 14: Expression von *S100 A9* in läsionaler Psoriasis-Haut (a) und nicht-läsionaler Psoriasis-Haut (b) von Patient P2 sowie in der gesunden Kontrolle K2 (c), Vergrößerung jeweils 10x

Diagnose	#	Einzelwerte				Mittelwerte			
		S100 A8		S100 A9		S100 A8		S100 A9	
		E	D	E	D	E	D	E	D
Läsionale Psoriasisishaut	P1	4	+++	4	++	4	+++	3,5	++
	P2	4	+++	4	+				
	P3	4	+++	4	++				
	P4	4	+++	2	x				
Nicht-läsionale Psoriasisishaut	P1	4	++	2	+	4	++	2,25	+
	P2	4	+	3	+				
	P3	4	++	2	x				
	P4	4	+	2	+				
Gesunde Haut	K1	4	+	4	+++	4	+	2,5	++
	K2	4	+	2	0				
	K3	4	+	2	x				
	K4	4	++	2	x				

Tabelle 10: Immunreaktivität in Hautproben gegenüber S100 A8 und S100 A9 – Einzelne Werte der jeweiligen Präparate sowie Mittelwerte der Diagnosegruppen läsionale, nicht-läsionale Psoriasisishaut und gesunde Haut; E – Epidermis, Immunreaktivität angegeben im Epidermisscore (von 0 bis 4 Punkte); D – Dermis, Immunreaktivität in dermalen Leukozyten (von 0 bis +++); x – keine dermalen Leukozyteninfiltrate im Präparat vorhanden, P1-4: Patienten 1-4 – von jedem dieser Patienten jeweils eine Probe aus läsionaler und eine aus nicht-läsionaler Psoriasisishaut; K1-4: gesunde Kontrollen der Patienten 1-4, die mit diesen in Alter, Geschlecht und Lokalisation der Biopsie übereinstimmen

HNP1-3 und LL-37

HNP1-3 wurden in den Proben der läSIONalen Psoriasisishaut am stärksten exprimiert mit einem mittleren Epidermisscore von 1,5. Etwas schwächere Immunreaktivität zeigten die nicht-läsionale Psoriasisishaut mit 0,75 und die gesunde Haut mit 0,5. Die Dermis war ebenfalls in den Psoriasis-Läsionen am stärksten gefärbt.

LL-37 wurde nur in der Epidermis der Psoriasispatienten exprimiert. Hier zeigte sich die Immunreaktivität in Leukozyteninfiltraten im Stratum corneum bei zwei läSIONalen und einer nicht-läsionalen Psoriasisishautprobe sowie in einigen dermalen Leukozyten. Die gesunde Haut blieb negativ.

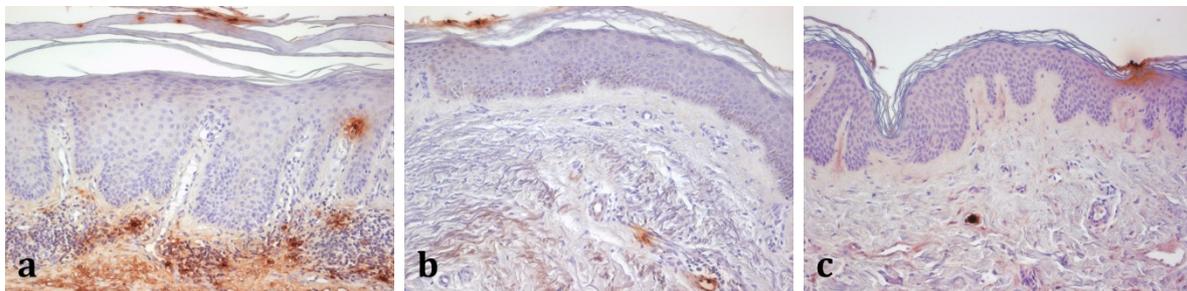


Abbildung 15: Expression von *HNP1-3* in läSIONaler Psoriasisishaut (a) und nicht-läsionaler Psoriasisishaut (b) von Patient P1 sowie in der gesunden Kontrolle K1 (c), Vergrößerung jeweils 10x

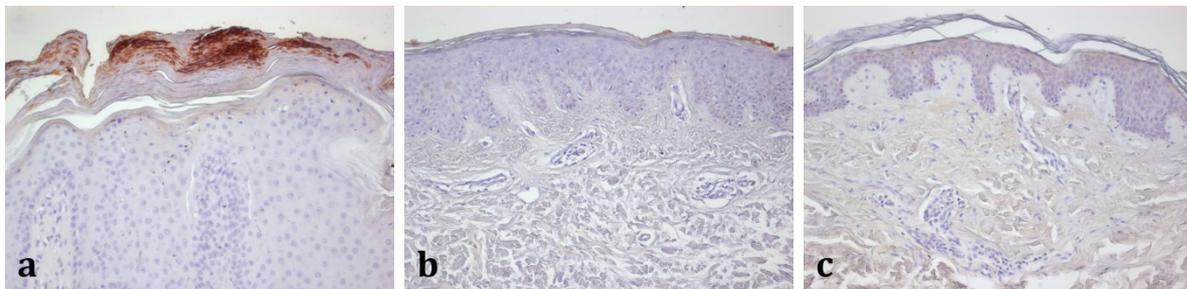


Abbildung 16: Expression von *LL-37* in läSIONaler Psoriasisishaut (a) und nicht-läsionaler Psoriasisishaut (b) von Patient P4 sowie in der gesunden Kontrolle K4 (c), Vergrößerung jeweils 10x

Diagnose	#	Einzelwerte				Mittelwerte			
		HNP1-3		LL-37		HNP1-3		LL-37	
		E	D	E	D	E	D	E	D
Läsionale Psoriasisishaut	P1	1	+++	0	0	1,5	+++	0,5	0
	P2	1	+	0	0				
	P3	3	+++	1	+				
	P4	1	+++	1	0				
Nicht-läsionale Psoriasisishaut	P1	1	+	0	0	0,75	+	0,25	0
	P2	0	0	0	0				
	P3	1	0	0	+				
	P4	1	+	1	0				
Gesunde Haut	K1	1	+	0	0	0,5	+	0	0
	K2	1	+	0	0				
	K3	0	+	0	0				
	K4	0	0	0	0				

Tabelle 111: Immunreaktivität in Hautproben gegenüber HNP1-3 und LL-37 – Einzelne Werte der jeweiligen Präparate sowie Mittelwerte der Diagnosegruppen läsionale, nicht-läsionale Psoriasisishaut und gesunde Haut; E – Epidermis, Immunreaktivität angegeben im Epidermisscore (von 0 bis 4 Punkte); D – Dermis, Immunreaktivität in dermalen Leukozyten (von 0 bis +++); P1-4: Patienten 1-4 – von jedem dieser Patienten jeweils eine Probe aus läsionaler und eine aus nicht-läsionaler Psoriasisishaut; K1-4: gesunde Kontrollen der Patienten 1-4, die mit diesen in Alter, Geschlecht und Lokalisation der Biopsie übereinstimmen

Psoriasin (S100 A7) und RNase 7

Psoriasin konnte in allen Hautproben nachgewiesen werden. Die stärkste Immunreaktivität zeigte sich jedoch in der Psoriasis vulgaris. Hier waren die Proben aus Läsionen mit einem durchschnittlichen Epidermisscore von 3 stärker positiv als aus nicht-läsionalen Hautbiopsien der Patienten (Epidermisscore 1,75). Die gesunden Kontrollen zeigten hingegen nur in einem Präparat eine leichte Positivität im Stratum corneum.

RNase 7 wurde ebenso in allen Gruppen nachgewiesen mit der stärksten Immunreaktivität in den Psoriasisläsionen (Epidermisscore 2,5) und der schwächsten in den gesunden Kontrollen (Epidermisscore 1,5).

Die Dermis zeigte weder in der Psoriasis noch in den gesunden Kontrollen *Psoriasin*- oder *RNase-7*-positive Zellen.

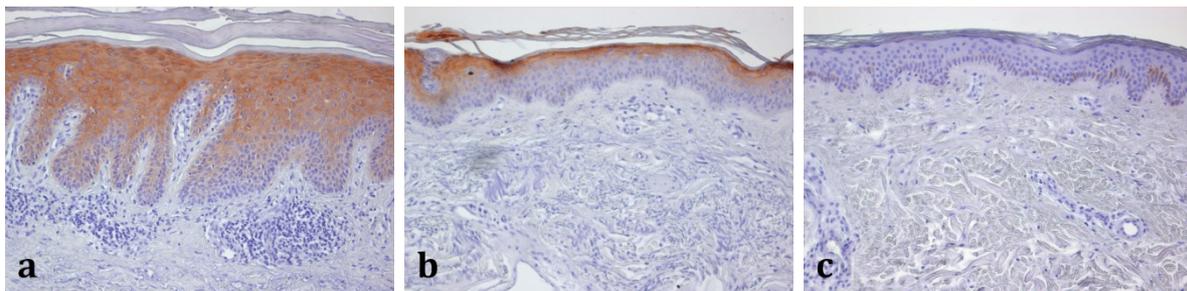


Abbildung 17: Expression von *Psoriasin* in läsionaler Psoriasisshaut (a) und nicht-läsionaler Psoriasisshaut (b) von Patient P1 sowie in der gesunden Kontrolle K1 (c), Vergrößerung jeweils 10x

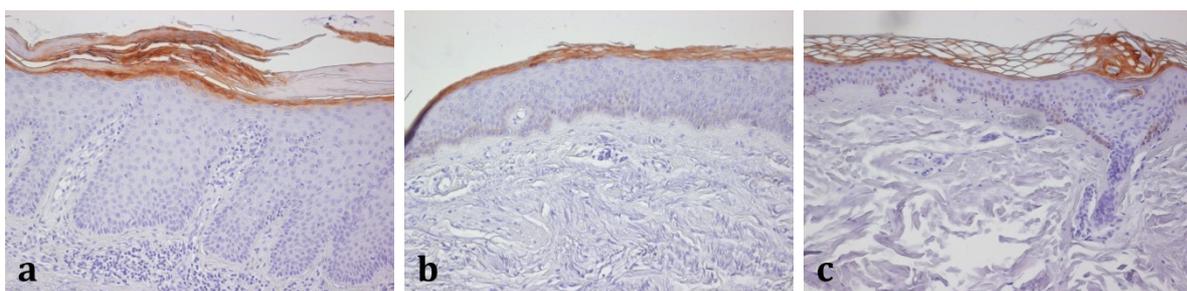


Abbildung 18: Expression von *RNase 7* in läsionaler Psoriasisshaut (a) und nicht-läsionaler Psoriasisshaut (b) von Patient P1 sowie in der gesunden Kontrolle K1 (c), Vergrößerung jeweils 10x

Diagnose	#	Einzelwerte				Mittelwerte			
		Psoriasin		RNase 7		Psoriasin		RNase 7	
		E	D	E	D	E	D	E	D
Läsionale Psoriasishaut	P1	3	0	2	0	3	0	2,5	0
	P2	3	0	3	0				
	P3	3	0	2	0				
	P4	3	0	3	0				
Nicht-läsionale Psoriasishaut	P1	3	0	2	0	1,75	0	1,75	0
	P2	1	0	2	0				
	P3	0	0	2	0				
	P4	3	0	1	0				
Gesunde Haut	K1	0	0	1	0	0,25	0	1,5	0
	K2	1	0	2	0				
	K3	0	0	1	0				
	K4	0	0	2	0				

Tabelle 12: Immunreaktivität in Hautproben gegenüber Psoriasin und RNase 7 – Einzelne Werte der jeweiligen Präparate sowie Mittelwerte der Diagnosegruppen läsionale, nicht-läsionale Psoriasishaut und gesunde Haut; E – Epidermis, Immunreaktivität angegeben im Epidermisscore (von 0 bis 4 Punkte); D – Dermis, Immunreaktivität in dermalen Leukozyten (von 0 bis +++); P1-4: Patienten 1-4 – von jedem dieser Patienten jeweils eine Probe aus läsionaler und eine aus nicht-läsionaler Psoriasishaut; K1-4: gesunde Kontrollen der Patienten 1-4, die mit diesen in Alter, Geschlecht und Lokalisation der Biopsie übereinstimmen

hBD-2 und hBD-3

Die Defensine *hBD-2* und *hBD-3* ließen sich nur in der Epidermis der Psoriasispatienten nachweisen. Hier waren die Läsionen deutlich stärker immunreaktiv als die nicht-läsionalen Areale: *hBD-2* zeigte Epidermisscores von 3 in läsionaler und 1,25 in nicht-läsionaler Psoriasis, *hBD-3* von 1,75 in läsionaler und 0,25 in nicht-läsionaler Psoriasis. Die gesunden Kontrollen zeigten keine Immunreaktivität. Die Dermis zeigte weder in der Psoriasis noch in den gesunden Kontrollen *hBD-2*- oder *hBD-3*-positive Zellen.

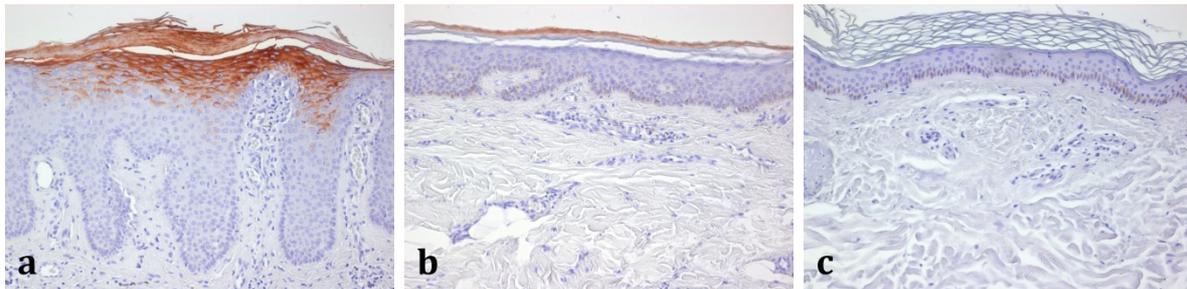


Abbildung 19: Expression von *hBD-2* in läsionaler Psoriasisshaut (a) und nicht-läsionaler Psoriasisshaut (b) von Patient P2 sowie in der gesunden Kontrolle K2 (c), Vergrößerung jeweils 10x

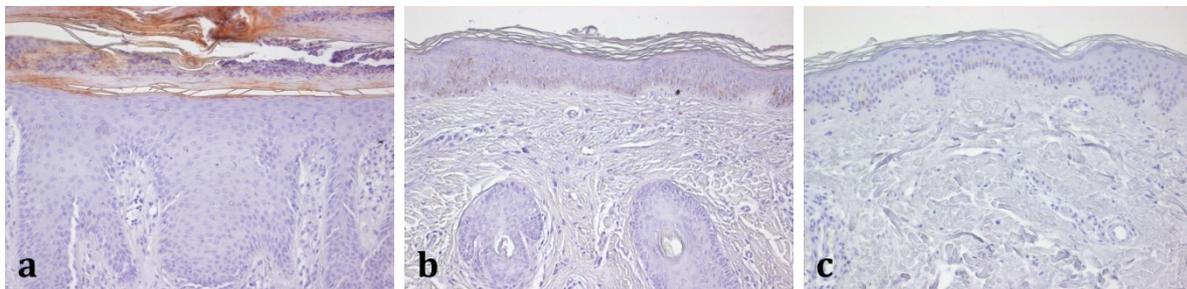


Abbildung 20: Expression von *hBD-3* in läsionaler Psoriasisshaut (a) und nicht-läsionaler Psoriasisshaut (b) von Patient P3 sowie in der gesunden Kontrolle K3 (c), Vergrößerung jeweils 10x

Diagnose	#	Einzelwerte				Mittelwerte			
		hBD-2		hBD-3		hBD-2		hBD-3	
		E	D	E	D	E	D	E	D
Läsionale Psoriasisishaut	P1	3	0	1	0	3	0	1,75	0
	P2	3	0	2	0				
	P3	3	0	2	0				
	P4	3	0	2	0				
Nicht-läsionale Psoriasisishaut	P1	2	0	0	0	1,25	0	0,25	0
	P2	1	0	0	0				
	P3	1	0	0	0				
	P4	1	0	1	0				
Gesunde Haut	K1	0	0	0	0	0	0	0	0
	K2	0	0	0	0				
	K3	0	0	0	0				
	K4	0	0	0	0				

Table 13: Immunreaktivität in Hautproben gegenüber hBD-2 und hBD-3 – Einzelne Werte der jeweiligen Präparate sowie Mittelwerte der Diagnosegruppen läsionale, nicht-läsionale Psoriasisishaut und gesunde Haut; E – Epidermis, Immunreaktivität angegeben im Epidermisscore (von 0 bis 4 Punkte); D – Dermis, Immunreaktivität in dermalen Leukozyten (von 0 bis +++); P1-4: Patienten 1-4 – von jedem dieser Patienten jeweils eine Probe aus läsionaler und eine aus nicht-läsionaler Psoriasisishaut; K1-4: gesunde Kontrollen der Patienten 1-4, die mit diesen in Alter, Geschlecht und Lokalisation der Biopsie übereinstimmen

Zusammenfassend wurde bei der Psoriasis vulgaris die stärkste Immunreaktivität gegenüber *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* gezeigt. Auch die antimikrobiellen Peptide *Psoriasin*, *RNase 7*, *hBD-2* und *-3* sowie *LL-37* zeigten eine sehr hohe Positivität. Die Immunreaktivität der läsionalen Haut erreichte fast immer einen höheren epidermalen Score als die nicht-läsionale und die gesunde Haut. Die einzige Ausnahme bildet hier *S100 A8*, das in allen Präparaten stark exprimiert wurde.

Tabellarische Übersicht der einzelnen antimikrobiellen Peptide und ihrer Beurteilung der jeweiligen Immunreaktivität anhand der Epidermis-Scores:

	<i>S100 A8</i>	<i>S100 A9</i>	<i>HNP1-3</i>	<i>LL-37</i>	<i>Psoriasin</i>	<i>RNase 7</i>	<i>hBD-2</i>	<i>hBD-3</i>
Läsional	4	3,5	1,5	0,5	3	2,5	3	1,75
Nicht-Läsional	4	2,25	0,75	0,25	1,75	1,75	1,25	0,25
Gesund	4	2,5	0,5	0	0,25	1,5	0	0

Table 14: Vergleich der Mittelwerte der Epidermisscores der einzelnen AMP in läsionaler Psoriasisshaut (n=4), nicht-läsionaler Psoriasisshaut (n=4) und in gesunder Haut (n=4)

3.3. Vergleich der Immunreaktivität von AMP in Gelenkproben mittels Fishertest

Mithilfe des modifizierten exakten Fishertests wurde untersucht, ob sich die Nachweise der Immunreaktivität der Proben von Psoriasis-Arthritis, rheumatoider Arthritis, Osteoarthrose und gesunder Synovialis statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Die 4 Diagnosen wurden dabei gemeinsam auf Homogenität der Ergebnisse untersucht.

Für die „gelenkpositiven“ AMP *hBD-3*, *LL-37*, *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* wurden alle 3 beurteilten Parameter untersucht: Immunreaktivität in der Membrana synovialis, in Leukozyten im Synovialstroma sowie in Leukozyten in Blutgefäßen. Mithilfe des Programms „R“ wurden die jeweiligen p-Werte für alle Entitäten ermittelt. Alle p-Werte waren größer als 0,05. Somit konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Immunreaktivität von AMP zwischen den Diagnosen gezeigt werden.

		p-Wert
hBD-3	Membrana synovialis	–
	Leukozyten Stroma	–
	Leukozyten Blutgefäße	0,3333
LL-37	Membrana synovialis	–
	Leukozyten Stroma	>0,999
	Leukozyten Blutgefäße	0,6296
S100 A8	Membrana synovialis	>0,999
	Leukozyten Stroma	>0,999
	Leukozyten Blutgefäße	0,5494
S100 A9	Membrana synovialis	>0,999
	Leukozyten Stroma	0,8789
	Leukozyten Blutgefäße	0,1274
HNP1-3	Membrana synovialis	>0,999
	Leukozyten Stroma	0,8128
	Leukozyten Blutgefäße	0,9493

Table 15: Übersicht über p-Werte, die mit exaktem Fishertest für hBD-3, LL-37, S100 A8, S100 A9 und HNP1-3 ermittelt wurden, um eine statistische Signifikanz zwischen Psoriasis-Arthritis, rheumatoider Arthritis, Osteoarthrose und gesunder Synovialis zu untersuchen; „–“: kein p-Wert ermittelbar, da in dieser Gruppe alle Präparate negativ waren

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an Hautproben von Psoriasis vulgaris und Gelenkproben von Psoriasis-Arthritis (PsA), rheumatoider Arthritis (RA) und Osteoarthrose (OA) zeigten einige Gemeinsamkeiten, unterschieden sich aber auch in mehreren Punkten.

Die Epidermis bei Psoriasis vulgaris zeigte starke Immunreaktivität gegenüber allen untersuchten antimikrobiellen Peptiden *Psoriasin*, *RNase 7*, *hBD-2*, *hBD-3*, *LL-37*, *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3*. Dabei produzierten nicht nur eingewanderte Leukozyten

AMP, sondern vor allem auch die Keratinozyten selbst. Des Weiteren war ein deutlicher Unterschied der Psoriasisproben zu den gesunden Hautproben zu erkennen: Die Epidermis in den Psoriasisläsionen zeigte eine deutlich stärkere AMP-Expression als die nichtläsionale Haut der Psoriasispatienten. Am wenigsten Immunreaktivität konnte in der Haut der gesunden Kontrollen detektiert werden.

In der Synovialis wurde in der Membrana synovialis hingegen nur wenig Immunreaktivität gefunden, die von den Synoviozyten ausging. Die Immunreaktivität wurde hier vor allem in eingewanderten Leukozyten detektiert. Außerdem ließen sich nicht alle untersuchten AMP in den Proben immunhistochemisch nachweisen. Starke Immunreaktivität war gegenüber *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* und in einzelnen Proben gegenüber *LL-37* zu finden. *Psoriasin*, *RNase 7*, *hBD-2* und *hBD-3*, die in der Haut sehr stark exprimiert wurden, ließen sich in den Synovialisproben nicht nachweisen (Ausnahme: eine gesunde Synovialisprobe mit fokaler Immunreaktivität gegenüber *hBD-3*).

Eine differenzielle Expression der Immunreaktivität bei RA im Vergleich zur Immunreaktivität bei PsA ließ sich nicht erkennen. In beiden Arthritisformen war eine Expression von *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* sowie vereinzelt von *LL-37* zu detektieren. Die Immunreaktivität ging dabei vor allem auf eingewanderte Leukozyten zurück, in einzelnen Präparaten waren aber auch positive Synoviozyten zu finden.

In der Osteoarthrose hingegen waren nur vereinzelt positive Leukozyten im Synovialstroma oder in Blutgefäßen zu identifizieren, die Immunreaktivität gegenüber *S100 A9* und *HNP1-3* aufwiesen. Ähnlich verhielt es sich in den Präparaten der gesunden Probanden, in denen nur vereinzelt für *S100 A8*, *S100 A9*, *HNP1-3* und *hBD-3* positive Leukozyten zu finden waren und die Synovialis gänzlich negativ war.

Somit stellte sich die Gewebeexpression von AMP bei Psoriasisarthritis und rheumatoider Arthritis im Rahmen der analysierten immunhistochemischen Färbungen deutlich verstärkt im Vergleich zur Expression in Osteoarthrose und gesunder Synovialis dar. Mehr Präparate der PsA und der RA zeigten Immunreaktivität und in diesen produzierten mehr Zellen in den Biopsien AMP.

Im Vergleich der AMP-Immunreaktivität in Hautbiopsien der Psoriasis vulgaris und Gelenkbiopsien der PsA fällt auf, dass bei beiden Krankheitsmanifestationen *S100 A8*, *S100 A9*, *HNP1-3* und *LL-37* nachzuweisen waren. *Psoriasin*, *RNase 7*, *hBD-2* und *hBD-3* hingegen wurden nur in der Haut von Psoriasis vulgaris exprimiert.

4. Diskussion

4.1. Methoden

Untersuchungsmethoden

Mithilfe der Immunhistochemie wurden 12 Hautproben und 27 Gelenkproben aufgearbeitet und auf die Expression antimikrobieller Peptide systematisch untersucht. Die Immunhistochemie bietet mehrere Vorteile. Zum einen ist die in dieser Arbeit gewählte indirekte Immunhistochemie sehr spezifisch für das Antigen, da mehrere Schritte notwendig sind, um schlussendlich eine positive Färbung zu erzielen. Darüber hinaus kann die ABC-Methode durch den Aufbau großer Komplexe auch ein anfangs kleines Signal lichtmikroskopisch sichtbar werden lassen (Hsu, Raine et al. 1981). So wird neben der Spezifität auch die Sensitivität erhöht. Die Immunhistochemie bietet außerdem den Vorteil, dass die Architektur des Gewebes erhalten bleibt und der Untersucher genau detektieren kann, in welchen zellulären Strukturen sich die Immunreaktivität befindet. Nachteilig hingegen ist, dass für die Immunhistochemie Gewebebiopsien entnommen werden müssen, die, je nach Gewebe, invasive operative Eingriffe nötig machen. Hautproben sind vergleichsweise einfach zu gewinnen, im Fall von Gelenkproben aber müssen diese über Arthroscopien oder offene Operationen gewonnen werden.

Um Synovialisproben entzündlicher Gelenkerkrankungen zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit Biopsien bei Patienten entnommen, die sich aufgrund notwendiger Gelenkersätze Operationen unterziehen mussten. So konnten insgesamt 27 Synovialisproben gewonnen werden. Aufgrund der teilweise sehr langen und schweren Krankheitsverläufe erhielten die meisten Patienten zum Zeitpunkt der Synovialisbiopsie verschiedene immunsuppressive Therapien. Somit ist bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse zu bedenken, dass die Patienten zum großen Teil systemisch behandelt wurden. Um eine möglichst hohe Aussagekraft über die Einflüsse von Entzündung auf die AMP-Immunreaktivität machen zu können, wurde von einer unabhängigen Person bei allen Proben ein „Synovitis-Score“ nach Krenn et al. bestimmt (Krenn, Morawietz et al. 2006). Der Synovitisscore beurteilt die Verdickung der Membrana synovialis, die An-

zahl der Leukozyteninfiltrate im subsynovialen Stroma und das Vorhandensein eingewanderter Leukozyten (Lymphozyten und Plasmazellen). Die Beurteilung wurde an nur mit Hämalaun gefärbten Präparaten durchgeführt.

Der Synovitisscore kann unabhängig von der Diagnose zur Beurteilung der Entzündung in der Synovialis verwendet werden, weshalb er gut geeignet ist für die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Zudem muss für die Anwendung keine spezielle Färbung durchgeführt werden. Kritisch ist, dass bei großen Präparaten die Ergebnisse des Synovitisscores erheblich variieren können. Wir berücksichtigten daher die Empfehlung des Autors der Publikation, in einem solchen Fall in Analogie zur Beurteilung neoplastischer Veränderungen das Areal mit den stärksten Veränderungen zu untersuchen (höchster Synovitisscore).

Beurteilung der Hautproben

Um die Epidermis der Hautproben zu beurteilen wurde ein „IHC-Score“ verwendet (Vergleich 2.2. Beurteilung der Hautpräparate). Der IHC-Score bietet die Möglichkeit, die AMP-Expression in den einzelnen Epidermisschichten zu beurteilen (Wittersheim et al. 2013). Durch die Vergabe von Punkten für immunreaktive Epidermisschichten ergibt sich die Möglichkeit, Mittelwerte in Diagnosegruppen zu bilden, die für Vergleiche herangezogen werden können. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass nicht zwischen fokaler und diffuser oder zwischen schwacher und starker Immunreaktivität innerhalb der Epidermisschichten differenziert werden kann und Unterschiede innerhalb des Präparates in der Bewertung nicht zum Ausdruck gebracht werden können.

Neben der Epidermis wurde die Immunreaktivität in der Dermis beurteilt, die auf eingewanderte Leukozyten zurückzuführen war. Hier wurde die Intensität der Immunreaktivität bewertet. Unterschiede innerhalb des Präparates konnten nicht direkt zum Ausdruck gebracht werden, weshalb die Untersucher eine über das gesamte Präparat gemittelte repräsentative Aussage trafen.

Um valide Ergebnisse zu erhalten, beurteilten 2 unabhängige Untersucher verblindet die Präparate, d.h. die Untersucher kannten die Diagnosen der Patienten nicht.

Beurteilung der Gelenkproben

Bei den Proben von Patienten mit Psoriasis-Arthritis, rheumatoider Arthritis, Osteoarthrose und gesunder Synovialis wurden 3 Gesichtspunkte beurteilt:

1. Immunreaktivität in Synoviozyten in der Membrana synovialis
2. Immunreaktivität in Leukozyten im Synovialstroma
3. Immunreaktivität in Leukozyten in Blutgefäßen der Synovialis

Um die Immunreaktivität der Synoviozyten zu quantifizieren, wurden die positiven und negativen Zellen bei 100facher Vergrößerung im Lichtmikroskop von 2 voneinander unabhängigen Untersuchern ausgezählt. Diese Methode gibt die Möglichkeit, die Immunreaktivität möglichst objektiv zu quantifizieren. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte dennoch kritisch berücksichtigt werden, dass nicht die kompletten Präparate ausgezählt werden konnten und auch die Präparate selbst nur kleine Ausschnitte eines gesamten Gelenkes zeigen.

Die separate Beurteilung von immunreaktiven Leukozyten, die in das Stroma eingewandert sind, und Leukozyten in Blutgefäßen gibt Hinweise darauf, inwiefern diese Teil der Pathologie der Synovialitis sein könnten. Eingewanderte Leukozyten könnten eher eine Rolle in der Pathogenese spielen als im Blut zirkulierende Leukozyten, die gegebenenfalls nur zufällig im Präparat zu sehen sind.

4.2. Ergebnisse Gelenke

Psoriasis-Arthritis (PsA)

Die antimikrobiellen Peptide *S100 A8* und *S100 A9* fanden sich in 7 von 10 PsA-Proben. Immunreaktivität war vor allem in Leukozyten im Synovialstroma und in Leukozyten in Blutgefäßen zu finden. Des Weiteren zeigte sich eine Induktion von beiden AMP in der Membrana synovialis in einem Präparat, in dem durchschnittlich 31% der Zellen *S100 A8* und 14% *S100 A9* exprimierten. Nach Verteilung und Morphologie handelte es sich hierbei um Synoviozyten.

Diese Beobachtungen decken sich mit den Angaben zu *S100 A8* und *S100 A9* in PsA bei Kane et al. (Kane et al. 2003): In dieser Arbeit wurden Proben von Patienten mit PsA (n=14) und Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA, n=11) immunhistochemisch

auf die Expression von *S100 A8* und *S100 A9* untersucht. Immunreaktivität zeigte sich vor allem im synovialen Stroma, die Membrana synovialis zeigte nur vereinzelt positive Zellen. Die Proben der PsA zeigten dabei vor allem Immunreaktivität in perivaskulären Infiltraten, wohingegen in der RA diese Assoziation zu den Blutgefäßen nicht erkennbar war und die positiven Zellen eher vereinzelt im Synovialstroma lagen.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich ein ähnlicher Trend erkennen: In der PsA zeigten 5 von 10 Proben Immunreaktivität gegenüber *S100 A8* und/oder *S100 A9* in Blutgefäßen, in den Proben der RA waren es hingegen nur 2 von 8 Proben. Aufgrund der geringen Fallzahlen konnte eine statistische Signifikanz nicht nachgewiesen werden.

Neben der Expression von *S100 A8* und *S100 A9* im Synovialisgewebe wurden in der Literatur zudem erhöhte Konzentrationen dieser Proteine im Serum und in der Synovialflüssigkeit von PsA-Patienten beschrieben (Aochi et al. 2011; Cretu et al. 2014). Neben ihrer antimikrobiellen Wirkung werden *S100 A8* und *A9* immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben, wobei hier bisher nur Erkenntnisse über RA vorliegen: *S100 A8* stimuliert *in vitro* Synoviozyten von RA-Patienten zur Produktion von IL-6 und fördert damit die Differenzierung der TH-17-Zellen (Lee et al. 2013). Damit trägt *S100 A8* zum Fortschreiten der Pathogenese der RA bei, was sich auch in klinischen Beobachtungen widerspiegelt: Hohe Konzentrationen von *S100 A8* und *S100 A9* werden mit einer erhöhten Krankheitsaktivität der RA assoziiert, umgekehrt sprechen niedrige Level für eine Remission (Kang et al. 2014). Hinweise darauf, dass *S100 A8* und *S100 A9* auch in der PsA eine Rolle spielen, zeigen die Erkenntnisse von Ademowo et al.: In der Synovialis von PsA-Patienten, bei denen TNF- α -Inhibitoren keine oder nur schwache Wirkungen zeigten und die Krankheitsaktivität entsprechend hoch war, wurden hohe Konzentrationen von *S100 A8* und *S100 A9* nachgewiesen (Ademowo et al. 2014). Die selektive Inhibition von *S100 A8* stellt damit auch für die PsA einen möglichen Therapieansatz dar, den es zu erforschen gilt.

Immunreaktivität gegenüber *HNP1-3* fand sich in 8 von 10 Präparaten der PsA, vor allem in Leukozyten im Synovialstroma und in Blutgefäßen. In einem Präparat wurde zudem eine *HNP1-3*-Expression in Synoviozyten gezeigt mit durchschnittlich 25% positiven Zellen.

HNP1-3 wird vor allem in neutrophilen Granulozyten und in einigen monozytären und lymphozytären Zellreihen exprimiert (Agerberth et al. 2000; Lehrer 2004; Riepl et al.

2010), was sich auch in einigen Präparaten dieser Arbeit zeigte. Viele der positiven Zellen konnten aufgrund der typischen Morphologie mit dem septierten, polymorphen Zellkern als neutrophile Granulozyten identifiziert werden. Die Granulozyten zeigten sich dabei sowohl in Blutgefäßen als auch im synovialen Stroma. Da sie dort vermehrt im Fall einer Entzündung, besonders bei der PsA (Kruithof et al. 2005), zu finden sind, stellt dies eine mögliche Erklärung für die hohe Immunreaktivität gegenüber *HNP1-3* in der PsA dar. Im Vergleich zu den Synovitiscores der Präparate fällt auf, dass 4 von 5 Präparaten, die im Synovitiscore Punkte für eingewanderte Leukozyten („I“ = inflammatory infiltrate) erhielten, und 4 von 6 Präparaten, die Punkte für eine erhöhte Zelldichte im Synovialstroma („R“ = density of resident cells) erhielten, Immunreaktivität gegenüber *HNP1-3* im synovialen Stroma zeigten. Damit zeigte sich eine mögliche Assoziation der *HNP1-3*-Expression mit einer erhöhten Zelldichte im Synovialstroma, einer vermehrten Einwanderung von Leukozyten und damit einer verstärkten Entzündungsaktivität in der Synovialis.

Ebenso wie *HNP1-3* wird auch *LL-37* vor allem von neutrophilen Granulozyten exprimiert. Bei den immunhistochemischen Färbungen für *LL-37* zeigten sich ebenfalls positive Zellen, die aufgrund ihres polymorphen, septierten Zellkernes als neutrophile Granulozyten identifiziert werden konnten. *LL-37* wurde insgesamt deutlich schwächer exprimiert als *HNP1-3* und war nur vereinzelt in 2 von 10 Präparaten zu finden.

Angaben zur Expression oder Produktion von *LL-37* oder *HNP1-3* in PsA sind bislang in der Literatur nicht vorhanden. Da *LL-37* in der Haut von Patienten mit Psoriasis über die Bildung von Komplexen mit eigener DNA plasmazytoide dendritische Zellen aktivieren kann und *LL-37* damit eine wichtige Rolle in der Pathogenese zugeschrieben wird (Lande et al. 2007), ist von hohem Interesse herauszufinden, inwiefern *LL-37* die Pathogenese der PsA im Gelenk vorantreiben könnte.

Rheumatoide Arthritis (RA)

S100 A8 und *S100 A9* wurden jeweils in 2 von 8 Präparaten nachgewiesen. Ein Präparat schloss eine Expression in der Membrana synovialis ein mit 65% *S100-A8*-positiven Synoviozyten und 34% *S100-A9*-positiven Synoviozyten.

In der Literatur finden sich bereits mehrere Untersuchungen zu *S100 A8* und *S100 A9* bei RA (Gu et al. 2002; Kane, Roth et al. 2003; de Seny et al. 2008; Baillet et al. 2010; Lee,

Woo et al. 2013). Die Studien zeigen, dass *S100 A8* und *S100 A9* in RA in hohem Maß produziert werden – im Serum, in Monozyten im peripheren Blut, in der Synovialflüssigkeit und auch im Synovialisgewebe. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die gemessenen Konzentrationen von *S100 A8* und *S100 A9* im Serum mit der Krankheitsaktivität der RA assoziiert sind, weshalb *S100 A8* und *S100 A9* aktuell als potentielle Marker sowohl für die Krankheitsaktivität der RA als auch für das Screening vor der Diagnosestellung diskutiert werden (Kang, Woo et al. 2014).

Besonders interessant ist dabei, dass die Konzentration von *S100 A8* und *S100 A9* nicht mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Synovialflüssigkeit oder im Blut der Patienten korreliert (Baillet, Trocme et al. 2010), wie es bei anderen Arthritiden mit erhöhter *S100 A8*- und *S100 A9*-Produktion in der Synovialflüssigkeit der Fall ist. Da neutrophile Granulozyten *S100 A8* und *S100 A9* produzieren, wird die Produktion in der Synovialflüssigkeit bei den anderen Arthritiden vor allem auf diese Zellpopulation zurückgeführt. Bei der RA hingegen, wo auch bei niedrigen Zahlen von neutrophilen Granulozyten hohe Konzentrationen von *S100 A8* und *S100 A9* gemessen wurden, lässt sich daher eine zusätzliche Produktion durch andere Zellen, beispielsweise Synoviozyten, vermuten.

Diese Vermutung ließ sich in einem Präparat der vorliegenden Arbeit bestätigen, in dem sich Immunreaktivität gegenüber *S100 A8* und *S100 A9* in der Membrana synovialis zeigte (siehe auch Abbildung 8, Präparat 8, S. 33). Die Morphologie und Verteilung der positiven Zellen lässt vermuten, dass es sich um Synoviozyten handelt, wobei berücksichtigt werden muss, dass die pathologischen Veränderungen mit vermehrter Zellzahl und eingewanderten Leukozyten täuschen könnten und daher weitere Untersuchungen zur Bestätigung der Expression von *S100 A8* und *S100 A9* in Synoviozyten vonnöten sind.

Immunreaktivität gegenüber *HNP1-3* war in 5 von 8 Präparaten nachweisbar und vor allem auf in das Synovialstroma eingewanderte Leukozyten zurückzuführen. In einem Präparat zeigte sich zusätzlich eine Expression in der Membrana synovialis mit einem durchschnittlichen Anteil der positiven Synoviozyten von 55%. Diese Beobachtungen decken sich mit den Angaben in der Literatur, wonach *HNP1-3* in RA vor allem im synovialen Stroma in neutrophilen Granulozyten detektiert wurde und Immunreaktivität in Synoviozyten nur vereinzelt vorhanden war (Paulsen et al. 2002; Riepl, Grassel et al. 2010). Dabei ist erkennbar, dass *HNP1-3* im Vergleich zu OA in RA deutlich indu-

ziert ist (Riepl, Grassel et al. 2010; Ahn et al. 2013). Die Assoziation von hohen *HNP1*-Konzentrationen mit erhöhten CRP-Werten, radiologisch nachweisbaren Erosionen und positivem Rheumafaktor bei den RA-Patienten gibt Hinweise auf eine mögliche proinflammatorische Wirkung von *HNP1* (Ahn, Huang et al. 2013). Zudem führte die Stimulation einer RA-Synoviozyten-Kultur mit *HNP1* zu einer Induktion von IL-6, IL-8 und den knorpeldestruierenden Matrix-Metalloproteinasen MMP-1 und MMP-3 (Ahn, Huang et al. 2013). Als Mechanismus der Induktion konnte die Phosphorylierung von JNK (c-Jun N-terminale Kinasen) und ERK (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase, syn. MAPK = mitogen-aktivierte Proteinkinase) identifiziert werden, da sich die RA-Synoviozyten nach Gabe von JNK- und ERK-Inhibitoren nicht von *HNP1* stimulieren ließen. Somit wirkt *HNP1* in RA *in vitro* tatsächlich proinflammatorisch über die Induktion von IL-6 und IL-8 und zugleich knorpeldestruierend über die Induktion von MMP-1 und -3.

Osteoarthrose (OA)

In allen 4 Präparaten konnte eine Immunreaktivität gegenüber *S100 A9* nachgewiesen werden, in Leukozyten in Blutgefäßen und in Leukozyten im Synovialstroma. Die Membrana synovialis blieb in allen Proben negativ.

Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von *S100 A8* und *S100 A9* in OA sind bislang nicht publiziert, jedoch wurde per Spektrometrie (SELDI-TOF-MS – Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) Synovialflüssigkeit von OA-Patienten auf eine Produktion von *S100 A8* und *S100 A9* untersucht (Baillet, Trocme et al. 2010). Neben RA und anderen hochgradigen Synovialitiden (systemischer Lupus erythematodes, M. Bechterew, Pseudogicht, juvenile idiopathische Arthritis) wurden auch Proben von Patienten mit OA untersucht, um die RA als hochgradige Synovialitis mit OA als niedriggradiger Synovialitis zu vergleichen. Es wurde per Spektrometrie eine Produktion von *S100 A8* und *S100 A9* in der Synovialflüssigkeit der OA gefunden, die jedoch deutlich geringer war als die in der RA. Gesunde Proben wurden dabei nicht untersucht, weshalb offen bleibt, inwiefern die in der OA gemessenen Konzentrationen von den physiologischen abweichen.

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Expression von *S100 A9* ging vor allem auf Leukozyten innerhalb der Blutgefäßlumina zurück. Da Leukozyten in Kapillaren im Vergleich zu residenten Zellen im Gewebe durch den Blutfluss nur eine relativ kurze Zeit im Gewebe verbringen, könnte dies erklären, warum Baillet et al. nur geringe Konzen-

trationen dieses AMP in der Synovialflüssigkeit von Osteoarthroseproben messen konnten.

Warum in der vorliegenden Arbeit kein *S100 A8* in den Gelenkproben detektiert werden konnte, könnte folgendermaßen erklärt werden: 1. Wie im Fall von *S100 A9* könnte auch die Expression von *S100 A8* auf einige wenige Leukozyten in Blutgefäßen zurückgehen, die in den histologischen Schnitten nicht erfasst waren. 2. Die bei Baillet et al. gemessene Produktion von *S100 A8* in Osteoarthrose geht auf eine andere Zellpopulation in der Gelenkhöhle außerhalb der Synovialis zurück. *S100 A8* und *S100 A9* werden jedoch in der Regel von den gleichen Zelltypen gebildet, v.a. von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in frühen Stadien und liegen extrazellulär vor allem zusammen als Heterodimer „Calprotektin“ vor (Ehrchen et al. 2009). Demnach könnten in der vorliegenden Arbeit zufällig keine *S100 A8*-positiven Zellen in den vorliegenden Schnitten erfasst worden sein, was bei einer niedrigen Fallzahl von n=4 möglich wäre.

S100 A8 und *S100 A9* können aber auch getrennt voneinander als Calgranulin A (*S100 A8*) bzw. Calgranulin B (*S100 A9*) vorliegen, was am Beispiel der Psoriasisläsionen deutlich wird, in denen *S100 A8* und *S100 A9* zwar beide von sowohl Keratinozyten als auch von neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, *S100 A8* jedoch *vorrangig* von Keratinozyten, *S100 A9* hingegen in höherem Maß von neutrophilen Granulozyten (Aochi, Tsuji et al. 2011). Demnach könnte in der OA gegebenenfalls ein Zelltyp vorherrschen, der eher *S100 A9* exprimiert, wodurch in der vorliegenden Arbeit nur dieses AMP detektiert wurde.

HNP1-3 konnte in allen 4 Präparaten der OA nachgewiesen werden, in Leukozyten im Synovialstroma und/oder in Blutgefäßen. Die Membrana synovialis zeigte keine Immunreaktivität.

In der Literatur gibt es Vergleiche der *HNP1-3*-Expression von OA als niedriggradiger Synovialitis mit der von rheumatoider Arthritis als hochgradiger Synovialitis (Riepl, Grassel et al. 2010; Ahn, Huang et al. 2013) und von OA mit RA, pyogener Arthritis und gesunder Synovialis (Paulsen, Pufe et al. 2002). In der Synovialis zeigten sich immunhistochemisch keine Unterschiede zwischen OA und RA, in beiden Entitäten fanden sich positive Zellen in der Membrana synovialis und in den darunter liegenden oberen Schichten des Synovialstromas, die mithilfe der Doppel-Immunfluoreszenz als neutrophile Granulozyten charakterisiert werden konnten. Unterschiede konnten nur in der

Konzentration von *HNP1-3* in der Synovialflüssigkeit festgestellt werden, die deutlich geringer in der OA war als in der RA (Riepl, Grassel et al. 2010; Ahn, Huang et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit war die Immunreaktivität gegenüber *HNP1-3* in der OA geringer als in der RA und auch der PsA. Viele der *HNP1-3*-positiven Zellen konnten durch die typische Morphologie mit dem septierten, polymorphen Zellkern als neutrophile Granulozyten identifiziert werden. Diese Beobachtung kann erklären, warum die Immunreaktivität in der OA geringer war als in RA und PsA, da in der geringgradigen Synovialitis der OA nur selten neutrophile Granulozyten anzutreffen sind im Gegensatz zu den hochgradigen Entzündungen PsA und RA (Kruithof, Baeten et al. 2005; de Lange-Brokaar et al. 2012).

Gesunde Synovialis

Immunreaktivität gegenüber *S100 A8* und *S100 A9* wurde in jeweils einem Präparat identifiziert, wobei in Synoviozyten nur gegenüber *S100 A8* Immunreaktivität nachzuweisen war.

Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von *S100 A8* und *S100 A9* in gesunden Synovialisproben finden sich nicht in der Literatur. Die Genexpression von *S100 A8* und *S100 A9* in mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (nicht weiter differenziert) wurde bei Gesunden mithilfe eines Gen-Microarrays untersucht und mit RA- und PsA-Patienten verglichen (Gu, Marker-Hermann et al. 2002): Die RA- und PsA-Patienten zeigten eine stark erhöhte Expression der Gene von *S100 A8* und *S100 A9* im Gegensatz zu den Gesunden.

In den Gelenkproben der vorliegenden Arbeit wurde auch in der gesunden Synovialis eine Expression von *S100 A8* und *S100 A9* detektiert. Dabei ist fraglich, inwiefern diese Expression als physiologisch zu werten war oder ob die wenigen Patienten, die Immunreaktivität gegenüber *S100 A8* und *S100 A9* zeigten, eine Reizung der Synovialis hatten, welche ggf. Grund für die Arthroskopie war und dabei jedoch so schwach ausgeprägt war, dass sich makroskopisch keine Pathologie feststellen ließ. Solch eine Reizung der Synovialis könnte zu einer geringen *S100 A8*- bzw. *S100 A9*-Expression geführt haben.

HNP1-3 ließ sich in 3 von 5 Präparaten in Leukozyten im Synovialstroma und in Blutgefäßen detektieren, in Synoviozyten wurde kein *HNP1-3* exprimiert. Die Immunreaktivität im Synovialstroma ging vor allem auf Granulozyten zurück, die vereinzelt im

Bindegewebe zu finden waren. Physiologischerweise ist die Anzahl neutrophiler Granulozyten in gesunden Gelenken gering, was erklären könnte, warum die Immunreaktivität gegenüber *HNP1-3* in den gesunden Proben eher spärlich war. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Paulsen et al., bei denen ebenfalls einige wenige Granulozyten im Synovialstroma von Gesunden *HNP1-3* exprimierten (Paulsen, Pufe et al. 2002).

4.3. Therapien der Patienten

Die spezielle Möglichkeit, Gewebeproben von Gelenken verschiedener Arthritisentitäten auf ihre vergleichende Expression an verschiedenen Klassen von AMP zu untersuchen, ist in dieser Arbeit der Kooperation mit den Kollegen aus Leeds und Aachen zu verdanken. Wichtig zu beachten bei der Bewertung der Ergebnisse ist die medikamentöse Therapie, die die Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie erhielten. Hinweise zum Einfluss von Methotrexat (MTX), einem seit vielen Jahren in der Therapie entzündlicher Gelenkerkrankungen etablierten DMARD, finden sich in der oben bereits erwähnten Arbeit von David Kane, in der Proben von PsA-Patienten, die sowohl vor als auch nach Beginn der MTX-Therapie biopsiert worden waren, auf die Expression von *S100 A8* und *S100 A9* immunhistochemisch untersucht wurden (Kane, Roth et al. 2003). In den Präparaten zeigten sich deutliche Reduktionen der AMP-Expression unter der MTX-Therapie, in einigen Präparaten waren die Proteine sogar gar nicht mehr nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Patienten zum Zeitpunkt der Biopsie mit MTX behandelt. Darunter war ein PsA-Patient, in dessen Probe keine Immunreaktivität gegenüber *S100 A8* und *S100 A9* nachgewiesen wurde. Ob dies an der MTX-Behandlung lag, bleibt offen. In der Gruppe der RA wurden mehrere Patienten mit MTX behandelt. Einige dieser Proben zeigten hingegen eine mitunter sehr starke Expression von *S100 A8* und *S100 A9*, darunter auch Immunreaktivität in Synoviozyten der Membrana synovialis. Andere RA-Präparate unter MTX-Therapie wiederum zeigten keine Expression der beiden AMP. Damit stellt sich die Frage, wie diese Unterschiede zustande kamen – warum exprimierten einige Patienten unter MTX-Therapie *S100 A8* und *S100 A9* und andere Patienten nicht? Möglich wäre, dass genau die Patienten, die trotz MTX-Therapie eine *S100 A8/A9*-Expression zeigten, schlecht auf MTX ansprachen. 4 der

5 RA-Patienten zeigten unter MTX erhöhte CRP-Werte und leicht- oder mittelgradige Synovialitiden im Synovitisscore. Da *S100 A8/A9* bereits als potentielle Marker für die Krankheitsaktivität der RA beschrieben sind (Kang, Woo et al. 2014), sollte in Zukunft ebenfalls eine Assoziation zum Therapieansprechen von z.B. MTX untersucht werden. Die Erforschung der Mechanismen, die bei Arthritispatienten zur Expression der proinflammatorischen AMP *S100 A8* und *S100 A9* trotz MTX-Therapie führen, könnte möglicherweise neue Therapieansätze hervorbringen. Außerdem könnten möglicherweise AMP als Biomarker zur Quantifizierung der Wirksamkeit genutzt werden: Regelmäßig gemessene Konzentrationen der AMP (bevorzugt im Serum) könnten ein weiteres Instrument zur Messung der Krankheitsaktivität und damit der Beurteilung des Therapieerfolges darstellen.

Hinweise darauf, dass nicht generell davon ausgegangen werden kann, dass immunsuppressive Medikamente die AMP-Expression hemmen, finden sich bei Riepl et al. (Riepl, Grassel et al. 2010): Zunächst wurde erwartet, dass das immunsuppressive Hormon Kortisol die Expression des proinflammatorisch wirkenden *HNP1-3* hemmen würde. Untersuchungen der *HNP1-3*-Produktion von Synoviozytenkulturen zeigten jedoch, dass Kortisol weder allein die Produktion minderte noch synergistische Effekte zusammen mit Noradrenalin, das *HNP1-3* hemmt, erzeugte.

Mit den Angaben zu der medikamentösen Therapie der Patienten finden sich in der vorliegenden Arbeit Hinweise, welche antimikrobiellen Peptide trotz verschiedener Medikamente in den Synovialisproben exprimiert wurden (Vergleich Tabellen 6-8, S. 2929-34). Weitergehende Untersuchungen, möglichst an noch nicht therapierten Patienten, sind aufgrund der geringen Fallzahlen unbedingt erforderlich.

4.4. Vergleich der Gelenkerkrankungen

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Expression antimikrobieller Peptide zwischen den untersuchten Gelenkentzündungsentitäten herauszufinden. Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse der AMP-Expression von rheumatoider Arthritis und Psoriasis-Arthritis, erkennt man zunächst viele Gemeinsamkeiten. Beide Entitäten zeigen keine Expression von Psoriasin, RNase 7, hBD-2 und hBD-3. Gemeinsam ist der PsA und der RA außerdem die Immunreaktivität gegen-

über S100 A8, S100 A9 und HNP1-3, die stärker ist als die Immunreaktivität gegenüber den genannten AMP in OA und den gesunden Kontrollen (Vergleich Tabellen 6-9, S. 29-36). LL-37 wurde nur in PsA detektiert, jedoch eher spärlich in einzelnen Leukozyten im Synovialstroma.

AMP-Expression in der Membrana synovialis

S100 A8, *S100 A9* und *HNP1-3* wurden nicht nur im Synovialstroma von PsA und RA exprimiert, sondern wurden auch in der Membrana synovialis in Synoviozyten detektiert. Auch wenn die Ergebnisse nicht statistisch signifikant waren, fällt auf, dass die Expression von *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* nur in den Synoviozyten von PsA und RA zu detektieren war, in der Osteoarthrose und der gesunden Synovialis (mit Ausnahme eines einzelnen *S100 A8*-positiven Präparates) die Expression hingegen auf das Synovialstroma beschränkt war.

Alle Synoviozyten-positiven Präparate erhielten im Rahmen des „Synovitis-Scores“ 1 oder 2 Punkte in der Kategorie „Verdickung der Membrana synovialis“, umgekehrt ließ sich jedoch bei vielen anderen Präparaten, die ebenfalls 1 oder 2 Punkte für die Verdickung der Membrana synovialis erhielten, keine Immunreaktivität in Synoviozyten nachweisen. Die Verdickung scheint also in gewisser Weise Voraussetzung für die AMP-Expression in Synoviozyten zu sein, ist aber nicht allein entscheidend. In den anderen Kriterien des Synovitisscores „Dichte residenter Zellen im Synovialstroma“ und „Anzahl infiltrierter Zellen im Synovialstroma“ war keine Assoziation zwischen AMP-Expression und einer hohen Punktzahl im Synovitisscore erkennbar.

In der Literatur wird die Expression einzelner antimikrobieller Peptide in der Deckschicht der Synovialis ebenfalls für hochgradig entzündliche Synovialitiden beschrieben. Bei Kane et al. zeigten die Epithelien von RA und PsA vereinzelt Immunreaktivität gegenüber *S100 A8* und *S100 A9*, unterschieden sich dabei jedoch nicht voneinander.

S100 A8 und A9

Deutlich stärker als in der Membrana synovialis war die Immunreaktivität gegenüber *S100 A8* und *S100 A9* im Synovialstroma. Hier zeigten sich zudem Unterschiede in der Expression der AMP zwischen PsA und RA: In der Immunhistochemie zeigten sich in der PsA Infiltrate von *S100-A8*- und *S100-A9*-positiven Leukozyten vor allem perivasal. In den Proben der RA exprimierten hingegen nur einzeln im Stroma liegende Leukozyten

S100 A8 und/oder *S100 A9*. Die Assoziation zu den Blutgefäßen, wie sie in der PsA vorherrschte, war in der RA nicht zu erkennen. Eine Untersuchung von Youssef et al. zeigt die Abhängigkeit der Expression von *S100 A8* und *S100 A9* von der Nähe zur Knorpel-Pannus-Region in der rheumatoiden Arthritis. Nah an dieser Junktionszone, wo besonders viele Phagozyten zu finden sind, ließ sich eine hohe Immunreaktivität detektieren. Weit entfernt von der Knorpel-Pannus-Region hingegen wurden in den RA-Proben nur wenig *S100 A8* und *S100 A9* exprimiert (Youssef et al. 1999).

Da *S100 A8* und *S100 A9* vor allem von Phagozyten gebildet werden und im Rahmen von Entzündungen als proinflammatorische Zytokine agieren (Ehrchen, Sunderkotter et al. 2009), ist es nicht verwunderlich, dass in der Osteoarthritis, einer niedriggradigen Synovialitis, weniger Immunreaktivität detektiert wurde als in den hochgradigen Synovialitiden Psoriasis-Arthritis und rheumatoider Arthritis.

HNP1-3

HNP1-3 wurde in allen Entitäten nachgewiesen, wobei die stärkste Immunreaktivität in der Psoriasis-Arthritis und der rheumatoiden Arthritis identifiziert wurde. In beiden Arthritiden waren im Vergleich zur Osteoarthritis und den gesunden Kontrollen mehr *HNP1-3*-positive Leukozyten im Synovialstroma und in synovialen Blutgefäßen detektierbar, die Immunreaktivität war stärker in den einzelnen Zellen und nur in der PsA und der RA wurde *HNP1-3* im Synovialisepithel exprimiert. Signifikante Unterschiede zwischen den PsA- und den RA-Proben konnten jedoch nicht gefunden werden. In beiden Gruppen ging die Immunreaktivität vor allem auf eingewanderte Leukozyten im Synovialstroma zurück, die häufig aufgrund ihrer Morphologie als neutrophile Granulozyten identifiziert werden konnten.

Untersuchungen zur Expression von *HNP1-3* in Psoriasis-Arthritis sind bisher in der Literatur nicht beschrieben. Zur rheumatoiden Arthritis hingegen finden sich mehrere Untersuchungen, die allesamt erhöhte Konzentrationen von *HNP1-3* in Synovialis und Synovialflüssigkeit zeigten und unsere Ergebnisse damit bestätigten (Paulsen, Pufe et al. 2002; Bokarewa et al. 2003; Riepl, Grassel et al. 2010; Ahn, Huang et al. 2013). Auch konnte ein Mechanismus, der zu einer erhöhten Expression dieses AMP führt, bereits identifiziert werden (Riepl, Grassel et al. 2010): Noradrenalin kann im gesunden Gelenk, wenn es durch sympathische Nervenendigungen in hohen Dosen freigesetzt wird, die *HNP1-3*-Expression über β 2-Rezeptoren hemmen. Da diese Nervenendigungen in der RA

durch die vorherrschende Entzündung geschädigt sind und damit die Noradrenalin-freisetzung vermindert ist, ist die Hemmung der *HNP1-3*-Expression über β 2-Rezeptoren, die nur bei hohen Konzentrationen stimuliert werden, nicht möglich. Wie Noradrenalin hemmt auch TNF- α unter physiologischen Bedingungen die Expression von *HNP1-3*. Durch stetig hohe TNF- α -Konzentrationen in der RA sind die TNF- α -Rezeptoren jedoch desensibilisiert und die Hemmung der *HNP1-3*-Expression ist damit abgeschwächt. Damit fehlen in der RA zwei Mechanismen zur Hemmung der *HNP1-3*-Expression.

Da *HNP1-3* selbst auch eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird (Soehnlein et al. 2008; Presicce et al. 2009), liegt nahe, dass erhöhte *HNP1-3*-Konzentrationen zu einer erhöhten Krankheitsaktivität führen können, was sich mit klinischen Beobachtungen deckt. Demnach korreliert bei RA-Patienten die Höhe der *HNP1-3*-Konzentration in der Synovialflüssigkeit mit der Leukozytenzahl im Blut (Bokarewa, Jin et al. 2003) und ist ebenso deutlich höher, wenn bei den Patienten radiologisch Erosionen, ein CRP >2mg/dl im Blut oder ein positiver Rheumafaktor nachweisbar sind (Ahn, Huang et al. 2013). Diese Assoziation von *HNP1-3* mit einer erhöhten Krankheitsaktivität in rheumatoider Arthritis ist auch in der PsA denkbar, da in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Induktion von *HNP1-3* in den Proben der PsA detektierbar war und alle Patienten aufgrund ihres schweren Krankheitsverlaufes operativ Gelenkersätze erhalten mussten.

In der vorliegenden Arbeit wurde Immunreaktivität gegenüber *HNP1-3* auch in Biopsien bei Osteoarthritis detektiert. Betrachtet man die positiven Präparate unter dem Lichtmikroskop, fällt auf, dass zwar in allen Präparaten positive Zellen zu finden sind, die Immunreaktivität jedoch deutlich schwächer ist als in der RA oder der PsA. In der OA exprimieren nur einzelne Zellen im Synovialstroma *HNP1-3*. Wie auch bei der RA und der PsA sind viele dieser Zellen aufgrund ihrer typischen Morphologie als neutrophile Granulozyten identifizierbar, nur ist die Anzahl in der OA deutlich geringer. Da ebenfalls in gesunden Proben in der vorliegenden Arbeit sowie in der Literatur (Paulsen, Pufe et al. 2002) einzelne *HNP1-3*-positive Granulozyten im Synovialstroma gefunden wurden, stellt sich die Frage, inwiefern eine niedrige *HNP1-3*-Expression physiologisch ist und ob *HNP1-3* in der Osteoarthritis überhaupt vermehrt exprimiert wird.

LL-37

LL-37 wurde in 2 PsA-Proben detektiert, in rheumatoider Arthritis hingegen fand sich keinerlei Immunreaktivität gegenüber dem Cathelicidin. Dabei sei anzumerken, dass die Immunreaktivität gegenüber *LL-37* in der Psoriasis-Arthritis nur in wenigen Zellen zu detektieren war. In der Literatur finden sich keine Untersuchungen zur Expression von *LL-37* in PsA, jedoch eine Publikation zu rheumatoider Arthritis (Paulsen, Pufe et al. 2002): Per RT-PCR konnte *LL-37* in Synovialisproben von Patienten mit RA nachgewiesen werden. Warum in der vorliegenden Arbeit mittels Immunhistochemie keine Immunreaktivität nachgewiesen werden konnte, könnte folgendermaßen begründet werden: *LL-37* wird in vielen Epithelien des Körpers exprimiert, aber auch von verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystem wie natürlichen Killerzellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten (Vandamme et al. 2012). Besonders die neutrophilen Granulozyten sind in rheumatoider Arthritis in den Gelenken in einer hohen Zahl zu finden, jedoch vor allem in der Synovialflüssigkeit und nicht in der Synovialis. Die neutrophilen Granulozyten diapedieren von Chemokinen angelockt zunächst von den Blutgefäßen der Synovialis in das synoviale Stroma, wandern im Anschluss daran jedoch rasch in die Synovialflüssigkeit (Harris 1990). Mit der geringen Anzahl neutrophiler Granulozyten im Synovialisgewebe sinkt damit auch die Wahrscheinlichkeit, histologisch Immunreaktivität gegenüber *LL-37* nachzuweisen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die höchste Immunreaktivität gegenüber mehreren AMP, vor allem *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3*, in den Proben der Psoriasisarthritis und der rheumatoiden Arthritis detektiert wurde. In der Osteoarthrose und den gesunden Kontrollen waren auch verschiedene AMP nachweisbar, die Expression war jedoch schwächer als in den hochgradigen Synovialitiden. Dabei überwiegen die Gemeinsamkeiten von RA und PsA in ihrer AMP-Expression. Unterschiede konnten in der Expression von *LL-37* (nur in PsA detektiert) und *S100 A8/A9* (bei PsA in Assoziation zu den Leukozyten in Blutgefäßen, bei RA vereinzelt im Synovialstroma liegende positive Leukozyten) festgestellt werden.

Dass AMP vorwiegend in hochgradigen Synovialitiden exprimiert werden, unterstützt die Vermutung, dass einige AMP in sterilen Gelenkentzündungen wie der PsA und der RA vor allem immunmodulatorische Funktionen erfüllen und aufgrund des Fehlens von Mikroben ihre antimikrobielle Wirkung eher im Hintergrund steht. Das Fehlen von

Mikroorganismen als Induktoren der AMP-Expression, wie beispielsweise an der Haut, wo Mikroben in Keratinozyten eine Expression von AMP induzieren können (Vergleich 4.5. Ergebnisse Haut), lässt den Schluss zu, dass in der Synovialis von PsA und RA andere Induktionsmechanismen zur Expression von AMP im Vordergrund stehen. Dabei wäre es denkbar, dass IL-17 eine Rolle spielt, denn IL-17 ist in der PsA in hohem Maß zu finden (Menon et al. 2014) und kann zudem die Expression folgender AMP in Keratinozyten induzieren: *S100 A8*, *S100 A9*, *Psoriasin*, *hBD-2* und *RNase 7* (Liang et al. 2006; Simanski et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden in der PsA *S100 A8* und *S100 A9* nachgewiesen, was IL-17 nach oben genannter Hypothese stimuliert haben könnte. Fraglich ist jedoch, warum *hBD-2*, *Psoriasin* und *RNase 7* nicht auch induziert wurden. Möglich ist, dass dafür der notwendige Induktionsmechanismus durch Bakterien fehlte, denn auch in der physiologisch sterilen Synovialis ist unter pathologischen Bedingungen eine Induktion von AMP durch Bakterien möglich: In pyogener Arthritis mit nachgewiesenem Befall von *Staphylococcus aureus* oder *Staphylococcus epidermidis* wurde eine Expression von *hBD-2* in der Synovialis immunhistochemisch nachgewiesen (Varoga et al. 2009). Denkbar ist also, dass in den sterilen Arthritiden PsA und RA durch proinflammatorische Zytokine im Rahmen der Entzündung eine AMP-Expression stimuliert wird, aufgrund der nicht vorhandenen bakteriellen Normalflora das Profil der AMP jedoch anders ist als das der Haut bei Psoriasis.

4.5. Ergebnisse Haut

S100 A8 und S100 A9

Die beiden S100-Proteine *S100 A8* und *S100 A9* werden in gesunder Haut nur in geringem Maß, in Psoriasisläsionen hingegen stark exprimiert (Kerkhoff et al. 2012). Bei *S100 A8* geht die Expression stärker auf die Keratinozyten selbst zurück, *S100 A9* hingegen wird vermehrt von neutrophilen Granulozyten exprimiert (Aochi, Tsuji et al. 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich größtenteils mit diesen Angaben. *S100 A9* wurde auch hier in den Psoriasisläsionen verstärkt nachgewiesen (Epidermisscore durchschnittlich 3,5 im Vergleich zu 2,25 bei nicht-läsionaler Haut). Auch in der Dermis waren in den Läsionen mehr *S100 A9*-positive Zellen zu detektieren. Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse zur *S100 A8*-Expression, findet man jedoch

Unterschiede zu bisherigen Arbeiten. In den dermalen Leukozyten lässt sich in den Proben der Psoriasisläsionen eine höhere *S100 A8*-Expression als in den nichtläsionalen oder gesunden Proben detektieren. In der Epidermis jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit in allen Proben Immunreaktivität gegenüber *S100 A8* in allen Epidermisschichten nachgewiesen. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss die Auswertung mittels des IHC-Scores genauer betrachtet werden: Bei den Ergebnissen zur *S100 A8*-Expression könnte der IHC-Score an seine Grenzen stoßen, da er nicht berücksichtigt, wie stark oder schwach die Immunreaktivität ist und ob sie fokal oder diffus in den einzelnen Epidermisschichten zu finden ist. Betrachtet man die Präparate dieser Arbeit im Lichtmikroskop, so fällt auf, dass zwar auch in den nichtläsionalen und gesunden Proben alle Epidermisschichten Immunreaktivität gegenüber *S100 A8* aufweisen, die Immunreaktivität aber deutlich schwächer als in den Psoriasisläsionen und zudem häufig nur fokal ausgeprägt ist. Würden Stärke der Expression sowie die Differenzierung zwischen fokal und diffus zusätzlich im IHC-Score berücksichtigt, würde der Score allerdings unübersichtlicher und schlechter für Vergleiche heranziehbar sein, da keine Mittelwerte mehr gebildet werden könnten. Deshalb wurden diese beiden Kriterien nicht in den Score aufgenommen.

Welche Mechanismen zu der erhöhten Expression von *S100 A8* und *S100 A9* in Psoriasisläsionen führen, ist nicht abschließend geklärt. Es gibt Hinweise, dass IL-22, IL-17A und IL-17F (in der Psoriasispathogenese zentrale proinflammatorische Zytokine) sowie ein Epithel-assoziiertes Wachstumsfaktor (LEDGF, lens epithelium-derived growth factor) in Keratinozyten die Expression der AMP induzieren können (Liang, Tan et al. 2006; Takeichi et al. 2010). *S100 A8* und *S100 A9* selbst tragen wiederum über verschiedene Mechanismen zur Entstehung der Psoriasis bei – sie hemmen die Differenzierung und fördern die Proliferation der Keratinozyten und induzieren die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α , die wiederum weitere Immunzellen anlocken (Nukui et al. 2008). Zudem fördern sie die Angiogenese, indem sie Endothelzellen zur Proliferation und Formation neuer Blutgefäße anregen (Lee et al. 2012). *S100 A8* und *S100 A9* fungieren damit als proinflammatorische Zytokine in der Psoriasispathogenese und könnten somit auch ein neues therapeutisches Ziel darstellen.

HNP1-3 und LL-37

Immunreaktivität gegenüber *HNP1-3* war in der vorliegenden Arbeit vor allem in den Psoriasisläsionen detektierbar. Die Immunreaktivität ging dabei vorrangig auf eingewanderte Leukozyten zurück. So zeigte zum einen die Dermis viele positive neutrophile Granulozyten (im Lichtmikroskop durch die typische Morphologie identifiziert) und andere positive mononukleäre Zellen, aber auch in der Epidermis war Immunreaktivität zu finden. Diese war vor allem in Akkumulationen von neutrophilen Granulozyten im Stratum corneum, den sogenannten Munroschen Mikroabszessen, nachzuweisen. In einem Präparat wurde jedoch auch Immunreaktivität in Keratinozyten detektiert. In der Literatur finden sich ebenfalls Hinweise darauf, dass die Expression von *HNP1-3* in der Epidermis nicht nur auf Granulozyten, sondern auch auf Keratinozyten zurückzuführen ist (Harder und Schröder 2005). Zwei Umstände gaben in der Arbeit von Harder et al. Hinweise auf die *HNP1-3*-Expression in Keratinozyten: Zum einen wurde Schuppenmaterial von chronischen Plaques, die in der Regel keine oder nur sehr wenige neutrophile Granulozyten enthalten, verwendet und zum anderen in den Schuppen die Konzentrationen der Neutrophilen-Marker Myeloperoxidase und Laktoferrin bestimmt, die beide nur in geringer Konzentration nachweisbar waren. Die *HNP1-3*-Konzentration war jedoch hoch. Damit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die *HNP1-3*-Expression nicht auf neutrophile Granulozyten zurückging, jedoch konnte nicht bewiesen werden, dass die *HNP1-3*-Expression auf die Keratinozyten zurückzuführen war. In einem Präparat in der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von *HNP1-3* in Keratinozyten detektiert werden, wobei sie in den hohen Epidermisschichten am stärksten und im Stratum basale nicht nachzuweisen war.

LL-37 wurde in der vorliegenden Arbeit nur in der Haut der Psoriasispatienten detektiert, die Proben der gesunden Kontrollen blieben gänzlich negativ. Die Immunreaktivität ging sowohl auf neutrophile Granulozyten in Munroschen Mikroabszessen zurück als auch auf Keratinozyten selbst und war am stärksten in der läsionalen Psoriasis Haut nachweisbar. Auch in der Dermis wurde in einigen neutrophilen Granulozyten eine *LL-37*-Expression nachgewiesen.

Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben in der Literatur, wonach in der Psoriasis das AMP *LL-37* induziert ist und vor allem von Keratinozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Frohm et al. 1997). Jedoch können auch andere Zellen wie NK-Zellen oder T-Zellen dieses AMP exprimieren (Agerberth, Charo et al. 2000). *LL-37* trägt

nicht nur mit seiner antimikrobiellen Wirkung gegenüber mehreren Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Larrick et al. 1995) zur Immunabwehr bei *LL-37* soll auch maßgeblich die Entstehung der Psoriasis begünstigen können (Batycka-Baran et al. 2014): Es kann mit körpereigener DNA aus zerfallenen Zellen Komplexe bilden, die plasmazytoide Zellen über TLR-9, der in gesunder Haut nur mikrobielle DNA bindet, erkennen. Diese Bindung führt zur Aktivierung der plasmazytoiden dendritischen Zellen, die daraufhin IFN- α produzieren (Lande, Gregorio et al. 2007). IFN- α aktiviert myeloide dendritische Zellen, die im aktivierten Zustand die Differenzierung von TH-1- und TH-17-Zellen induzieren, welche dann über Zytokine wie IL17-A und -F, IL-22, TNF- α und IFN- γ Keratinozyten weiter stimulieren können (Nestle et al. 2009). Somit kann *LL-37* entscheidend zur Entstehung der Psoriasis beitragen, indem es die Aktivierung der plasmazytoiden dendritischen Zellen ermöglicht.

Psoriasin und RNase 7

Eine Expression von *Psoriasin* konnte in der vorliegenden Arbeit in den Proben der Psoriasispatienten und auch in den gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. In den Psoriasisläsionen wurde starke Immunreaktivität detektiert, in den nichtläsionalen Proben der Psoriasispatienten war die Immunreaktivität etwas schwächer und in den gesunden Kontrollen wurden nur fokal einige *Psoriasin*-positiven Keratinozyten im Stratum corneum nachgewiesen. Diese Angaben decken sich mit Angaben aus der Literatur zur Expression von *Psoriasin*. *Psoriasin* wird konstitutiv von gesunder Haut exprimiert, die Expression schwankt jedoch stark in Abhängigkeit von der Körperlokalisierung (Gläser et al. 2005). In der Psoriasis hingegen ist *Psoriasin* stark induziert, was zur erstmaligen Isolierung und weiteren Charakterisierung aus psoriatischen Keratinozyten führte (Celis et al. 1990; Madsen et al. 1991). Die Funktionen des AMP sind dabei vielfältig. Äußerst wichtig für den Schutz der gesunden Haut und besonders der barrieregestörten Psoriasis-Haut ist die antimikrobielle Funktion von *Psoriasin*. Bereits in sehr geringen Konzentrationen wirkt *Psoriasin* bakterizid gegen *Escherichia coli*, in höheren Konzentrationen außerdem gegen *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus*. Auf *Psoriasin* wird, da es von gesunder Haut konstitutiv gebildet wird, die natürliche Resistenz der Haut auf die Besiedlung von und Infektionen mit *E. coli* zurückgeführt (Gläser, Harder et al. 2005). Neben der antimikrobiellen Funktion werden *Psoriasin* auch chemotaktische Wirkungen auf Granulozyten, Monozyten und Lympho-

zyten zugeschrieben (Wolf et al. 2008). *Psoriasis* stimuliert neutrophile Granulozyten zur Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen und proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8 und TNF- α (Zheng et al. 2008). Die Produktion von *Psoriasis* kann wiederum selbst durch proinflammatorische Zytokine induziert werden: IL-17A, IL-22 und TNF- α (Hegyi et al. 2012). Eine Hemmung von *Psoriasis* könnte somit theoretisch einen möglichen therapeutischen Nutzen darstellen. Denkbar ist dabei jedoch, dass neben der proinflammatorischen Wirkung auch die antimikrobielle Wirkung vermindert würde, was die Psoriasisläsionen gegebenenfalls anfälliger machen könnte für Infektionen.

RNase 7 konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls sowohl in Psoriasisläsionen als auch in nichtläsionaler Psoriasis-Haut sowie in gesunder Haut detektiert werden, wobei die Immunreaktivität in der läsionalen Psoriasis-Haut am stärksten war. Diese konstitutive Expression von *RNase 7* in gesunder Haut und die induzierte in Psoriasisläsionen wurden in der Literatur ebenfalls beschrieben (Harder et al. 2002). *RNase 7* kennzeichnet eine starke antimikrobielle Aktivität sowohl gegen Gram-positive Erreger (*Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*) als auch gegen Gram-negative Erreger (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* (einen vancomycin-resistenten Stamm)) sowie den Hefepilz *Candida albicans* (Harder und Schröder 2002). Die Konzentrationen, bei denen *RNase 7* in vitro bereits antimikrobiell wirkt, sind äußerst gering, was *RNase 7* zum potentesten bisher bekannten AMP macht (Harder und Schröder 2002; Harder und Schröder 2005).

Induzierbar ist *RNase 7* durch IL-1 β , TNF- α , IFN γ , IL-17A und über den Kontakt mit Bakterien (Harder und Schröder 2002; Simanski, Rademacher et al. 2013). Inwiefern *RNase 7* weitere immunmodulatorische Funktionen erfüllt und zur Pathogenese der Psoriasis beiträgt, ist bisher unklar.

hBD-2 und hBD-3

Die humanen β -Defensine *hBD-2* und *hBD-3* wurden nur in der Haut der Psoriasispatienten nachgewiesen – in der läsionalen Psoriasis-Haut war die Immunreaktivität deutlich stärker als in der nichtläsionalen. Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben der Literatur, wonach *hBD-2* und *hBD-3* in Psoriasisläsionen stark induziert sind (Harder, Bartels et al. 1997; Harder et al. 2001). Die Funktionen der Defensine sind dabei vielfältig. Zum einen haben sie antimikrobielle Wirkungen: *HBD-2* wirkt vor allem

bakterizid gegen Gram-negative Bakterien wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*. Außerdem zeigt es eine antimikrobielle Wirkung gegen *Candida albicans*, gegen Gram-positive Bakterien hingegen wirkt *hBD-2* nur in hohen Konzentrationen bakterio-statisch (Harder, Bartels et al. 1997). Im Gegensatz dazu zeigt *hBD-3* bakterizide Wirkung gegen sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien, darunter auch multiresistente Erreger wie *Methicillin-resistente Staphylococcus-aureus-(MRSA)*-Stämme und *Vancomycin-resistente Enterococcus-faecium-(VRE)*-Stämme (Harder, Bartels et al. 2001). Besonders in Hinblick auf die Pathogenese der Psoriasis zeigen *hBD-2* und *hBD-3* weitere interessante immunmodulatorische Funktionen: Sie wirken chemotaktisch auf T-Zellen und dendritische Zellen, *hBD-2* zusätzlich auf Mastzellen und *hBD-3* zusätzlich auf Monozyten/Makrophagen (Oppenheim et al. 2005). Dazu stimulieren *hBD-2* und *hBD-3* Keratinozyten sowohl zur Differenzierung als auch zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-10 und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) (Niyonsaba et al. 2007). Darüber hinaus stimulieren *hBD-2* und -3 wie auch *LL-37* die Aufnahme von eigener DNA in Komplexen durch plasmazytoide dendritische Zellen, die dadurch aktiviert werden und die Pathogenese der Psoriasis weiter vorantreiben (Tewary et al. 2013; Lande et al. 2014). Die vielfältigen immunmodulatorischen Funktionen der β -Defensine spiegeln sich in der klinischen Beobachtung wieder, dass erhöhte Serumwerte von *hBD-2* mit einer erhöhten Krankheitsaktivität der Psoriasis, gemessen am PASI-Score (Psoriasis Area and Severity Index), assoziiert sind (Jansen et al. 2009). Somit zeigen sich, wie auch bei *Psoriasis*, Vor- und Nachteile der Induktion der β -Defensine: Auf der einen Seite können sie die Psoriasisläsionen mit ihrer antimikrobiellen Wirkung schützen, auf der anderen Seite können sie mit ihren proinflammatorischen Funktionen die Pathogenese vorantreiben.

4.6. Vergleich Haut – Gelenk

Im Vergleich der Expression der antimikrobiellen Peptide in der Haut der Psoriasis vulgaris mit der Expression in der Synovialis der Psoriasis-Arthritis finden sich sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten.

Auffallend ist, dass *Psoriasis*, *RNase 7*, *hBD-2* und *hBD-3* nur in der Psoriasis der Haut detektiert wurden. In den PsA-Proben hingegen wurde keinerlei Immunreaktivität

gegenüber diesen AMP nachgewiesen. In der Betrachtung der Induktionsmechanismen dieser AMP in der Haut fällt auf, dass neben verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen alle durch den Kontakt der Keratinozyten mit Bakterien induziert werden können (Harder und Schröder 2002; Gläser, Harder et al. 2005; Harder und Schröder 2005). Da die Gelenkhöhle jedoch steril ist und die Synoviozyten somit keinen Bakterienkontakt haben, ist dieser Induktionsmechanismus in der Psoriasisarthritis nicht möglich. Interessant ist bei dieser Überlegung die Betrachtung der Untersuchungen von Varoga et al.: Hier wurde eine Expression von *hBD-2* in Synovialisproben von Patienten mit pyogener Arthritis beschrieben (Varoga, Klostermeier et al. 2009). Bei allen Patienten wurde *Staphylococcus aureus* oder *Staphylococcus epidermidis* in der Gelenkhöhle nachgewiesen – die nunmehr infizierte Synovialis wurde durch den Bakterienkontakt zur Expression von *hBD-2* stimuliert. Synoviozyten sind demnach in der Lage, β -Defensine zu exprimieren. Ob dies auch für *Psoriasin* und *RNase 7* zutrifft, ist weiterhin unklar. Für *Psoriasin* beispielsweise wäre es denkbar, pyogene Arthritiden, die durch *Escherichia coli* hervorgerufen wurden, zu untersuchen, da dieses Bakterium in Keratinozyten die Expression von *Psoriasin* induziert (Gläser, Harder et al. 2005).

Neben Bakterien sind auch proinflammatorische Zytokine in der Lage, die Expression von AMP zu induzieren, wie beispielsweise IL-17, das in Keratinozyten die *hBD-2*- und die *Psoriasin*-Expression stimuliert (Liang, Tan et al. 2006). IL-17 wird zwar auch in der PsA in hohem Maß von CD-8+-T-Zellen produziert (Menon, Gullick et al. 2014), nur bleibt hier die Induktion von *hBD-2* und *Psoriasin* aus. Dieses Beispiel zeigt die Komplexität der AMP-Induktion. Betrachtet man IL-17 weiter, so fällt auf, dass es neben *hBD-2* und *Psoriasin* weitere AMP in Keratinozytenkulturen induziert: *S100 A8* und *S100 A9*. Diese beiden AMP wiederum wurden nicht nur in der Epidermis der Psoriasis vulgaris, sondern auch in der Synovialis der Psoriasis-Arthritis in mehreren Proben nachgewiesen. Während die Immunreaktivität in der Haut sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis stark war, zeigte sich in der Synovialis die Expression von *S100 A8* und *S100 A9* vor allem im Synovialstroma in eingewanderten Leukozyten. Synoviozyten zeigten hingegen nur in einem Präparat Immunreaktivität. In jedem Fall ist die Induktion von *S100 A8* und *S100 A9* besonders interessant zu betrachten, da sich diese AMP in der Pathogenese der Psoriasis als stark proinflammatorisch wirkende Zytokine gezeigt haben (Vergleich *S100 A8* und *S100 A9*, S. 64). Demnach stellt sich die Frage, inwiefern sie auch in der Pathogenese der PsA proinflammatorisch wirken. Erste Hinweise darauf

gibt es bereits, da in experimentell induzierten Arthritiden *S100 A8* und *S100 A9* die Produktion von knorpeldestruierenden MMP (Matrixmetalloproteinasen) stimulierten und zudem *S100 A8* und *S100 A9* mit einer vermehrten Krankheitsaktivität in der RA in Verbindung gebracht werden (van Lent et al. 2008; Kang, Woo et al. 2014). Außerdem vermindert Methotrexat bei Psoriasispatienten die Expression von *S100 A8* und *S100 A9* (Kane, Roth et al. 2003), was ebenfalls indirekt für eine proinflammatorische Wirkung der AMP im Gelenk sprechen könnte. Dennoch sind genaue Induktionsmechanismen in den Leukozyten der PsA und auch in den Synoviozyten bisher unbekannt und sollten in der Zukunft weiter erforscht werden.

HNP1-3 und *LL-37*, die vor allem von neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, wurden ebenfalls in der Psoriasis der Haut und in der Synovialis der PsA detektiert. *HNP1-3* wurde vor allem von Leukozyten, die in vielen Fällen aufgrund ihrer typischen Morphologie als neutrophile Granulozyten identifiziert werden konnten, exprimiert. In der Haut wurde zusätzlich in einem Präparat Immunreaktivität in Keratinozyten nachgewiesen und auch in der Psoriasisarthritis zeigte sich in einer Probe eine Induktion in Synoviozyten. Auch *HNP1-3* wird eine Induktion knorpeldestruierender MMP zugeschrieben (Ahn, Huang et al. 2013), wobei diese Untersuchungen bisher nur an RA-Proben gemacht wurden.

LL-37 wurde ebenfalls in der Psoriasis der Haut sowie der Synovialis der PsA detektiert. Während die Immunreaktivität in der Haut sowohl auf neutrophile Granulozyten in Stratum corneum und Dermis als auch auf Keratinozyten selbst zurückging, zeigten in der Synovialis der PsA nur einzelne eingewanderte Leukozyten im Synovialstroma eine *LL-37*-Expression. Da *LL-37* in der Pathogenese der Psoriasis in der Haut mit der Aktivierung plasmazytoider dendritischer Zellen eine wichtige, initiale Rolle zugeschrieben wird (Vergleich *HNP1-3* und *LL-37*, S. 66), ist es von großem Interesse durch weitere Untersuchungen zu verstehen, inwiefern *LL-37* auch in der Psoriasisarthritis zur Pathogenese beiträgt.

4.7. Zusammenfassung und Ausblick

Psoriasis wird nach heutigem Kenntnisstand als chronisch inflammatorische Systemerkrankung angesehen, zu der neben den Hautläsionen verschiedene assoziierte Er-

krankungen gehören, u.a. die Psoriasis-Arthritis (PsA). Da 30% der Psoriasis-Patienten in Deutschland zusätzlich zu Hautläsionen eine Psoriasis-Arthritis entwickeln, ist die Erforschung von Unterschieden und Gemeinsamkeiten der beiden Ausprägungen von hohem Interesse.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Expression antimikrobieller Peptide (AMP) in der Epidermis von Psoriasisläsionen und der Synovialis von Psoriasis-Arthritis (PsA). Um die Ergebnisse der AMP-Expression besser interpretieren zu können, wurden neben den PsA-Proben (n=10) auch Proben von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA, n=8), Osteoarthrose (OA, n=4) sowie gesunden Kontrollen (n=5) gewonnen und von den Patienten der Psoriasis-Hautläsionen (n=4) zusätzlich Proben aus makroskopisch gesunder Haut sowie Proben von Hautgesunden gleichen Alters, gleichen Geschlechts und gleicher Lokalisation der Biopsie. Die arthroskopisch gewonnenen Synovialisproben (n=27) und die bioptisch gewonnenen Hautproben (n=12) wurden mithilfe der Immunhistochemie auf die Expression verschiedener Klassen von AMP untersucht: *Psoriasin (S100 A7)*, *Ribonuklease 7 (RNase 7)*, die humanen β -Defensine *hBD-2* und *hBD-3*, das Cathelicidin *LL-37*, *S100 A8 (Calgranulin A)*, *S100 A9 (Calgranulin B)* und die humanen α -Defensine *HNP1-3 (humane neutrophile Peptide 1-3)*. Die Präparate wurden lichtmikroskopisch von 2 unabhängigen Gutachtern analysiert. Zur Beurteilung der Hautproben wurde ein Epidermisscore, der die Immunreaktivität in den einzelnen Schichten der Oberhaut bewertete, verwendet. Weiterhin wurde die Immunreaktivität in der Dermis beurteilt. Die Synovialisproben wurden nach 3 Gesichtspunkten analysiert: 1. Immunreaktivität in Synoviozyten der Membrana synovialis, 2. Immunreaktivität in eingewanderten Leukozyten im Synovialstroma und 3. Immunreaktivität in Leukozyten, die in Blutgefäßen zu erkennen waren. Zudem wurde lichtmikroskopisch von einem weiteren unabhängigen Gutachter verblindet für jede Probe ein Synovitisscore zur Beurteilung der Entzündungsaktivität bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten eine mitunter starke Induktion von *S100 A8*, *S100 A9*, *HNP1-3* und *LL-37* in den Hautläsionen der psoriatischen Epidermis und in der Synovialis der PsA, die auch eine Expression von *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* in Synoviozyten der Membrana synovialis einschloss.

Psoriasin, *RNase 7*, *hBD-2* und *hBD-3* hingegen wurden nur in der Epidermis der Psoriasis detektiert, die Synovialisproben zeigten keine Immunreaktivität. Die Synovialis-

proben der rheumatoiden Arthritis zeigten ein ähnliches Expressionsmuster wie die der PsA: *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* wurden mitunter stark exprimiert, sowohl im Synovialstroma als auch in der Membrana synovialis. In der Osteoarthrose und den gesunden Kontrollen war die Expression der AMP schwächer und nur vereinzelt in Leukozyten im Synovialstroma zu detektieren.

In der Literatur wurde bereits berichtet, dass *S100 A8* und *S100 A9* mit ihren proinflammatorischen Funktionen wie der Induktion der IL-6-, IL-8- und TNF- α -Produktion in Keratinozyten vorantreiben können. Im Gelenk können AMP ebenfalls proinflammatorisch wirken: *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* können die Produktion knorpeldestruierender Proteinase sowie proinflammatorischer Zytokine in experimentellen Arthritiden induzieren.

Aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen Expression von *S100 A8*, *S100 A9* und lässt sich daher spekulieren, dass *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* auch die Pathogenese der PsA mit ihren vielfältigen proinflammatorischen Funktionen vorantreiben könnten.

Da die Konzentrationen von *S100 A8* und *S100 A9* im Serum von Psoriasispatienten vor allem mit der Krankheitsaktivität der PsA und weniger mit der Stärke des Hautbefalls (gemessen am PASI-Score) assoziiert sind, ist von großem Interesse herauszufinden, wo und durch welche Zellen diese AMP gebildet werden. Hier liefert die vorliegende Arbeit äußerst interessante Hinweise, da gezeigt werden konnte, dass die Immunreaktivität gegenüber *S100 A8* und *S100 A9* vor allem auf verschiedene, entzündungsbedingt in das Synovialstroma eingewanderte Leukozyten zurückzuführen war und auch vereinzelt in Synoviozyten in der Membrana synovialis eine Expression der AMP detektiert wurde. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde für die vorwiegend von neutrophilen Granulozyten exprimierten AMP *HNP1-3* nachgewiesen.

Wie in der PsA wurde auch in der RA Immunreaktivität gegenüber *S100 A8*, *S100 A9* und *HNP1-3* in vorwiegend entzündungsbedingt eingewanderten Leukozyten im Synovialstroma nachgewiesen, wobei ebenfalls auch in Synoviozyten der Membrana synovialis eine Expression detektiert wurde. Statistisch signifikante Unterschiede in der AMP-Expression der PsA und der RA wurden nicht festgestellt. Auffällig war jedoch, dass PsA und RA als hochgradige Synovialitiden stärkere Immunreaktivität gegenüber den genannten AMP zeigten als die Osteoarthrose und die gesunden Kontrollen.

Eine Assoziation zwischen Immunreaktivität und Synovitisscore oder Immunreaktivität und Therapie der Patienten war in keiner Gelenkentzündung erkennbar.

Psoriasin, *RNase 7*, *hBD-2* und *hBD-3* wurden nur in der Haut der Psoriasis detektiert. In keiner der untersuchten Arthritiden der vorliegenden Arbeit wurden diese AMP exprimiert. Da bereits bekannt ist, dass im Falle einer bakteriellen Infektion des Gelenkes *hBD-2* induzierbar ist, lässt sich vermuten, dass in der sterilen PsA die Induktion der AMP durch Mikroorganismen ausbleibt und Bakterien nicht wie an der Haut als potente Induktoren fungieren können.

Die Erforschung der Pathogenese der Psoriasis an der Haut und am Gelenk hat unter anderem zum Ziel, neue Verfahren zu entwickeln, um bei Patienten mit einer Psoriasis der Haut, wie sie typischerweise in der Krankheitsgeschichte zunächst viele Jahre allein auftritt, eine beginnende zusätzliche PsA frühzeitig diagnostizierbar zu machen und die Patienten einer effektiven Therapie zuzuführen. Idealerweise würde man dabei die Diagnose stellen wollen, bevor erste Beschwerden und damit verbundene Schäden am Gelenk entstehen. Eine Möglichkeit wäre die der „Screeningmarker“, die die PsA charakterisieren und von der Psoriasis der Haut abgrenzen könnten. In regelmäßigen Abständen könnten diese Marker aus dem einfach zu gewinnenden Blutserum von Psoriasispatienten bestimmt werden, um die Entwicklung einer PsA frühzeitig anzuzeigen. Zum Nachweis von Serumproteinen als Frühmarker einer PsA gibt es bereits erste Studien. Bis zur klinischen Anwendbarkeit von AMP als Screeningmarker ist der Weg jedoch noch weit: Weitere Untersuchungen sollten angestrebt werden, da weiterhin unklar ist, welche Funktionen AMP in der Pathogenese der PsA spielen und für welche Entzündungsmechanismen sie stehen. Erst wenn dazu weitere Erkenntnisse vorliegen, kann deutlich werden, was eine Erhöhung eines AMP im Serum im Sinne eines Screeningmarkers bedeutet. Im nächsten Schritt müssten Untersuchungen zeigen, dass eine Erhöhung der Screeningmarker mit einer erhöhten Krankheitsaktivität, einer bestimmten Komorbidität o. ä. assoziiert ist. Für *S100 A8* und *S100 A9* beispielsweise konnte bereits gezeigt werden, dass die Konzentrationen im Serum vor allem von der Krankheitsaktivität der PsA abhängen und weniger von der Stärke des Hautbefalls. Demnach könnten *S100 A8* und *S100 A9* als Screeningmarker geeignet sein oder auch als Marker zum Therapiemonitoring.

Ein weiteres Ziel der Erforschung von AMP und ihrer Wirkungen ist der Erkenntnisgewinn zur therapeutischen Nutzbarkeit der Moleküle. Da für mehrere AMP eine proinflammatorische Wirkung in Gelenken beschrieben ist, wäre es interessant zu untersuchen, inwiefern eine Hemmung die Entzündung und damit die Krankheitsaktivität mildern könnte. Kritisch zu beachten ist dabei die gleichzeitige, für die Immunabwehr äußerst wichtige antimikrobielle Funktion der AMP, deren Hemmung schwere Infektionen zur Folge haben könnte.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Systemerkrankung Psoriasis nicht nur zu einer Induktion von AMP an der Haut führen kann, sondern in der Psoriasisarthritis ebenfalls zu einer Induktion von *S100 A8*, *S100 A9*, *HNP1-3* und *LL-37* in der Synovialis. Gleichzeitig zeigen sich Unterschiede zwischen Haut und Gelenk: Die AMP *Psoriasin*, *RNase 7*, *hBD-2* und *hBD-3*, die in hohem Maß in der Haut der Psoriasis exprimiert werden, ließen sich nicht in der Synovialis der Psoriasisarthritis detektieren. So gibt die Arbeit Hinweise auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten der hochaktiven und komplexen AMP, die mit ihren vielfältigen Funktionen nicht nur wichtige Rollen in der Psoriasis der Haut, sondern ebenfalls in der Psoriasisarthritis einnehmen können.

Literaturverzeichnis

- Ademowo, O. S., B. Hernandez, et al. (2014). "Discovery and confirmation of a protein biomarker panel with potential to predict response to biological therapy in psoriatic arthritis." *Ann Rheum Dis*.
- Agerberth, B., J. Charo, et al. (2000). "The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations." *Blood* **96**(9): 3086-3093.
- Ahn, J. K., B. Huang, et al. (2013). "The role of alpha-defensin-1 and related signal transduction mechanisms in the production of IL-6, IL-8 and MMPs in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes." *Rheumatology (Oxford)* **52**(8): 1368-1376.
- Aochi, S., K. Tsuji, et al. (2011). "Markedly elevated serum levels of calcium-binding S100A8/A9 proteins in psoriatic arthritis are due to activated monocytes/macrophages." *J Am Acad Dermatol* **64**(5): 879-887.
- Baillet, A., C. Trocme, et al. (2010). "Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases." *Rheumatology (Oxford)* **49**(4): 671-682.
- Batycka-Baran, A., J. Maj, et al. (2014). "The new insight into the role of antimicrobial proteins-alarmins in the immunopathogenesis of psoriasis." *J Immunol Res* **2014**: 628289.
- Bokarewa, M. I., T. Jin, et al. (2003). "Intraarticular release and accumulation of defensins and bactericidal/permeability-increasing protein in patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **30**(8): 1719-1724.
- Braff, M. H., A. Bardan, et al. (2005). "Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides." *J Invest Dermatol* **125**(1): 9-13.
- Celis, J. E., D. Cruger, et al. (1990). "A two-dimensional gel protein database of noncultured total normal human epidermal keratinocytes: identification of proteins strongly up-regulated in psoriatic epidermis." *Electrophoresis* **11**(3): 242-254.
- Clarkson, D. B., Fan, Y. and Joe, H. (1993). "An Algorithm for Performing Fisher's Exact Test in $r \times c$ Contingency Tables." *ACM Transactions on Mathematical Software* **19**: 484-488.
- Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N. (1941). "Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group." *Proc Soc Exp Biol Med* **47**: 200-202.
- Cretu, D., I. Prassas, et al. (2014). "Identification of psoriatic arthritis mediators in synovial fluid by quantitative mass spectrometry." *Clin Proteomics* **11**(1): 27.

- de Lange-Brokaar, B. J., A. Ioan-Facsinay, et al. (2012). "Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review." *Osteoarthritis Cartilage* **20**(12): 1484-1499.
- de Seny, D., M. Fillet, et al. (2008). "Monomeric calgranulins measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis." *Clin Chem* **54**(6): 1066-1075.
- Ehrchen, J. M., C. Sunderkotter, et al. (2009). "The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer." *J Leukoc Biol* **86**(3): 557-566.
- Fisher, R. and F. Yates (1948). *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*. London, Oliver & Boyd: 26-27.
- Frohm, M., B. Agerberth, et al. (1997). "The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders." *J Biol Chem* **272**(24): 15258-15263.
- Gläser, R., J. Harder, et al. (2005). "Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection." *Nat Immunol* **6**(1): 57-64.
- Gu, J., E. Marker-Hermann, et al. (2002). "A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthritis patients." *Rheumatology (Oxford)* **41**(7): 759-766.
- Harder, J., J. Bartels, et al. (1997). "A peptide antibiotic from human skin." *Nature* **387**(6636): 861.
- Harder, J., J. Bartels, et al. (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem. United States.* **276**: 5707-5713.
- Harder, J., R. Gläser, et al. (2007). "The role and potential therapeutical applications of antimicrobial proteins in infectious and inflammatory diseases." *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **7**(2): 75-82.
- Harder, J. and J. M. Schröder (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem. United States.* **277**: 46779-46784.
- Harder, J. and J. M. Schröder (2005). "Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins." *J Leukoc Biol* **77**(4): 476-486.
- Harris, E. D., Jr. (1990). "Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy." *N Engl J Med* **322**(18): 1277-1289.

- Hegyí, Z., S. Zwicker, et al. (2012). Vitamin D Analog Calcipotriol Suppresses the Th17 Cytokine-Induced Proinflammatory S100 "Alarmins" Psoriasin (S100A7) and Koebnerisin (S100A15) in Psoriasis. *J Invest Dermatol*, United States. **132**: 1416-1424.
- Henes, J. C., E. Ziupa, et al. (2014). "High prevalence of psoriatic arthritis in dermatological patients with psoriasis: a cross-sectional study." *Rheumatol Int* **34**(2): 227-234.
- Henseler, T. and E. Christophers (1995). Disease concomitance in psoriasis. *J Am Acad Dermatol*, United States. **32**: 982-986.
- Hsu, S. M., L. Raine, et al. (1981). "Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures." *J Histochem Cytochem* **29**(4): 577-580.
- Jansen, P. A., D. Rodijk-Olthuis, et al. (2009). "Beta-defensin-2 protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin." *PLoS One* **4**(3): e4725.
- Kane, D., J. Roth, et al. (2003). "Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis." *Arthritis Rheum* **48**(6): 1676-1685.
- Kang, K. Y., J. W. Woo, et al. (2014). "S100A8/A9 as a biomarker for synovial inflammation and joint damage in patients with rheumatoid arthritis." *Korean J Intern Med* **29**(1): 12-19.
- Kerkhoff, C., A. Voss, et al. (2012). "Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology." *Exp Dermatol* **21**(11): 822-826.
- Krenn, V., L. Morawietz, et al. (2006). "Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis." *Histopathology* **49**(4): 358-364.
- Kruithof, E., D. Baeten, et al. (2005). "Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthritis more than it does rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* **7**(3): R569-580.
- Lande, R., G. Chamilos, et al. (2014). "Cationic antimicrobial peptides in psoriatic skin cooperate to break innate tolerance to self-DNA." *Eur J Immunol*.
- Lande, R., J. Gregorio, et al. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide." *Nature* **449**(7162): 564-569.
- Larrick, J. W., M. Hirata, et al. (1995). "Anti-microbial activity of human CAP18 peptides." *Immunotechnology* **1**(1): 65-72.
- Lee, D. G., J. W. Woo, et al. (2013). "MRP8 promotes Th17 differentiation via upregulation of IL-6 production by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis." *Exp Mol Med* **45**: e20.

- Lee, Y., S. Jang, et al. (2012). "S100A8 and S100A9 are messengers in the crosstalk between epidermis and dermis modulating a psoriatic milieu in human skin." *Biochem Biophys Res Commun* **423**(4): 647-653.
- Lehrer, R. I. (2004). "Primate defensins." *Nat Rev Microbiol* **2**(9): 727-738.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, 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**(10): 2271-2279.
- Madsen, P., H. H. Rasmussen, et al. (1991). "Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin." *J Invest Dermatol* **97**(4): 701-712.
- Mease, P. J. and A. W. Armstrong (2014). "Managing patients with psoriatic disease: the diagnosis and pharmacologic treatment of psoriatic arthritis in patients with psoriasis." *Drugs* **74**(4): 423-441.
- Menon, B., N. J. Gullick, et al. (2014). "Interleukin-17+CD8+ T cells are enriched in the joints of patients with psoriatic arthritis and correlate with disease activity and joint damage progression." *Arthritis Rheumatol* **66**(5): 1272-1281.
- Namimatsu, S., M. Ghazizadeh, et al. (2005). Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: a universal antigen retrieval method. *J Histochem Cytochem. United States.* **53**: 3-11.
- Nestle, F. O., D. H. Kaplan, et al. (2009). "Psoriasis." *N Engl J Med* **361**(5): 496-509.
- Niyonsaba, F., H. Ushio, et al. (2007). "Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines." *J Invest Dermatol* **127**(3): 594-604.
- Nukui, T., R. Ehama, et al. (2008). "S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes." *J Cell Biochem* **104**(2): 453-464.
- Oppenheim, J. J. and D. Yang (2005). "Alarmins: chemotactic activators of immune responses." *Curr Opin Immunol* **17**(4): 359-365.
- Paulsen, F., T. Pufe, et al. (2002). "Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes." *J Pathol* **198**(3): 369-377.
- Presicce, P., S. Giannelli, et al. (2009). "Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91." *J Leukoc Biol* **86**(4): 941-948.
- R-Core-Team (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing.

- Reich, K., K. Kruger, et al. (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**(5): 1040-1047.
- Riepl, B., S. Grassel, et al. (2010). "Tumor necrosis factor and norepinephrine lower the levels of human neutrophil peptides 1-3 secretion by mixed synovial tissue cultures in osteoarthritis and rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* **12**(3): R110.
- Shi, S. R., R. J. Cote, et al. (2001). "Antigen retrieval techniques: current perspectives." *J Histochem Cytochem* **49**(8): 931-937.
- Simanski, M., F. Rademacher, et al. (2013). "IL-17A and IFN-gamma synergistically induce RNase 7 expression via STAT3 in primary keratinocytes." *PLoS One* **8**(3): e59531.
- Soehnlein, O., Y. Kai-Larsen, et al. (2008). "Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages." *J Clin Invest* **118**(10): 3491-3502.
- Takeichi, T., K. Sugiura, et al. (2010). "Overexpression of LEDGF/DFS70 induces IL-6 via p38 activation in HaCaT cells, similar to that seen in the psoriatic condition." *J Invest Dermatol* **130**(12): 2760-2767.
- Tewary, P., G. de la Rosa, et al. (2013). "beta-Defensin 2 and 3 promote the uptake of self or CpG DNA, enhance IFN-alpha production by human plasmacytoid dendritic cells, and promote inflammation." *J Immunol* **191**(2): 865-874.
- van Lent, P. L., L. Grevers, et al. (2008). "Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis." *Ann Rheum Dis* **67**(12): 1750-1758.
- Vandamme, D., B. Landuyt, et al. (2012). "A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide." *Cell Immunol* **280**(1): 22-35.
- Varoga, D., E. Klostermeier, et al. (2009). "The antimicrobial peptide HBD-2 and the Toll-like receptors-2 and -4 are induced in synovial membranes in case of septic arthritis." *Virchows Arch* **454**(6): 685-694.
- Werner, M., A. Chott, et al. (2000). "Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry." *Am J Surg Pathol* **24**(7): 1016-1019.
- Wittersheim, M., J. Cordes, et al. (2013). "Differential expression and in vivo secretion of the antimicrobial peptides psoriasin (S100A7), RNase 7, human beta-defensin-2 and -3 in healthy human skin." *Exp Dermatol* **22**(5): 364-366.
- Wolf, R., O. M. Howard, et al. (2008). "Chemotactic activity of S100A7 (Psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation with highly homologous but functionally distinct S100A15." *J Immunol* **181**(2): 1499-1506.

- Yang, D. and J. J. Oppenheim (2004). "Antimicrobial proteins act as "alarmins" in joint immune defense." *Arthritis Rheum* **50**(11): 3401-3403.
- Youssef, P., J. Roth, et al. (1999). "Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane." *J Rheumatol* **26**(12): 2523-2528.
- Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." *Nature* **415**(6870): 389-395.
- Zheng, Y., F. Niyonsaba, et al. (2008). "Microbicidal protein psoriasin is a multifunctional modulator of neutrophil activation." *Immunology* **124**(3): 357-367.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Regine Gläser, für die Überlassung dieses spannenden Themas und die ausgezeichnete Betreuung bedanken. Dank ihrer Begeisterung, ihrer Motivation, ihres Engagements und ihrer absoluten Zuverlässigkeit ist diese Arbeit möglich geworden. Ich bin sehr dankbar, dass ich Teil ihrer Arbeitsgruppe sein durfte.

Des Weiteren möchte ich Frau Christel Martensen-Kerl für die exzellente Einführung in die Arbeitstechniken danken. Ihre stetige Hilfsbereitschaft und nette Zusammenarbeit haben das Gelingen der Experimente ermöglicht.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Harder für seine Diskussionsbereitschaft, Hilfe und die immer neuen Ideen.

Für die Bereitstellung der Proben und die gute Zusammenarbeit bei der Erstellung von Veröffentlichungen möchte ich Prof. Dennis McGonagle, Dr. Richard Cuthbert und Karen Henshaw aus Leeds, England, danken. Die vielen Diskussionen haben sehr viel Spaß gemacht.

Sehr dankbar bin ich Anne-Kathrin Fiege für die Hilfe bei der Beurteilung der Präparate, ihre Geduld und Motivation.

Ebenso dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. med. Ivo Leuschner für die fachkundige Mitbeurteilung der Synovialispräparate.

Dankbar bin ich ebenfalls Herrn Dipl. Inform. Jürgen Hedderich für die fachkundige Beratung im Bereich Statistik.

Danken möchte ich außerdem Herrn Prof. Dr. med. Thomas Schwarz für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Universitäts-Hautklinik Kiel.

Für die nette Atmosphäre im Labor möchte ich außerdem Vera, Gela, Bente und Steffi danken.

Mein Dank gilt außerdem meiner Familie – meinen Eltern und Geschwistern, die mich immer unterstützen, und meinem Daniel für seine geduldige Hilfe in allen Layout- und Softwarefragen und seine Unterstützung und Motivation. Meiner Tochter Sophia möchte ich für ihre verlässlichen Schlaf- und Wachphasen danken, die mir genug Zeit für die Arbeit ließen und Freude in den Pausen gemacht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Henrike Edith Tessie Bierkarre, geb. Kosfeld
Geboren am 20. April 1987 in Westerland/Sylt

Schulische Ausbildung

08/1993 – 07/1997	Hochtorgrundschule, Neustadt in Holstein
08/1997 – 01/2004	Kreisgymnasium, Neustadt in Holstein
01/2004 – 07/2004	Hillcrest High School, Hamilton, Neuseeland
07/2004 – 06/2006	Abitur am Ostseegymnasium Timmendorfer Strand

Hochschulausbildung

10/2006 – 12/2012	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2008	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2009	Beginn der Doktorarbeit in der Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Kiel bei Frau Prof. Dr. Regine Gläser
Sommersemester 2011	Erasmus-Auslandssemester in Amiens, Frankreich
Praktisches Jahr 2011/12	Dermatologie – Universitätsklinik Kiel Innere Medizin – Flensburger Kliniken Chirurgie – Northern General Hospital, Sheffield, England
12/2012	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ärztliche Weiterbildung

Seit 01/2015	Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie des Städtischen Klinikums Braunschweig
--------------	--

Veröffentlichungen

Originalarbeit:

Henrike Bierkarre, Jürgen Harder, Richard Cuthbert, Paul Emery, Richard Reece, Ivo Leuschner, Ulrich Mrowietz, Jürgen Hedderich, Dennis McGonagle, Regine Gläser (2016): Differential Expression of Antimicrobial Peptides in Psoriasis and Psoriatic Arthritis as a Novel Contributory Mechanisms for Skin and Joint Disease Heterogeneity, *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2016;45(3): 188-96. DOI 10.3109/03009742.2015.1091497

Abstract:

H. Kosfeld, I. Leuschner, J. Harder, U. Mrowietz, R. Cuthbert, K. Henshaw, P. Emery, D. Varoga, T. Pufe, R. Reece, D. McGonagle and R. Gläser (2011): Differential expression of antimicrobial peptides in synovial tissue of psoriatic arthritis indicating a diverse pathogenetic concept of skin and joint disease? *Experimental Dermatology* 20: 185-18
Posterpräsentation bei der Jahrestagung der ADF (Arbeitsgruppe dermatologischer Forschung) in Tübingen