

Aus der Hautklinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Immunhistochemische Analyse der Psoriasis Pustulosa Generalisata

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Kyra Berenike Hammer  
Aus Bad Kreuznach

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild  
1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Ernst Schopf  
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Andreas Schwarting  
  
Tag der Promotion: 10. Juni 2025

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung .....	6
1.1	Einführung zu psoriatischen Erkrankungen .....	6
1.2	Epidemiologie .....	7
1.3	Pathogenese und Genetik.....	8
1.4	Das Krankheitsbild samt Komorbiditäten.....	11
1.5	Histologie.....	14
1.6	Diagnose .....	15
1.7	Differentialdiagnosen.....	16
1.8	Therapie und Prognose .....	17
2.	Zielsetzung .....	19
3.	Material.....	20
3.1	Herstellung der Paraffinschnitte .....	20
3.2	Immunhistochemische Färbungen.....	21
3.3	Antikörperauswahl.....	21
3.4	Auswertung (Auszählen und Fotografieren).....	24
4.	Methoden .....	24
4.1	Patientenauswahl .....	24
4.2	Probengewinn.....	25
4.3	Herstellung der Paraffinschnitte .....	25
4.3.1	Fixierung .....	25
4.4	Einführung in die Immunhistochemie .....	26
4.4.1	Definition.....	26
4.4.2	Antikörperherkunft.....	26
4.4.3	Antikörpernachweis und Anfärbung .....	28
4.4.4	Färben .....	31
4.5	Biopsatanalyse .....	33

4.5.1 Bilderdokumentation .....	33
4.5.2 Bildanalyse.....	34
5 Ergebnisse .....	37
5.1 Bilder histologischer Schnitte und Antikörperverteilung bei PPG Patienten .....	37
Patient 1 .....	37
Patient 2 .....	39
Patient 3 .....	41
Patient 4 .....	43
Patient 5 .....	45
Patient 6 .....	47
Patient 7 .....	49
Patient 8 .....	51
Patient 9 .....	53
Patient 10 .....	55
Patient 11 .....	57
Patient 12 .....	59
Patient 13 .....	61
5.2 Bilder histologischer Schnitte und Antikörperverteilung der Kontrollproben .....	63
Patient 14 .....	63
Patient 15 .....	65
Patient 16 .....	67
Patient 17 .....	69
Patient 18 .....	71
Patient 19 .....	73
5.3 Überblickaufnahmen für repräsentative Patienten aus jeder Gruppe..	75
5.4 Antikörperverteilung: Vergleich der gemittelten Werte bei den verschiedenen Antikörpern.....	77
6 Diskussion .....	81

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	81
6.2 Diskussion der Methoden.....	82
6.3 Diskussion der Ergebnisse .....	84
7 Zusammenfassung.....	86
8 Anhang.....	89
8.1 Histologische Übersichtsaufnahmen in HE-Färbung .....	89
8.1.1 Patienten mit PPG .....	90
8.1.2 Patienten der Kontrollgruppe .....	103
9 Tabellen- & Abbildungsverzeichnis.....	109
10 Literaturverzeichnis.....	111
11 Danksagung.....	115
12 Lebenslauf.....	116

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
Bzw	Beziehungsweise
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FOX-P3	Forkhead-Box-Protein P3, Scurfin
HLA	Human leukocyte antigen
IDZ	Interdigitierende dendritische Retikulumzellen
IL	Interleukin
INF	Interferon
JAK3	Januskinase 3
MHC	major histocompatibility complex
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
pH	Potentia Hydrogenii
PPG	Psoriasis pustulosa generalisata
PPP	Psoriasis pustulosa palmoplantaris
PV	Psoriasis vulgaris
PSORS	Psoriasis susceptibility loci
R	Rezeptor
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# 1. Einleitung

## 1.1 Einführung zu psoriatischen Erkrankungen

Psoriasis ist eine dermatologische Erkrankung, die umgangssprachlich als Schuppenflechte Bekanntheit erlangt hat. Bereits vor 150 Jahren wurde sie beschrieben und von Seuchen wie Lepra klar abgegrenzt (1). Die Haut der betroffenen Patienten zeichnet sich durch schuppene Herde aus, welche oftmals einen Pruritus mit sich ziehen (2, S. 364). Dies erklärt den Namen Psoriasis, welcher sich vom altgriechischen „psóra“ herleitet, was mit Krätze übersetzt werden kann.

Als autoimmunologisch bedingte, genetisch prädisponierte Erkrankung ist die Psoriasis nicht infektiös und kann kontinuierlich oder aber schubweise verlaufen. Die psoriatischen Plaques zeigen sich als abgegrenzte, erythematöse Hautveränderungen mit silbrig-weißer Schuppung und entstehen aufgrund einer überschießenden Immunreaktion, die eine stark vermehrte Produktion der Epidermis nach sich zieht, welche Auswirkung der lokalen Entzündungsreaktion ist. Zusätzlich findet sich bei 10-30% der Betroffenen eine seronegative psoriatische Arthritis (3, S. 505).

Aufgrund der sichtbaren Hautveränderungen leiden die Betroffenen oftmals unter Stigmatisierung, da Mitmenschen ungerechtfertigter Weise Ansteckungsgefahr befürchten. Komorbiditätsbedingt ist dadurch die Prävalenz von Depressionen und Angststörungen erhöht. Aber auch physische Komorbiditäten sind mit Psoriasis assoziiert, wie das metabolische Syndrom und weitere kardiovaskuläre Erkrankungen (4).

Obwohl sich Psoriasis selten ab Geburt oder im hohen Lebensalter erstmanifestiert, kann sie in jedem Alter auftreten. Die Hälfte der Betroffenen erkrankt vor dem 22. Lebensjahr und neun von zehn Patienten haben Schuppenflechte erstmals vor dem 50. Lebensjahr. Weiterhin differenzieren kann man hier zwei Typen, die sich im Alter ihrer Erstmanifestation unterscheiden und denen unterschiedliche Ätiologien zugrunde liegen. Beim häufigeren, familiär vermehrten, als Frühtypen bezeichneten Typ 1, liegt der Erkrankungsbeginn zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahrzent, während die Krankheit bei Typ 2 erst 20 bis 30 Jahre später beginnt (2, S. 362, 5).

Zur Gruppe der psoriatischen Hauterkrankungen zählt neben der Psoriasis vulgaris (PV) auch die Psoriasis pustulosa generalisata und palmoplantaris, kurz PPG und PPP. PPG, die 1910 erstmals durch Zumbusch beschrieben wurde, ist daher auch als Typ Zumbusch bekannt (6). Auf ihr liegt der Fokus des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Bei der PPG handelt es sich um eine besonders schwerwiegende, durchaus lebensbedrohliche Form der Schuppenflechte, die sich im Gegensatz zur Psoriasis pustulosa palmoplantaris an allen Körperstellen außer Hand- und Fußflächen manifestieren kann. Obwohl sie mit der Psoriasis vulgaris assoziiert ist, steht in der Diskussion ob die PPG nicht eigene Entität hat. Die genaue Beziehung zwischen PPG und PV ist noch nicht gänzlich geklärt.

Es treten eitrige, sterile Pusteln auf geröteter, ödematöser Haut auf, die von Fieber und generellem Krankheitsgefühl begleitet werden, was stationäre Behandlung im akuten Schub nötig machen kann (2, S. 382, 3, S. 510).

Eine PPG kann auch nur in der Schwangerschaft auftreten und heißt dann Impetigo herpetiformis. Meist manifestiert sie sich im dritten Trimenon und klingt postpartal wieder ab (7).

Komorbiditäten die speziell mit der pustulösen Form einhergehen können, sind entzündliche Erkrankungen der Augen. Im Speziellen Conjunctivitis, Iritis sowie Uveitis, aber auch eine lingua geographica (8).

## 1.2 Epidemiologie

Die weltweite Prävalenz von Psoriasis beträgt 2%, eine Häufung zeigt sich allerdings in der Weißen, Kaukasischen und Skandinavischen Bevölkerung, in Norwegen 8,5%, während sich in der Asiatischen und Afrikanischen Bevölkerung eine verringerte Prävalenz zeigt, so zum Beispiel 0% in Taiwan (9). Dies ist auf die genomischen Ähnlichkeiten innerhalb einer Ethnizität zurückzuführen.

Diese hohe Prävalenz macht Schuppenflechte zu einer der häufigsten Hauterkrankungen. Damit einhergeht eine große finanzielle und sozioökonomische Last im Gesundheitssystem. So verursacht ein Psoriasis Patient 116% mehr Ausgaben als ein Patient aus der Kontrollgruppe in einer dänischen nationalen Studie (10).

Während die Psoriasis vulgaris mit einer Prävalenz von 1,5-2,5% eine häufige dermale Erkrankung ist, von der das weibliche Geschlecht etwas weniger betroffen ist als das männliche, ist die Psoriasis pustulosa generalisata eine weitaus seltenere Erkrankung, bei der eine Inzidenz von 0,2/100.000 vorliegt.

Studien berichten über einer Prävalenz von 1,76/Million in Frankreich und bis zu 7,46/Million in Asien, was gegensätzlich zur generellen Prävalenz von psoriatischen Erkrankungen ist, die in der kaukasischen Bevölkerung am höchsten ist (2, S. 362 u. 382, 11, 12).

0,7% - 7% aller psoriatischen Erkrankungen von Kindern und Jugendlichen lassen sich auf PPG zurückführen, auch hier sind Jungen öfter betroffen. Bei Erwachsenen sind es 5% (6, 13, S. 56). Mehr als 59% der an PPG erkrankten sind gleichzeitig auch von PV betroffen, ein Zusammenhang der Erkrankungen ist trotz der eigenen Entität also wahrscheinlich (14). Zwischen dem ersten Auftreten von PV und PPG können bis zu 20 Jahre vergehen. Diese Zeit nennt man präpustuläre Dauer (7).

### 1.3 Pathogenese und Genetik

Dass der Ausbruch der Schuppenflechte eine genetische Komponente innehat, wird klar, wenn man Studien betrachtet, die sich mit dem intrafamiliären Auftreten von Psoriasis beschäftigen. Zwillingsstudien konnten zeigen, dass unter monozygoten Zwillingen eine Korrelation der Erkrankung von 70% besteht, bei dizygoten Zwillingen 15-30% und jeder dritte Betroffene einen nahen Verwandten mit der Erkrankung hat. Die Vererbung ist multifaktoriell (15-18).

Wenn eine genetische Disposition vorhanden ist, muss es nicht zwingend zum Ausbruch kommen. Als solche genetische Disposition zählt das Allel HLA-Cw\*0602. Liegt es bei Individuen homozygot vor, haben sie ein dreifach erhöhtes Risiko zu erkranken, verglichen zu eben solchen, bei denen das Allel heterozygot vorliegt. Ebenso manifestiert sich die Erkrankung bei den homozygoten Genotypen in früheren Lebensjahren (19).

Kommen Risikofaktoren hinzu, wird ein Ausbruch von PPG wahrscheinlicher. Zu diesen gehören beispielsweise:

- Infektionen mit dem Varizella-Zoster-Virus oder Epstein-Barr sowie Pilzkrankungen der Haut und dies betreffende Erkrankungen durch einen Staphylococcus aureus,
- plötzliches Absetzen von Glucocorticoiden,
- Schwangerschaft, hier heißt es Impetigo herpetiformis,
- Medikamente wie Lithium, Jod aber auch Antibiotika wie Penicillin,
- Strahlen- und Phototherapien,
- Impfungen,
- Elektrolytentgleisungen, insbesondere jene, die den Calciumhaushalt betreffen (6, 8, 20, 21).

Obwohl die Genese von psoriatischen Erkrankungen noch nicht gänzlich klar ist, weiß man, dass ihnen eine Vielzahl von Dysregulationen im kutanen Gewebe zugrunde liegen. Die Entzündungsreaktion wird zwar hauptsächlich über T-Lymphozyten vermittelt, aber auch Makrophagen und Neutrophile Granulozyten tragen zu der stark überschießenden Proliferation der Keratinozyten bei, die das klinische Bild prägen. Diese Komplexität an Beteiligung der verschiedenen immunologisch aktiven Zellen erschwert die Differenzierung der Pathogenese weiterhin (1, 2, S. 368, 22).

Bereits 1979 konnte durch den Einsatz von Cyclosporin A als immunsuppressiv wirksames Medikament gegen Psoriasis nachgewiesen werden, dass Psoriasis nicht nur den Keratinozyten betrifft, sondern eine Erkrankung des gesamten Immunsystems ist, auch wenn bislang kein Autoantigen gefunden werden konnte (23).

Wie anfangs erwähnt, existiert ein familiär gehäufte Fröhotyp der Erkrankung. Vornehmlich bei diesem konnten bisher 19 verschiedene Genloci entdeckt werden, sogenannte „psoriasis susceptibility loci“ (PSORS), die mitunter für das Krankheitsgeschehen verantwortlich gemacht werden (24).

PSORS1, der auf Chromosom 6p21 liegt, wird hier die bislang größte Rolle zugeschrieben. Einigkeit besteht, dass dieser für Teile des major histocompatibility complex (MHC) codiert (25). Hierbei handelt es sich um ein System aus Glykoproteinen und dazugehörigen Rezeptoren, die es dem

gesunden, unspezifischen Immunsystem ermöglichen, fremde oder kranke von eigenen, gesunden Zellen zu entscheiden.

Wenn an Psoriasis erkrankte Menschen ihr Knochenmark und somit auch ihre Th-Zellen für Menschen spendeten, die dieses aufgrund anderer Ursachen benötigten, kam es zum Ausbruch der Schuppenflechte bei vorher nicht Betroffenen. Andersherum konnten Betroffene dieser Hauterkrankung aber auch koinzidentuell, durch Knochenmarkspende Gesunder, von Psoriasis geheilt werden, was durch die Beteiligung der Th-Zellen erklärbar ist (26, 27).

Es handelt sich um eine T1-Helferzellen vermittelte Erkrankung, denn von CD4<sup>+</sup> T1-Helferzellen exprimierte proinflammatorische Zytokine wie Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-12 konnten aus psoriatisch veränderter Haut gewonnen werden, während für Th2-Zellen spezifische Zytokine nicht gefunden werden konnten. Th1-Zellen vermitteln allerdings nicht die sichtbare Proliferation der Keratinozyten (22, 28).

Für die Proliferation der Keratinozyten zuständig sind mitunter die Th17-Zellen und ihre produzierten Zytokine. Gesunde Epidermis erneuert sich alle 26-28 Tage. Psoriatische Haut hingegen benötigt dazu, getriggert unter anderem durch IL-6, IL-8, IL-17 und vor allem IL-22, nur 3-4 Tage. Die Mitose wird gesteigert, Keratinozyten hyperplasieren und gelangen schneller an die Hautoberfläche (22, 29, 30).

Obwohl die Vermutung besteht, dass PV und PPG Krankheiten unterschiedlicher Entität sind, findet man auch beim Vergleich der Serumspiegel der Zytokine Gemeinsamkeiten.

Signifikant erhöhte INF- $\gamma$  Konzentrationen finden sich also auch im Blut der Patienten. Unterschiede findet man hier zwischen den verschiedenen Typen der Psoriasis. In der Kontrollgruppe liegt die INF- $\gamma$  Blutkonzentration bei  $0.91 \pm 0.38$  pg/mL. Bei PV ist die Konzentration des INF- $\gamma$  mit  $2.15 \pm 0.30$  pg/mL am höchsten, während sie bei der Psoriasis Pustulosa am wenigsten erhöht ist, mit  $1.08 \pm 0.21$  pg/mL (31).

Bei der PV sind die Serum Konzentrationen von IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-17, IL18, IL-23, IL-36, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und VEGF erhöht. Bei der PPG findet man ebenso erhöhte Spiegel an TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A/F, IL-23, wenngleich auch nicht so stark wie bei der PV. (32, 33) Dahingegen sind die IL-1 und IL-36 Serumkonzentrationen bei PPG höher als bei der PV (20).

Für die PPG gilt, dass nicht nur der Serumspiegel des IL-36 erhöht ist, sondern sich ebenso eine erhöhte Konzentration im betroffenen Hautgewebe zeigt. Es konnte eine missense Mutation im Gen, welches für diesen Antagonisten des Rezeptors kodiert, den IL-36RN, detektiert werden (34). Dadurch kommt es zum Funktionsverlust des Rezeptorantagonisten und damit einhergehend zu einer zügellosen IL-36 Aktivität (35).

Die proinflammatorische Wirkung des Zytokins wird durch eine Anlockung weiterer Neutrophiler Granulozyten und verstärkter Expression von IL-1, IL-6 und IL-8 erreicht. 81% der untersuchten PPG Patienten stellten sich als homozygot für die Mutation dar (36).

#### 1.4 Das Krankheitsbild samt Komorbiditäten

Das klinische Bild einer Psoriasis pustulosa generalisata kann unterschiedlich sein, da die Krankheit in synchronen Schüben verläuft.

Während eines Schubs entstehen erst makroskopisch sichtbare, oberflächliche, sterile Pusteln mit stecknadelkopfgroßer Größe auf ödematös geschwollener und erythematös veränderter Haut, die einen Großteil der Körperoberfläche betreffen können, vgl. Abb.1. Während diese anfangs noch gut abgrenzbar sind, kann es im Verlauf zu einem Verschmelzen der Pusteln kommen, was zu großflächigen eitrig, schmerzhaften Arealen führt (7, 37).

Die Pusteln enthalten eine Vielzahl an Neutrophilen Granulozyten. Auftreten können sie mit und ohne psoriatischen Plaques, vgl. Abbildung 3a-e. Patienten klagen über Schmerzen und Juckreiz (2, S. 382, 3, S. 510, 37). Zwar können die Pusteln am ganzen Körper auftreten, begrenzen sie sich aber auf Hand- und Fußflächen, spricht man von der palmoplantaren Psoriasis pustulosa, die einen eigenen Krankheitswert hat, vgl. Abb. 2c.

Die PPG begrenzt sich aber nicht ausschließlich auf die Haut. Die Erkrankung verläuft systemisch, sie wird von starkem Fieber, Appetitlosigkeit und damit einhergehendem Gewichtsverlust, generellem Unwohlsein, Myalgien, Arthralgien, erhöhter Blutsenkungsgeschwindigkeit, Hypoalbuminämie und einer ausgeprägten Leukozytose begleitet. Weitere Komplikationen können

Hyperthermie, Elektrolytentgleisungen, Leber- und Nierenversagen sein (7, 38, 39).

Diese Begleiterscheinungen sind gefürchtet und machen stationäre Aufnahme oft unumgänglich, da unbehandelt ein Tod durch Herzversagen eintreten kann. Durch die systemische Beteiligung kann der geschwächte Patient Pneumonien und Sepsen entwickeln (3, S. 510, 40).

PPG ist somit eine der schwerwiegendsten mit Schuppenflechte assoziierten Erkrankungen.

Oftmals dauern die Schübe zwischen Tagen und Wochen an, bevor es zur Spontanremission kommt. Die Pusteln platzen und hinterlassen von Desquamation geprägte, gerötete Areale, die eine epidermale Nekrose nach sich ziehen können und das Risiko einer Sepsis erhöhen (7). Zwischen den einzelnen Schüben können einige Jahre bis Jahrzehnte vergehen.

Wie bereits in der Einführung erwähnt gibt es häufige Komorbiditäten, denen Gehör geschenkt werden muss, da sie auch mit dem Erscheinungsbild des Patienten einhergehen und behandlungswürdig sein können.

Signifikant ist die body-mass-index (BMI) Erhöhung, verglichen zur Kontrollgruppe. Zudem ist nachgewiesen, dass sich starke Adipositas zusätzlich negativ auf das Krankheitsbild auswirkt, ein circulus vitiosus also (41, 42).

Damit geht ein erhöhtes Risiko für das metabolische Syndrom einher, also auch für Diabetes mellitus Typ2, erhöhte Blutfette, Hyperurikämie, aber insbesondere kardiovaskuläre Probleme und Arteriosklerose, welche mit der generalisierten Inflammation korrelieren (43, 44).

Einen Blick sollte man auch auf die Psyche werfen, denn nicht nur das körperliche Wohlbefinden des psoriatischen Patienten kann leiden. Der Leidensdruck ist hoch, die Hautveränderungen sind oft offensichtlich, das Selbstbewusstsein schwindet. Patienten verspüren den Drang ihre Symptome zu verstecken, was die Tendenz zur sozialen Distanzierung mit sich bringt und auf vielen Ebenen des täglichen Lebens Einfluss nimmt (45). Bei einem Drittel der Erkrankten entwickeln sich dadurch, also komorbiditätsbedingt, Depressionen oder depressiven Verstimmungen (46, 47).



Abbildung 1 Akuter Schub einer PPG; International Journal of Dermatology, Volume: 53, Issue: 6, Pages: 676-684, First published: 22 August 2013, DOI: (10.1111/ijd.12070)

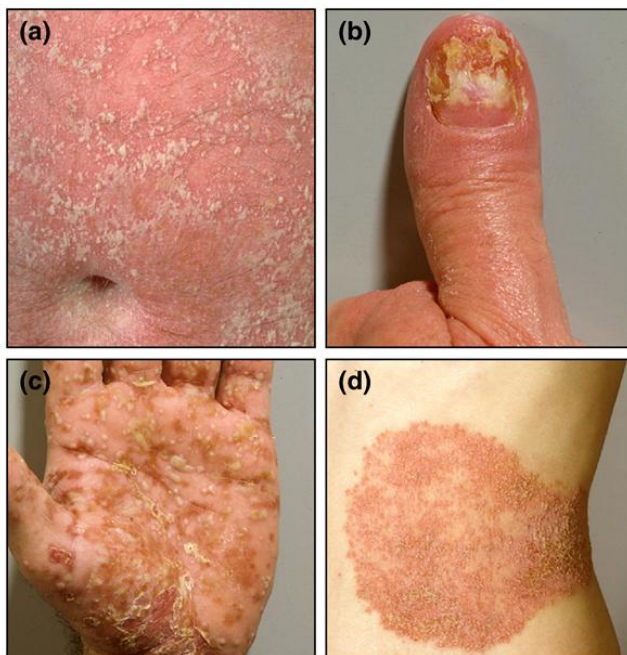


Abbildung 2 Generalized pustular psoriasis (a), Acrodermatitis continua of Hallopeau (b), Palmoplantar pustulosis (c) and an unclear case of a single episode of a sterile, localized pustular eruption that would be classified as undifferentiated pustulosis (d).

Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, Volume: 31, Issue: 11, Pages: 1792-1799, First published: 06 June 2017, DOI: (10.1111/jdv.14386)

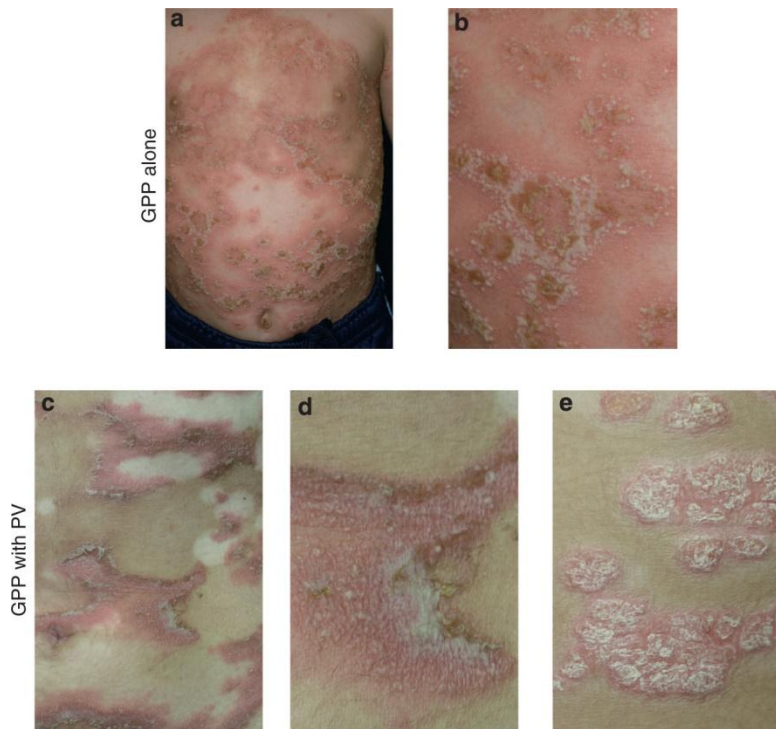


Abbildung 3 Representative clinical features of the two subtypes of generalized pustular psoriasis (GPP): GPP alone and GPP with psoriasis vulgaris (PV). (a, b) GPP alone patient (Patient 2). Pustules on background erythema are seen on the trunk. (c–e) GPP with PV patient (Patient 12). Both pustular lesions (c, d) and psoriatic plaques (e) are observed on the trunk at different times.

J Invest Dermatol 2013 1332514-2521DOI: (10.1038/jid.2013.230) Copyright © 2013 The Society for Investigative Dermatology, Inc

## 1.5 Histologie

Unterhalb des stratum corneum finden sich bei der PPG im mikroskopischen Bild Anhäufungen von mit Neutrophilen Granulozyten gefüllten Pusteln. Als Kardinalsymptome der Psoriasis tragen sie die Namen „Kogoj’s spongiform pustules“ und „Munro's subcorneal microabscesses“ (48, 49). Das klassische Bild zeigt eine sterile Entzündung, also keine Infiltration von Bakterien oder Pilzen, auch wenn diese zusätzlich als Superinfektion auftreten können. Die Keratinozyten sind geschwollen, hyperplasiert und morphologisch verändert, vgl. Abbildung 4a. In der oberen Dermis sind Monozyten und Makrophagen eingewandert. Die ödematöse Schwellung und Zelleinwanderung von immunologischen Zellen findet sich zwar ebenso bei der PV, ist bei der PPG aber noch prominenter. Auch bei der PPG sind die Reteleisten der Epidermis

verlängert und die versorgenden Kapillaren erweitert, vgl. Abbildung 4 b (8, 14, 37, 38).

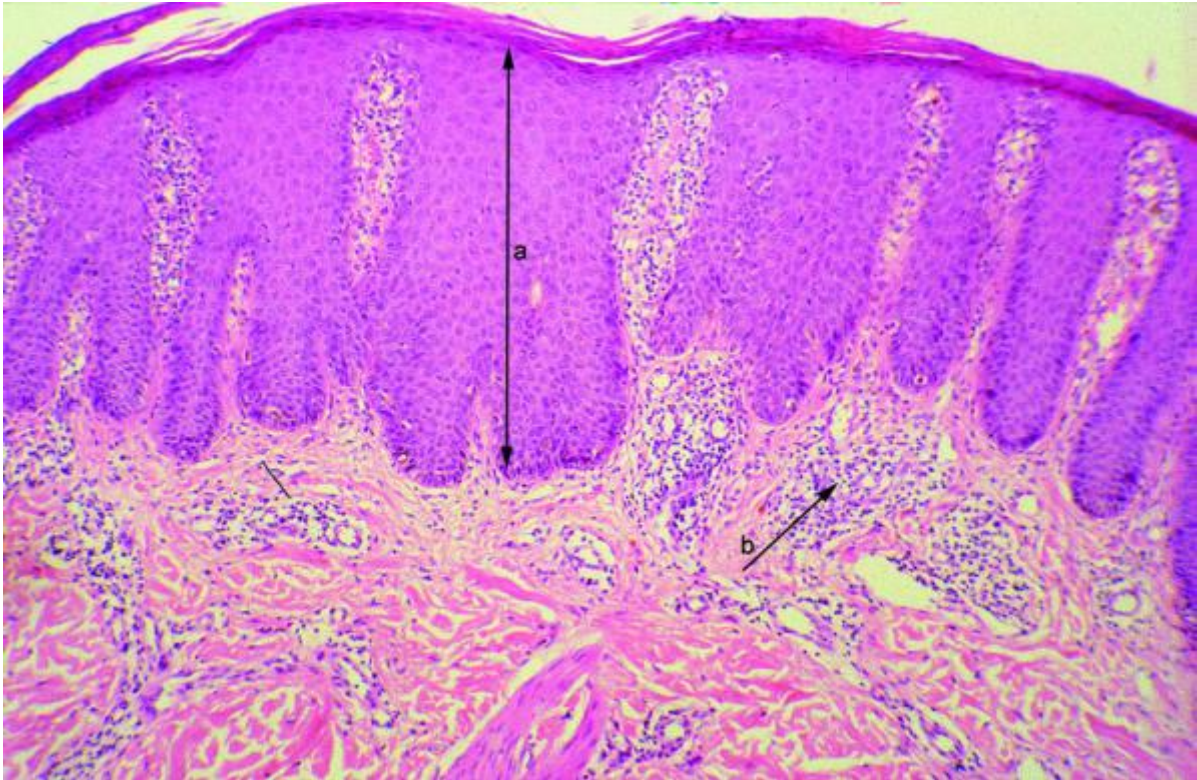


Abbildung 4 Histologisches Bild psoriatisch veränderter Haut, a: proliferierte Keratinozyten, b: Leukozyten Infiltration und Angiogenese

BMJ. 2006 Aug 19; 333(7564): 380–384. doi: 10.1136/bmj.333.7564.380 Copyright © 2006, BMJ Publishing Group Ltd

## 1.6 Diagnose

Da bislang kein psoriasispezifischer Antikörper (AK) gefunden wurde, kann man die Diagnose nicht wie bei anderen Autoimmunerkrankungen durch einen Antikörpernachweis im Blut durchführen. Um eine psoriatische Erkrankung richtig zu diagnostizieren, ist die Betrachtung des „großen Ganzen“ von Bedeutung. Psoriasis und damit assoziierte Erkrankungen sind in ihrem Verlauf und ihrer Manifestation zwar sehr eigen, trotzdem hat die Blickdiagnose von spezialisierten Ärzten große Kreditabilität in der Diagnostik. Wichtig ist es, eine gründliche Anamnese durchzuführen und den Verlauf zu dokumentieren, denn um die Erkrankung sicher zu diagnostizieren, muss ein Schub über drei Monate

persistieren, oder aber es muss mindestens einen zweiten Schub, also einen Rückfall geben (37).

Zusätzlich können Hautbiopsien entnommen werden um sie histologisch auszuwerten und um bei Unsicherheit differentialdiagnostisch tätig zu werden (30, 50).

## 1.7 Differentialdiagnosen

Nicht jede pustulöse Dermatitis ist eine PPG. Darum ist es wichtig die häufigsten Differentialdiagnosen zu kennen:

- Akute generalisierte exanthematische Pustulose (AGEP)
- Subkorneale Pustulose Sneddon-Wilkinson
- Akute febrile neutrophile Dermatose, Sweet-Syndrom
- Pemphigus vulgaris und foliaceus
- Dermatitis Herpetiformis Duhring
- Sekundär infizierte Mykosen, z.B. Dermatophyten
- Impetigo contagiosa
- Dyshidrosis
- Akuter kutaner Lupus erythematodes
- Pyodermie
- Disseminierter, kutaner Ausbruch des Herpes simplex virus (2, S. 383, 3, S. 511, 13, S. 56, 20, 51)

Insbesondere eine AGEP hat klinisch sehr große Ähnlichkeiten mit einer PPG, weshalb die richtige Diagnose oftmals nur bei gleichzeitiger histologischer Untersuchung und sorgfältiger Anamnese gestellt werden kann. Bei der AGEP treten ebenso stecknadelgroße Pusteln auf Erythemen auf (vgl. Abb.5), die von Fieber und Allgemeinsymptomen begleitet werden können. Hier handelt es sich aber um eine drug hypersensitivity reaction und keine Autoimmunerkrankung (2, S. 214).



Abbildung 5 Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) induced by azithromycin

Contact Dermatitis, Volume: 76, Issue: 6, Pages: 363-364, First published: 11 May 2017, DOI: (10.1111/cod.12717

## 1.8 Therapie und Prognose

Die Behandlungsoptionen von Psoriasis sind so vielfältig wie das Krankheitsbild selbst und müssen daher an die Beschwerden und Symptome der Betroffenen angepasst werden. Auch wenn es bislang keine Therapie gibt, die die Ursachen komplett bekämpft und Psoriasis heilt, hat die Medizin in den letzten Jahrzehnten sehr große Fortschritte in der Behandlung und Prophylaxe gemacht, sodass vielen Erkrankten Hilfe bei ihren Symptomen zukommt, diese sich abschwächen oder Patienten sogar über längeren Zeitraum komplett symptomfrei werden. Auch zur Therapie der PPG wird das Repertoire der für PV zur Verfügung stehenden Medikamente genutzt.

Grob kann man die Therapieoptionen in drei Kategorien einteilen, die miteinander kombiniert werden: Die äußere, topische, die physikalische Lichttherapie und die systemische Therapie.

Im letzten Jahrzehnt haben sich Biologica, insbesondere monoklonale Antikörper in der systemischen Therapie etabliert. Die im Folgenden genannten Antikörper Etanercept, Infliximab und Adalimumab richten sich alle gegen das bei Psoriasis verstärkt exprimierte Zytokin TNF- $\alpha$ . Angriffspunkte weiterer Antikörper sind die Th-Zellen, IL-12, IL-17 A/F und IL-23 (52).

Als first-line Therapie für die Symptome der Haut eignen sich Retinoide wie das Acitretin, Cyclosporin, Methorexate, systemische Glukocorticoide, und Psoralen, ggf. kombiniert mit UV-Licht als PUVA-Therapie sowie Infliximab (7, 20, 51, 53).

Zu Second-line Empfehlungen gehören insbesondere die Biologica Adalimumab und Etanercept aber auch topische Glucocorticoide und Calcipotriene (54).

Abgegrenzt werden hier Schwangere. Mittel erster Wahl sind für die Graviden vor allem topische Medikamente um die Leibesfrucht zu schützen. Zum Einsatz kommt als Mittel erster Wahl ein Glucocorticoid, gefolgt von einem Vitamin D<sub>3</sub> Präparat oder lokaler PUVA-Therapie. Hilft all das nicht, können systemische Glucocorticoide und Cyclosporin in Betracht gezogen werden (8).

Für Kinder wird aufgrund guter Wirksamkeit insbesondere das Retinoid Acitretin empfohlen (54).

Die Begleiterscheinungen der PPG, wie Fieber, Arthritis und generell Schmerzen sollten auch behandelt werden. Antirheumatika und fiebersenkende Mittel wie etwa Diclofenac, Ibuprofen und Acetylsalicylsäure sind hier geeignet. Bei den besonders schweren Fällen muss natürlich auch auf den Volumen- und Nahrungshaushalt geachtet werden.

Die Therapieempfehlungen sind länderabhängig und variieren. Zudem gibt es immer wieder Diskussionen über die teratogenen und organschädigenden Nebenwirkungen von Retinoiden (7). Das Paradoxon der systemischen Glukocorticoide macht einheitliche Empfehlungen ebenso schwierig. Auf der einen Seite wirken sie sehr gut beim akuten Psoriasis Schub, auf der anderen, ist ihr Absetzen einer der größten Risikofaktoren für die Entstehung eines PPG Schubs überhaupt (51).

Wenn die für den individuellen Patienten wirksame Therapie gefunden wurde und die Symptome abklingen, kann versucht werden, die Medikamente auszuschleichen und abzusetzen. Nicht bei allen Erkrankten ist dies möglich. Dann muss eine Erhaltungstherapie eingeleitet werden, um Rezidiven entgegenzuwirken (51).

Um die Prognose zu verbessern und vorbeugend aktiv zu sein, ist es ratsam, den Lebensstil anzupassen, also den Nikotin- und Alkoholkonsum einzuschränken, Stress zu umgehen, einer Adipositas entgegenzuwirken oder falls diese bereits besteht, sie zu bekämpfen (55, 56). Patienten mit Übergewicht sprechen insgesamt auch schlechter auf systemische Therapien mit Biologicals an (57).

## 2. Zielsetzung

Die immunhistochemische Analyse ist Kernstück dieser Arbeit. Mit der Auswahl von elf verschiedenen zu untersuchenden Antikörpern wird analysiert, welche Rolle und Relevanz diese bei der Psoriasis Pustulosa Generalisata haben und inwiefern sich die Expression zur Kontrollgruppe unterscheidet.

Durch die immunhistochemische Färbung kann visuell dargestellt werden, wie viele Antikörper sich im Schnitt befinden und wie hoch ihre Dichte ist. Die bebilderte Dokumentation macht die Auszählung und den anschließenden Vergleich erst möglich.

Ausgewählt wurden 13 Hautbiopsien von an PPG erkrankten Personen und sechs Kontrollproben aus gesunder Haut. Dies ergibt eine Gesamtzahl von 19 Personen, deren Hautschnitte analysiert wurden.

Bei den elf Antikörpern handelt es sich um eben solche, die in früheren Studien Relevanz bei psoriatischen Erkrankungen hatten. Ausgewählt sind: CXCR3 (CD183), FOX-P3, HLA-DR, IL8, IL17A, IL17F, IL23, IL36G, JAK3, PDE-4B und Tyrosinkinase. Zur Kontrolle wurden ebenso Kontrollfärbungen ohne Antikörper durchgeführt und ausgewertet. Hierbei handelt es sich um je eine Färbung ohne Vorbehandlung, eine Kontrolle für Citrat und eine für EDTA.

Dadurch ist es möglich weitere Prinzipien zum immunologischen Geschehen bei der PPG und dadurch der Pathologie zu entdecken, was Auswirkungen auf die Behandlung hat.

Übergeordnetes Ziel ist es, dadurch für die Zukunft einen Grundstein für weitere Behandlungsansätze, die die Immunologie targetieren, zu gewinnen und den Patienten Linderung in ihrer Symptomatik, insbesondere die der Haut, zu gewähren. Eine Eindämmung von Nebenwirkungen und allgemein eine Besserung der schlechteren Lebensqualität werden dadurch ebenso möglich.

Folgende Fragestellungen werden behandelt:

- Welche Antikörper häufen sich in den Hautschnitten der Patienten mit Psoriasis Pustulosa Generalisata verglichen zur Kontrollgruppe?

- Wie ist die quantitative Verteilung der verschiedenen Antikörper innerhalb der Biopsien und wie stehen sie zueinander?
  
- Welche Rückschlüsse kann man aus der Antikörperverteilung ziehen unter Berücksichtigung der aktuellen Studienlage?
  
- Was lässt sich aus dem Vergleich der Biopsien von Patienten mit Psoriasis Pustulosa Generalisata und der gesunden Haut schlussfolgern?

### 3. Material

#### 3.1 Herstellung der Paraffinschnitte

- Alkohole:
  - Ethanol 70% vergällt; Carl Roth GmbH + Co. KG
  - Ethanol 96% vergällt; Carl Roth GmbH + Co. KG
  - Isopropanol 100% GMP; Aug. Hedinger GmbH & Co. KG
- Xylol: Xylene Isomeregemisch; PanReac AppliChem
- Einbettkassette türkis; KABE Labortechnik GmbH
- Vakuum-Infiltrationsprozessor: Tissue-TEK® VIP 5 JR; Sarkura Finetek
- Ausblocker: Tissue-Tek TEK Sarkura®; Sarkura Finetek
- Formalinfixierung: ROTI®Histofix 4,5%, säurefreie (pH7), phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4,5%; Carl Roth GmbH + Co. KG
- Kühlplatte: Tissue-Tek® Cryo Console; Sarkura Finetek
- Halbmotorisches Rotationsmikrotom: Leica Biosystems RM2245; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
- Klinge: Feather Microtome Blade, Stainless Steel A35; FEATHER®
- Objektträger: Menzel Gläser Superfrost®Plus; Gerhard Menzel GmbH
- Wasserbad: GFL 1052; GFL®
- Paraffin-Strecktisch: MEDAX 12800; MEDAX Nagel GmbH
- Brutschrank: HORO 0353; HORO Dr. Ing. A. Hofmann GmbH

### 3.2 Immunhistochemische Färbungen

- Färbe-Kit: Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse; Code K5007
  - Fläschchen A: Sekundärantikörper: Dako REAL™ Envision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV)
  - Fläschchen B: Dako REAL™ Substrate Buffer
  - Fläschchen C: Dako REAL™ DAB+ Chromogen
- Glaseindeckautomat: Leica CV5030; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH
- Deckgläser: Menzel-Gläser Microscope Slides; Gerhard Menzel GmbH
- Eindeckmittel: Entellan®; Merck KGaA
- Demaskierungslösung: Dako REAL™, EnVision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH (50x)
- Citrate Buffer 10X pH6 (PT Module); Vitro S.A.
- Unter 3.3 genannte Primärantikörper
- Häkalaun: Mayers Häkalaunlösung; Merck KGaA
- Dako REAL™ Antibody Diluent
  
- Peroxidase-Blocking Solution, Dako REAL™; Agilent Dako
- Waschpuffer: EnVision™ Flex WASH BUFFER (20X); Agilent Dako
- Leitungswasser
- Dako REAL™ Incubation Container
- Dako REAL™ Slide Holder
- Alkohole:
  - Ethanol 70% vergällt; Carl Roth GmbH + Co. KG
  - Ethanol 96% vergällt; Carl Roth GmbH + Co. KG
  - Isopropanol 100% GMP; Aug. Hedinger GmbH & Co. KG
- Xylol: Xylene Isomerengemisch; PanReac AppliChem

### 3.3 Antikörperauswahl

In der folgenden Tabelle aufgelistet sind die elf verschiedenen Antikörper und der Verdünnungsgrad, wie der Antikörper vorbehandelt wurde; Citrat low pH und EDTA high pH.

Außerdem die Produktnummer, unter welcher der AK bei der entsprechenden Firma zu finden ist, sowie ein kurzes Beispiel zum natürlichen Vorkommen und Nutzen.

In der letzten Spalte ist dargestellt um welche Art von AK es sich handelt und aus welcher Spezies er gewonnen wurde. P steht für Poly-, M für Monoklonal.

AK Name	Verdünnung	Vorbehandlung	Firma	Natürliches Vorkommen	Klonalität M/P
CXCR3 (Cd 183) CXC-Motiv-Chemokin-rezeptor 3	1:100	Citrat	BD Pharmingen 557183	Oberfläche von Th-Zellen, NK-Zellen	M, Maus
HLA-DR Human Human-Leukocyte Antigen – DR isotype	1:100	Keine	Dako M0775	MHC-2-Oberflächen-R, Bestandteil des TCR, markiert B-Zellen, IDZ, Langerhans Zellen, Makrophagen	M, Maus
FOX P3 Forkhead-Box-Protein	1:250	EDTA	Abcam Ab20034	Transkriptionsfaktor im Zellkern von Th-Zellen	M, Maus
IL-17 A Interleukin 17A	1:500	Citrat	Bioss Antikörper Bs2140-R	Proinflammatorisches Zytokin aus Th <sub>17</sub> -Zellen	P, Kaninchen
IL-17 F Interleukin 17F	1:2500	Citrat	Novusbio NBPZ-27327	Proinflammatorisches Zytokin aus Th <sub>17</sub> -Zellen	M, Maus

IL-23 Interleukin 23	1:25	Citrat	Antibody online ABIN 614363	Proinflammatorisches Zytokin aus Th17-Zellen, dendritischen Zellen, Macrophagen, Monozyten	M, Maus
PDE 4B Phosphodiesterase 4B	1:200	Citrat	Antibody online ABIN 4344431	Universell, cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B, hydrolysiert cAMP zu AMP	M, Maus
IL-8 Interleukin 8/CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin 8	1:300	Citrat	Antibody online ABIN 957728	Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten, als chemotaktisch wirksames Zytokin und proangionetisch	M, Maus
IL-36 Gamma, IL-1f9 Interleukin-1 family member	1 :250	Citrat	Antibody online ABIN 2856607	Proinflammatorisches Zytokin in Keratinozyten	P, Kaninchen
JAK 3 Januskinase 3	1 :250	Citrat	Bioss Bs3208R	Intrazellulärer, membranständiger-R. Zytokin-R haben keine eigene Enzymaktivität → JAK-Kinase für	P, Kaninchen

				intrazelluläre Transduktion benötigt	
Tyrosin- kinase	1 :100	Citrat	USBio- logical 033359	Zelladhäsions- molekül, Tumorpro- gressions Marker	P, Kanin- chen

Tabelle 1 Antikörpereigenschaften

### 3.4 Auswertung (Auszählen und Fotografieren)

- Leica Application Suite Software
  - Softwareversion: V4.3.0
  - Hardwarekonfiguration: IL+DFC320
- Leica DMIL Lichtmikroskop
- Leica DFC295 Mikroskopkamera

## 4. Methoden

### 4.1 Patientenauswahl

Als Grundlage der immunhistochemischen Analyse, die im Vordergrund dieser Arbeit steht, dienen zwei verschiedene Patientengruppen.

Es wurden insgesamt 19 Hautbiopsien verwendet, die alle aus der Haut- und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz stammen und dort im Archiv eingelagert sind. Die genutzten Biopsate lassen sich, wie bereits erwähnt, in zwei Gruppen einteilen. Die erste beinhaltet die 13 an Psoriasis pustulosa generalisata erkrankten Menschen, während zur zweiten Gruppe sechs gesunde Hautproben zählen, die als Kontrollgruppe ohne PPG dienen.

## 4.2 Probengewinn

Die Histologie der Haut- und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz erhält Einsendungen von zu untersuchenden Hautproben aus der Klinik selbst, wie auch von niedergelassenen Dermatologen aus der Region.

Um eine Probeexzision durchzuführen, muss der behandelnde Arzt seinen Patienten über die Biopsie und mögliche Folgen aufklären, bevor nach erfolgreicher Desinfektion die Probe unter Lokalanästhesie entnommen werden kann.

Die Biopsien der Kontrollgruppe wurden ursprünglich für andere Zwecke entnommen und zur Forschung bereitgestellt.

## 4.3 Herstellung der Paraffinschnitte

1. Formalinfixierung der Biopsate
2. Entwässerung und aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, und Infiltration durch Paraffin im Tissue-TEK® VIP 5 JR
3. Einbettung mithilfe des Tissue-Tek TEK Sarkura® in der Einbettkassette
4. Kühlung des Paraffinblocks auf der Tissue-Tek® Cryo Console
5. Zuschneiden des Biopsats mit dem Halbmotorischen Rotationsmikrotom Leica Biosystems RM2245 und der Feather Microtome Blade A35 auf eine Schnittbreite von 2,5-3 Mikrometer
6. Aufbringen des Schnitts auf den Superfrost®Plus Objektträger
7. Strecken im GFL 1052 Wasserbad bei 50-55°C
8. Um Schrumpffartefakte zu verhindern, Ablegen des Objektträgers auf den Paraffin-Strecktisch MEDAX 12800
9. Trocknen im Brutschrank HORO 0353 zur besseren Haftung am Objektträger, Zeitansatz: 1h

### 4.3.1 Fixierung

Damit mit den Biopsien gearbeitet werden kann und die Morphologie bestmöglich erhalten werden kann, müssen die Biopsien entsprechend

vorbereitet werden. Hierfür Verwendung gefunden hat die Formalinfixierung von Paraffinschnitten. Dies dient nicht nur zur Konservierung, um die Autolyse zu stoppen, sondern auch zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

## 4.4 Einführung in die Immunhistochemie

### 4.4.1 Definition

Die Immunhistochemie wird auch Immun- oder Antikörperfärbung genannt, was das Verfahren schon im Wort erklärt.

Es handelt sich hierbei um eine im Labor angewandte Methode, um zu untersuchendes Gewebe anzufärben. Sichtbar gemacht werden, unter Verwendung von markierten Antikörpern als Reagenz, Zellstrukturen wie Proteine.

### 4.4.2 Antikörperherkunft

Die, auch in dieser Arbeit, verwendeten Antikörper kann man in zwei große Gruppen, nach auf Herkunft und Herstellung basierenden Kriterien, einteilen.

Das sind **monoklonale** und **polyklonale** Antikörper.

Erstere charakterisieren sich dadurch, dass sie mit ihrem variablen Teil nur ein einziges Epitop eines Antigens binden.

Dies kann man erreichen, wenn alle produzierten Antikörper in ihrem molekularen Aufbau gleich sind. Sie sind gleich, wenn sie von einer Plasmazelle oder eben ihrem Klon produziert werden.

Ebensolche Zellklone können gezüchtet werden. Im ersten Schritt wird hier dem Versuchstier der Wahl, beim monoklonalen AK oftmals einer Maus, ein Antigen injiziert. Als Folge der Immunreaktion des Versuchstiers wird nun von einem B-

Lymphozyten genau ein spezifischer Antikörper gebildet. Durch Entnahme der Milz kann nun diese Plasmazelle separiert werden.

Um die Zelle unsterblich zu machen, wird sie im Folgenden mit einer Myelomzelle fusioniert, es entsteht die Hybridomzelle. Wenn sie sich jetzt teilt erhält man ganz viele B-Zell-Klone die alle denselben Antikörper produzieren.

Monoklonale AK sind also in all ihre Eigenschaften immer gleich. In ihrer Affinität, in ihrer Bindungsstärke, in ihrer Primärstruktur und in jeder Charge.

Polyklonale Antikörper hingegen unterscheiden sich in dem Epitop, welches sie binden. Sie entstehen nicht aus einem Zellklon, sondern aus verschiedenen Plasmazellen. Es ist also, auch auf molekularer Ebene nicht das gleiche Immunglobulin. Daraus resultieren unterschiedliche Eigenschaften der verschiedenen Ak. Gemeinsam ist ihnen nur das Antigen.

Auch hier wird eine Immunantwort durch Antigenexposition erreicht.

Tier erster Wahl ist hier das Kaninchen, aber auch Pferde, Schweine und Schafe werden verwendet.

Das Kaninchen wird nicht nur wegen seiner ökonomischen Vorteile priorisiert. Nein, es hat auch weitere Vorteile. Denn wenn man innerhalb einer Charge polyklonale AK vieler kleiner Tiere hat, sind die chargenspezifischen Individualitäten kleiner, als wenn man die Antikörper wenigen, großen Tieren entnimmt.

Prinzipiell ist es egal, welches Epitop der Antikörper bindet. Wichtig ist hierbei nur, dass dieses Epitop spezifisch für das Antigen ist, da sonst mehr als nur ein Antigen detektiert, bzw. gebunden wird.

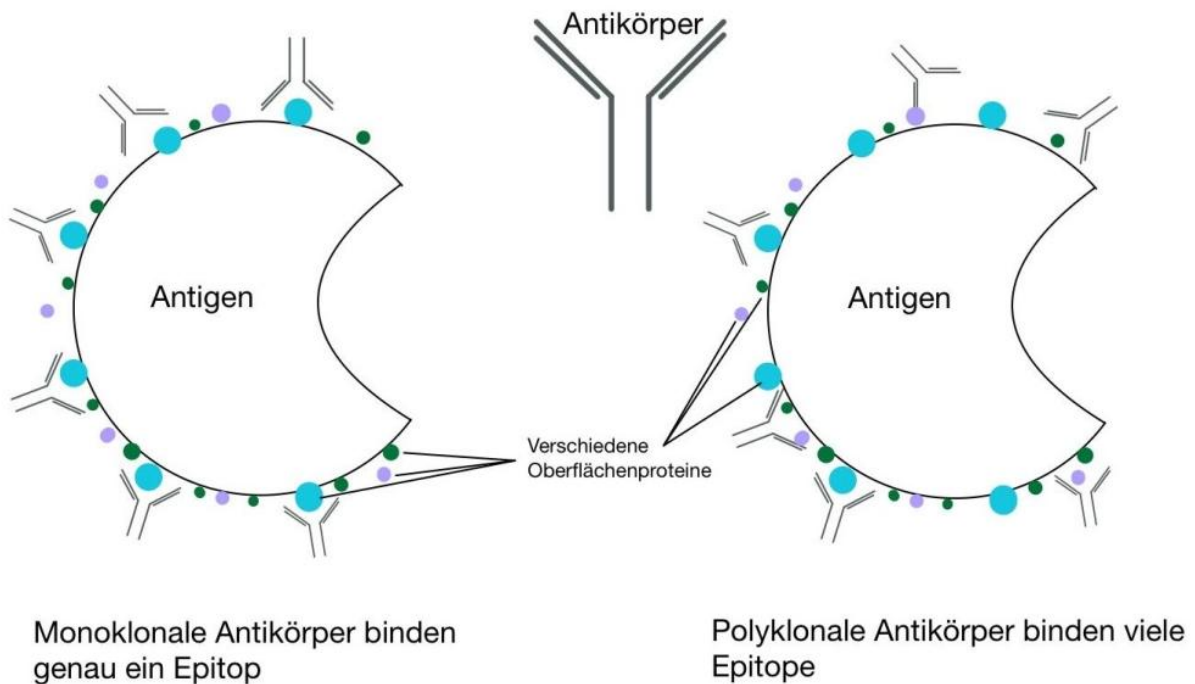


Abbildung 6 Schemazeichnung über die Bindung von mono- und polyklonalen AK am Antigen

#### 4.4.3 Antikörpernachweis und Anfärbung

Zum Nachweis des AK-AG-Komplexes, gibt es verschiedene Methoden. Wenn der primäre Antikörper am Antigen gebunden ist, kann man dies mikroskopisch nicht sehen, da sich, sofern wie in dieser Studie, kein enzymmarkierter primärer AK zum Einsatz kommt, keine Färbung einstellt.

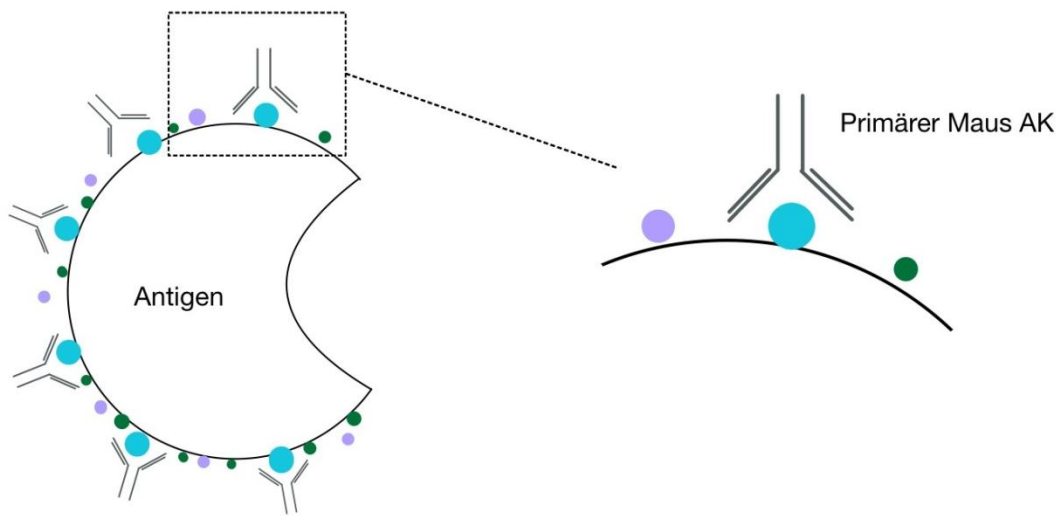
Um den Komplex nun anzufärben, gibt es verschiedene Methoden. Erläutert wird nachfolgend die Polymerkonjugat-Methode am Beispiel der monoklonalen primären Mausantikörper, da diese Methode bei dem verwendeten Färbekit verwendet wird.

Diese basiert auf einer Sekundärreaktion am Primärantikörper. Zum Einsatz kommt ein Polymerkonjugat. Bei diesem handelt es sich um ein langes Molekül, dessen Rückgrat aus einer Polysaccharidkette besteht. Der ausgewählte Zucker ist Dextran. An diesem konjugiert sind viele sekundäre Anti-Maus-AK, die den unspezifischen, konstanten Teil der primären AK binden, sowie Enzymmoleküle, die den Komplex färben, was dann für den Untersucher detektierbar ist.

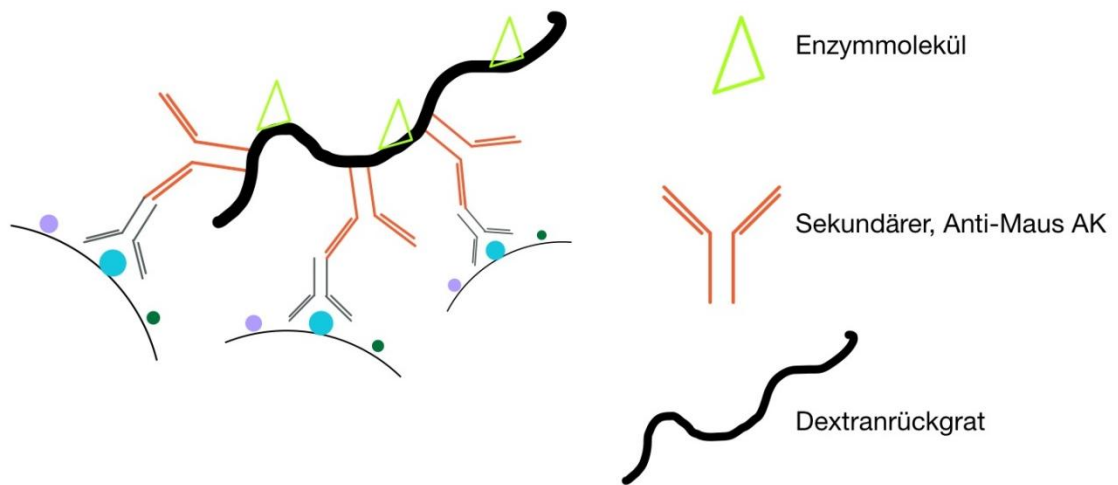
Analog dazu funktioniert dies natürlich für den konstanten Teil anderer wirttspezifischer AK.

Vorteile sind unter anderem, dass eine spezifische Sorte der Polymerkonjugate universell für alle Anti-Maus-AK verwendbar ist und man nicht jeden antigenspezifischen Primär-AK mit einem eigens hierfür hergestellten Enzymkomplex anfärben muss, was unwirtschaftlicher ist.

Durch die räumliche Nähe der Enzymmoleküle entsteht außerdem eine Verstärkung der Färbung, sodass diese für den Untersucher besser erkennbar ist.



Schritt 1: Der primäre (monoklonale) AK bindet am Antigen



Schritt 2: Bindung des Polymerkonjugats an Primär-AK-AG Komplexe

Abbildung 7 Polymerkonjugatmethode

#### 4.4.4 Färben

##### 4.4.4.1 Deparaffinierung

Der erste Schritt im Färbeprozess ist die Deparaffinierung. Ziel ist es, das zur Fixierung benötigte Paraffin wieder zu entfernen. Dies geschieht über eine absteigende Alkoholreihe:

1. Xylol
2. 100% Isopropanol
3. 96% Ethanol
4. 70% Ethanol
5. Aqua dest.

##### 4.4.4.2 Antigendemaskierung/Epitop Retrieval

Um mit den Biopsaten arbeiten zu können, mussten diese wie unter Fixierung beschrieben, aufgearbeitet werden. Das ist Voraussetzung, hat aber auch Schattenseiten. Durch die Bearbeitung mit, in diesem Falle, Formalin kommt es zu einer Verschlechterung oder einem kompletten Verlust der Immunreaktivität als Folge der chemischen Interaktion zwischen den Epitopen und dem Reagenz. So kann es, je nach Sensitivität des Epitops auf die verwendete Chemikalie, zu Konformationsänderungen kommen, die dazu führen, dass der Antikörper das Epitop nicht mehr erkennt und bindet. Die Tertiärstruktur verändert sich und es kann zu Vernetzungen innerhalb oder zwischen den Molekülen kommen. Intra- oder Intermolekulare Cross-links sind die Fachbezeichnungen für diese Quervernetzungen.

Das Phänomen wird als Antigenmaskierung bezeichnet, ist strenggenommen aber eine Epitopmaskierung.

Um diese Maskierung nun vor der Färbung wieder aufzuheben zu können, werden die Präparate vorbehandelt. Qualitätsunterschiede in der Demaskierung stellen sich durch die Wahl der Temperatur, die Inkubationsdauer und die Pufferlösung ein.

Nach der Deparaffinierung wird also eine geeignete Pufferlösung benötigt, um das Gemisch im Anschluss thermisch zu behandeln. Diese Pufferlösung muss epitopspezifisch gewählt werden.

Für die Antigendemaskierung zu beachten sind die Herstellerhinweise der Antikörpervertreiber. Diese geben an, welcher Puffer für das targetierte Epitop am besten geeignet ist, um die spätere AK – AG Interaktion zu optimieren.

Bei den in dieser Studie verwendeten Antikörpern wird ein Citrat- oder EDTA Puffer benutzt.

Der Citratpuffer ist ein low-pH Puffer, der sein Optimum mit pH 6,0 entfaltet und gilt damit als sauer. Dahingegen basisch ist der high-pH Puffer EDTA, bei einem pH von 8,0.

#### 4.4.4.3 Färben gemäß den Anweisungen für das Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse

- Entparaffinierung und Rehydrierung
- Antigendemaskierung
- Einwirkung Peroxidase-Blocking Solution: 5 Min
- 2x spülen mit Waschpuffer: EnVision™ Flex WASH BUFFER (20X)
- Inkubation des Primärantikörpers, Zeitansatz: 1h
- 2x spülen mit Waschpuffer: EnVision™ Flex WASH BUFFER (20X)
- Inkubation des Sekundärantikörpers aus Fläschchen A, Zeitansatz: 30 Min
- 2x spülen mit Waschpuffer: EnVision™ Flex WASH BUFFER (20X)
- Chromogenansatz: 20 Mikroliter Dako REAL™ DAB+ Chromogen aus Fläschchen C mit 1000 Mikrolitern Dako REAL™ Substrate Buffer aus Fläschchen B mischen und entwickeln, Zeitansatz: 7 Min
- Spülen mit Leitungswasser
- Gegenfärben mit Hämalaun: Mayers Hämalaunlösung, Zeitansatz: 1 Min
- Mit Leitungswasser bläuen, Zeitansatz: 10 Min
- Spülen mit Aqua dest.
- Schwenken in aufsteigender Alkoholreihe:
  - Ethanol 70% vergällt
  - Ethanol 96% vergällt
  - Isopropanol 100% GMP

- Xylol: Xylene Isomerengemisch
- Eindecken im Glaseindeckautomat: Leica CV5030 mit Entellan® und Deckglas Menzel-Gläser Microscope Slides

## 4.5 Biopsatanalyse

Um die Biopsate automatisch analysieren zu können kam das Programm ImageJ zur Anwendung.

### 4.5.1 Bilderdokumentation

Um die mikroskopierten Gewebeschnitte fotografisch dokumentieren zu können, wurden Bilder mithilfe der digitalen Mikroskopkamera Leica DFC295 gemacht. Alle Gewebeschnitte wurden jeweils mit jedem Antikörper angefärbt. Unter dem Mikroskop Leica DFC295 wurden jetzt in jedem Präparat fünf Zonen mit hoher Antikörperzahl gesucht um von diesen im Anschluss eine Fotografie bei 20-facher Vergrößerung anzufertigen. Dies gewährleistet eine stetige Bildgröße von 328x246 Mikrometern. In der nachfolgenden Abbildung ist ein Beispiel der verschiedenen Zonen bei der Anfärbung mit dem Antikörper CXCR3 gezeigt.

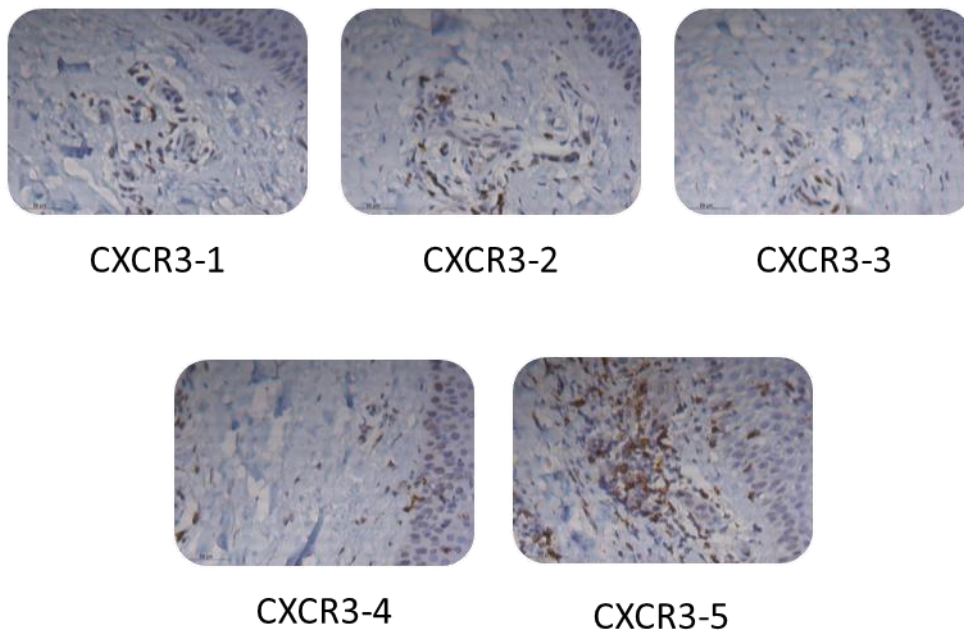


Abbildung 8: Die ausgewählten AK am Bsp. von CXCR3 bei Patient 14

#### 4.5.2 Bildanalyse

Die Analyse der Bilder erfolgt wie nachfolgend erläutert:

Als erstes wird das Bild mit dem ImageJ Plugin „IHC Profiler“ bearbeitet (<https://sourceforge.net/projects/ihcprofiler/>), damit es anschließend mit dem Programm ImageJ analysiert werden kann (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Bei dieser ersten Bearbeitung handelt es sich um eine Farb- und Kontrastbearbeitung, die den Fokus auf die durch die Antikörper angefärbten Bereiche lenkt.

Diese Bildanalyse erfolgt digital und automatisiert. Da dadurch Fehler entstehen können, wird das bearbeitete Bild direkt manuell mit dem Original verglichen. Sofern hierbei Fehler auffallen, wird das betroffene Bild nochmals manuell nachbearbeitet.

Im nächsten Schritt erfolgt die Analyse der Anzahl der gefärbten Partikel durch das Programm. Um auch hier Fehler zu minimieren erfolgt eine stichpunktartige manuelle Auszählung der Partikel, um die Ergebnisse zu validieren.

#### 4.5.2.1 Bearbeitung mit dem Plugin „ImageJ Plugin – IHC Profiler“

Das Plugin „ImageJ Plugin – IHC Profiler“ ermöglicht eine einfachere Erkennung der im Fokus stehenden, braun angefärbten Partikel, da hiermit das Bild schwarz-weiß gefärbt wird und durch einstellen des Kontrasts die volle Aufmerksamkeit auf den gefärbten Bereichen liegt.

Bearbeitungsprotokoll:

1. ImageJ öffnen
2. Bild auswählen und öffnen: File - Open – Datei wählen – Datei mit „open“ öffnen
3. Das Plugin wird jetzt auf die geöffnete, sichtbare Datei angewendet: Plugin – IHC Profiler → Mode: „Nuclear Stained Image“ – Color Deconvolution 1.5 → Vector: „H DAB“

#### 4.5.2.2 Analyse der Partikel durch ImageJ

Im nächsten Schritt wird das bearbeitete Bild durch ImageJ analysiert. Da es sich um eine automatisierte Analyse handelt, müssen eigene Makrobefehle gegeben werden um ein präzises, reproduzierbares Ergebnis zu erhalten.

Dies geschieht unter dem Reiter „AnalyzeParticles“

Bearbeitungsprotokoll:

Antikörper	setThreshold	Size (pixel ^2)	Circularity	Show	Summarize
CXCR3	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt

HLA-DR	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt
FOX P3	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt
IL-17A	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt
IL-17F	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt
IL-23	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt
PDE 4B	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt
IL-8	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt
IL-36G	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt
JAK3	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt
Tyrosin- kinase	0,100 - BW	70- Infinity	0.00-1.00	Outlines	Ausgewählt

Tabelle 2 Makrobefehle in ImageJ

# 5 Ergebnisse

## 5.1 Bilder histologischer Schnitte und Antikörperverteilung bei PPG Patienten

Patient 1

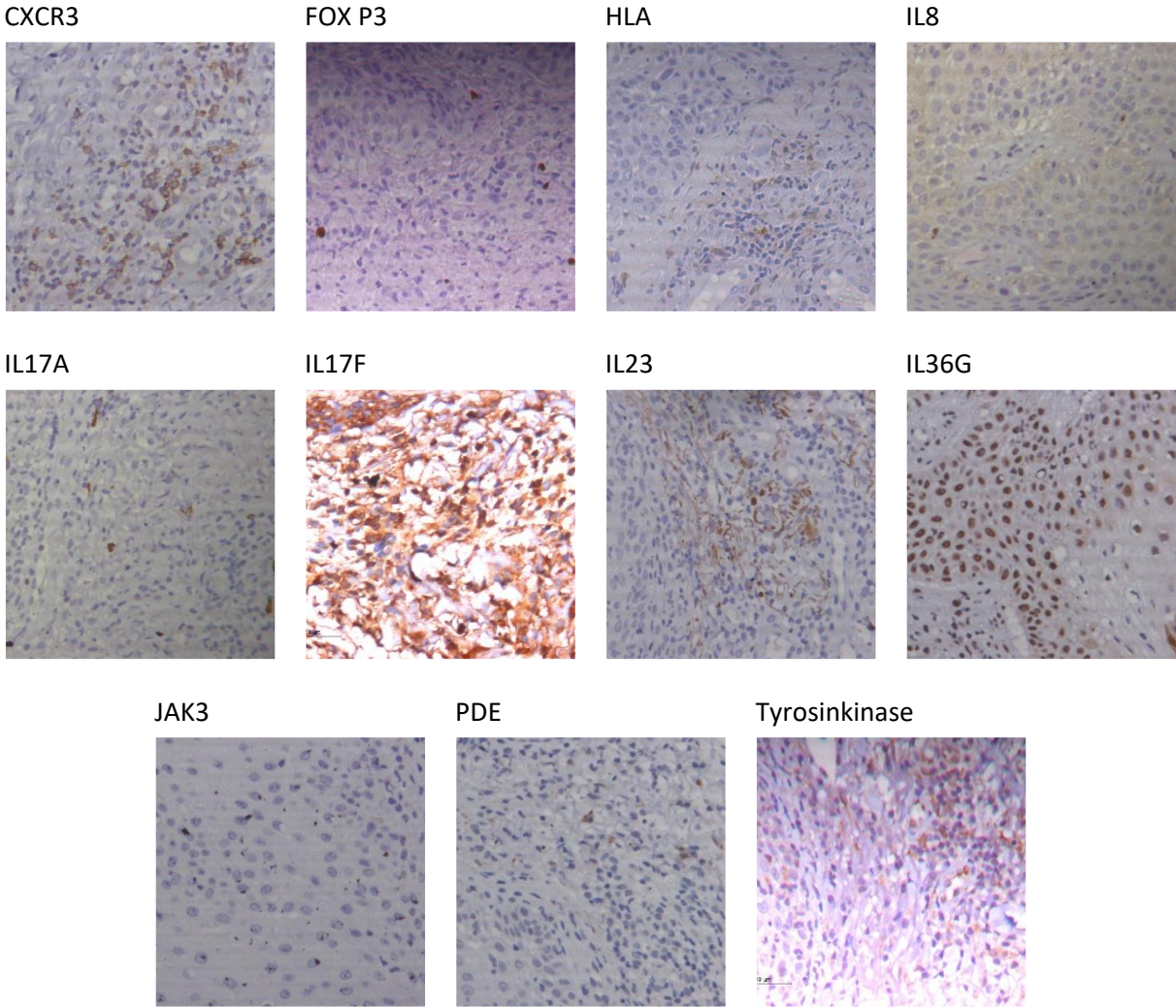


Abbildung 9: Patient 1; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

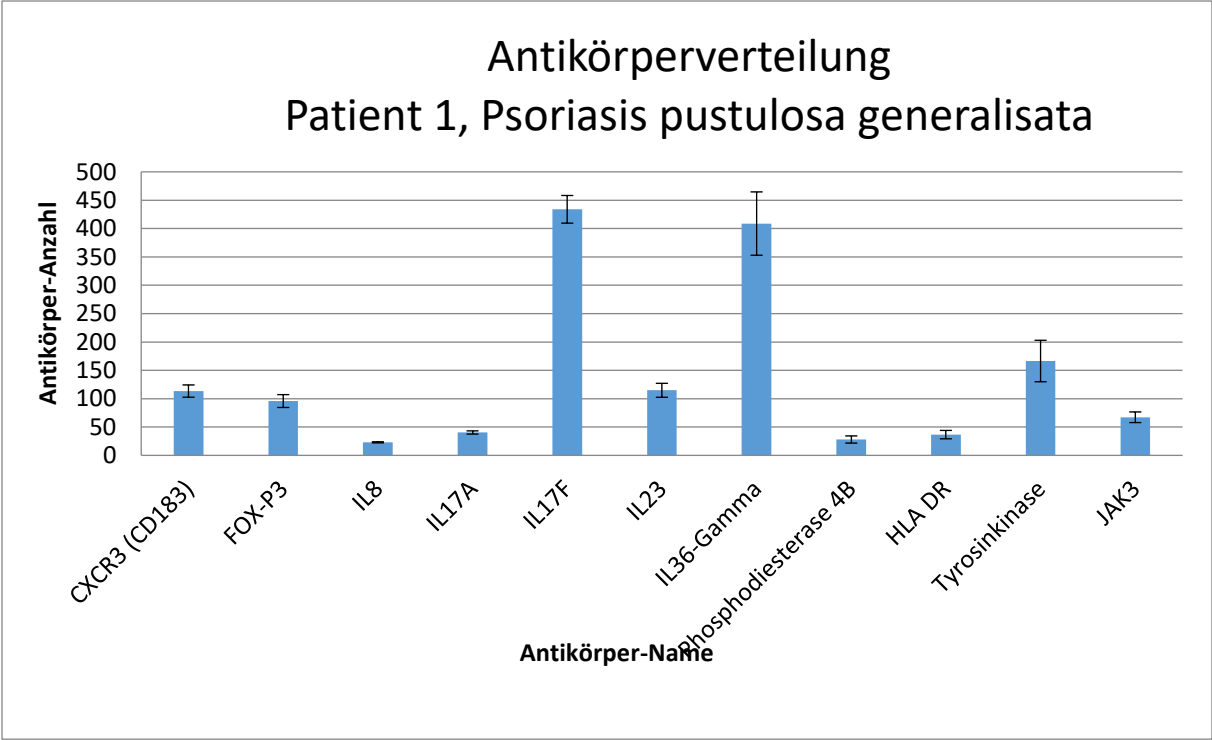


Diagramm 1: absolute Antikörperverteilung bei Patient 1, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 2

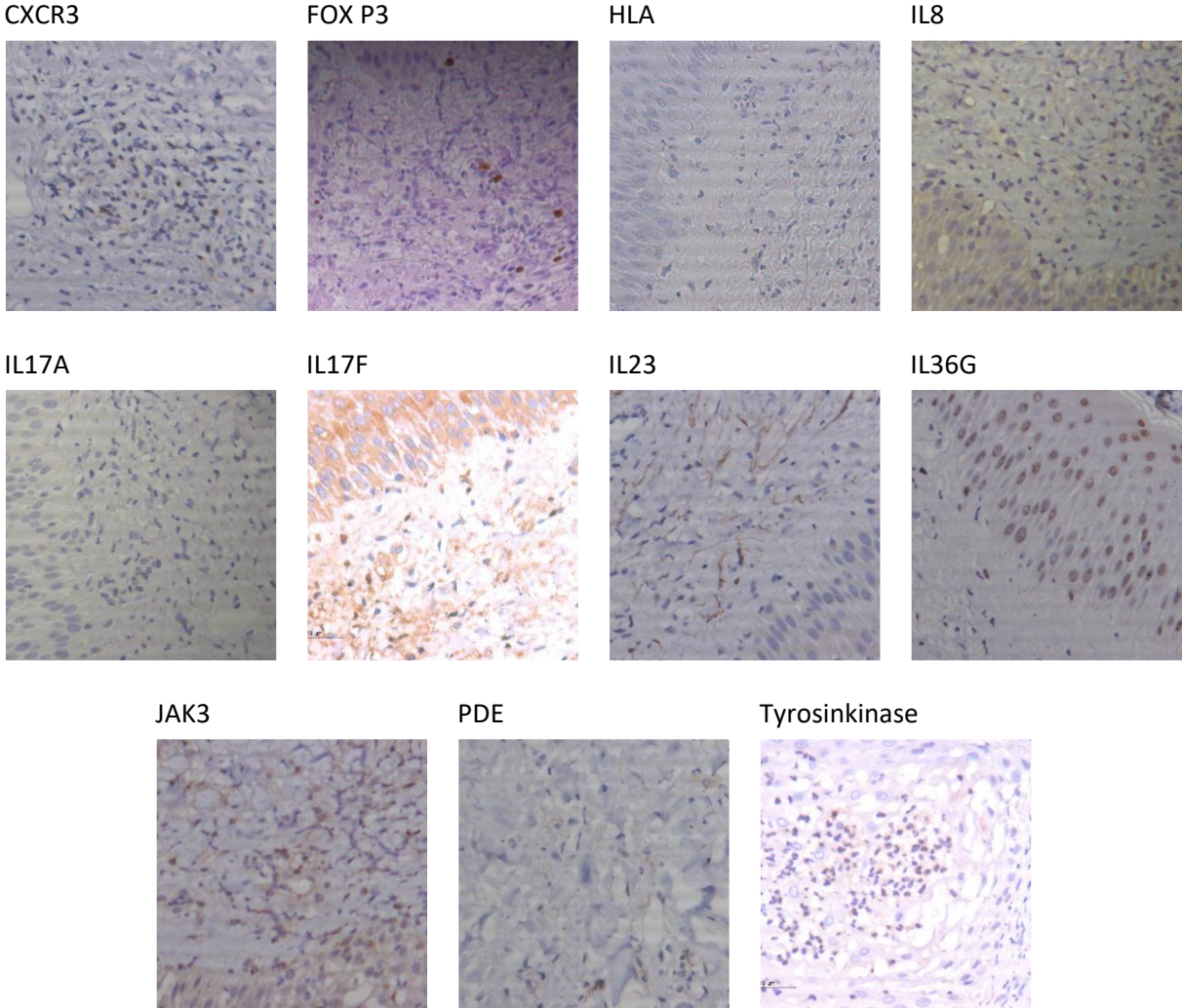


Abbildung 10: Patient 2; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

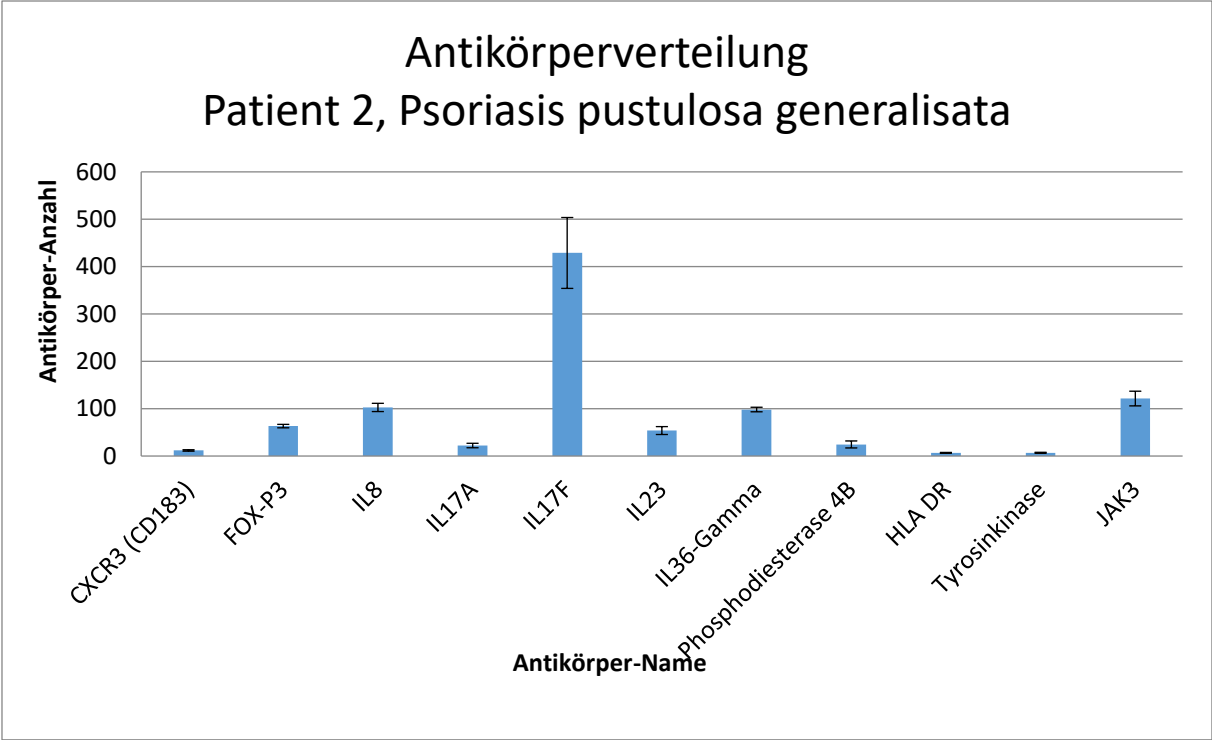
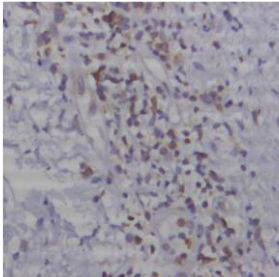


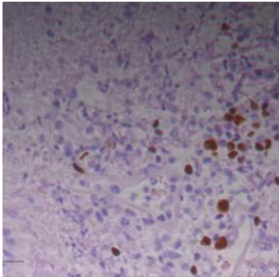
Diagramm 2: absolute Antikörperverteilung bei Patient 2, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 3

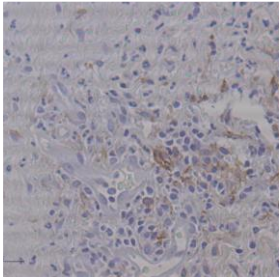
CXCR3



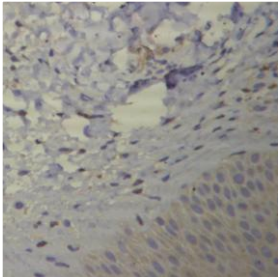
FOX P3



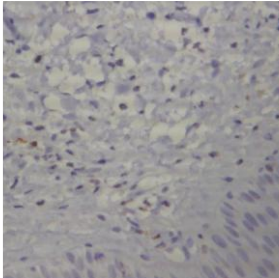
HLA



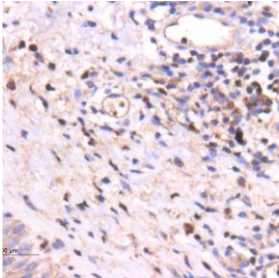
IL8



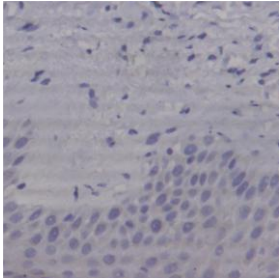
IL17A



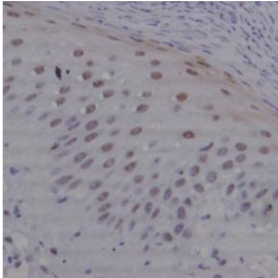
IL17F



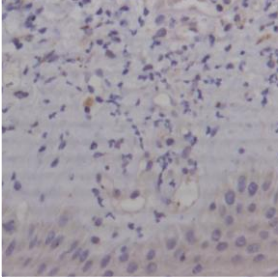
IL23



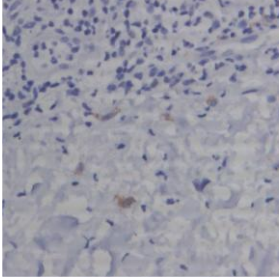
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

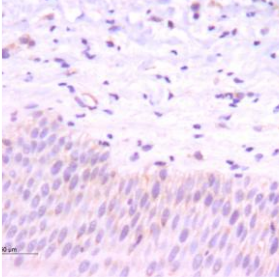


Abbildung 11: Patient 3; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

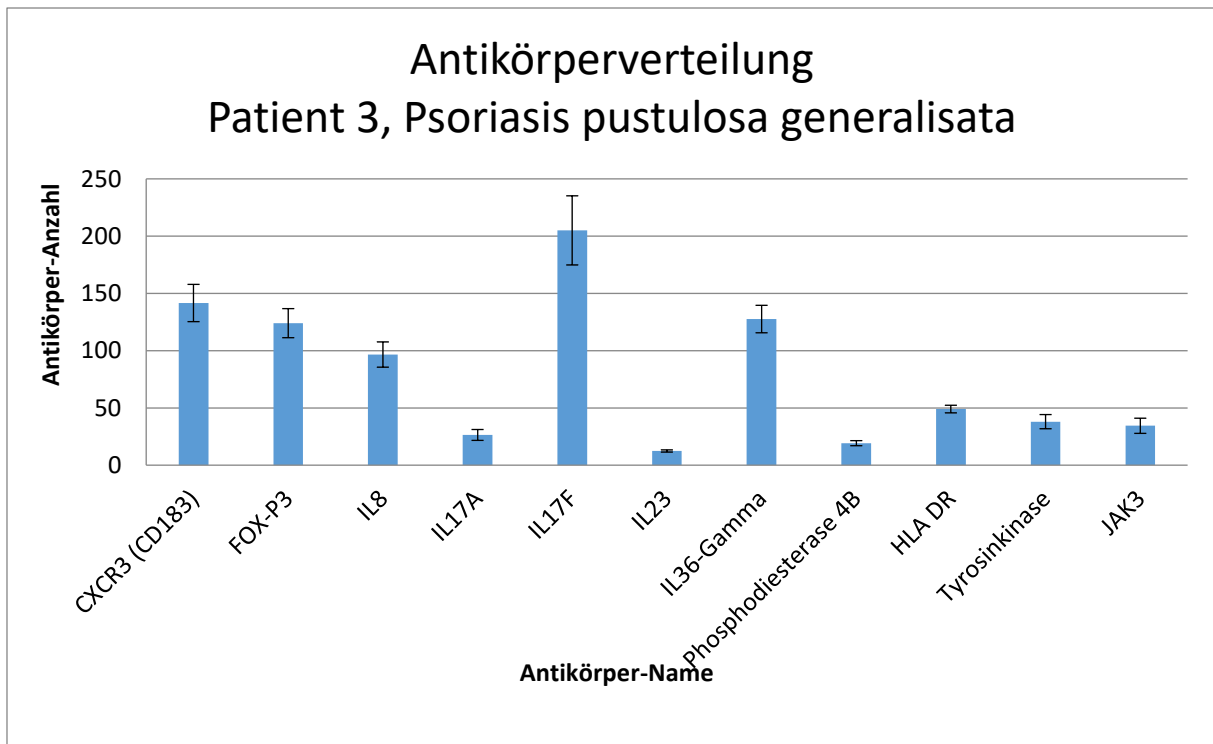


Diagramm 3: absolute Antikörperverteilung bei Patient 3, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 4

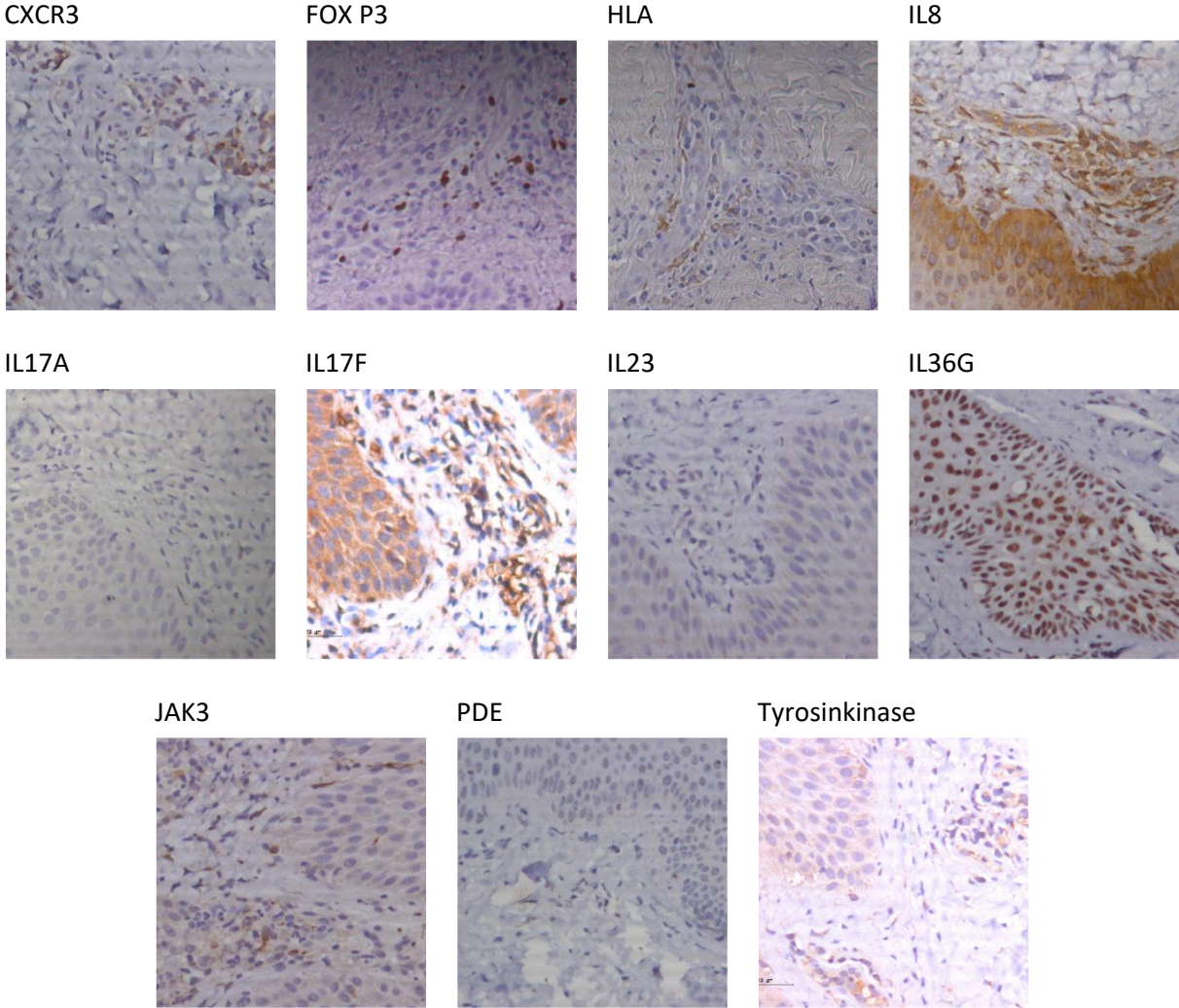


Abbildung 12: Patient 4; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

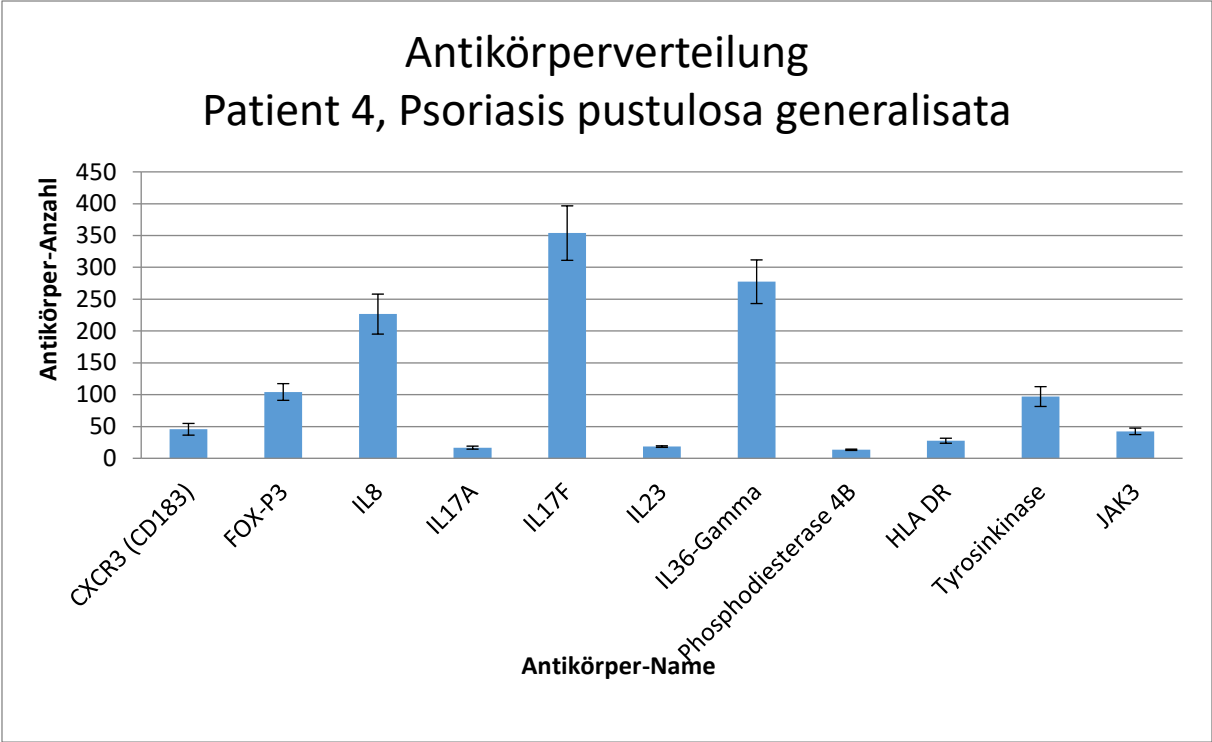


Diagramm 4: absolute Antikörperverteilung bei Patient 4, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 5

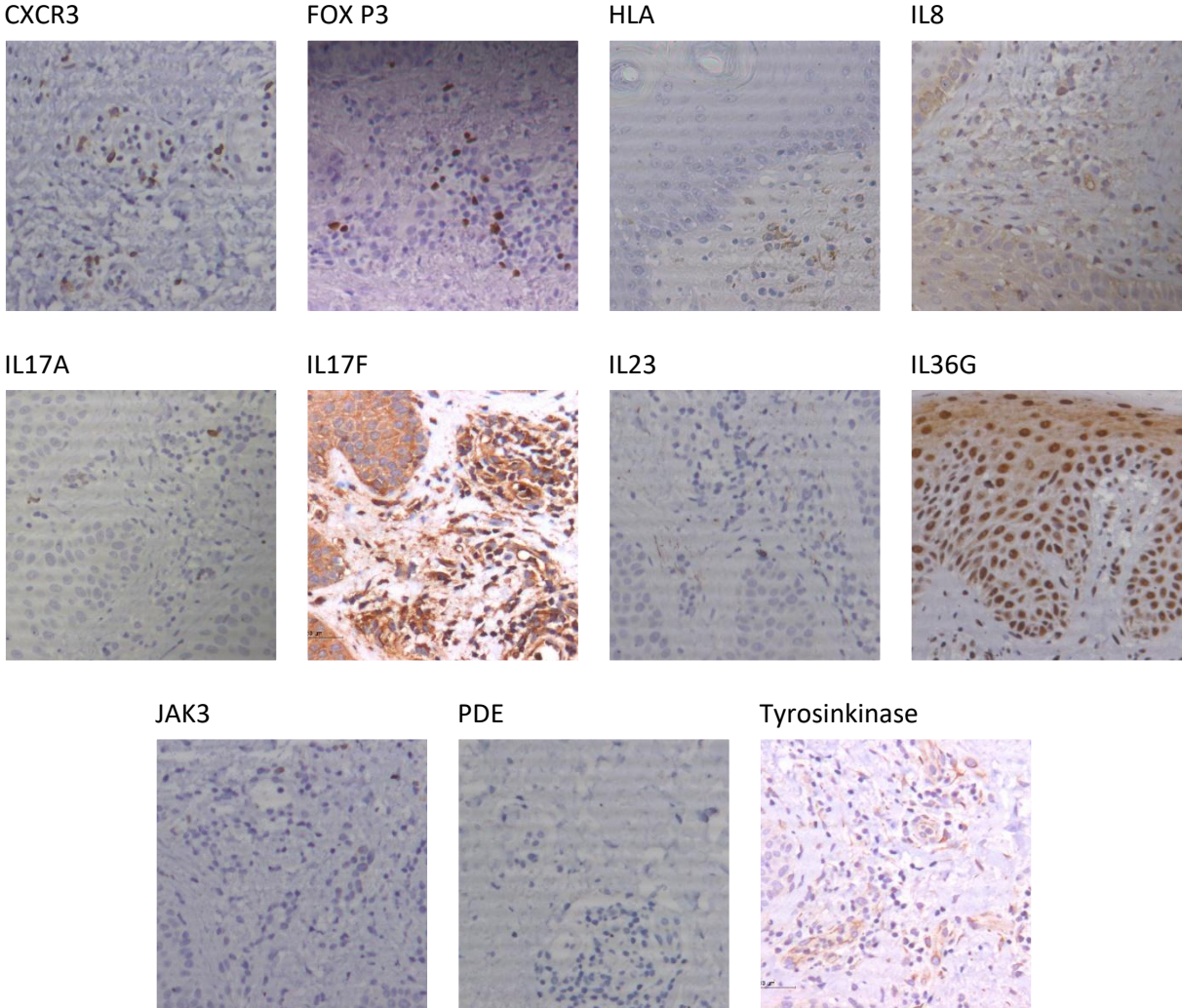


Abbildung 13: Patient 5; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

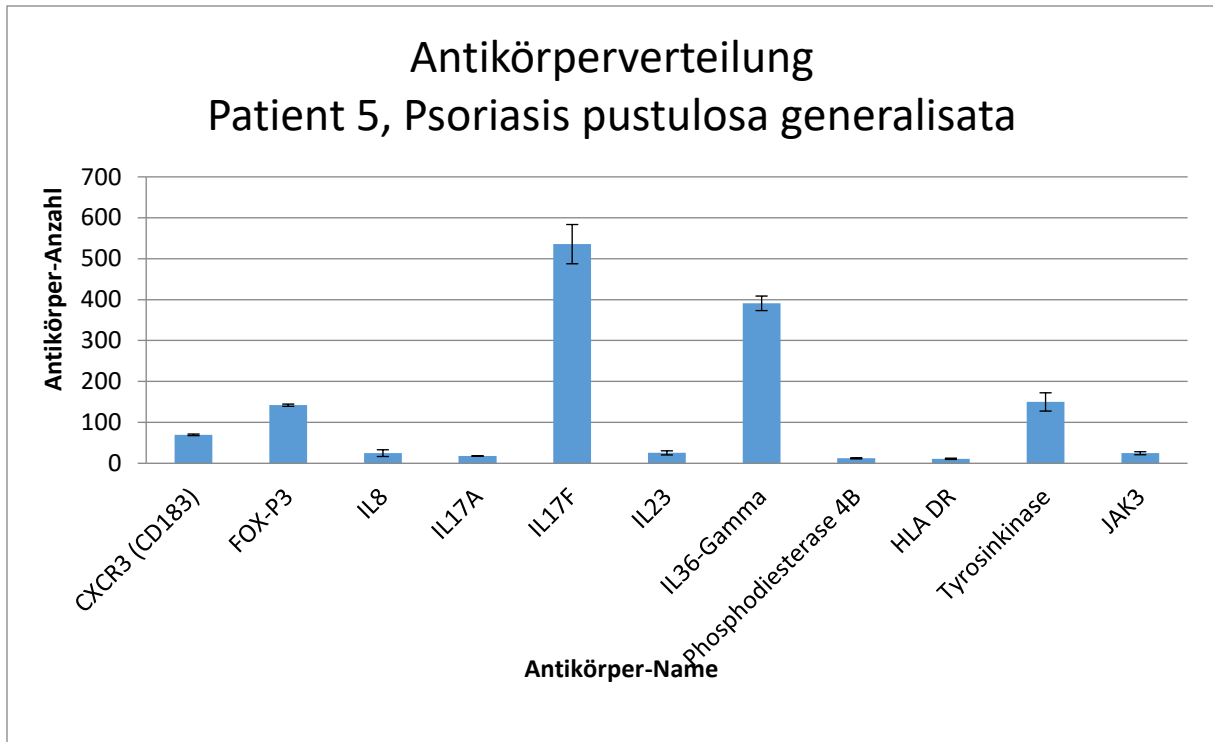


Diagramm 5: absolute Antikörperverteilung bei Patient 5, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 6

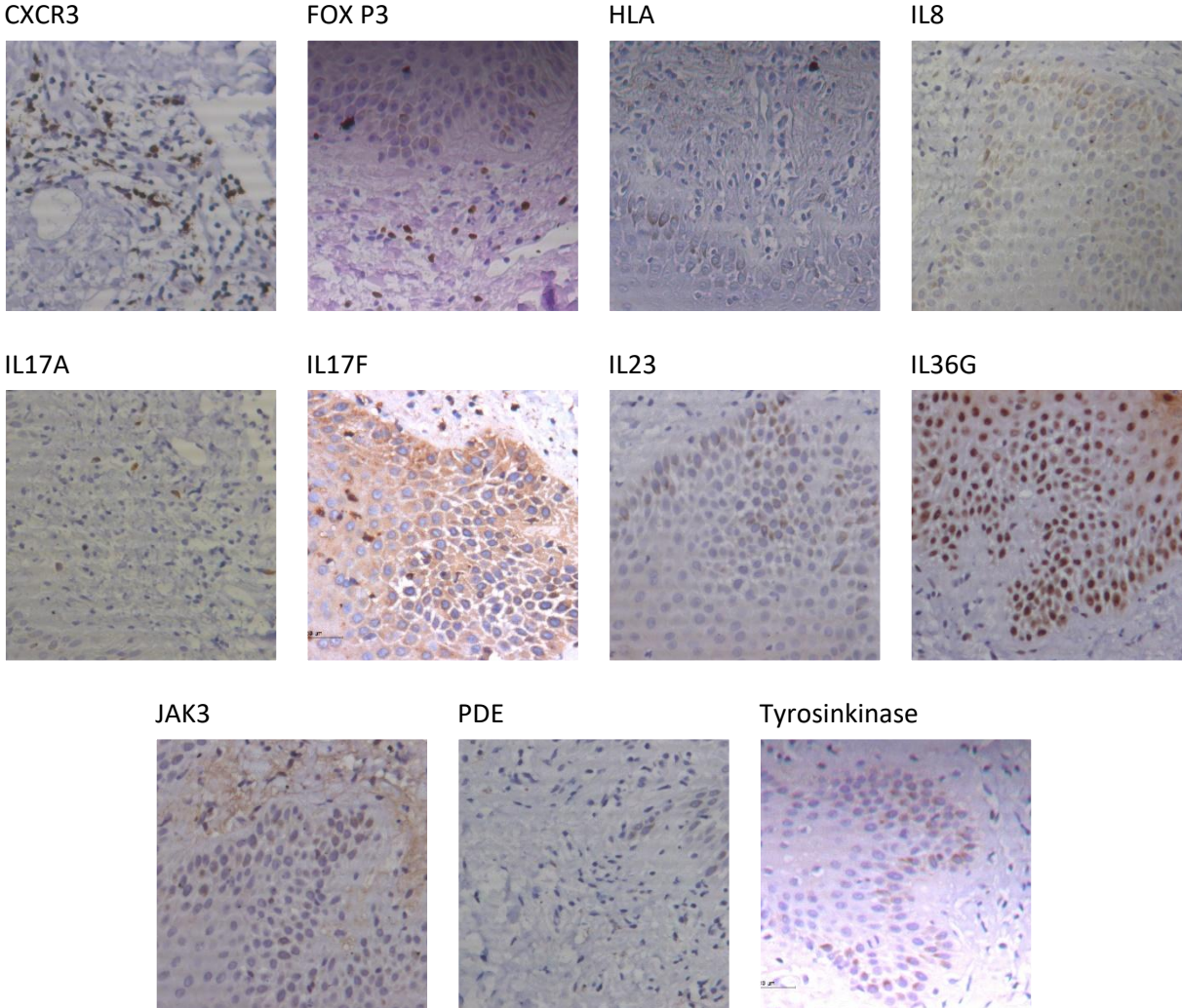


Abbildung 14: Patient 6; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

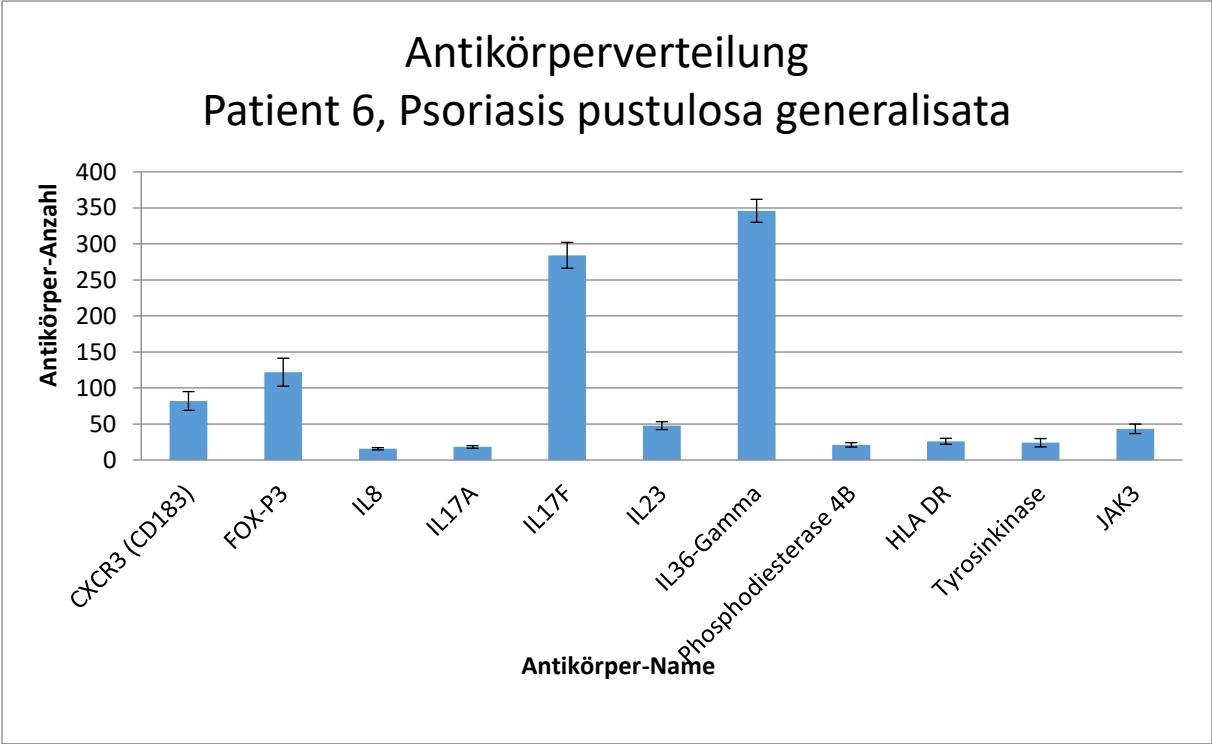
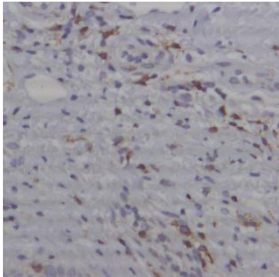


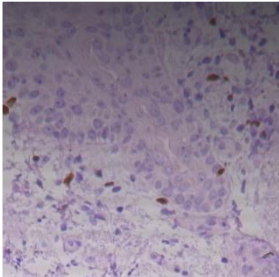
Diagramm 6: absolute Antikörperverteilung bei Patient 6, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 7

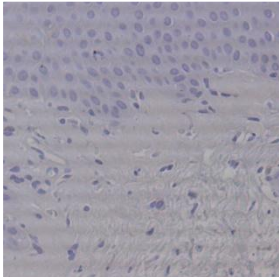
CXCR3



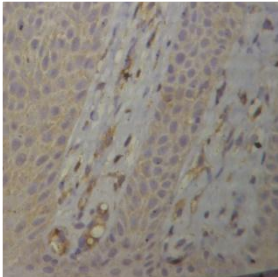
FOX P3



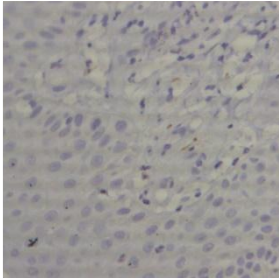
HLA



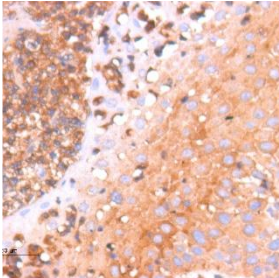
IL8



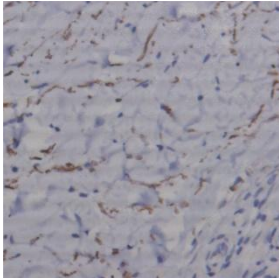
IL17A



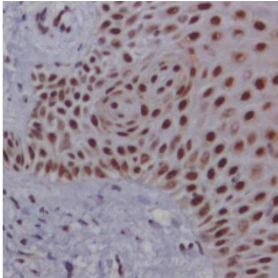
IL17F



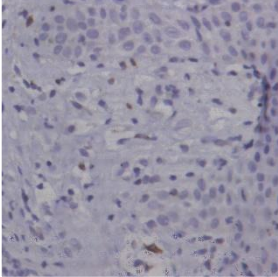
IL23



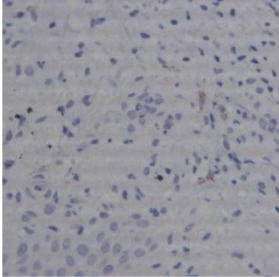
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

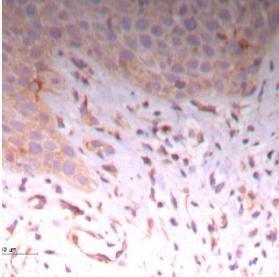


Abbildung 15: Patient 7; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

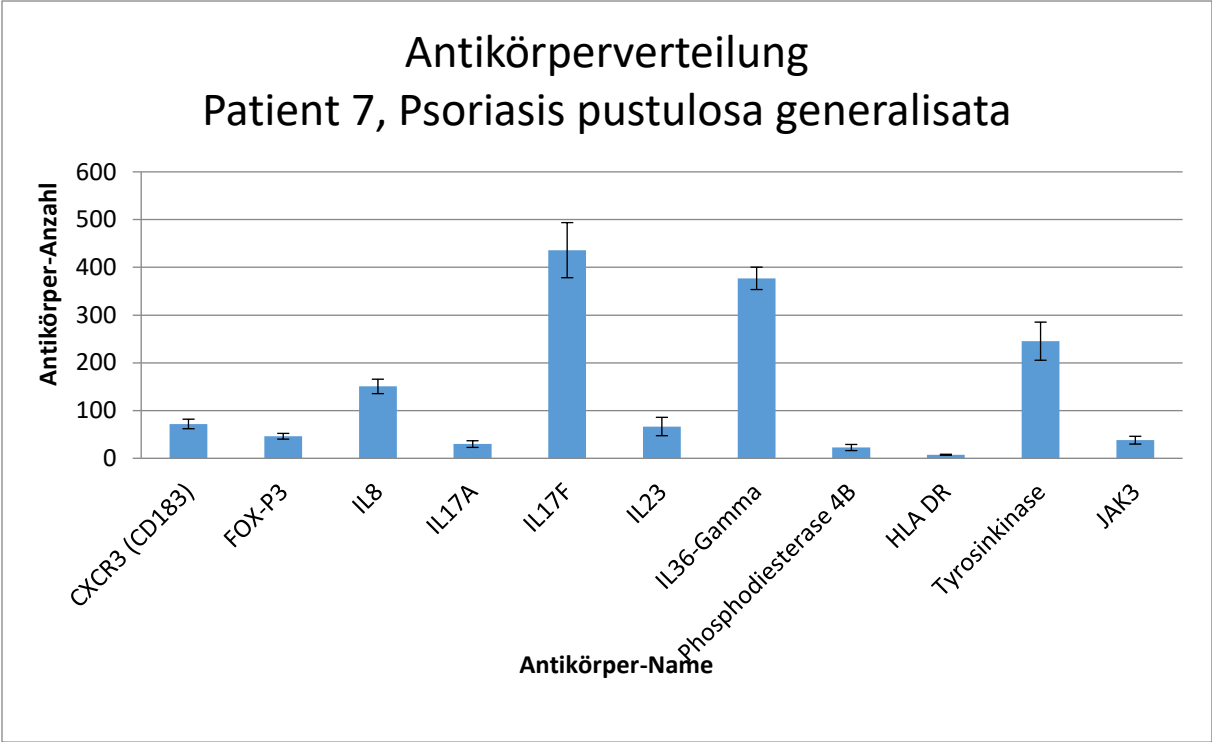


Diagramm 7: absolute Antikörperverteilung bei Patient 7, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 8

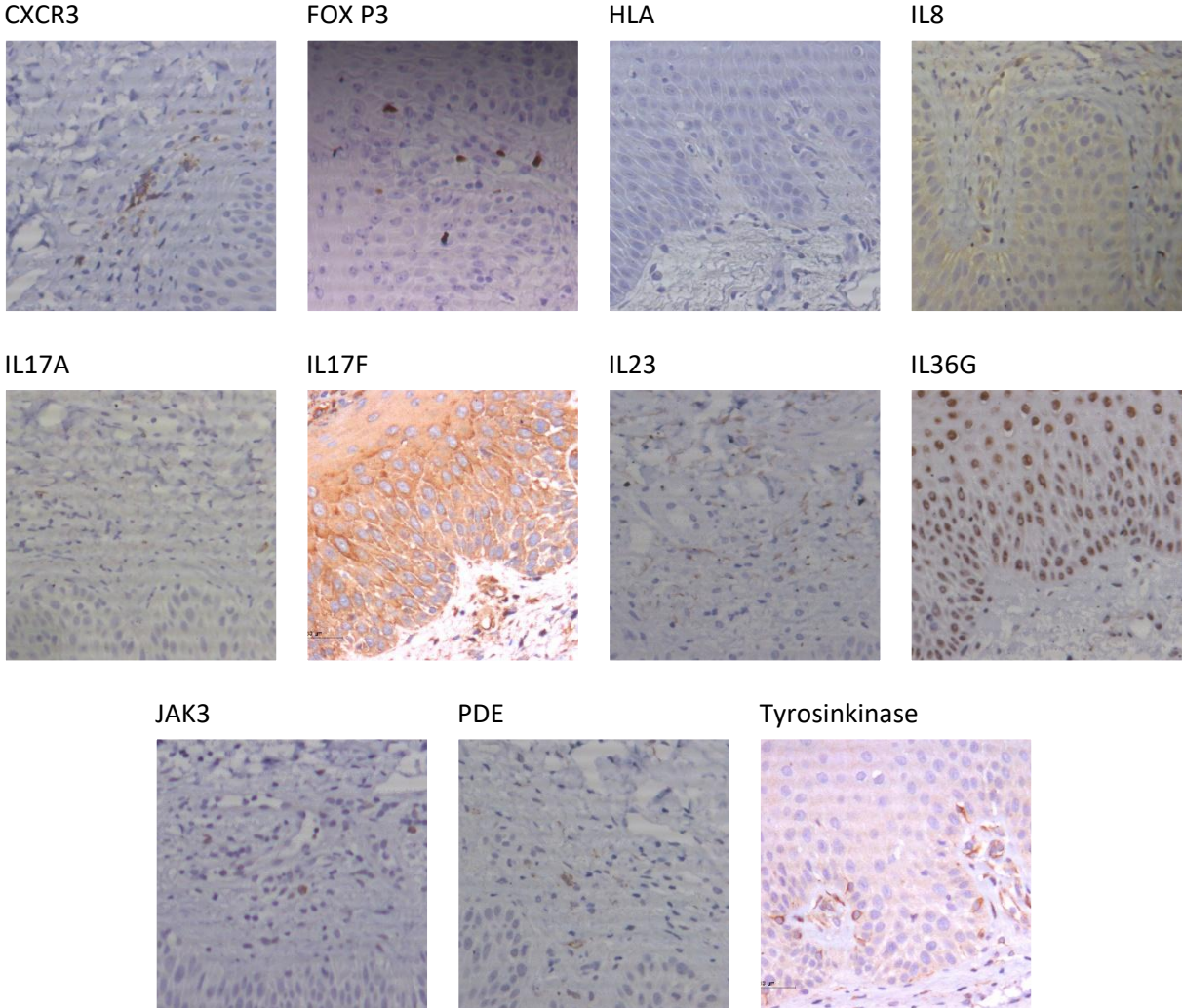


Abbildung 16: Patient 8; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

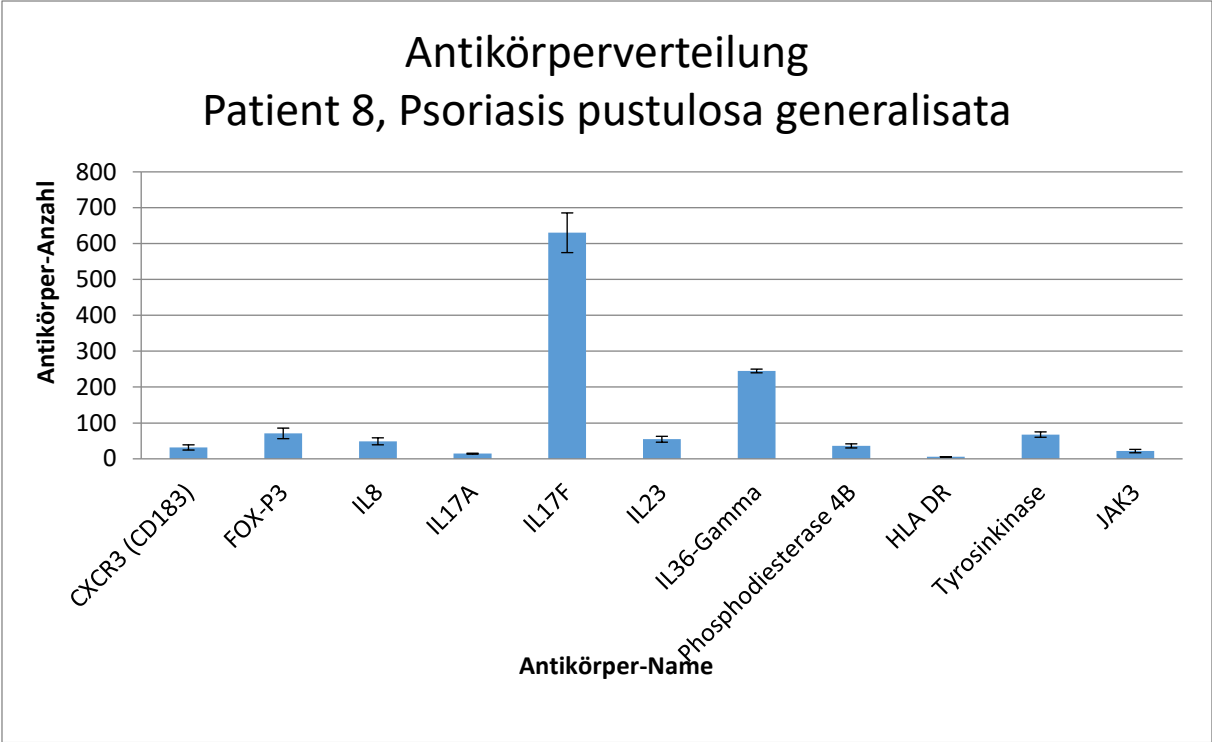
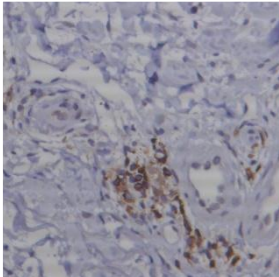


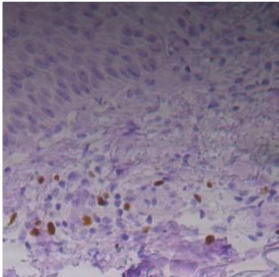
Diagramm 8: absolute Antikörperverteilung bei Patient 8, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 9

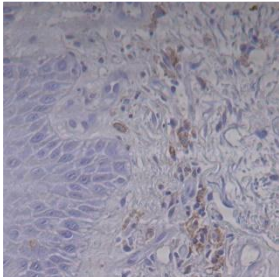
CXCR3



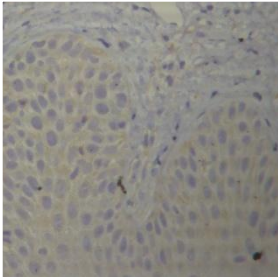
FOX P3



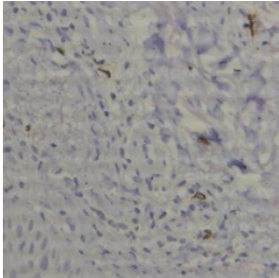
HLA



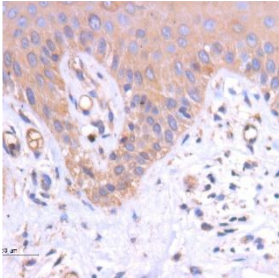
IL8



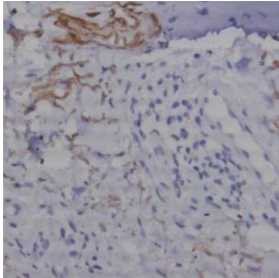
IL17A



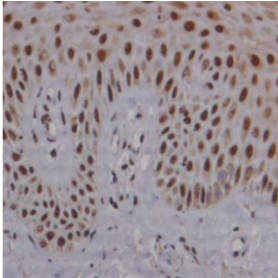
IL17F



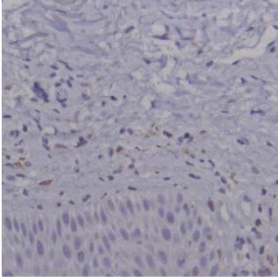
IL23



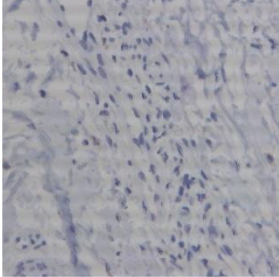
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

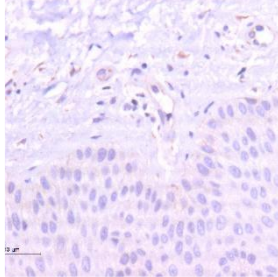


Abbildung 17: Patient 9; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

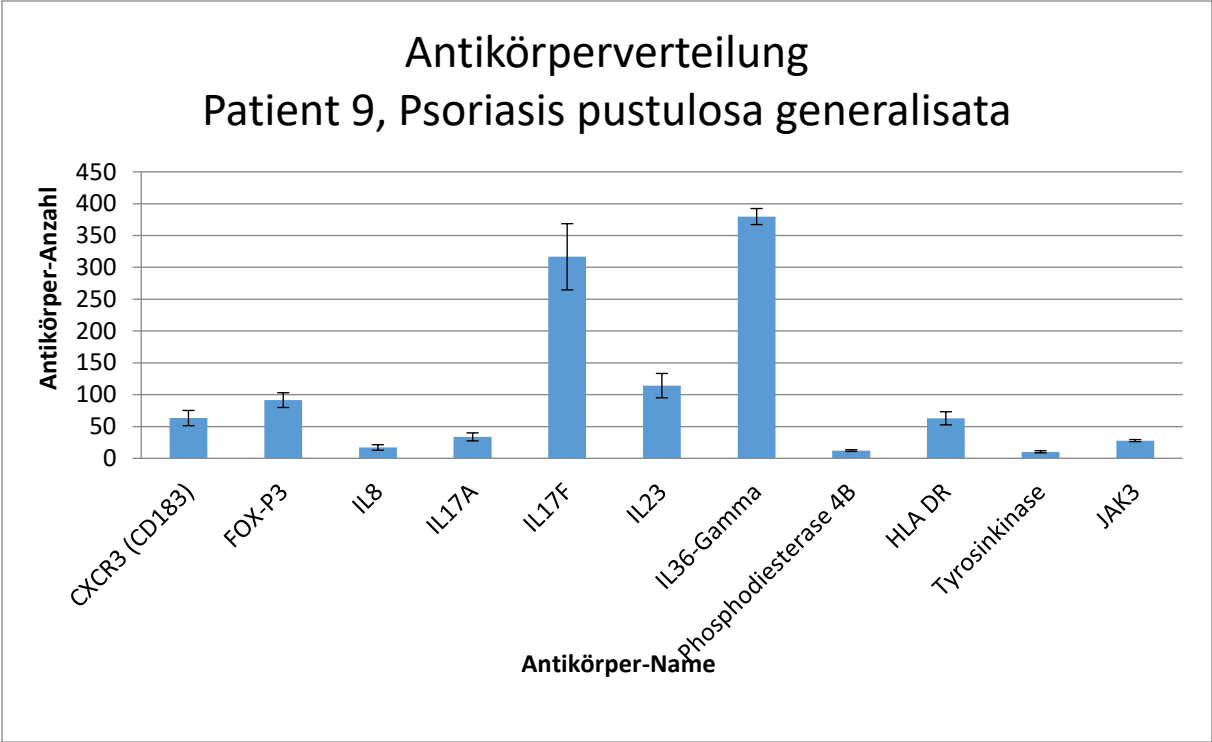
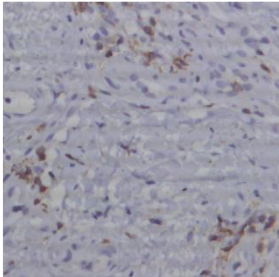


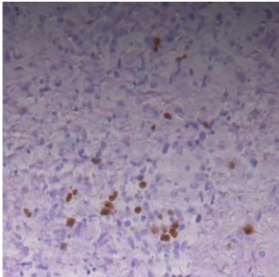
Diagramm 9: absolute Antikörperverteilung bei Patient 9, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 10

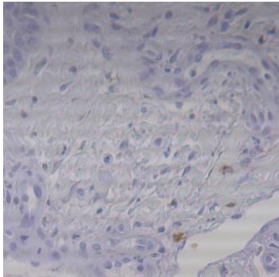
CXCR3



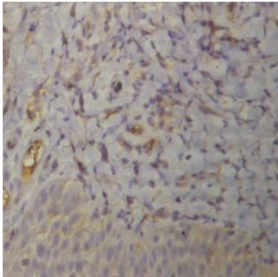
FOX P3



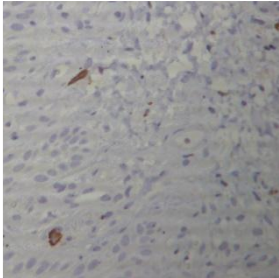
HLA



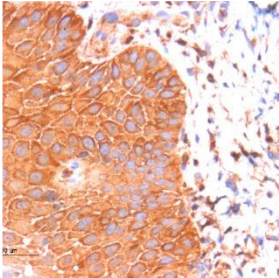
IL8



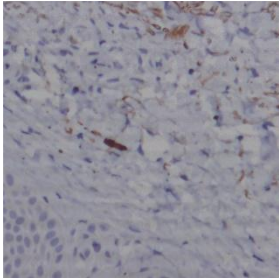
IL17A



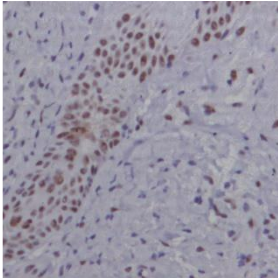
IL17F



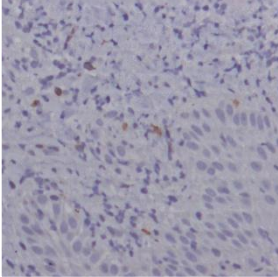
IL23



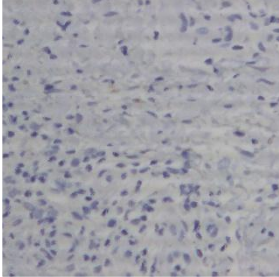
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

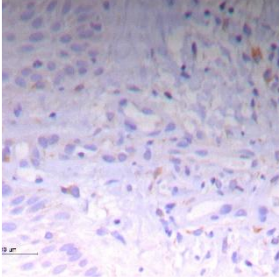


Abbildung 18: Patient 10; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

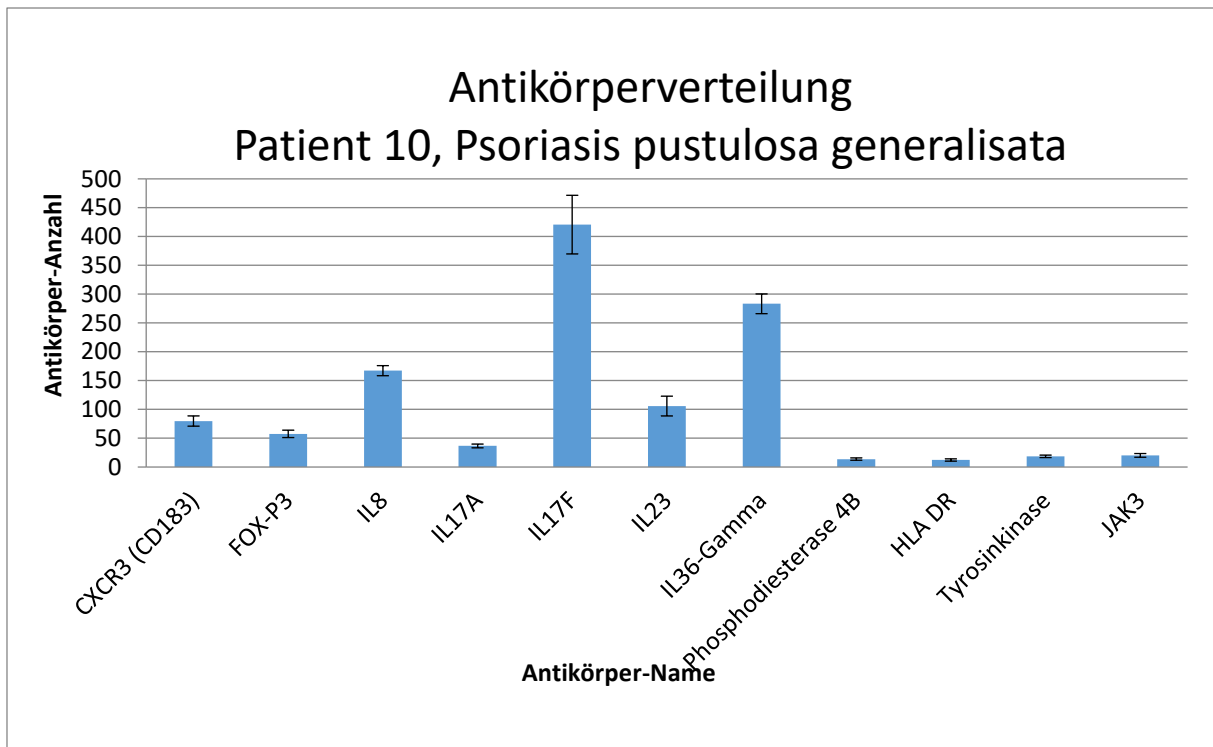


Diagramm 10: absolute Antikörperverteilung bei Patient 10, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 11

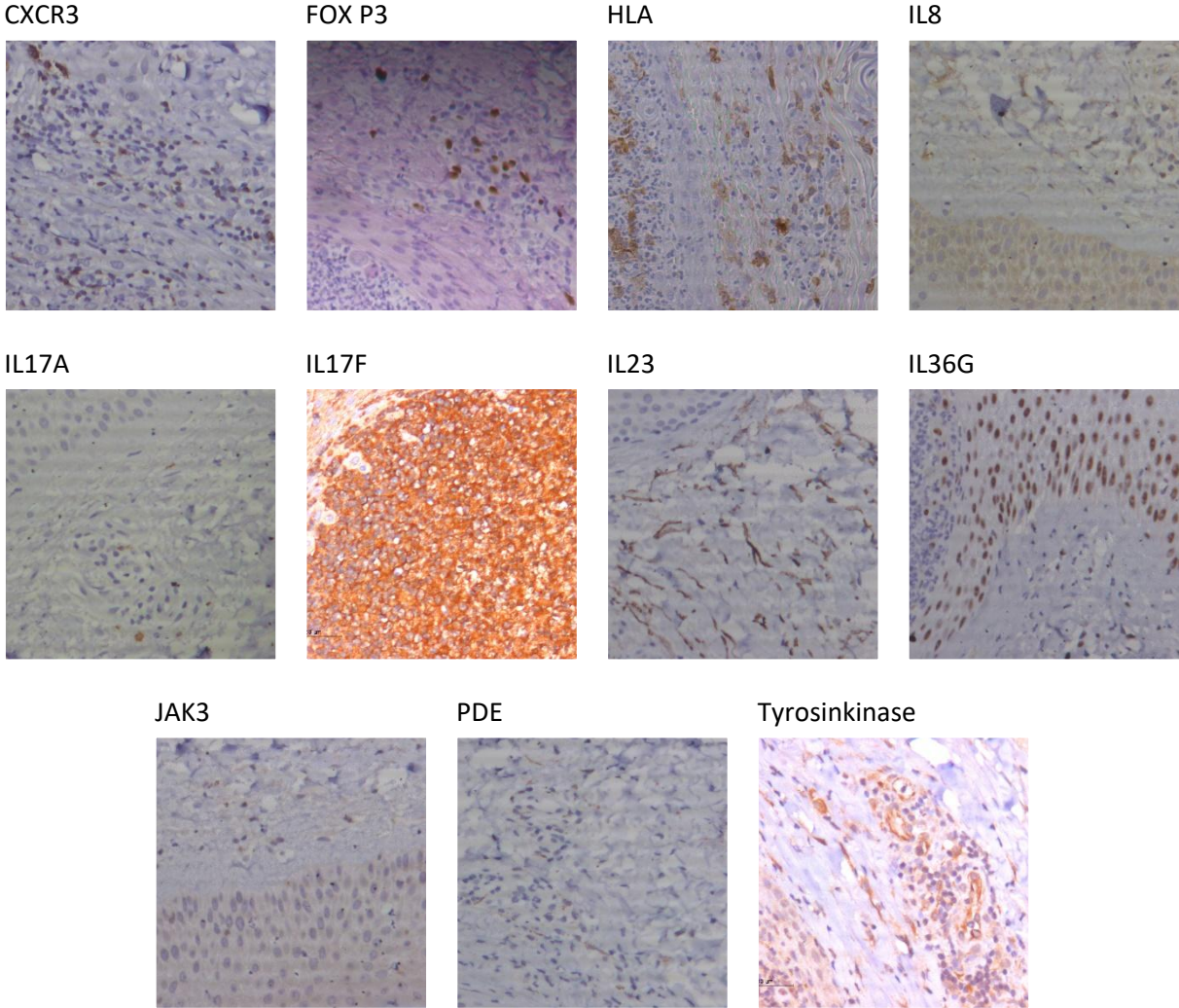


Abbildung 19: Patient 11; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

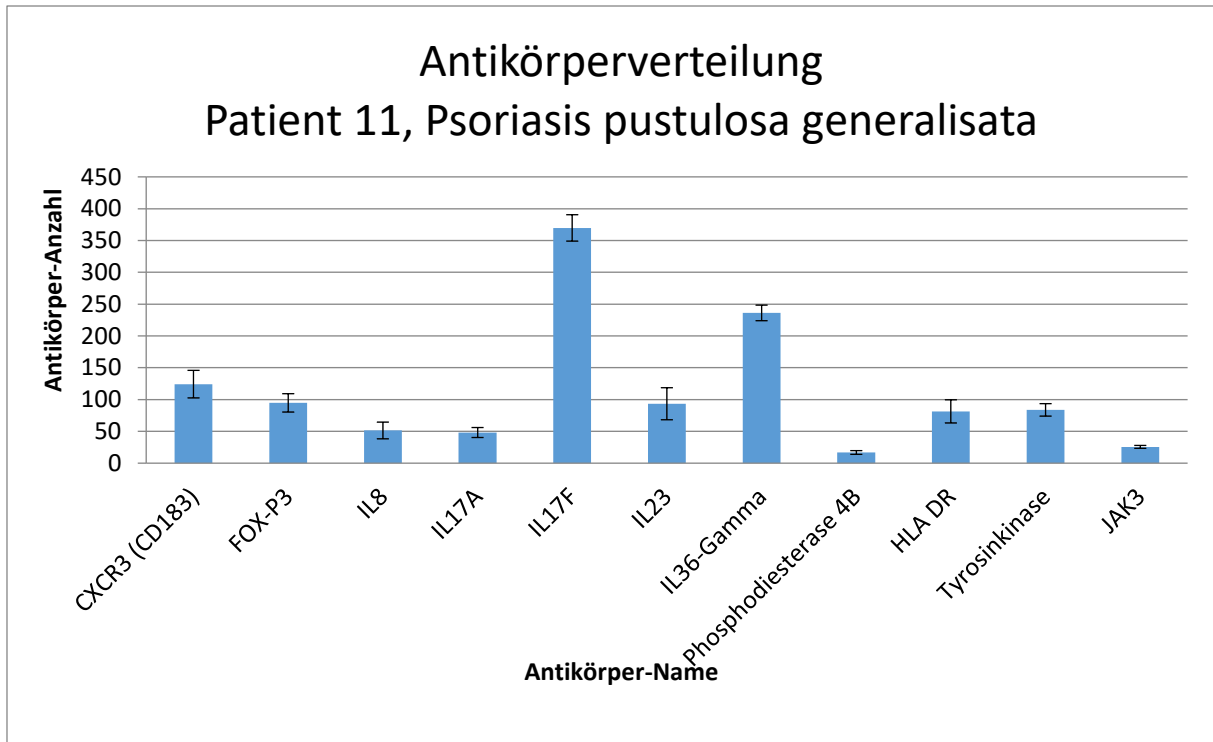
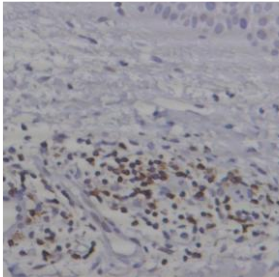


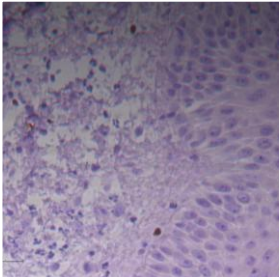
Diagramm 11: absolute Antikörperverteilung bei Patient 11, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 12

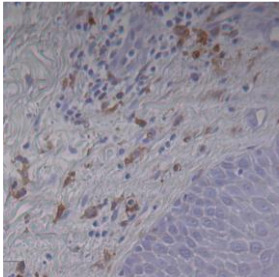
CXCR3



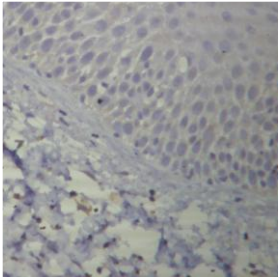
FOX P3



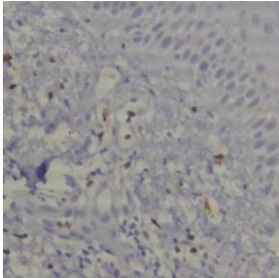
HLA



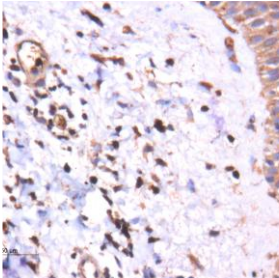
IL8



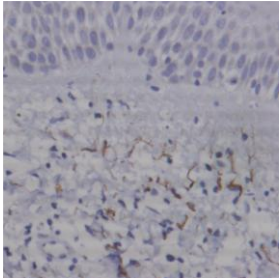
IL17A



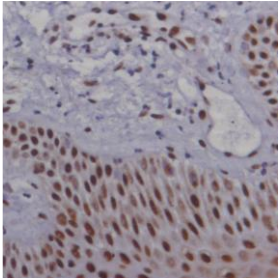
IL17F



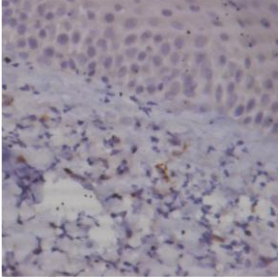
IL23



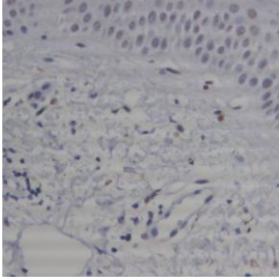
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

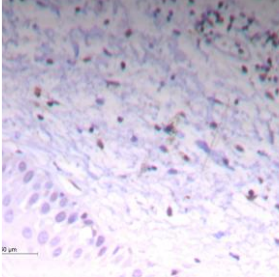


Abbildung 20: Patient 12; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

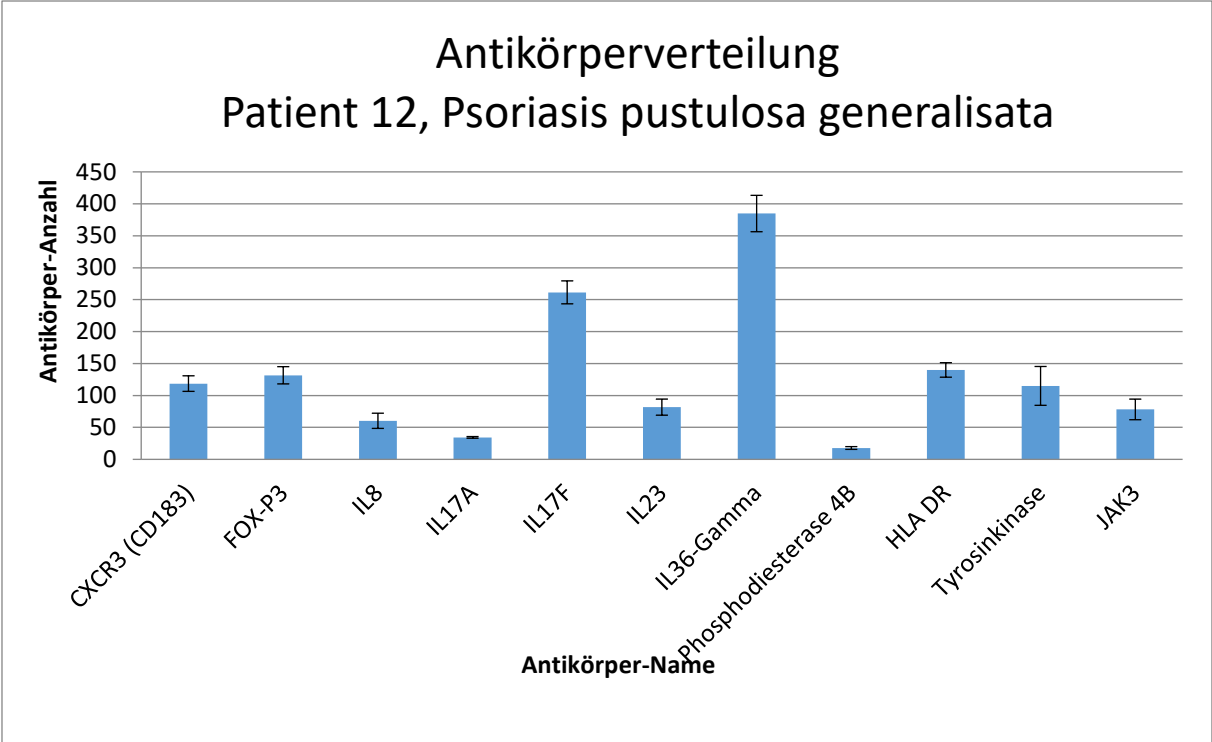
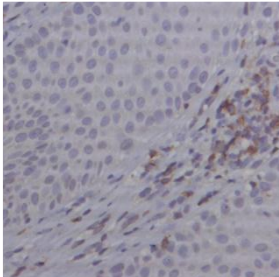


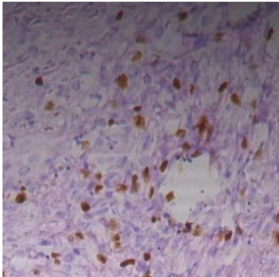
Diagramm 12: absolute Antikörperverteilung bei Patient 12, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 13

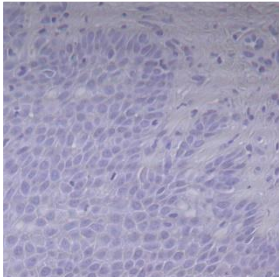
CXCR3



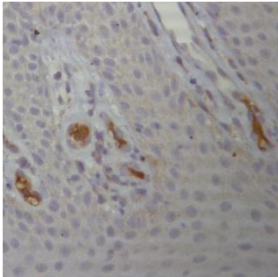
FOX P3



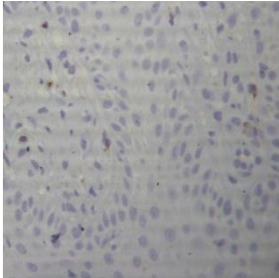
HLA



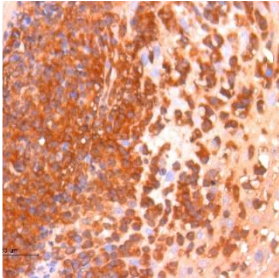
IL8



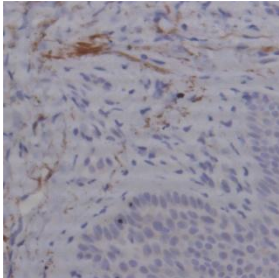
IL17A



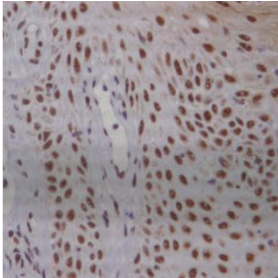
IL17F



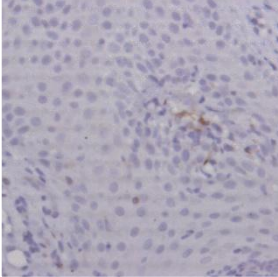
IL23



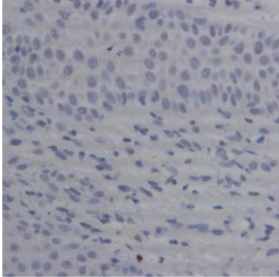
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

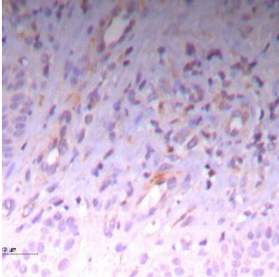


Abbildung 21: Patient 13; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

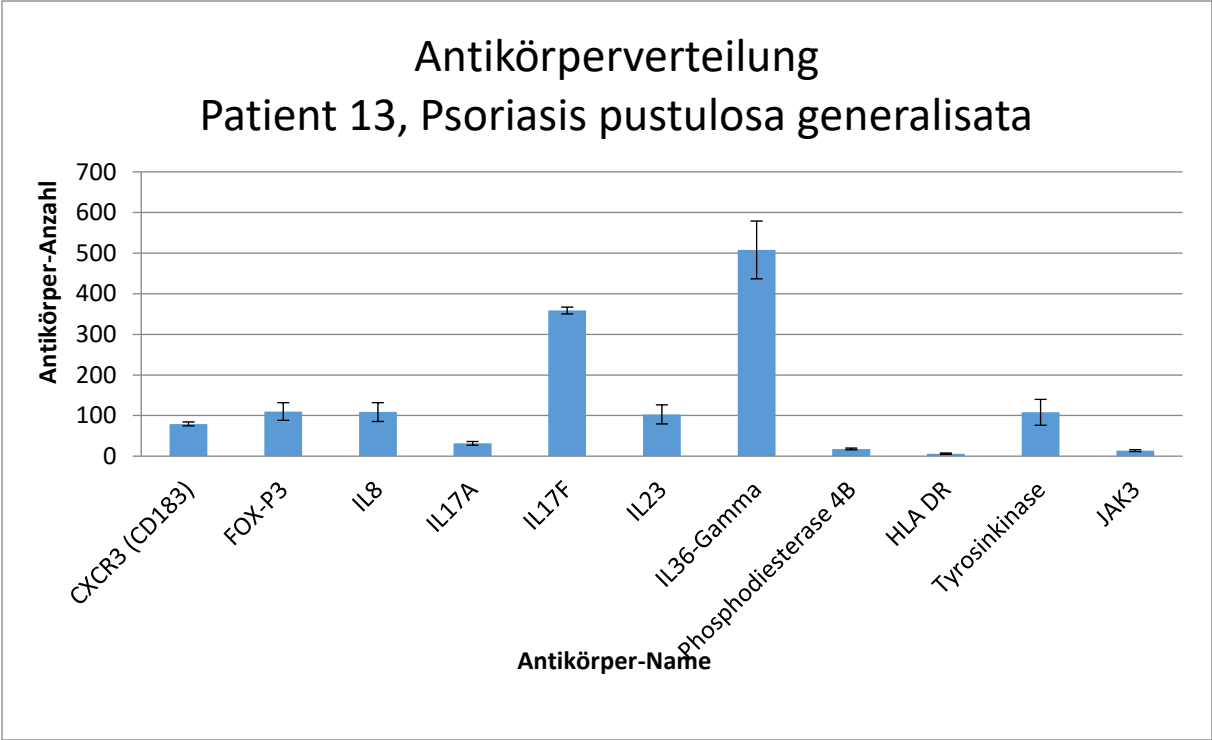


Diagramm 13: absolute Antikörperverteilung bei Patient 13, PPG; Fehlerindikator: Standardfehler

5.2 Bilder histologischer Schnitte und Antikörperverteilung der Kontrollproben

Patient 14

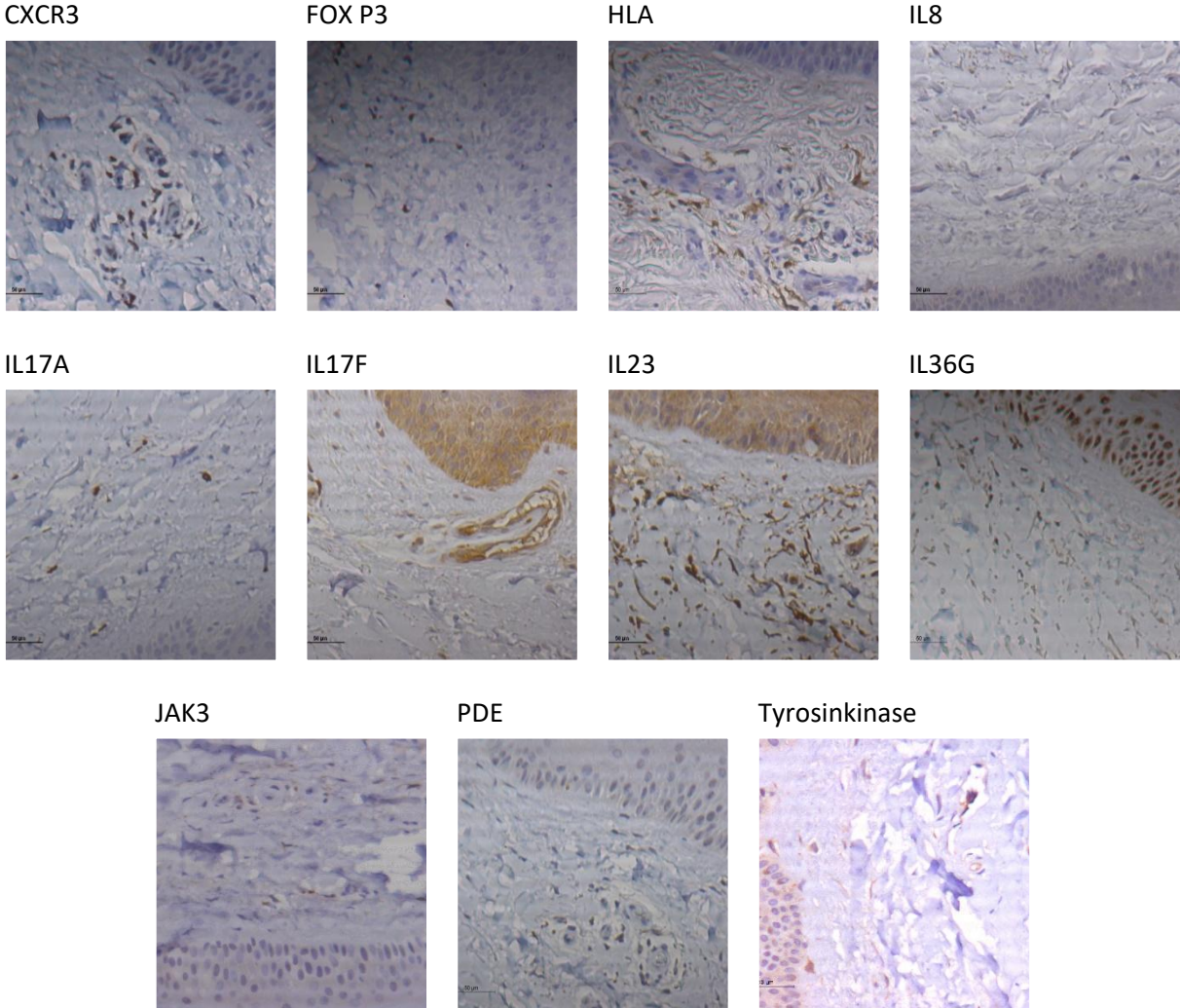


Abbildung 22: Patient 14; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

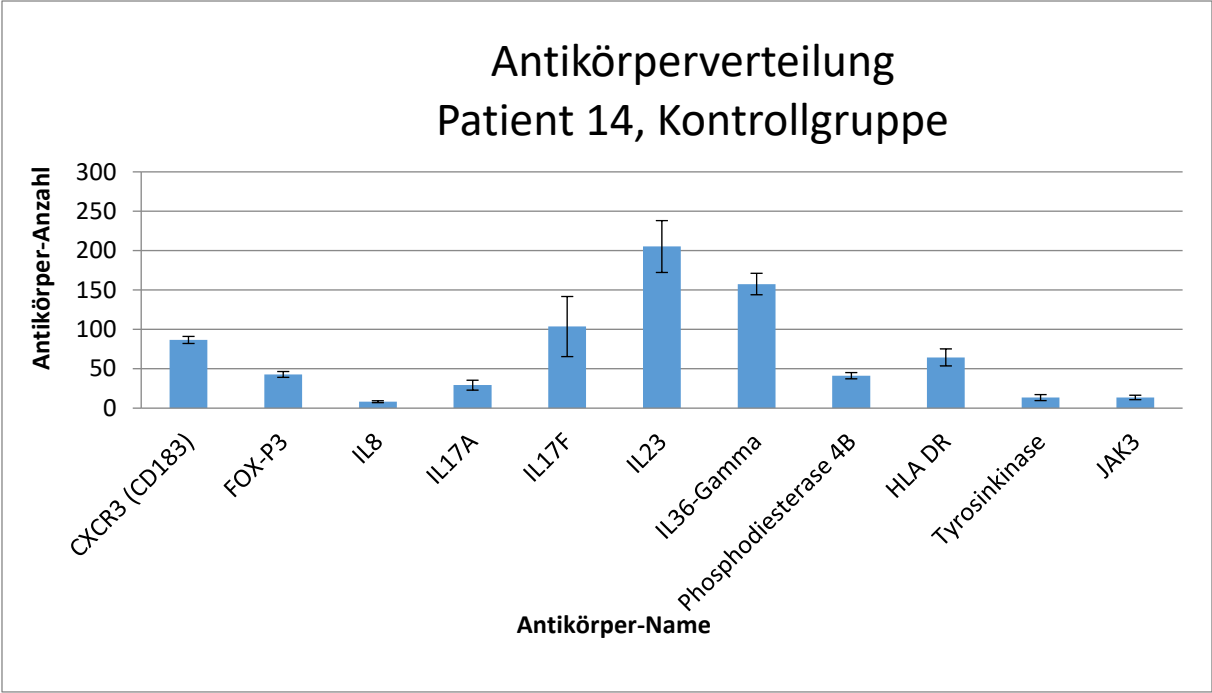
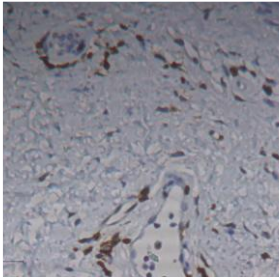


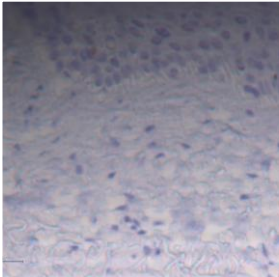
Diagramm 14: absolute Antikörperverteilung bei Patient 14, Kontrollgruppe; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 15

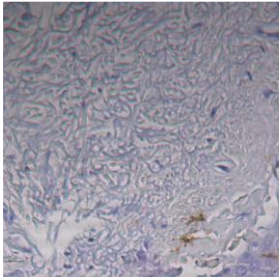
CXCR3



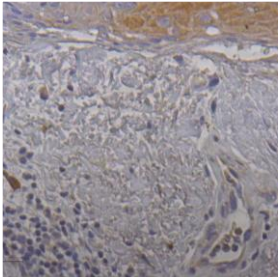
FOX P3



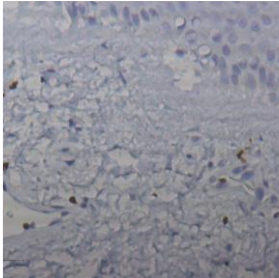
HLA



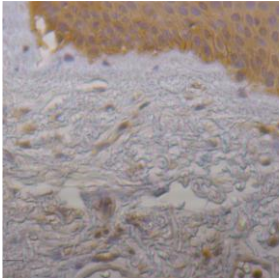
IL8



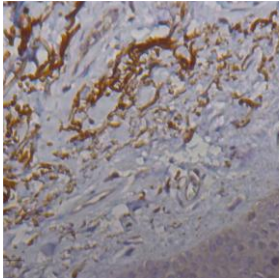
IL17A



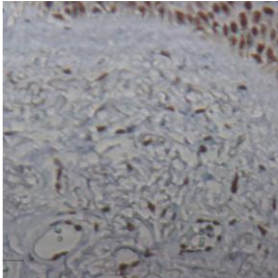
IL17F



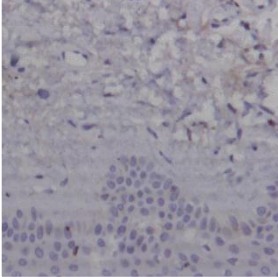
IL23



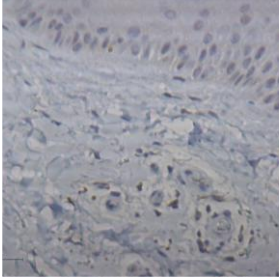
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

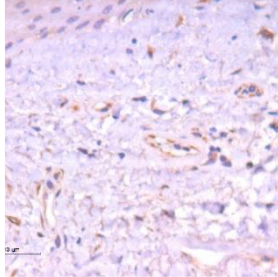


Abbildung 23: Patient 15; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

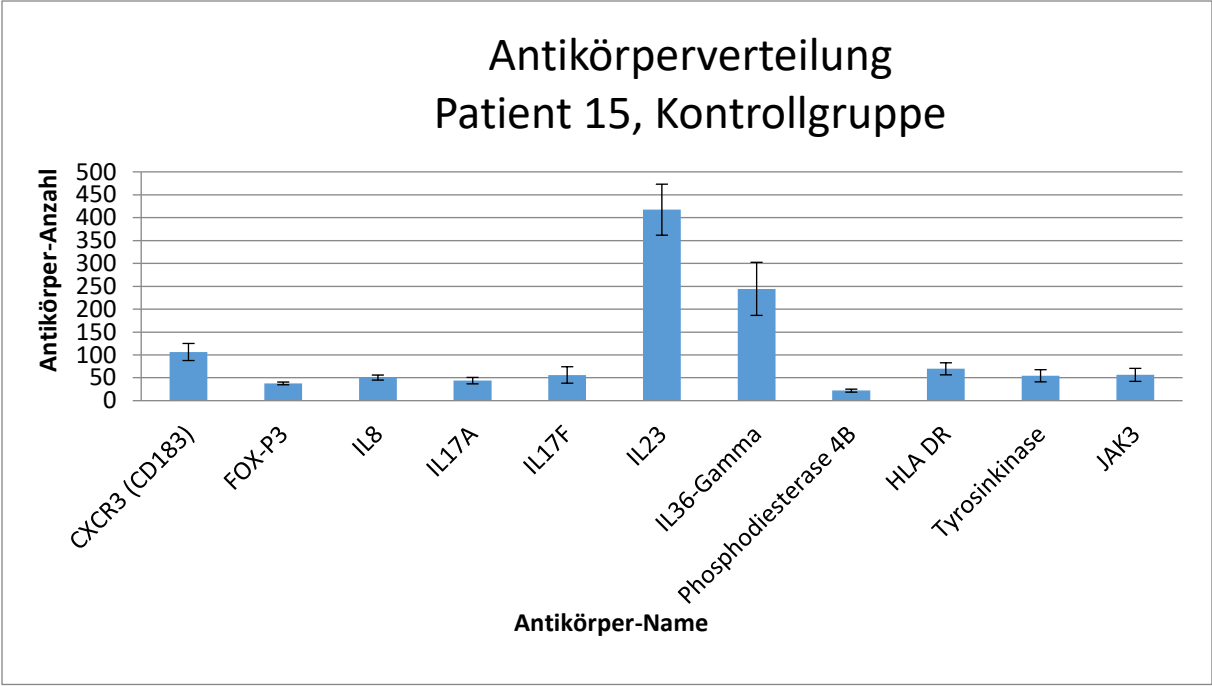
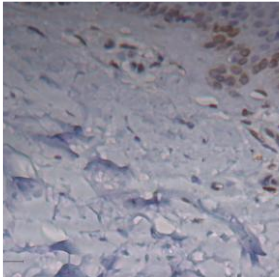


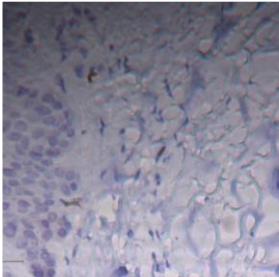
Diagramm 15: absolute Antikörperverteilung bei Patient 15, Kontrollgruppe; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 16

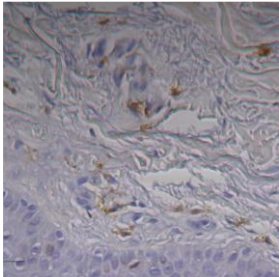
CXCR3



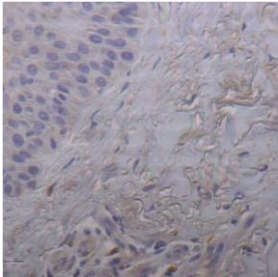
FOX P3



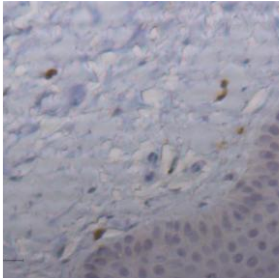
HLA



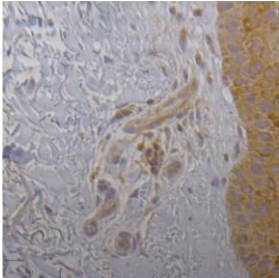
IL8



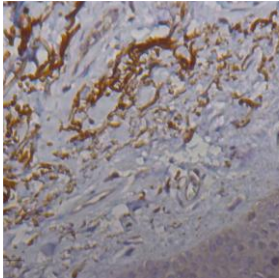
IL17A



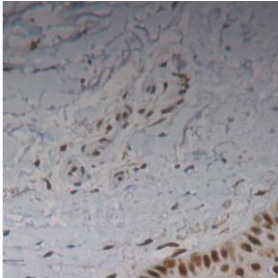
IL17F



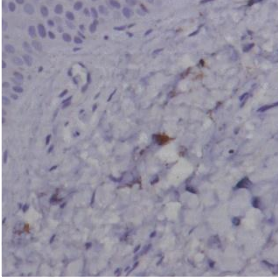
IL23



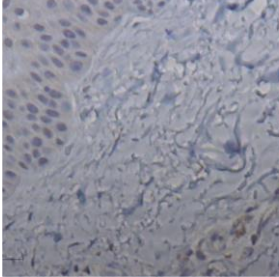
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

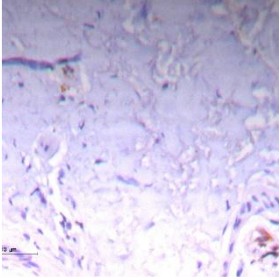


Abbildung 24: Patient 16; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

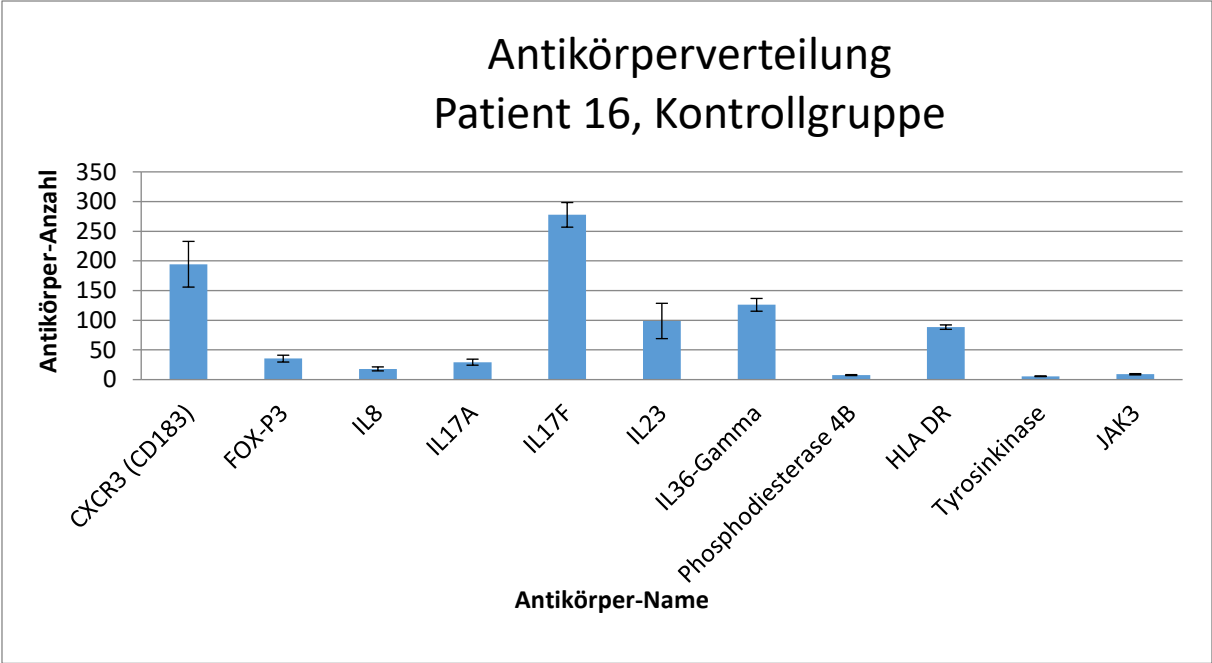
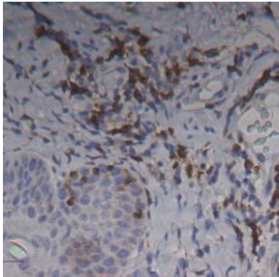


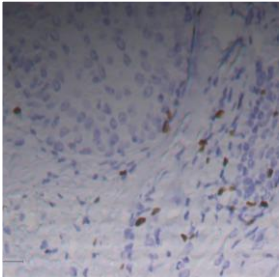
Diagramm 16: absolute Antikörperverteilung bei Patient 16, Kontrollgruppe; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 17

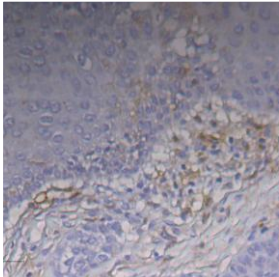
CXCR3



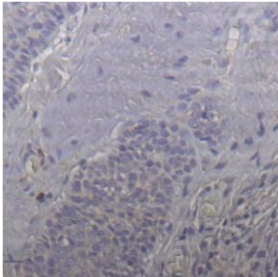
FOX P3



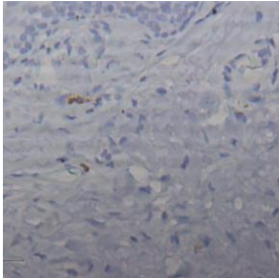
HLA



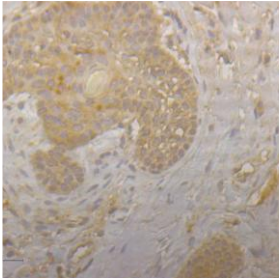
IL8



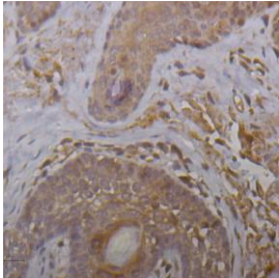
IL17A



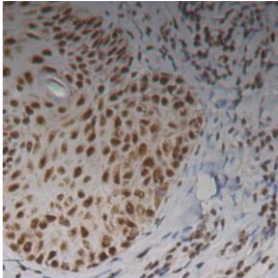
IL17F



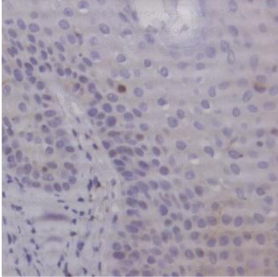
IL23



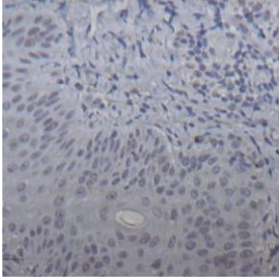
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

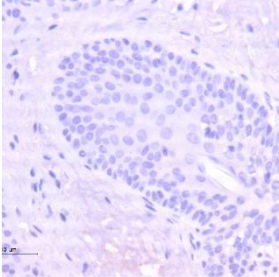


Abbildung 25: Patient 17; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

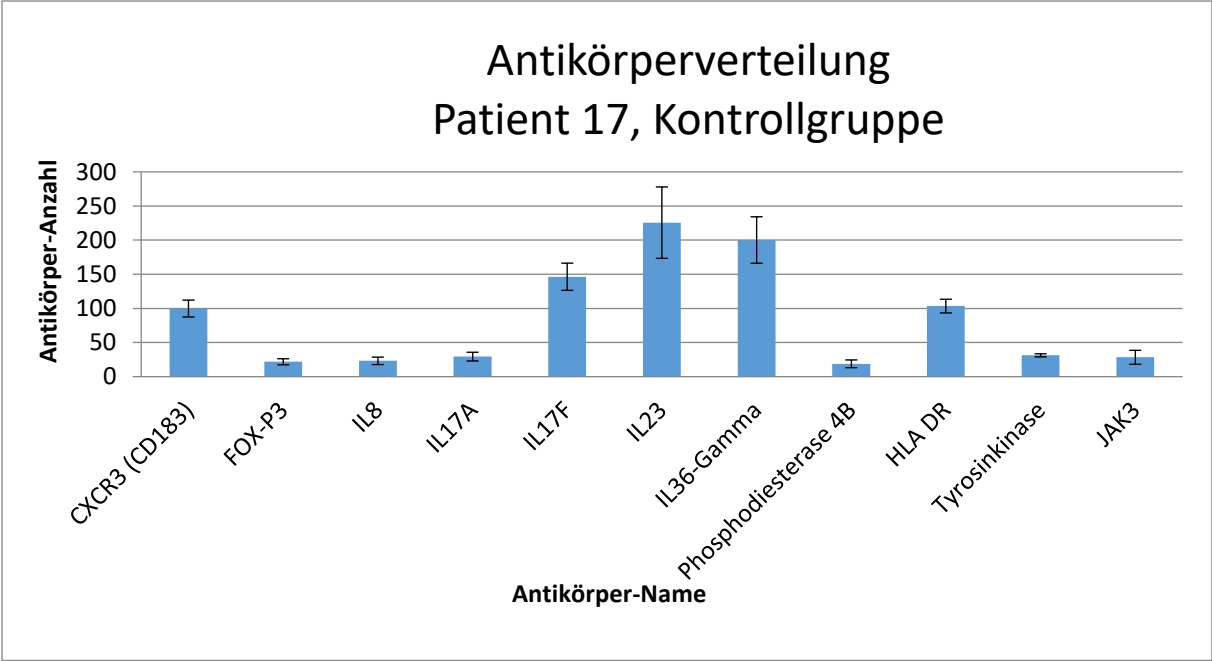
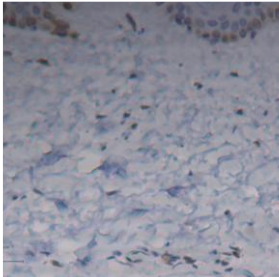


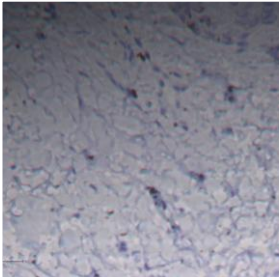
Diagramm 17: absolute Antikörperverteilung bei Patient 17, Kontrollgruppe; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 18

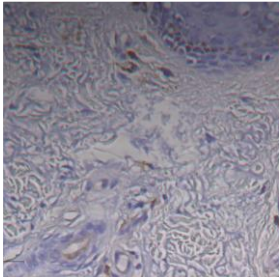
CXCR3



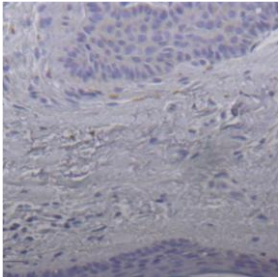
FOX P3



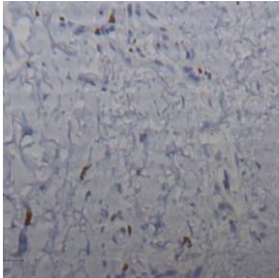
HLA



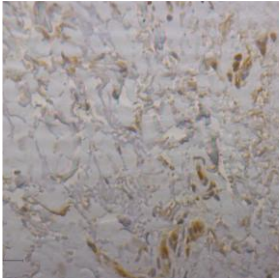
IL8



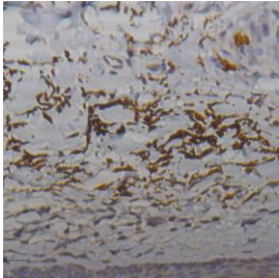
IL17A



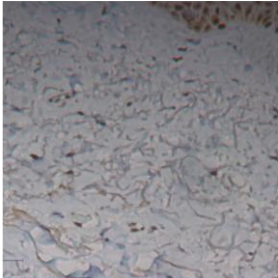
IL17F



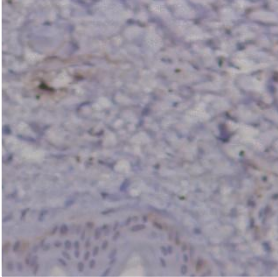
IL23



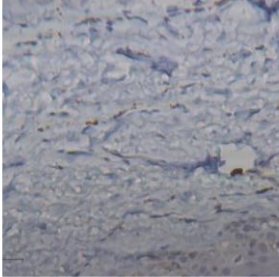
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

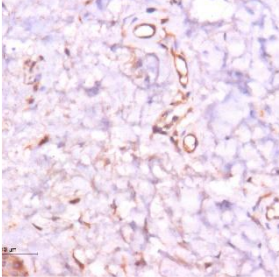


Abbildung 26: Patient 18; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

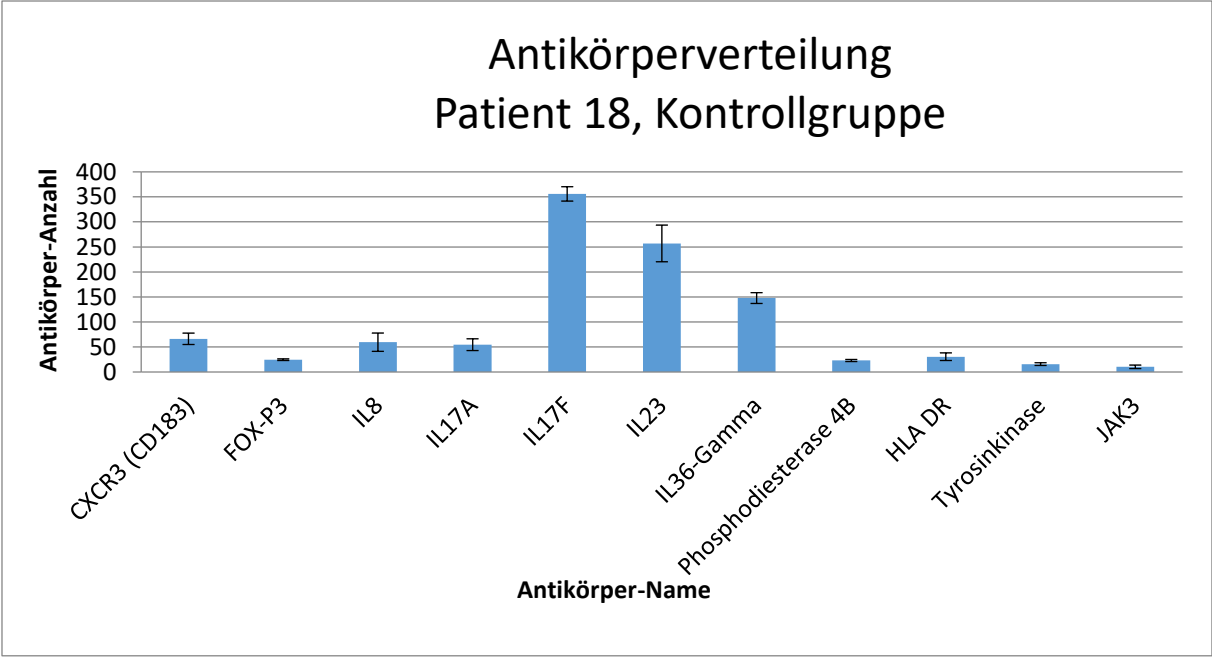


Diagramm 18: absolute Antikörperverteilung bei Patient 18, Kontrollgruppe; Fehlerindikator: Standardfehler

Patient 19

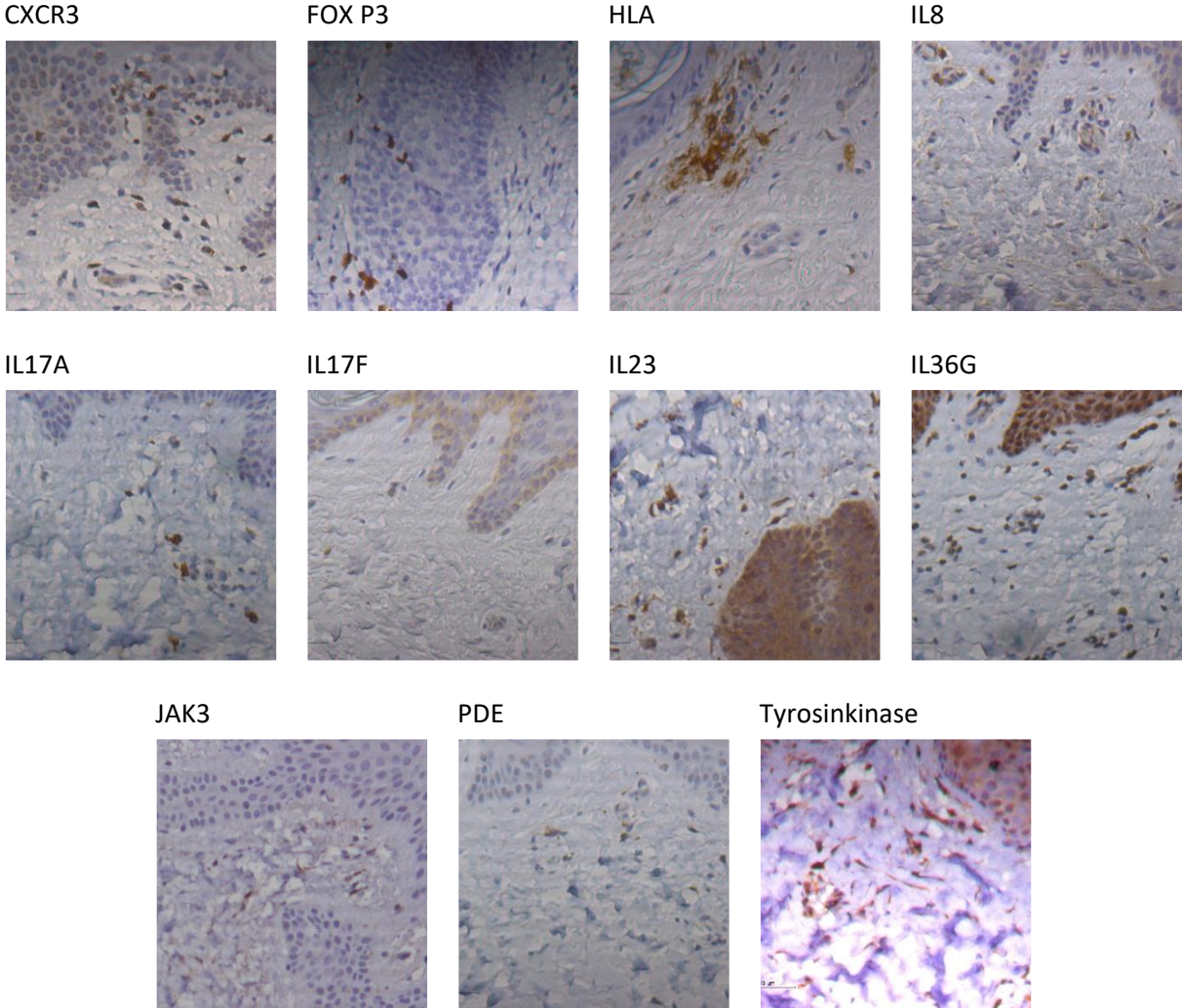


Abbildung 27: Patient 19; Histologie, ein Bildausschnitt pro Antikörper

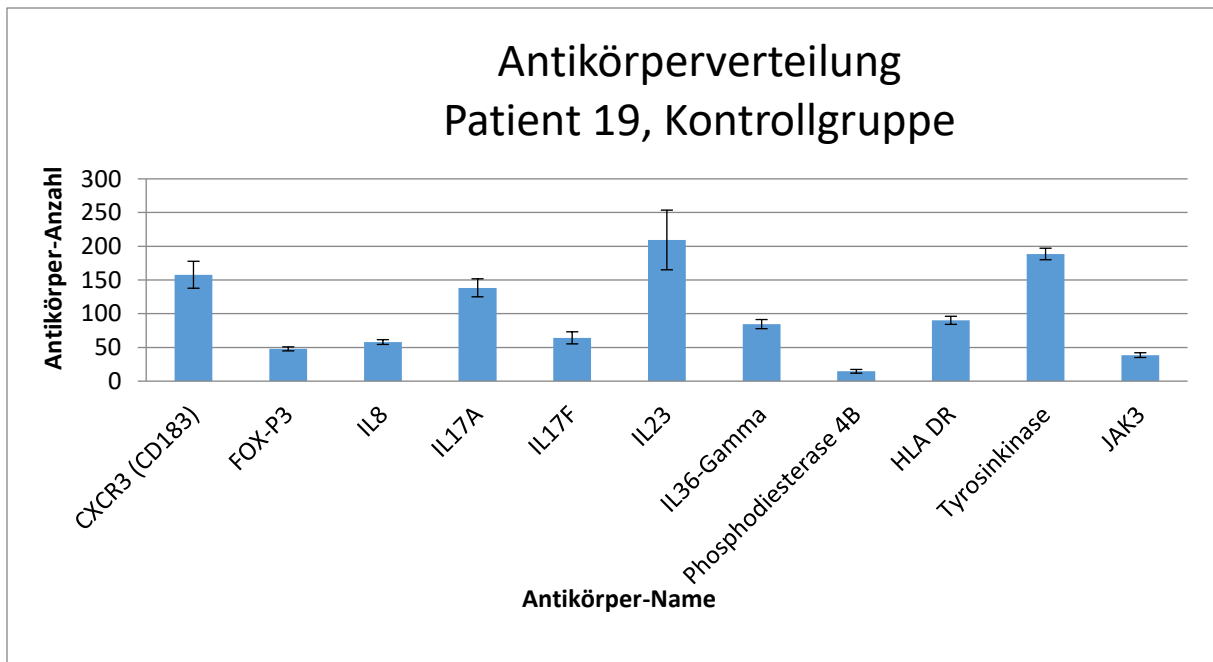


Diagramm 19: absolute Antikörperverteilung bei Patient 19, Kontrollgruppe; Fehlerindikator: Standardfehler

### 5.3 Überblicksaufnahmen für repräsentative Patienten aus jeder Gruppe

Um einen besseren Überblick über die Mikroskopie der Schnitte zu bekommen, sind im Folgenden Überblicksaufnahmen zu jedem Antikörper eines repräsentativen Patienten aus der Kontrollgruppe (Patient 14) und eines an PPG Erkrankten (Patient 11) angefertigt worden. Hier sieht man in 4-facher Vergrößerung den Übergang zwischen Epidermis und darunter liegenden Schichten sowie den verhornenden Anteil des Plattenepithels. Um den Überblick zu verbessern ist ebenfalls ein Teil des Randes auf den Bildern zu erkennen.

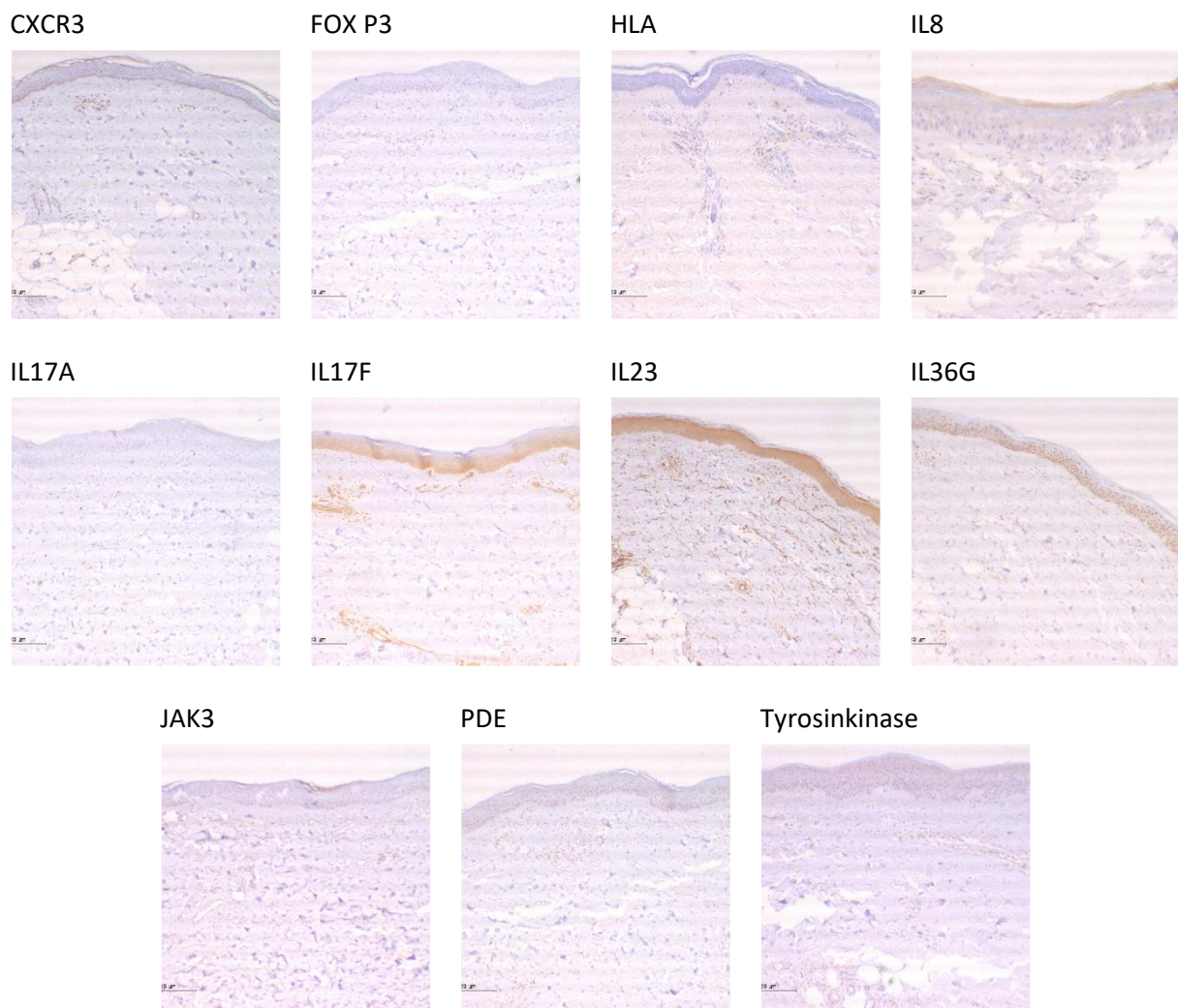
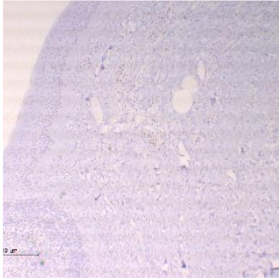
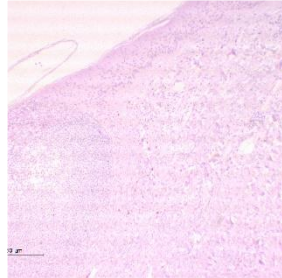


Abbildung 28: Überblicksaufnahmen Patient 14

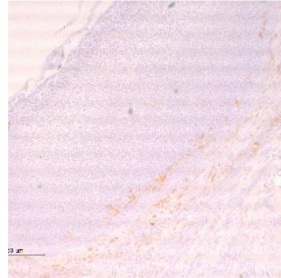
CXCR3



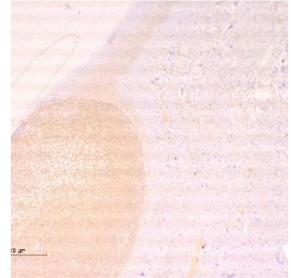
FOX P3



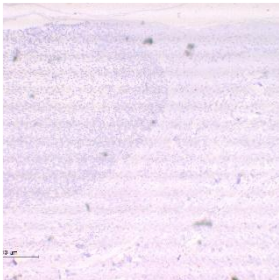
HLA



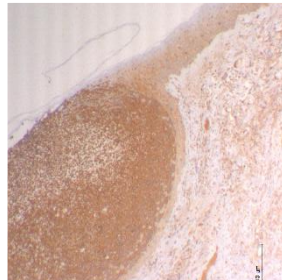
IL8



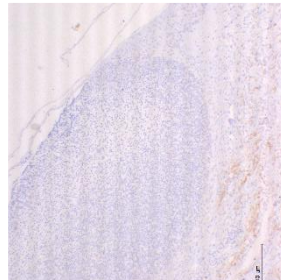
IL17A



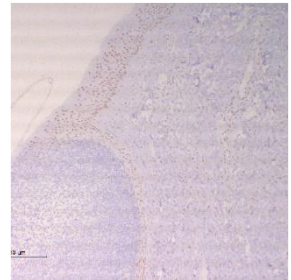
IL17F



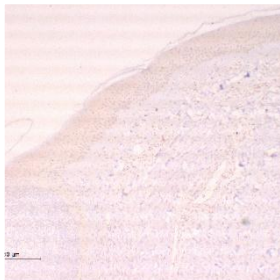
IL23



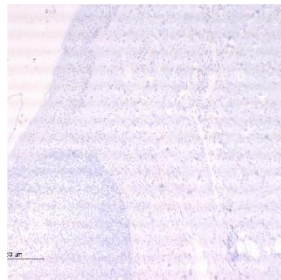
IL36G



JAK3



PDE



Tyrosinkinase

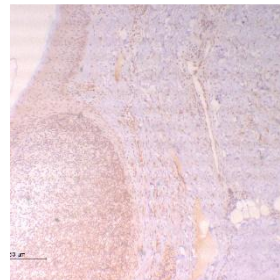


Abbildung 29: Überblickaufnahmen Patient 11

## 5.4 Antikörperverteilung: Vergleich der gemittelten Werte bei den verschiedenen Antikörpern

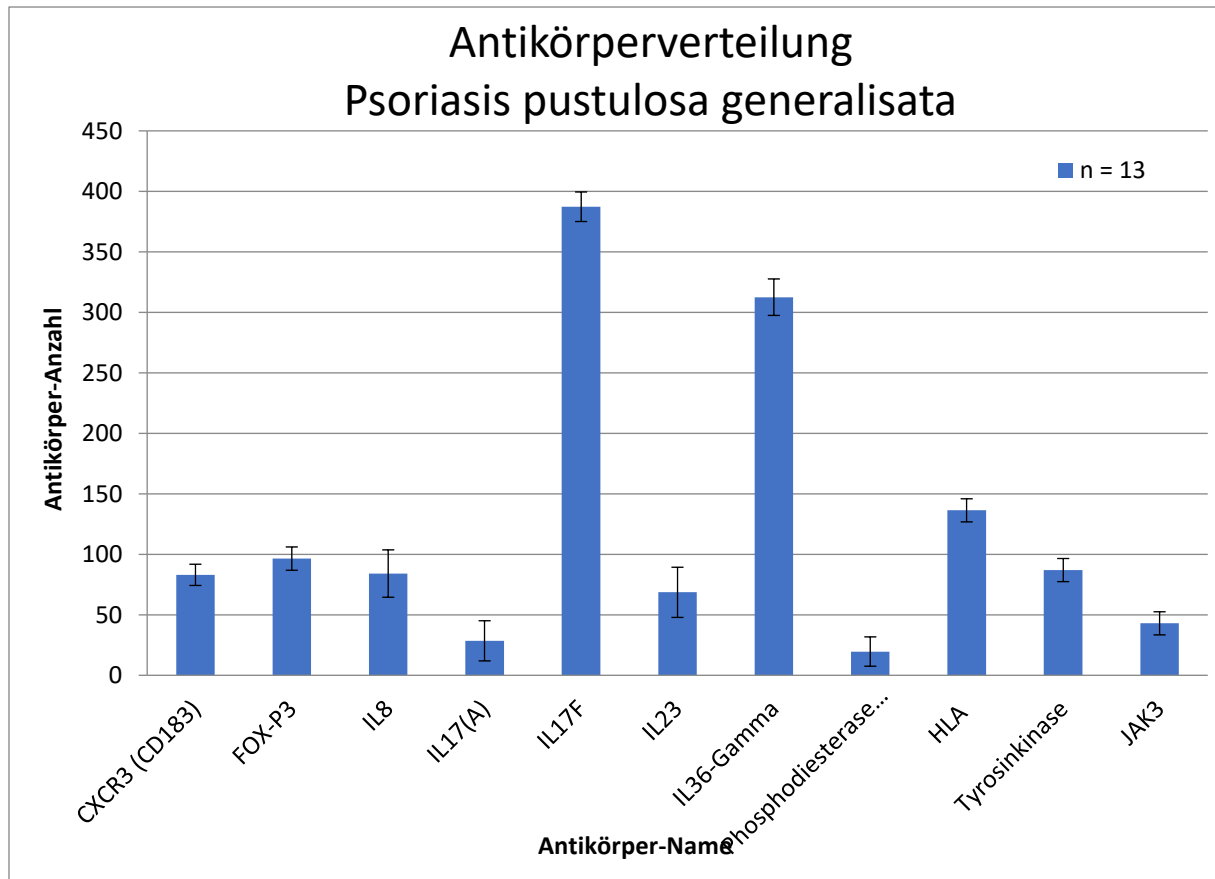


Diagramm 20: Absolute Antikörperzahl bei der PPG Gruppe, Fehlerindikator: Standardfehler

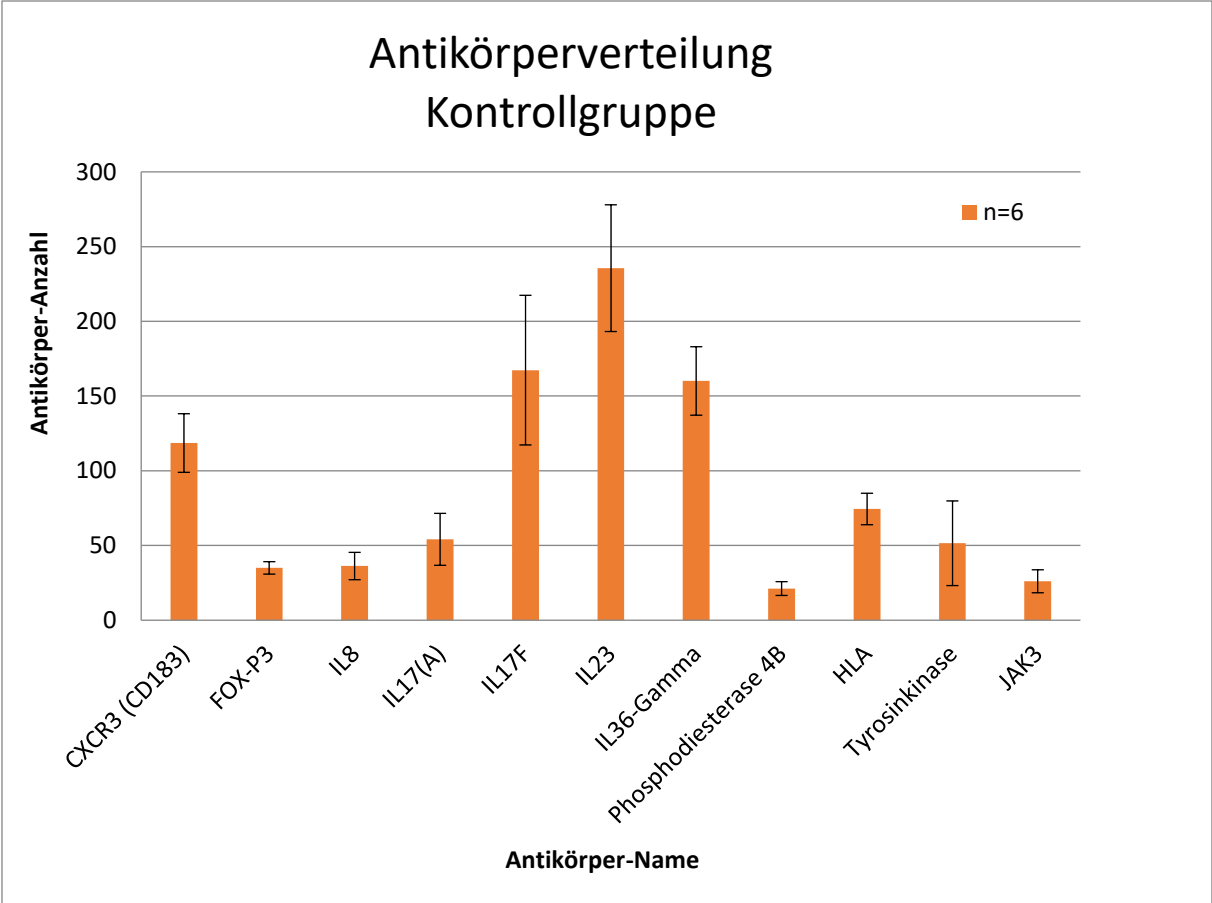


Diagramm 21: Absolute Antikörperzahl bei der Kontrollgruppe, Fehlerindikator: Standardfehler

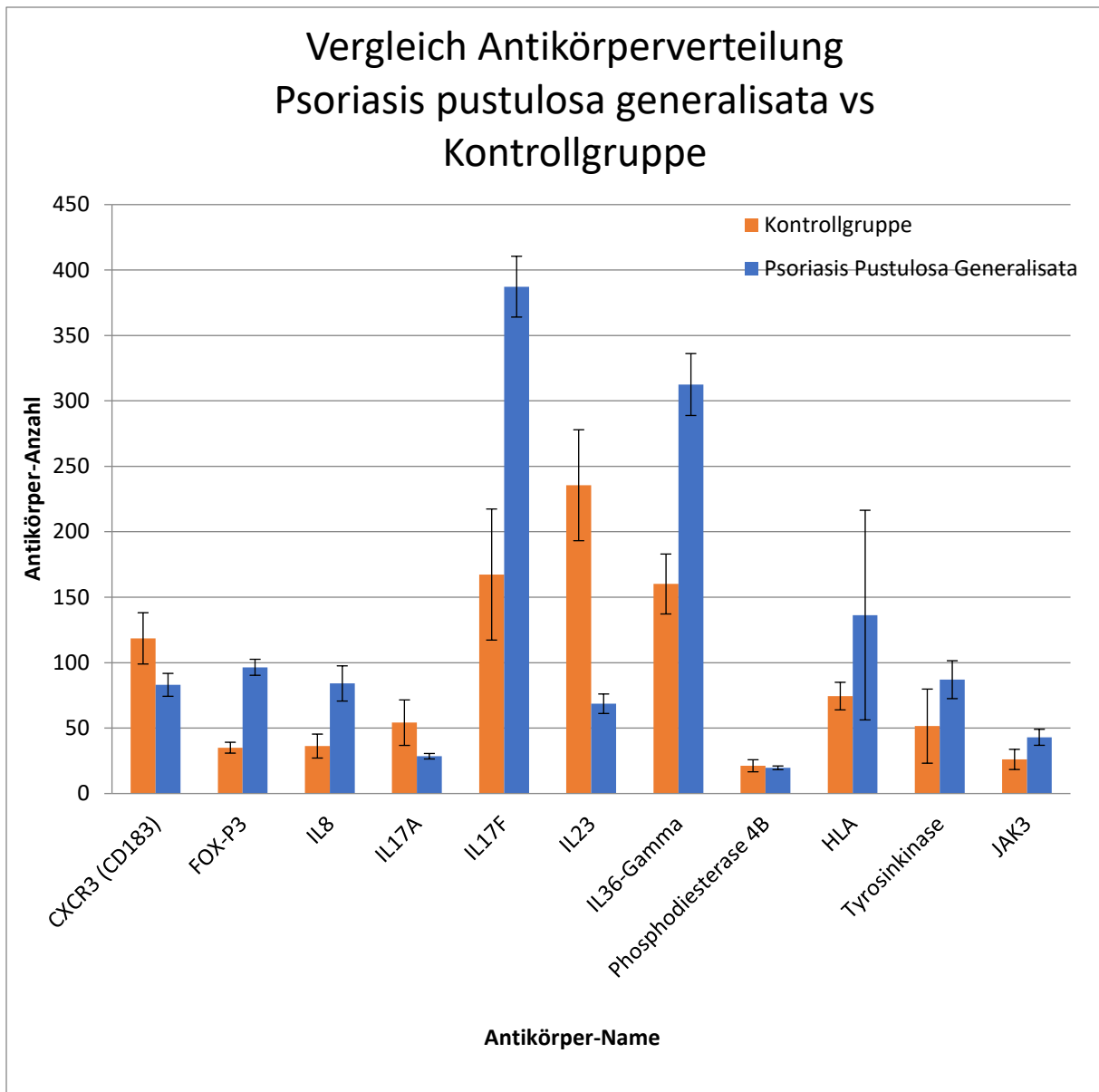


Diagramm 22: Vergleich der absoluten Antikörperzahlen beider Gruppen

T-Test, links der Antikörpername und rechts der P-Wert. Geordnet in der Signifikanz absteigenden Reihenfolge:

Antikörper Name	P-Value
Fox P3	5,46627E-06
IL 36G	0,001268784

IL 17F	0,004659964
IL 23	0,0099468
IL 8	0,03225824
CXCR3	0,156460518
JAK3	0,15673061
IL 17A	0,202095607
Tyrosinkinase	0,327664417
HLA	0,581566633
PDE	0,762720996

Tabelle 3 T-Test (Signifikanzen der Unterschiede in den verschiedenen Gruppen; geordnet: Absteigend)

## 6 Diskussion

### 6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Experiment besteht aus der immunhistochemischen Analyse der Antikörperexpression bei Hautbiopsien von 13 Patienten die an PPG erkrankt sind und sechs gesunden Kontrollpersonen.

Zuerst wurden beiden Gruppen die Hautbiopsien entnommen. Alle Hautbiopsien und somit auch Patienten wurden von der Haut- und Poliklinik der Johannes-Gutenberg-Universität akquiriert.

Dabei entstammen die Biopsien der erkrankten Gruppe direkt aus mit PPG befallener Haut, während es sich bei der Kontrollgruppe um gesunde Hautstellen, nicht erkrankter Haut handelt.

Ausgesucht wurden elf verschiedene Antikörper: CXCR3 (CD183), FOX-P3, IL8, IL17A, IL17F, IL23, IL36-Gamma, Phosphodiesterase 4B, HLA, Tyrosinkinase und JAK3.

Nach der immunhistochemischen Anfärbung jedes Hautschnitts, wurden diese unter dem Mikroskop betrachtet und Bilder gemacht, um diese anschließend Computersoftwareunterstützt auszuzählen. Dadurch konnte die absolute Häufigkeit der an der Immunreaktion beteiligten Zellen ausgezählt und im Anschluss mit Hilfe von Rechenoperationen ausgewertet werden.

In folgend absteigender Reihenfolge zeigt sich folgendes Häufigkeitsmuster der gemittelten, absoluten Antikörperzahlen in der Gruppe der PPG-Patienten:

IL 17F, IL 36G, HLA, FOX P3, Tyrosinkinase, IL 8, CXCR3, IL 23, JAK3, IL 17A, PDE.

Die Verteilung der absoluten Häufigkeitszahlen bei der Kontrollgruppe wie folgt, ebenfalls in absteigender Reihenfolge:

IL 23, IL 17F, IL 36G, CXCR3, HLA, IL 17A, Tyrosinkinase, IL 8, FOX P3, JAK3, PDE.

Vergleicht man nun die beiden Gruppen fallen die größten Unterschiede für IL 17F, IL 23 und IL 36G auf. Die Häufigkeit bei den Antikörpern IL 17F und IL 36G ist hierbei in der PPG Gruppe überlegen, während IL 23 bei der Kontrollgruppe sehr viel häufiger ist.

Auch für FOX P3, IL 8, HLA, Tyrosinkinase und JAK3 ist die Häufigkeit in der PPG Gruppe höher, als für die Kontrollgruppe. Bei CXCR3 und IL 17A ist die Anzahl in der Kontrollgruppe höher, während es bei der Phosphodiesterase ungefähr gleich ist.

Um die Signifikanz zu bestimmen wurden T-Tests durchgeführt. Anhand des P-Werts zeigt sich der signifikanteste Unterschied für Fox P3, gefolgt von IL 36G, IL 17F, IL 23 und IL 8.

Weniger signifikant sind die Unterschiede für die Tyrosinkinase, HLA und PDE.

Der P-Wert bei FOX P3 liegt bei 5,46627E-06, während er für PDE 0,762720996 beträgt.

## 6.2 Diskussion der Methoden

Um die Objektträger nutzen zu können, musste das Gewebe erstmal histologisch aufgearbeitet werden um es anschließend immunhistochemisch zu färben.

Der fertige Objektträger konnte nun mikroskopiert werden. Hierbei wurden 5 Bildausschnitte pro Objektträger ausgesucht und in 20-facher Vergrößerung fotografiert, um die entstandenen Bilder anschließend mithilfe von dem Plugin ICH-Profilier der Software *ImageJ* zu bearbeiten, um sie danach auch mit *ImageJ* automatisiert auszählen zu können.

In allen durchgeführten Schritten kann es nun, trotz aller Vorsicht, zu unvermeidbaren Fehlern kommen, die im Folgenden diskutiert werden.

Die histologische Aufarbeitung benötigt viel menschliche Arbeit einer routinierten Person. Nichtsdestotrotz kann es durch diesen, nicht mechanisiert und automatisierten Prozess zu personenspezifischen Fehlern kommen. Hierzu zählen unter anderem schwindende Konzentration, Zeitdruck und Müdigkeit,

was zu einer nicht jedes Mal identischen Handhabung der Geräte führen kann, nicht immer offensichtlich ist und damit in dem Moment nicht abstellbar ist. Genauso zu bedenken sind personenunabhängige, systematische Fehler, wie die Temperatur. Einerseits die der Umgebung, andererseits die der benutzten Geräte. Aber auch an Einflüsse wie Alterung und Abnutzung der Geräte muss gedacht werden.

Bei den Proben der PPG Patienten ist nicht bekannt, wie schwer der Schub ist und in welchem Stadium des Schubs der Patient sich gerade befindet, was Unterschiede bedingen kann. Zudem handelt es sich um verschiedene Körperregionen, die in ihrem histologischen Aufbau leichte Unterschiede aufweisen können.

Beim Mikroskopieren muss darauf geachtet werden, nach Möglichkeit keine Gefäße zu fotografieren, da sich die Häufigkeit der Antikörper hier stark zum Rest der Haut unterscheidet und für die Fragestellung weniger interessant ist. Dadurch müssen Zonen, die eine hohe Expression an Antikörpern haben, auf denen aber Gefäße zu sehen sind, ausgespart werden und andere Zonen gewählt werden, deren Antikörperzahl geringer ist. Folglich zählt man nicht alle Antikörper im Präparat aus, sondern sucht sich fünf Zonen aus. Genauere Ergebnisse könnten durch mehr Zonen pro Bild erreicht werden.

Um die Ergebnisse nicht durch unterschiedliche Mikroskopbedingungen zu verfälschen wurde in einer Sitzung der gleiche Antikörper für alle Schnitte beider Gruppen mikroskopiert.

Durch die Bearbeitung der Bilder mit festgelegtem Algorithmus, kann sichergestellt werden, dass die Auszählung, zumindest in der Theorie, gleiche Voraussetzung hat. Allerdings muss man auch hier jedes Originalbild mit dem bearbeiteten vergleichen, da das Programm nicht zwischen der, den Auswertenden interessierenden Antikörpern und anderen Plaques unterschiedlicher Genese unterscheiden kann. Das Bild wurde dann manuell nachbearbeitet. Um als Untersucher zu wissen, welche Struktur von Relevanz ist, vergleicht man mit den zu jeder Färbung angefertigten Negativ-Kontrollen.

Außerdem erlangt man durch das Programm eine Wiederholbarkeit und Überprüfbarkeit, die bei manueller Auszählung nicht gewährleistet werden kann.

Die genutzte Software bietet des Weiteren gegenüber einer rein manuellen Auszählung Zeitvorteil. Durch diesen können in gleicher Zeit mehr Daten ausgewertet werden. Je größer die Stichprobe, desto repräsentativer.

### 6.3 Diskussion der Ergebnisse

Das menschliche Immunsystem nimmt eine Schlüsselstelle ein, wenn es um die Dysregulationen in von Psoriasis betroffener Haut geht. Eine Vielzahl von Entzündungszellen, darunter vor allem CD4+ T-Helferzellen, Monozyten/Makrophagen Keratinozyten und Fibroblasten beteiligen sich an der Produktion und Wirkung von Zytokinen, insbesondere hier von Interesse die Interleukine.

Diese, als Mediatoren tätigen Botenstoffe, sorgen unter anderem für die stark proliferierende Epidermis, locken aber auch weitere Entzündungszellen chemotaktisch in das Gewebe, wie etwa neutrophile Granulozyten und wirken im Generellen proinflammatorisch.

Wie bereits durch vorausgegangene Studien gezeigt, gibt es einen Zusammenhang zwischen der IL 36G Expression und der PPG. Nicht nur in der Blutbahn, sondern auch in der betroffenen Haut selbst, konnten erhöhte Spiegel dieses Zytokins festgestellt werden (34, 58). IL 36G wird hauptsächlich von Keratinozyten selbst produziert und wirkt auf Fibroblasten Immunzellen wie T-Helferzellen und Epithelzellen chemotaktisch, proliferativ, proinflammatorisch und sekretorisch und trägt so zur Entstehung der Pusteln bei (34, 59, 60).

Dies wird unter anderem durch eine Mutation im IL 36RN Gen erklärt. Dieses kodiert für den Rezeptorantagonisten IL 36RN, welcher die Wirkung von IL 36G und IL 36A in gesundem Gewebe antagonisiert (35).

Bei der PPG ist die Expression von IL36G nicht nur höher als in gesunder Haut, sondern auch höher als bei der Psoriasis vulgaris. Anders stellt sich dies bei IL 17A dar. Hier ist die Expression bei der PV höher als bei der PPG (34).

Diese Arbeit bestätigt die hohe Relevanz von IL 36G bei der PPG, denn auch hier zeigt sich IL 36G mengenmäßig als der höchst exprimierte Antikörper und hat auch den signifikantesten Unterschied zur Normalhaut.

Bereits 2019 gab es erste erfolgreiche Versuche PPG mit einem IL 36-Rezeptor Antagonisten, dem monoklonalen Antikörper Spesolimab (BI 655130), in einer

Phase 1 Studie zu therapieren. Hier zeigten sich bereits nach einmaliger Gabe Therapieerfolge. Aktuell laufen hierzu Phase 2 und 3 Studien (61-63). Für die Psoriasis pustulosa palmoplantaris endete im April 2021 eine Phase 2a Studie über die Wirksamkeit von Spesolimab, die zu der Erkenntnis kam, dass das Biological hier zwar klinische Besserung brachte, den primären Endpunkt aufgrund nicht signifikanter Unterschiede aber nicht erfüllt hat. Weitere Ergebnisse werden hier aus Phase 2b Studien erhofft (64).

Auch Anakinra, ein IL-1 Rezeptor Antagonist und Gevokizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen IL-1beta haben in Studien Wirksamkeit gezeigt, was durch die Stimulierbarkeit der Produktion von IL36G durch IL1 erklärt wird (65).

Weitere Biologicals die bereits erfolgreich in der Therapie gegen vor allem therapieresistente Psoriasis vulgaris aber auch PPG und PPP verwendet werden, richten sich gegen TNF-alpha und IL 17 (65). In dieser Arbeit konnte für IL17F eine sehr hohe Expression bei der Patientengruppe verglichen zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden mit ebenso hoher Signifikanz. Betrachtet man die Expression von IL17A zeigt sich eine höhere Expression in der Kontrollgruppe, aber mit niedriger Signifikanz.

Die höchste Signifikanz für eine Überexpression im erkrankten Gewebe verglichen zu Normalhaut ist beim Antikörper FoxP3 zu erkennen. FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor der gehäuft in Zellkernen von CD4+ T-Helferzellen vorkommt. Hier reguliert es die Expression verschiedener immunologisch aktiver Gene (66). Auch wenn die genaue Rolle von FoxP3 noch nicht klar ist, haben Studien Zusammenhänge zwischen Mutationen im Intron des FoxP3 Gens und Psoriasis aufgedeckt (67, 68).

Methotrexat, ein sehr häufig eingesetztes und klinisch gut wirksames Medikament bei Psoriasis, reguliert die Expression von FoxP3 mRNA und T-Helferzellen (69). Die Beeinflussung von FoxP3 durch andere Medikamente könnte somit weitere Therapieerfolge erzielen.

Auch IL8 zeigt sich in dieser Arbeit als ein signifikant höher ausgeprägter Antikörper in der erkrankten Haut. IL8 ist ein insgesamt bei akuter Inflammation ausgeschüttetes Zytokin, welches neutrophile Granulozyten rekrutiert und aktiviert. Diese Neutrophilen sorgen mitunter für die Pustelbildung. Bereits bei anderen Erkrankungen die mit einer sterilen Neutrophilen Inflammation einhergehen, wie Lipopolysaccharid-induzierte Dermatitis und Arthritis sowie

Immunkomplex ablagernde Glomerulonephritiden, konnte ein hoch spezifischer Anti-IL8 Antikörper Gewebeschädigung entgegenwirken und vorbeugen (70, 71). Denkbar wäre ein solcher also auch für PPG.

## 7 Zusammenfassung

Psoriasis pustulosa generalisata ist eine schwere, chronisch-entzündliche, dermatologische Erkrankung die mit der Psoriasis vulgaris assoziiert ist. Sie kann durch ihre sterilen eitrigen Pusteln, welche am ganzen Körper verteilt vorkommen können und von Fieber und generellem Unwohlsein begleitet werden, durchaus lebensbedrohlich sein, sodass in schweren Schüben stationäre Behandlung notwendig ist. Da die Erkrankung nicht nur auf die Haut beschränkt ist, sondern auch mit vielen weiteren Komorbiditäten wie dem metabolischen Syndrom, psychischem Leiden und Arthritiden einhergehen kann, stellt sie ernsthafte sozioökonomische und Lebensqualität betreffende Einschränkungen dar.

Zwar ist die Pathogenese noch nicht vollständig verstanden, klar ist aber, dass genetische Komponenten mitschwingen und verschiedene Risikofaktoren zu der multifaktoriellen Entstehung beitragen. Darunter verschiedene Genmutationen in Zytokin codierenden Introns, aber auch infektiöse Geschehen und chemische Noxen.

In dieser Arbeit wurde eine immunhistochemische Analyse von elf Antikörpern bei 13 an PPG erkrankten und sechs gesunden Personen durchgeführt, um die quantitative Verteilung innerhalb der Proben auszählen, auswerten und im Anschluss interpretieren zu können und den Pathomechanismus weiter verstehen zu können.

Insgesamt hat man so eine Gruppe von 19 Patienten, deren Hautbiopsien je mit allen Antikörpern angefärbt wurden. Die sechs gesunden Hautschnitte weisen somit keine dermatologischen Erkrankungen auf und dienen als Kontrollgruppe.

Die Antikörperauswahl beläuft sich auf folgende elf Antikörper: CXCR3 (CD183), FoxP3, IL8, IL17A, IL17F, IL23, IL36G, Phosphodiesterase 4B, HLA DR, Tyrosinkinase und JAK3.

Im ersten Schritt wurden die Gewebeschnitte histologisch bearbeitet, damit die daraus resultierenden Paraffinschnitte immunhistochemisch mit den auserwählten Antikörpern und negativ Kontrollen angefärbt werden konnten. Pro Paraffinschnitt ein Antikörper. Im Anschluss konnten die entstandenen Objektträger dann beschriftet und mikroskopiert werden. Dabei wurden fünf Bildzonen mit maximaler Antikörperanfärbung fotografiert, um die Expression dieser daraufhin computergestützt auszählen zu können.

Die Ergebnisse konnten dann tabellarisch ausgewertet und verglichen werden. Erst für jeden Patienten einzeln, um dann die Mittelwerte aller vergleichen zu können und die Standardabweichungen für die durch die T-test vermittelte Signifikanzen berechnen zu können.

Insgesamt wurden so 280 Präparate ausgewertet.

Das Ergebnis der Antikörperauszählung zeigt für IL36G, IL17F, FoxP3, IL8, HLA, Tyrosinkinase und JAK3 eine absolut höhere Antikörperzahl in der Gruppe der an PPG erkrankten als in der Kontrollgruppe. Statistisch signifikant sind hier vor allem Fox P3 (P-Wert: 5,46627E-06), IL 36G (P-Wert: 0,001268784), IL 17F (P-Wert: 0,004659964) und IL 8 (P-Wert: 0,03225824).

Eine signifikant niedrigere Expression in der Normalhaut als in der erkrankten Haut zeigte sich nur bei IL 23 (P-Wert: 0,0099468).

Diese Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen PPG und den Zytokinen im Entzündungsgeschehen hin. Insbesondere IL 36G, IL 17F und FoxP3. Diese proinflammatorischen, chemotaktisch und regulativ tätigen Botenstoffe können targetiert und moderiert werden, um die Behandlungsmöglichkeiten der PPG zu verbessern.

Gerade spezifische monoklonale Antikörper gegen IL 36G sind Gegenstand aktuellster Forschung und von großer Relevanz als Biological. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Erkenntnisse zu IL 36G, als zentrale Schlüsselstelle in der Pathogenese.

Aktuelle first-line Therapie sind immer noch das gesamte Immunsystem schwächende Medikamente, wie Glucocorticoide und Methotrexat. Aber auch die klinisch häufig eingesetzten Biologicals Etanercept, Infliximab und Adalimumab gegen TNF-alpha wirken auf das gesamte System immunsuppressiv. Je spezifischer die Therapie gegen einzelne Zytokine, wie das stark exprimierte IL 36G ist, desto weniger Komplikationen und Nebenwirkungen sind auf das systemische Immunsystem zu erwarten.

Diese Erkenntnisse über die Signifikanz und Überexpression der untersuchten Zytokine ebnen den Weg für weitere Zytokin-gerichtete Forschung in der medikamentös gerichteten Therapie, aber auch für die Pathogenese und genetische Prädispositionen in den die Zytokine codierenden Genen.

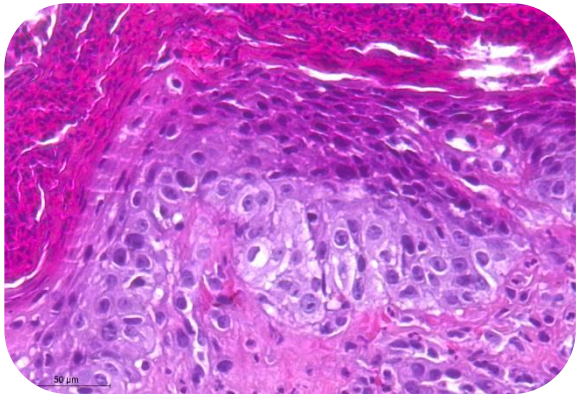
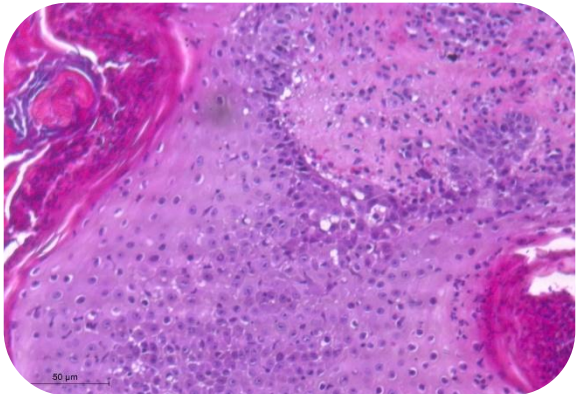
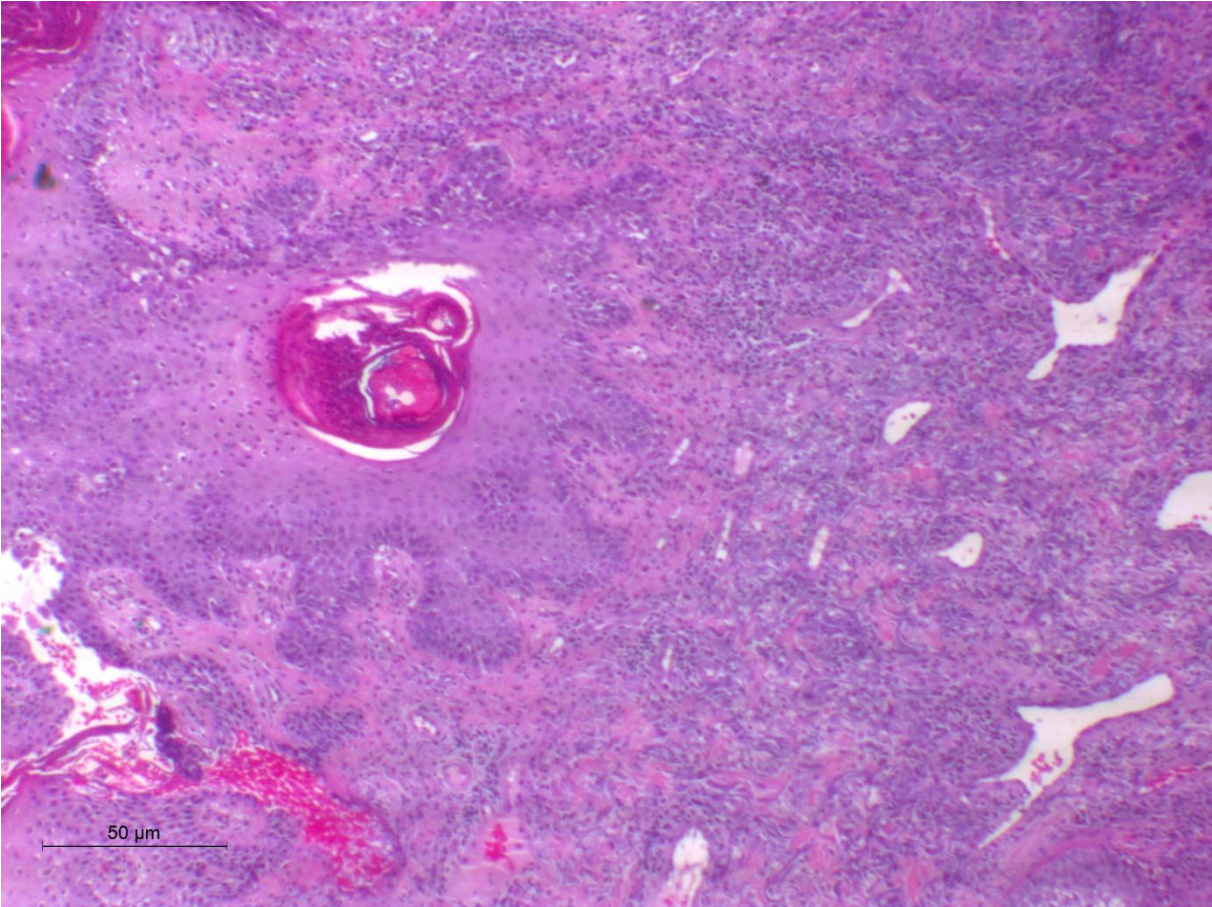
## 8 Anhang

### 8.1 Histologische Übersichtsaufnahmen in HE-Färbung

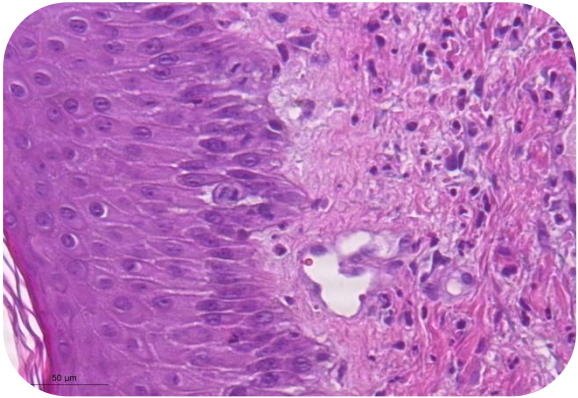
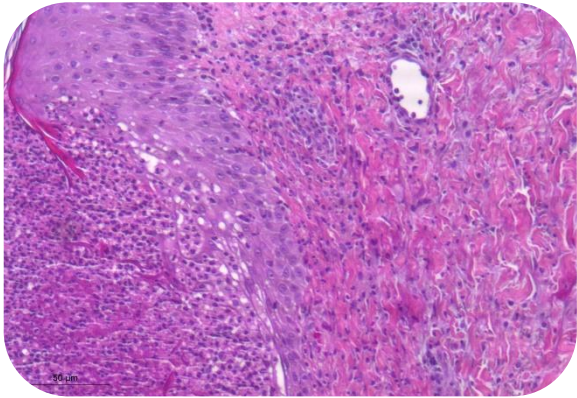
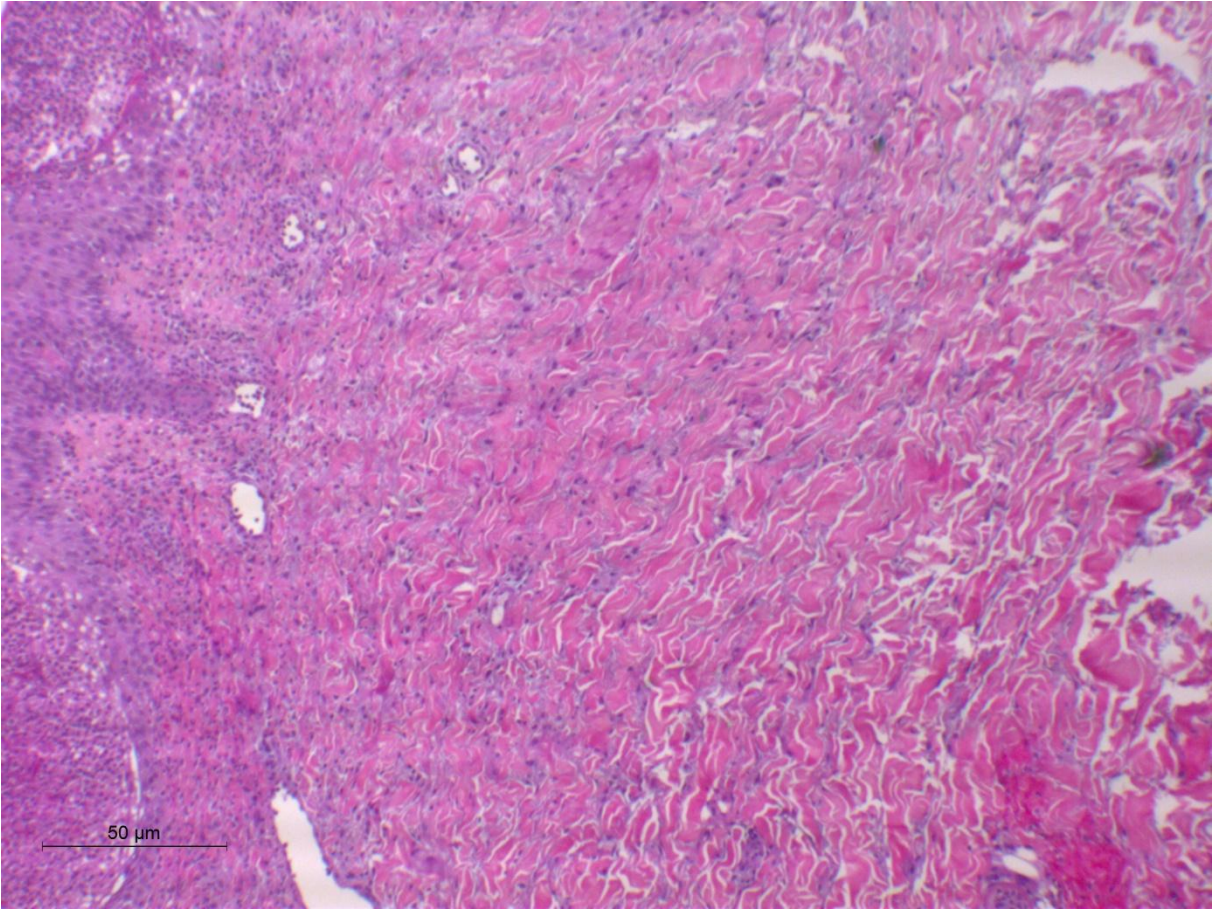
Im Folgenden ist je eine Übersichtsaufnahme in vierfacher Vergrößerung, ein Ausschnitt in zehnfacher und einer in zwanzigfacher Vergrößerung der Hämatoxylin-Eosin Färbung gezeigt, aufgeteilt nach den beiden Gruppen. Erst die Gruppe mit den 13 erkrankten Personen und danach folgend die sechs aus der Kontrollgruppe stammenden Schnitte der Normalhaut.

8.1.1 Patienten mit PPG

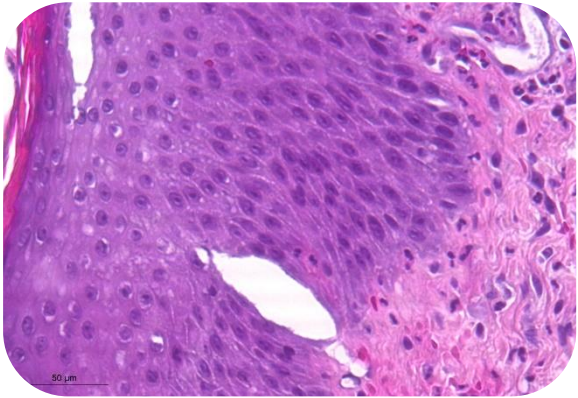
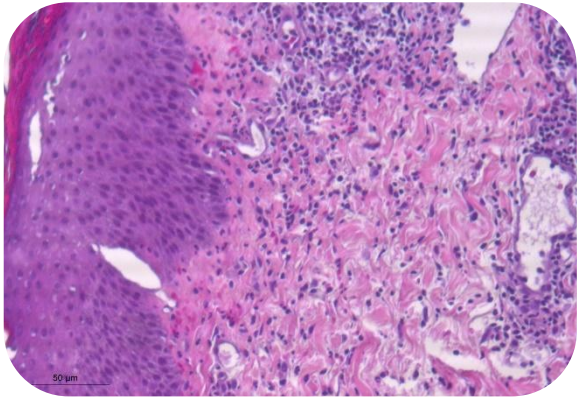
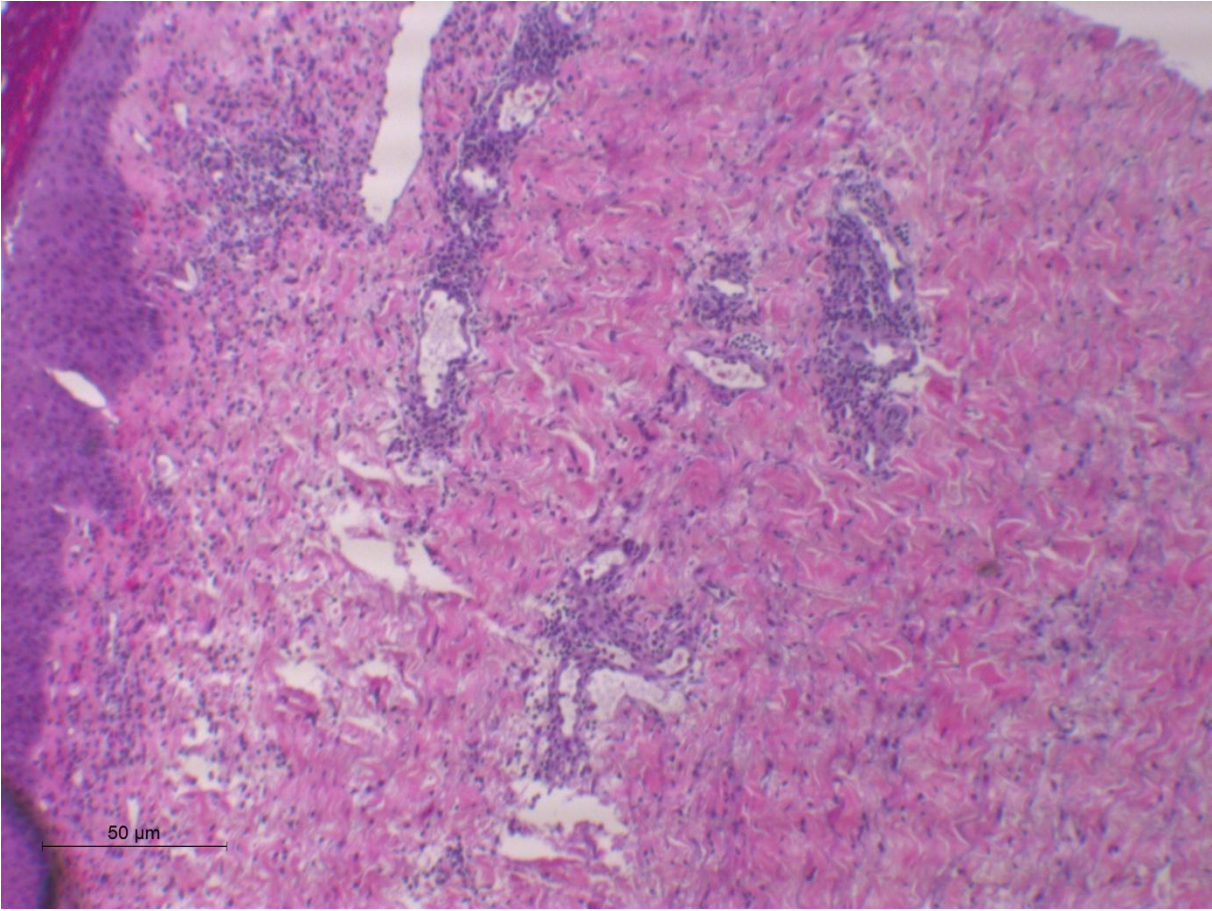
Patient 1



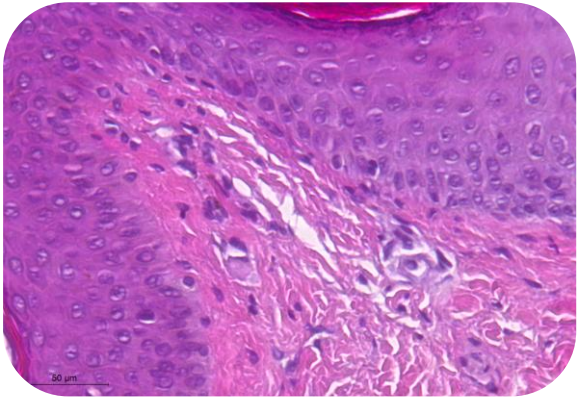
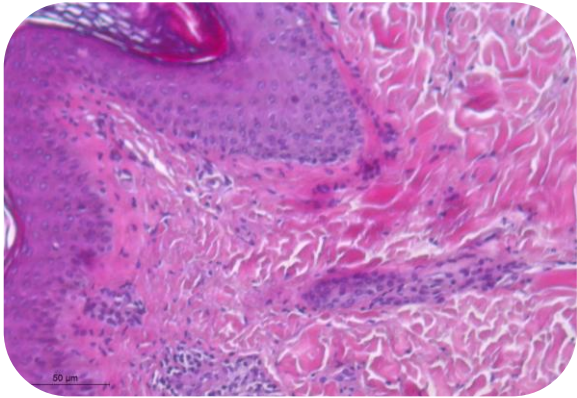
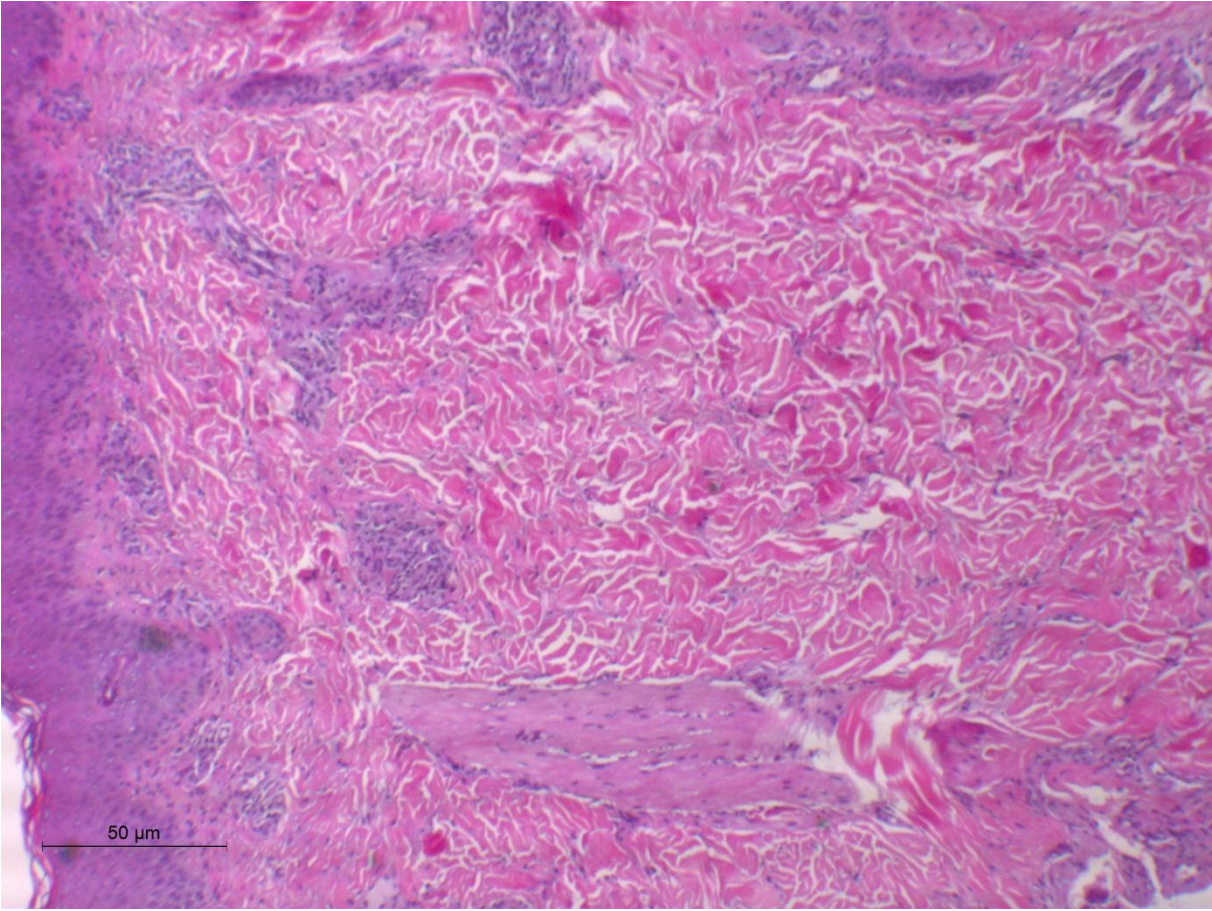
Patient 2



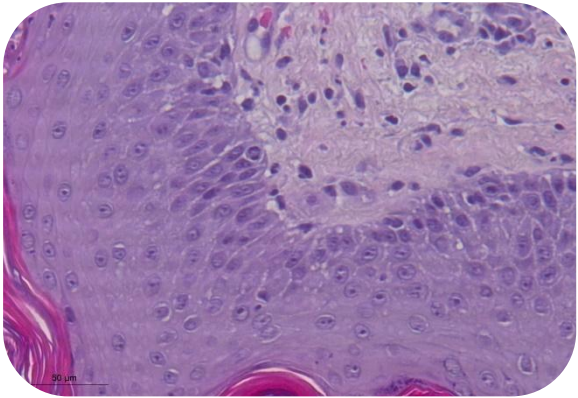
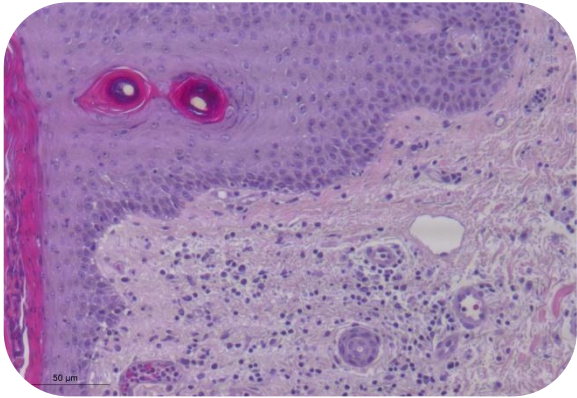
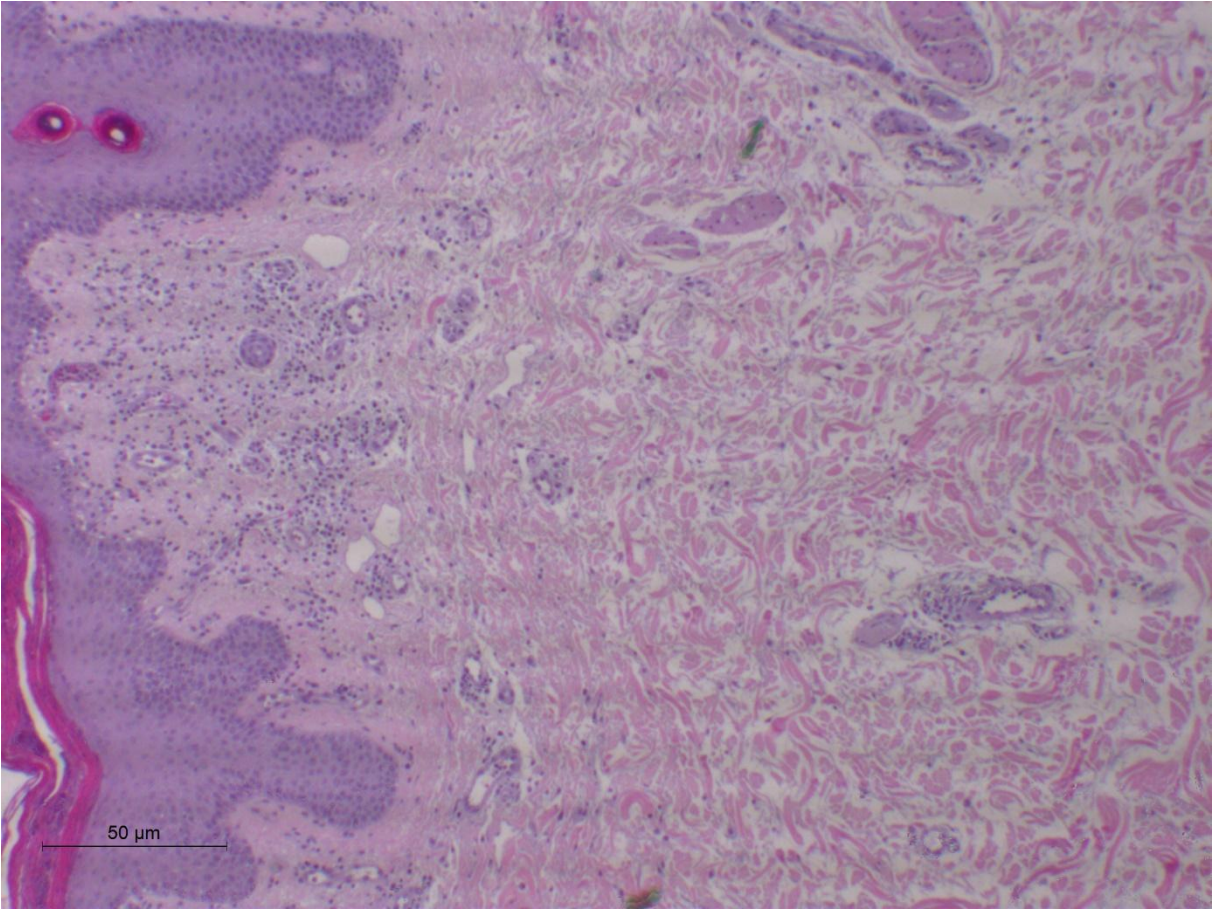
Patient 3



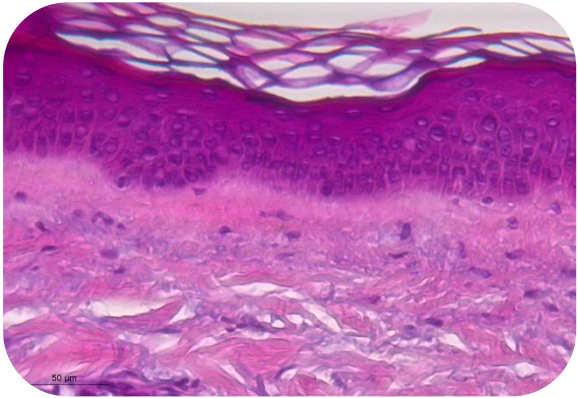
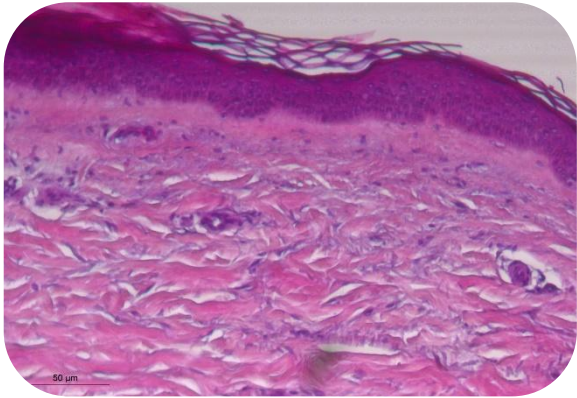
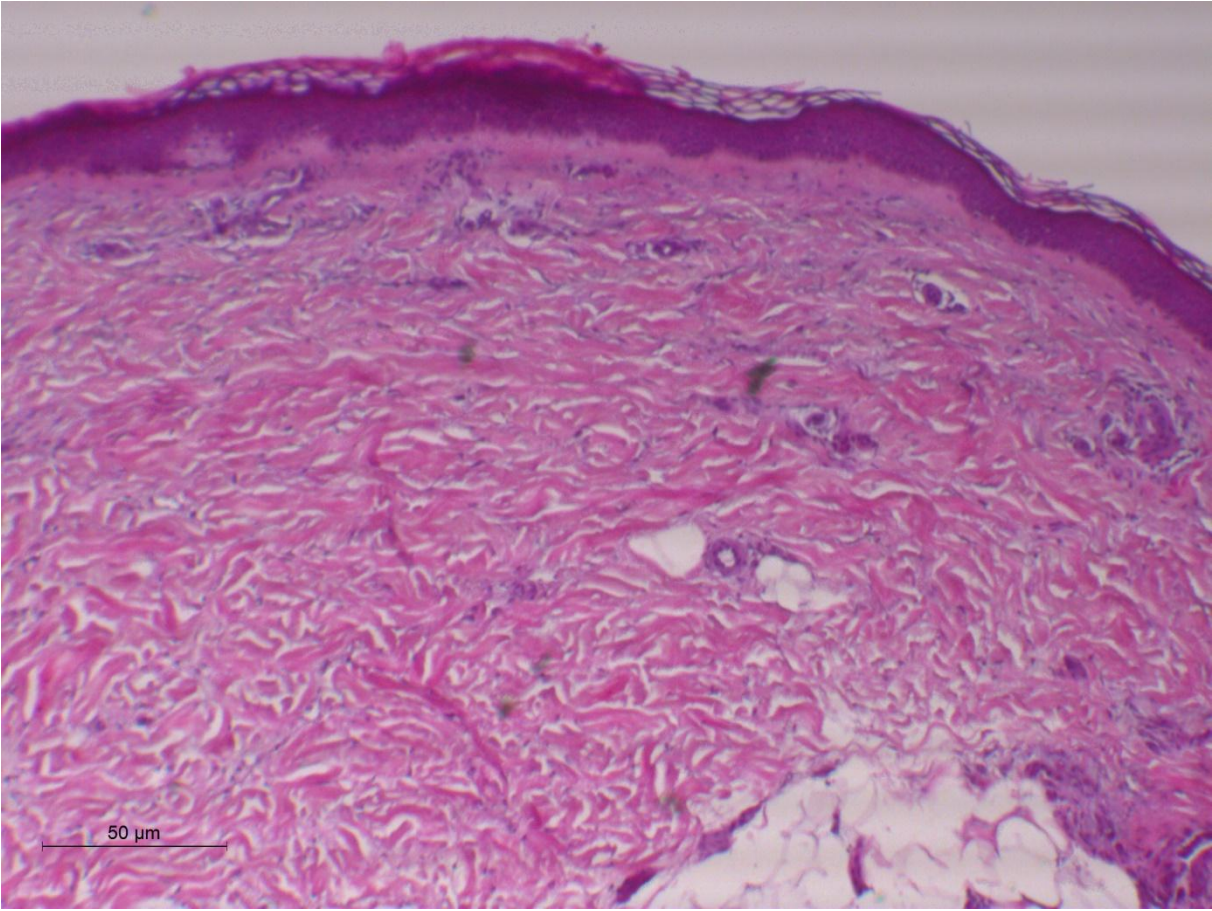
Patient 4



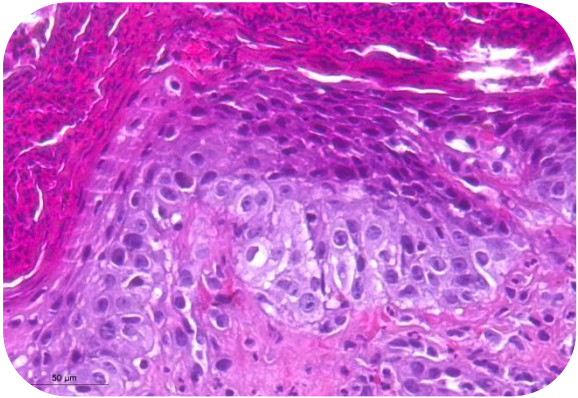
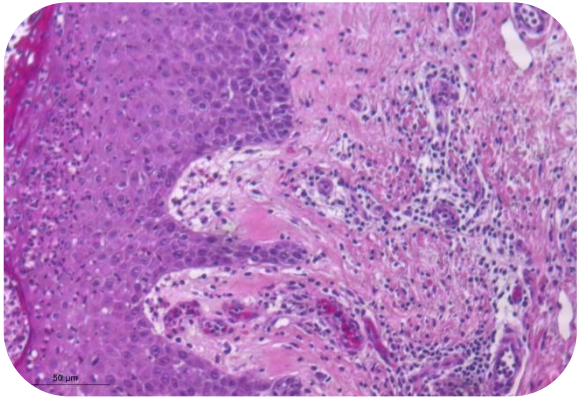
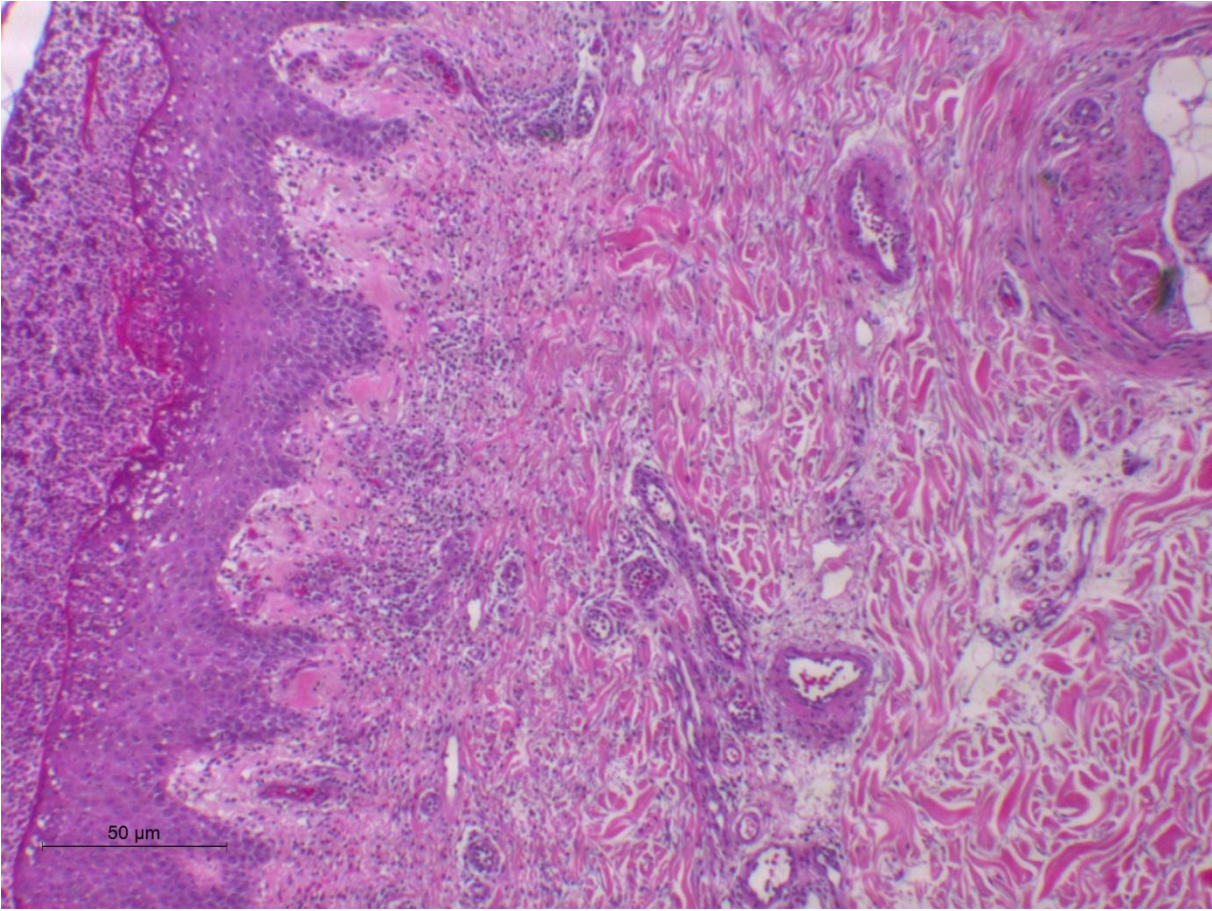
Patient 5



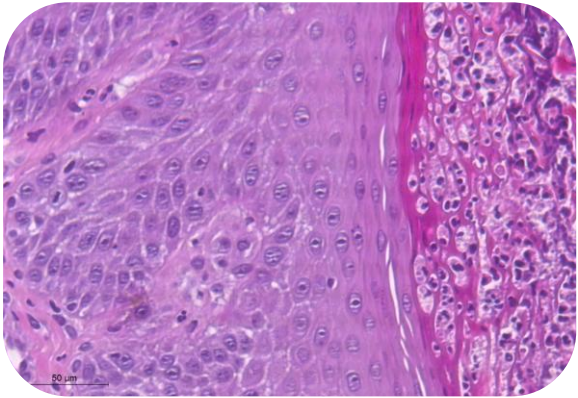
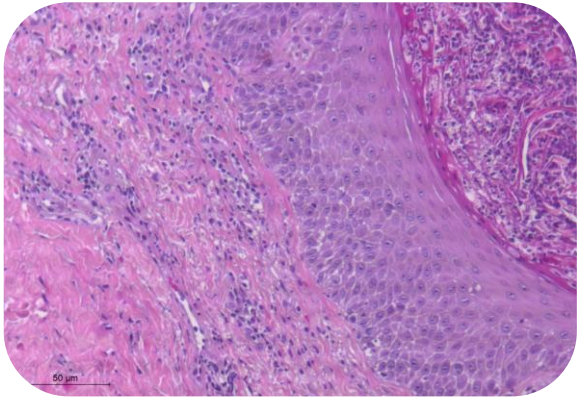
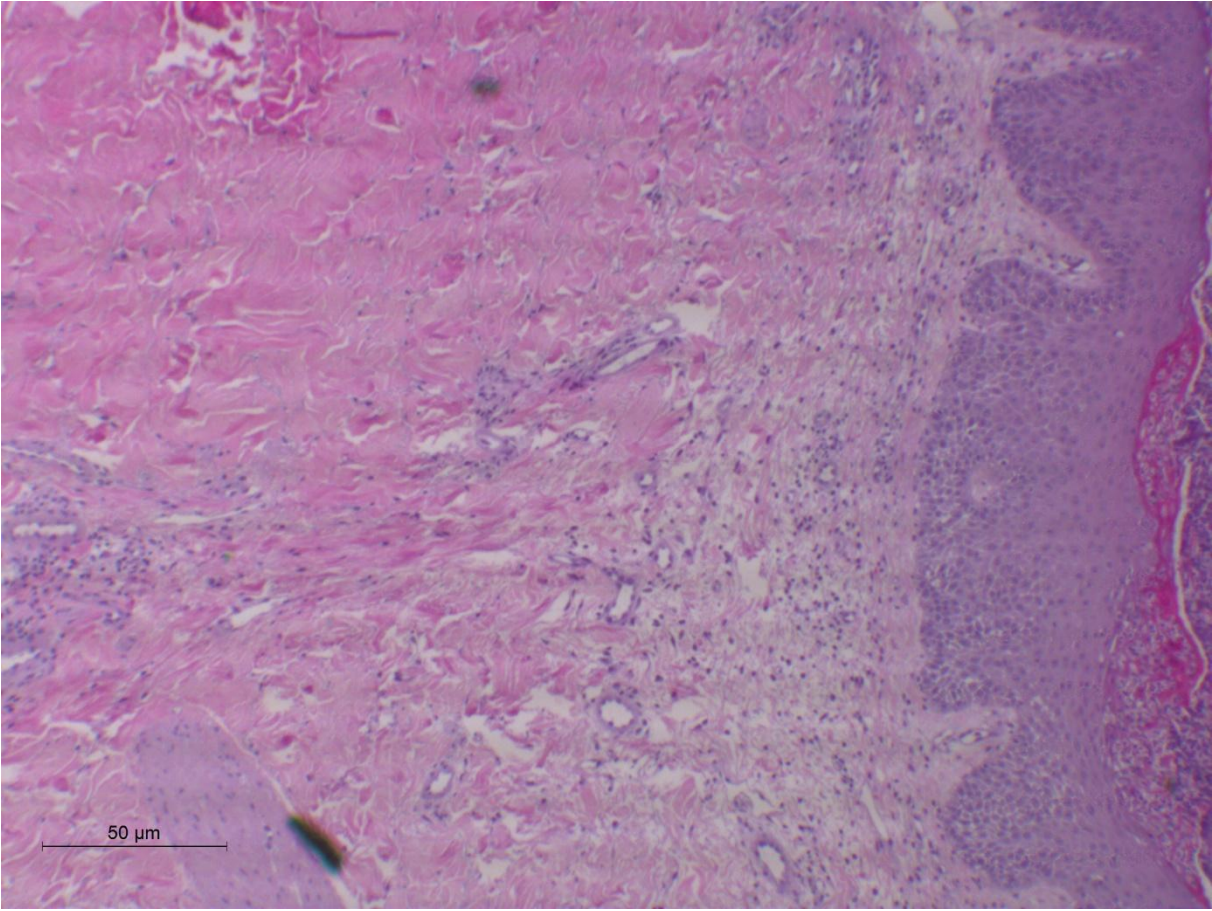
Patient 6



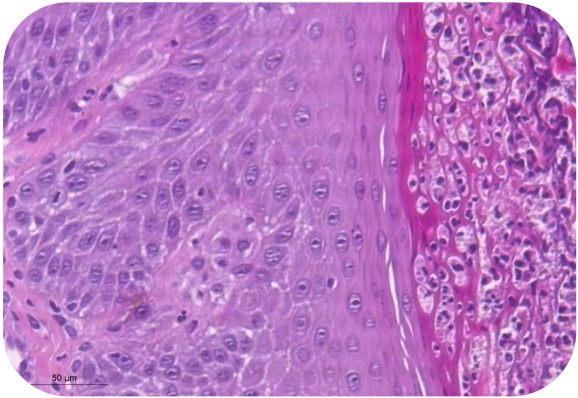
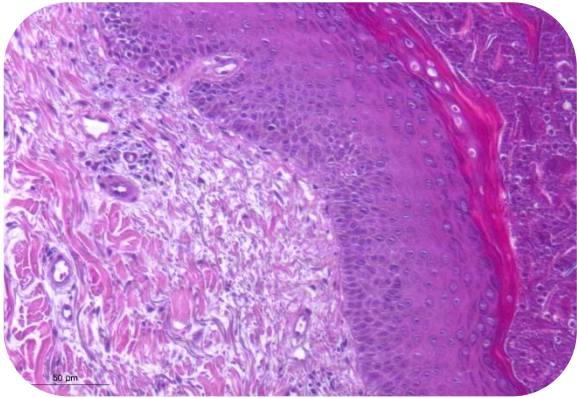
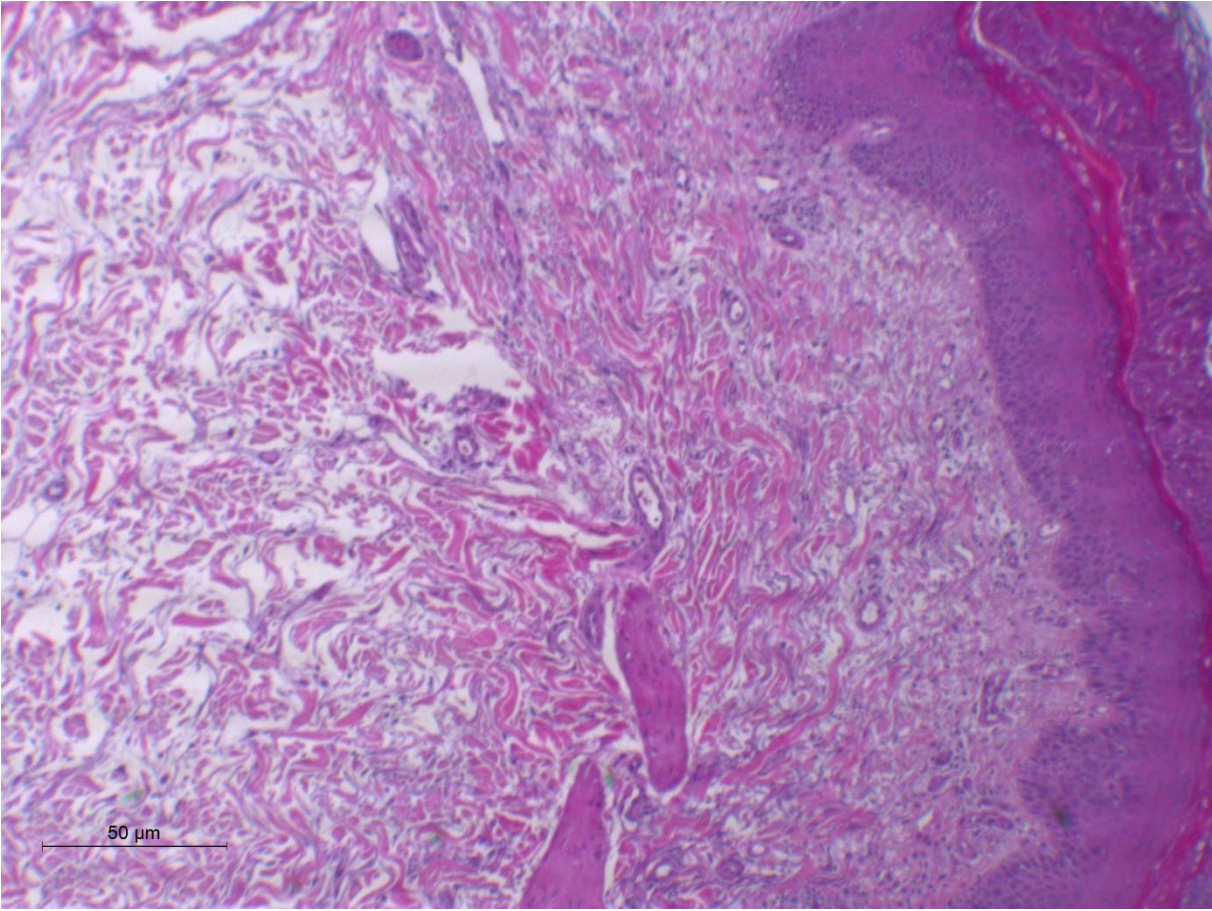
Patient 7



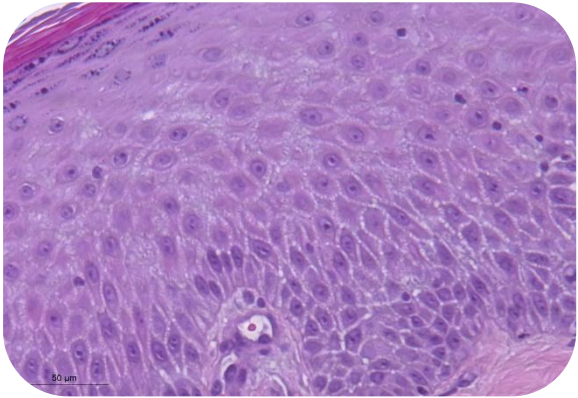
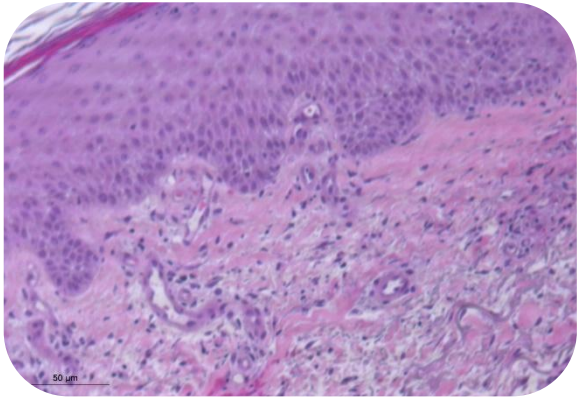
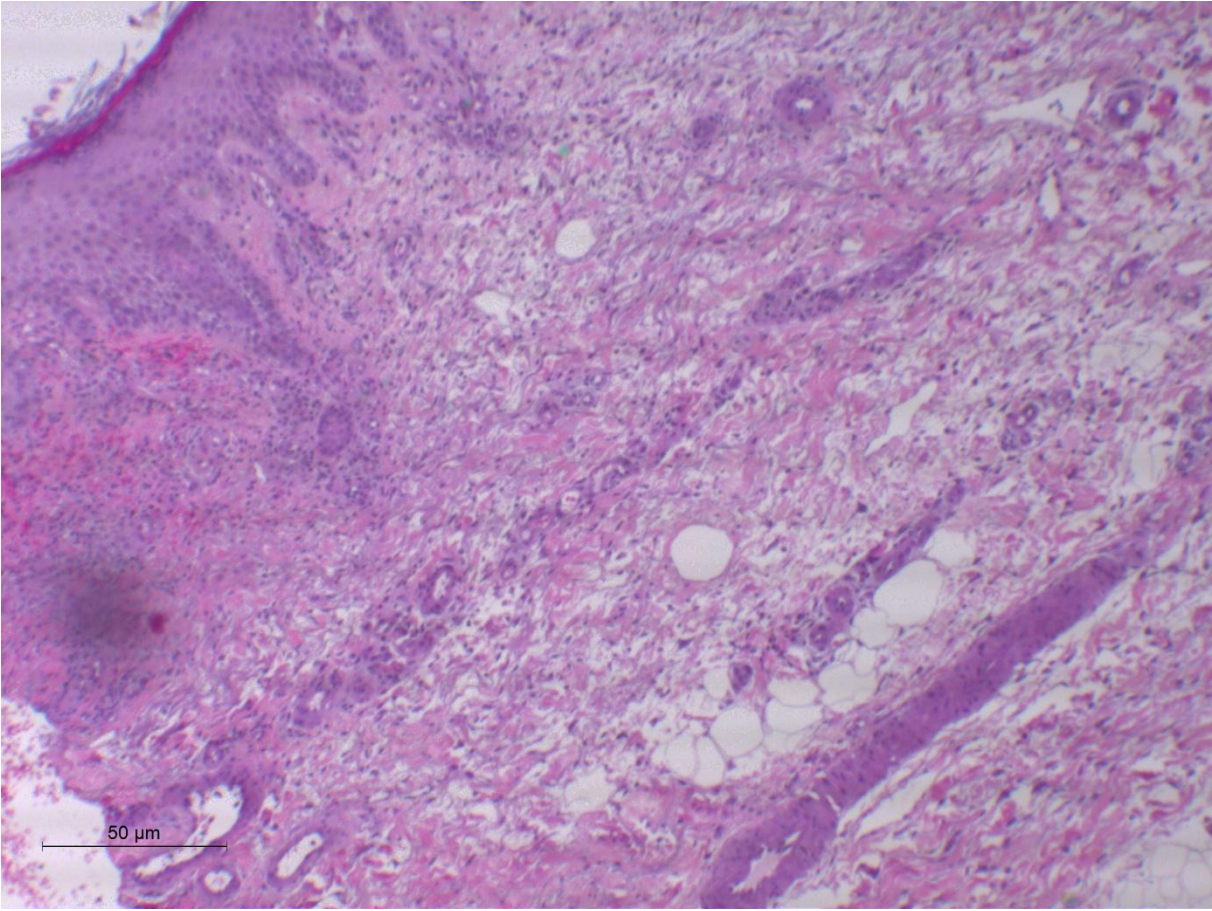
Patient 8



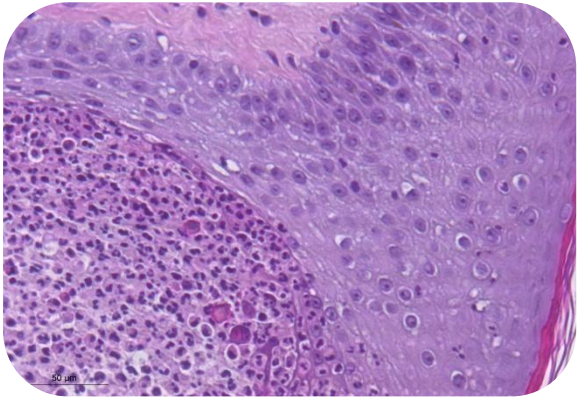
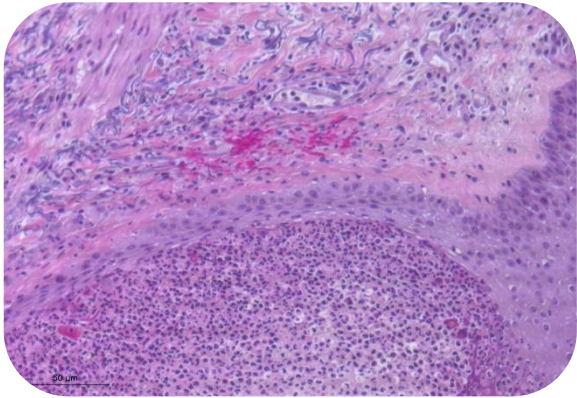
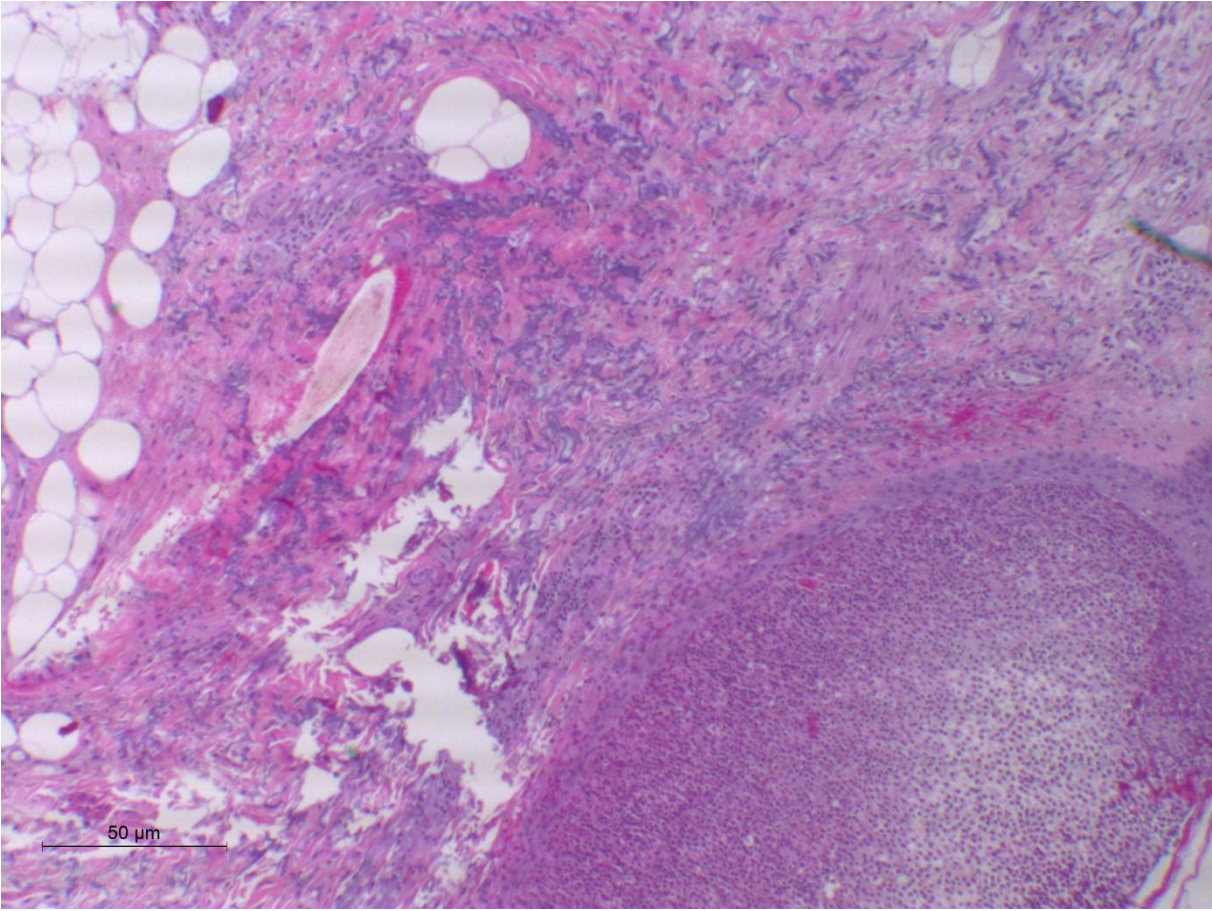
Patient 9



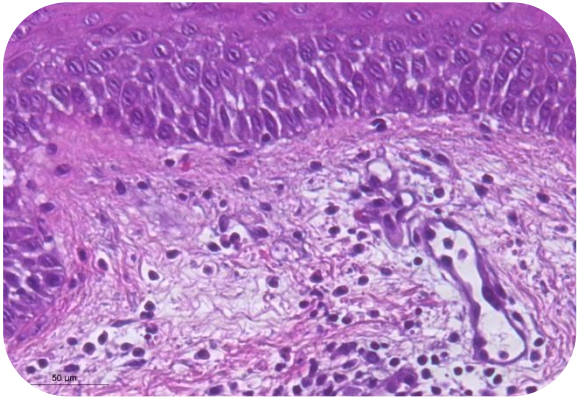
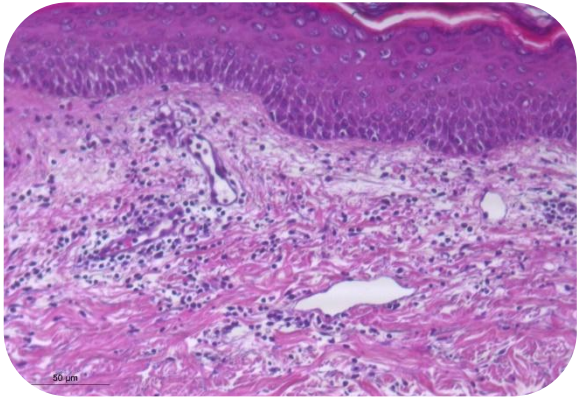
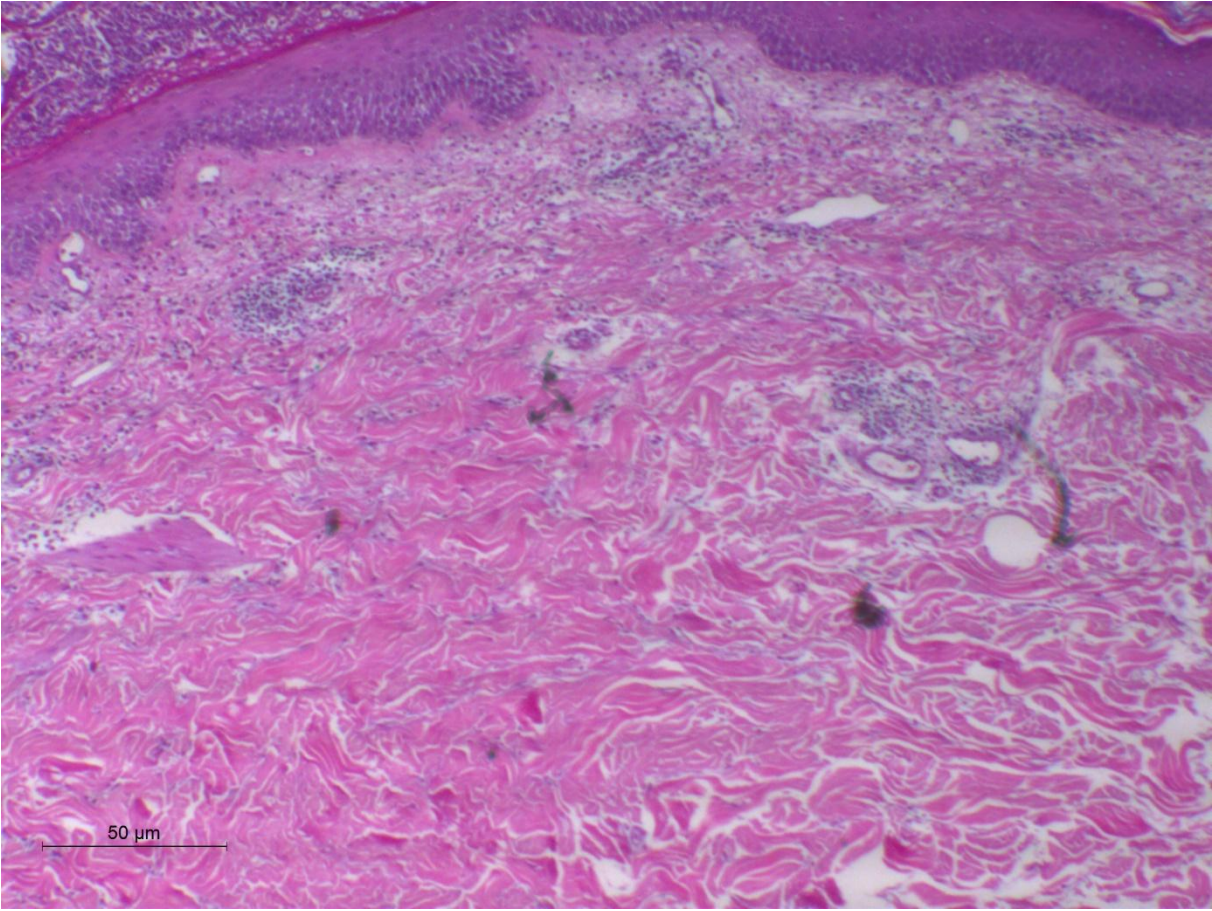
Patient 10



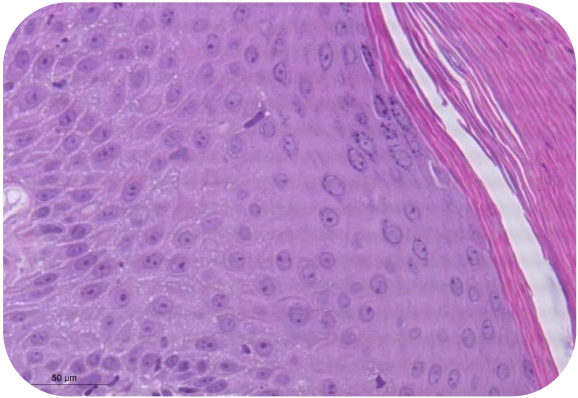
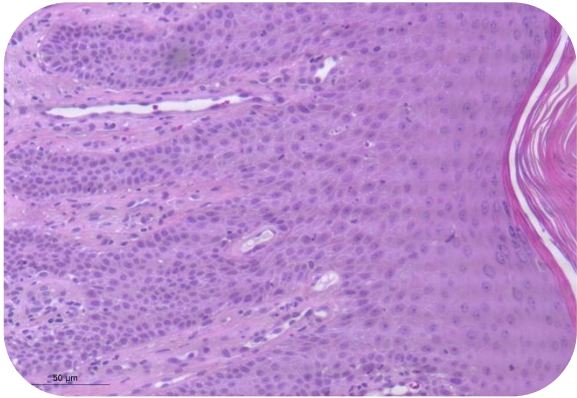
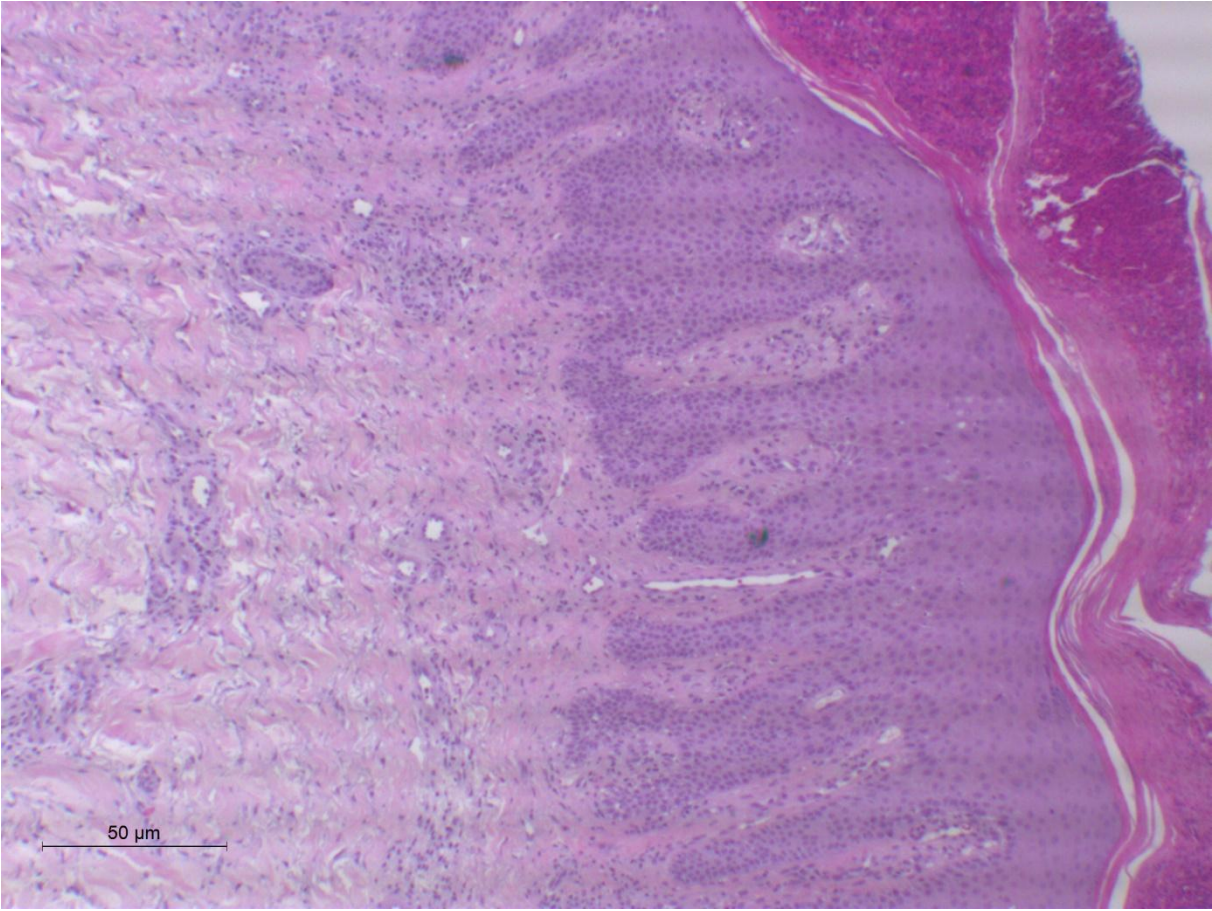
Patient 11



Patient 12

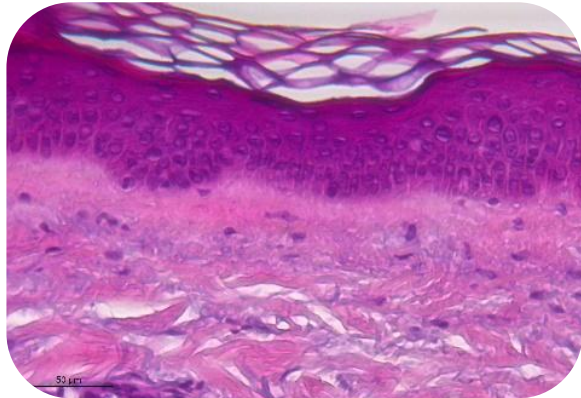
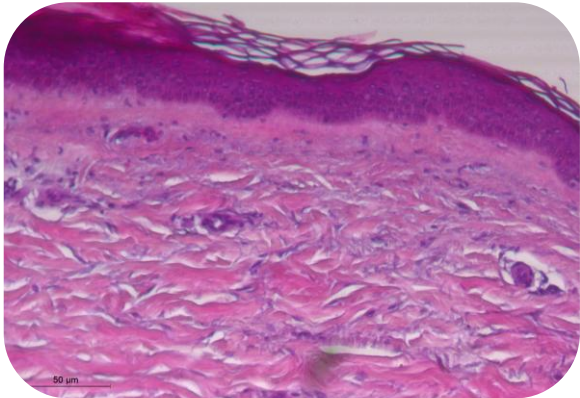
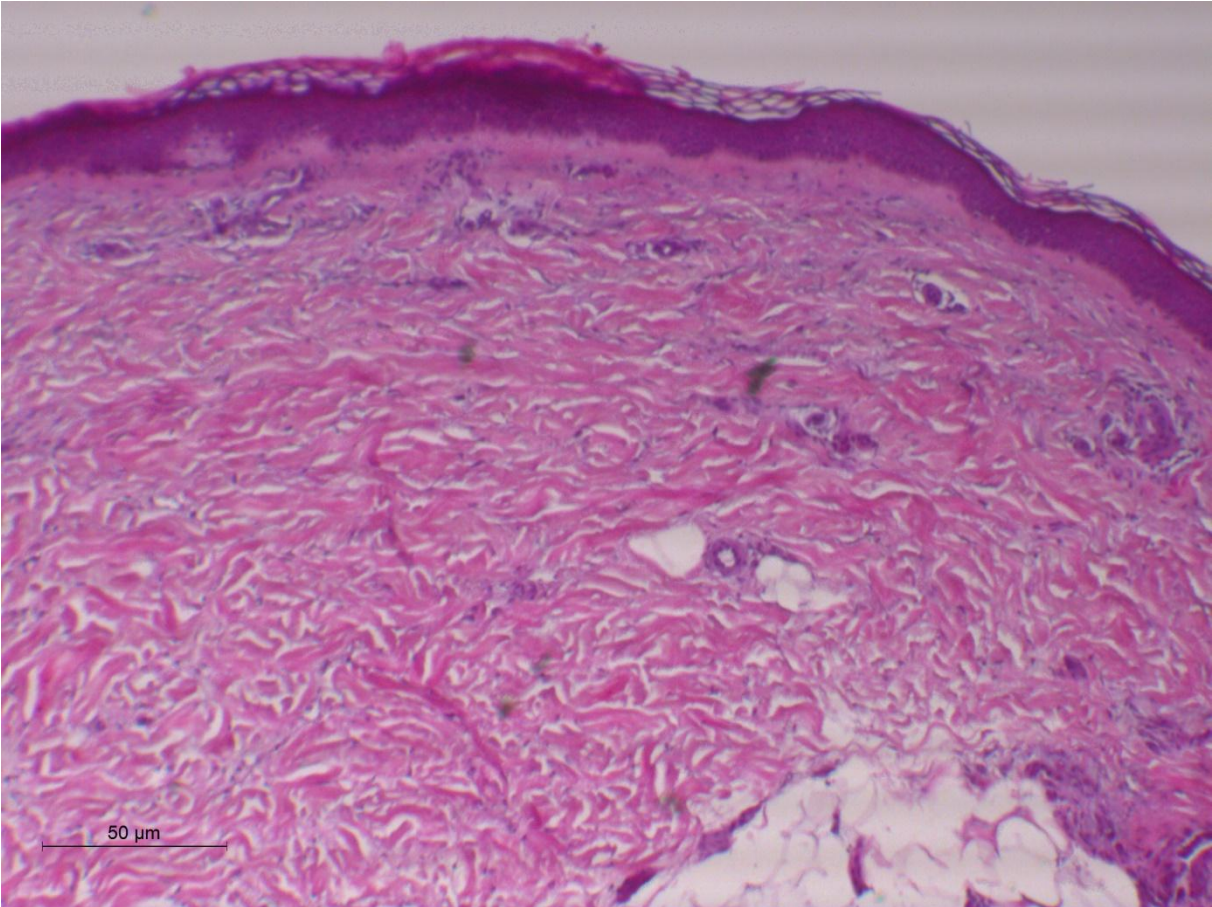


Patient 13

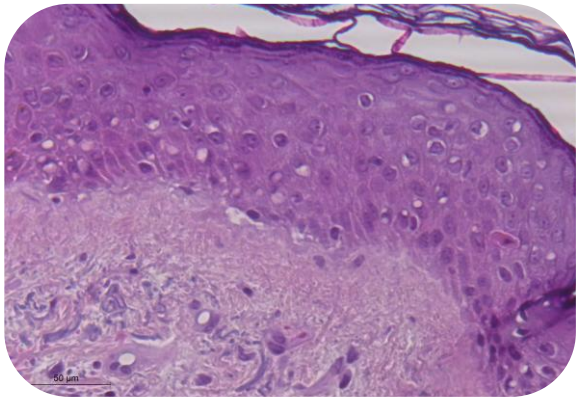
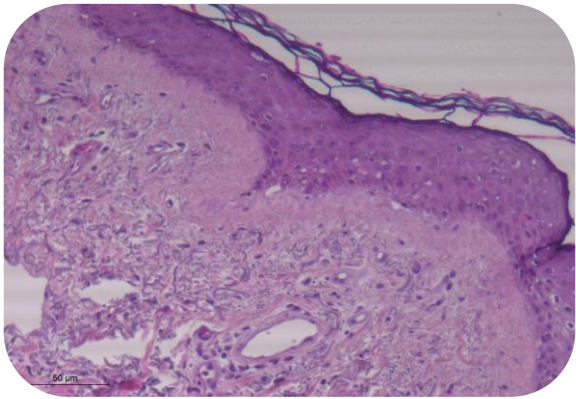
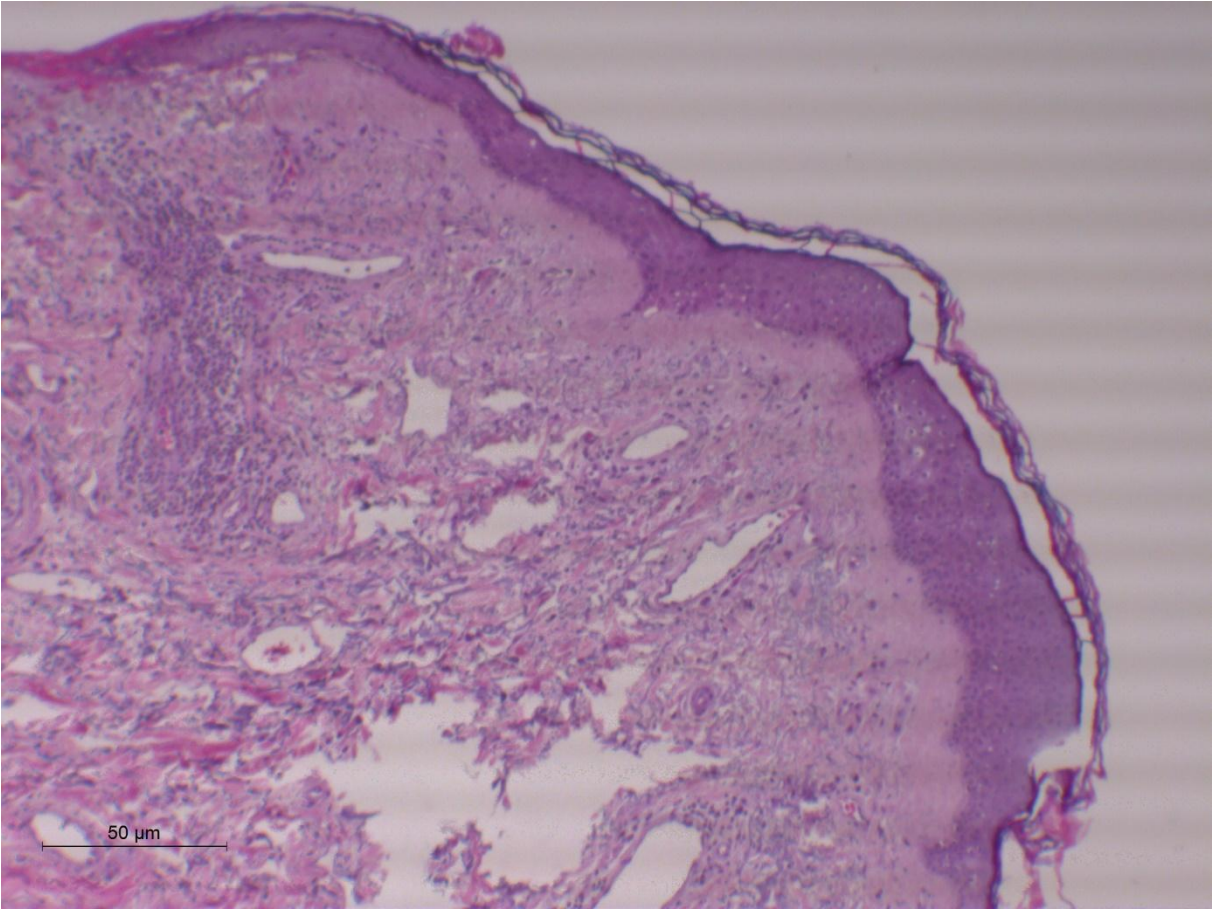


8.1.2 Patienten der Kontrollgruppe

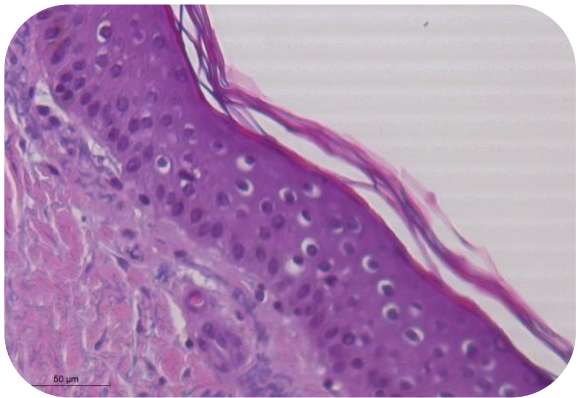
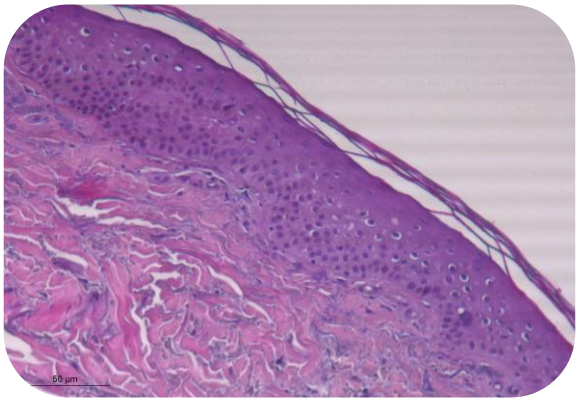
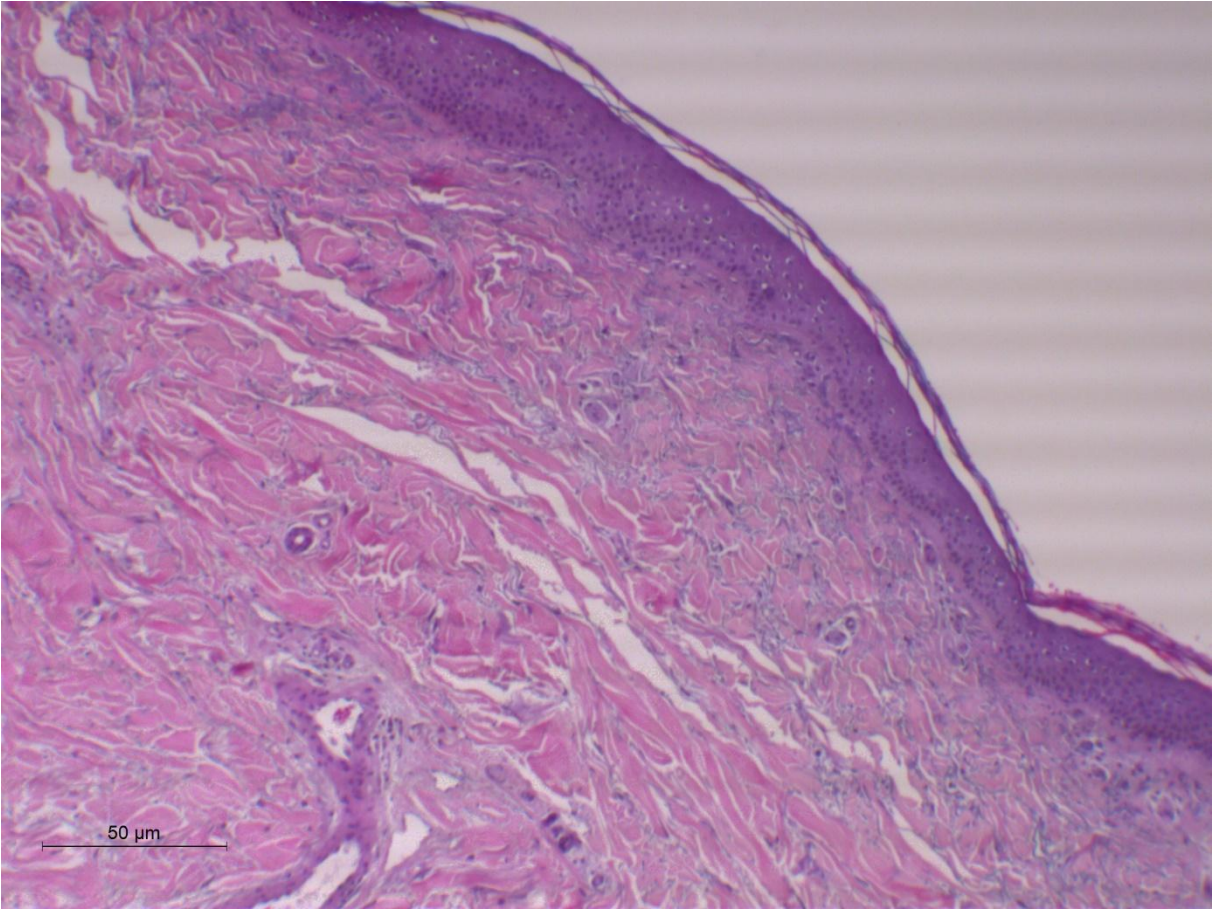
Patient 14



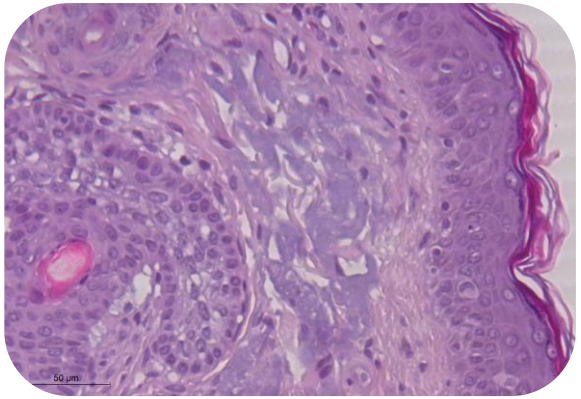
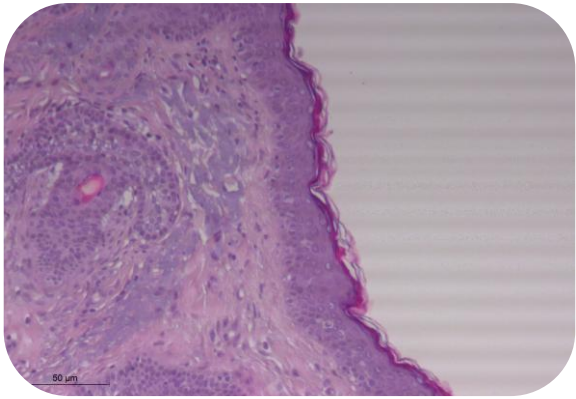
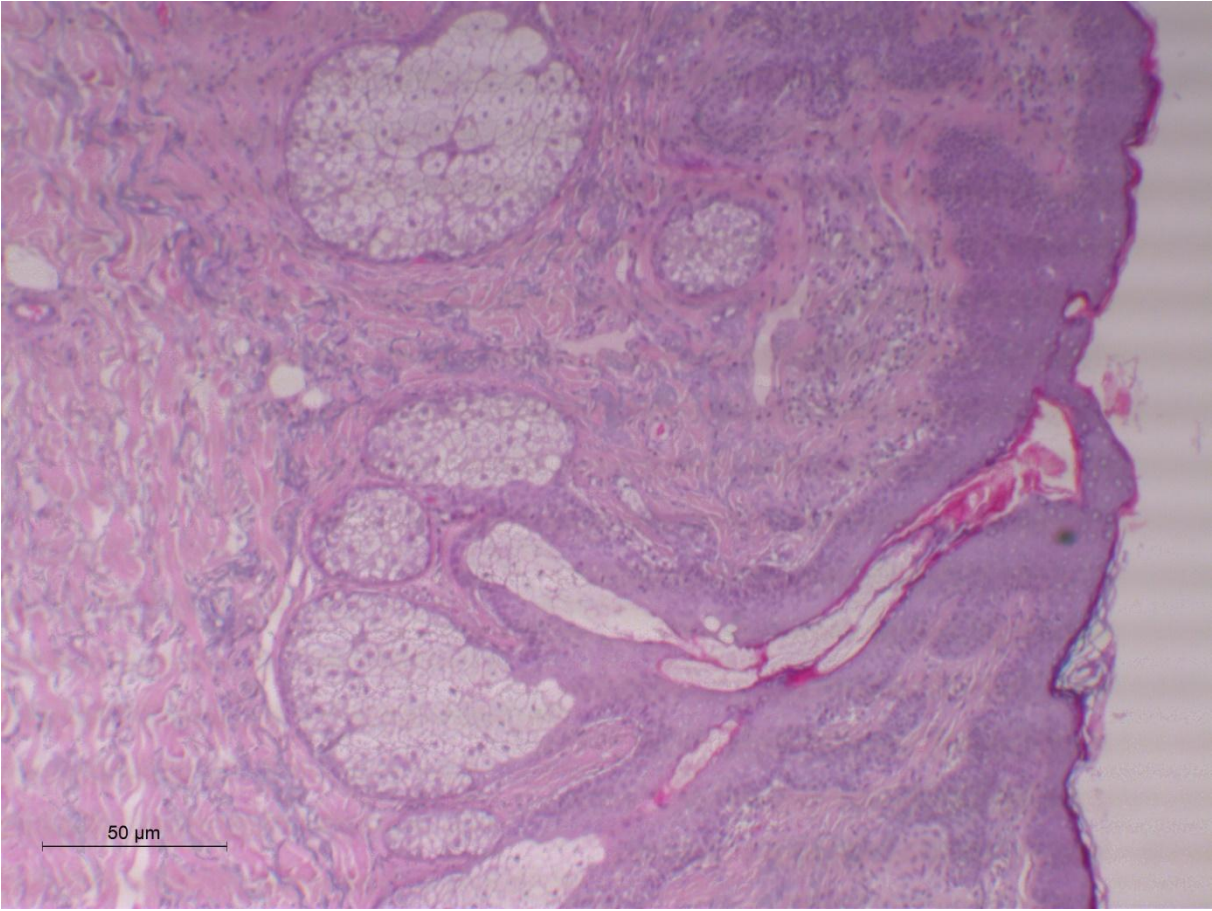
Patient 15



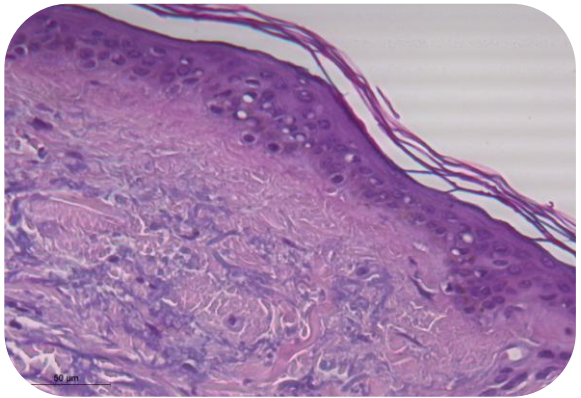
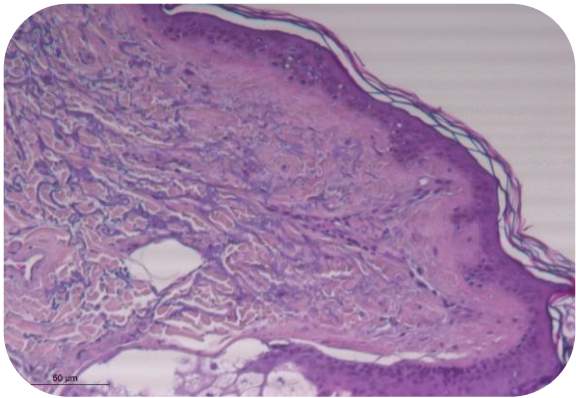
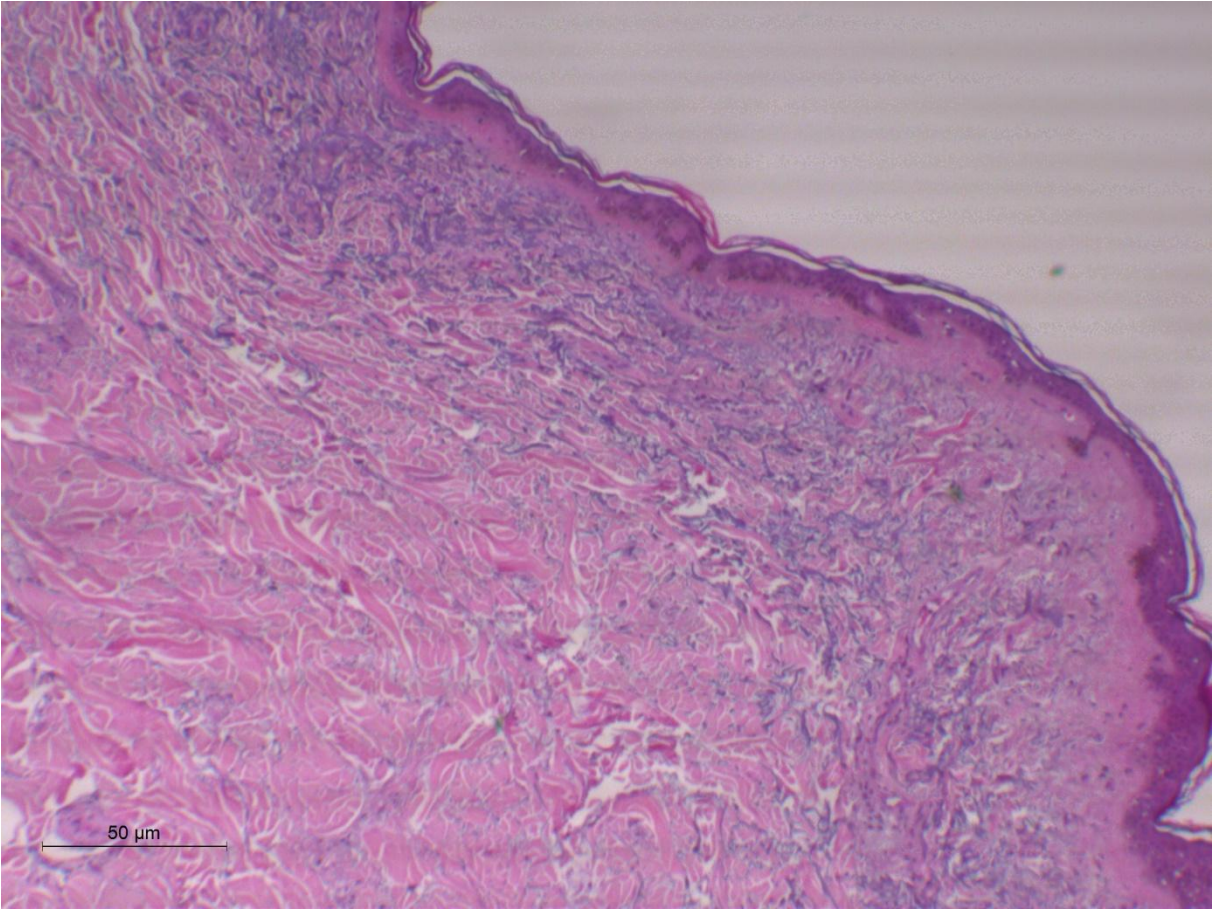
Patient 16



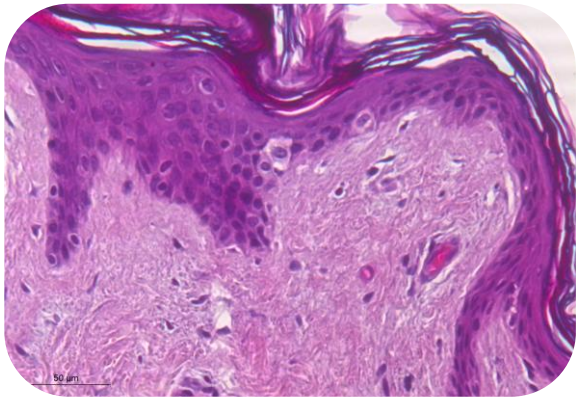
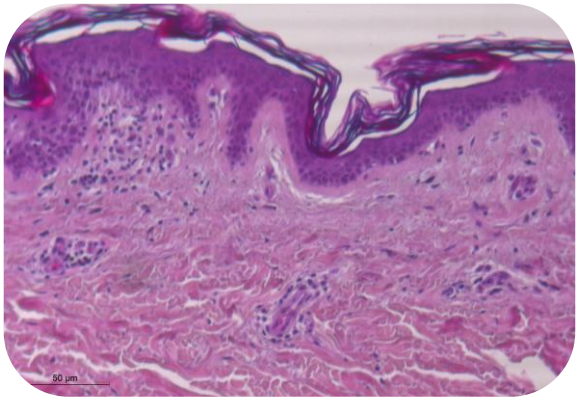
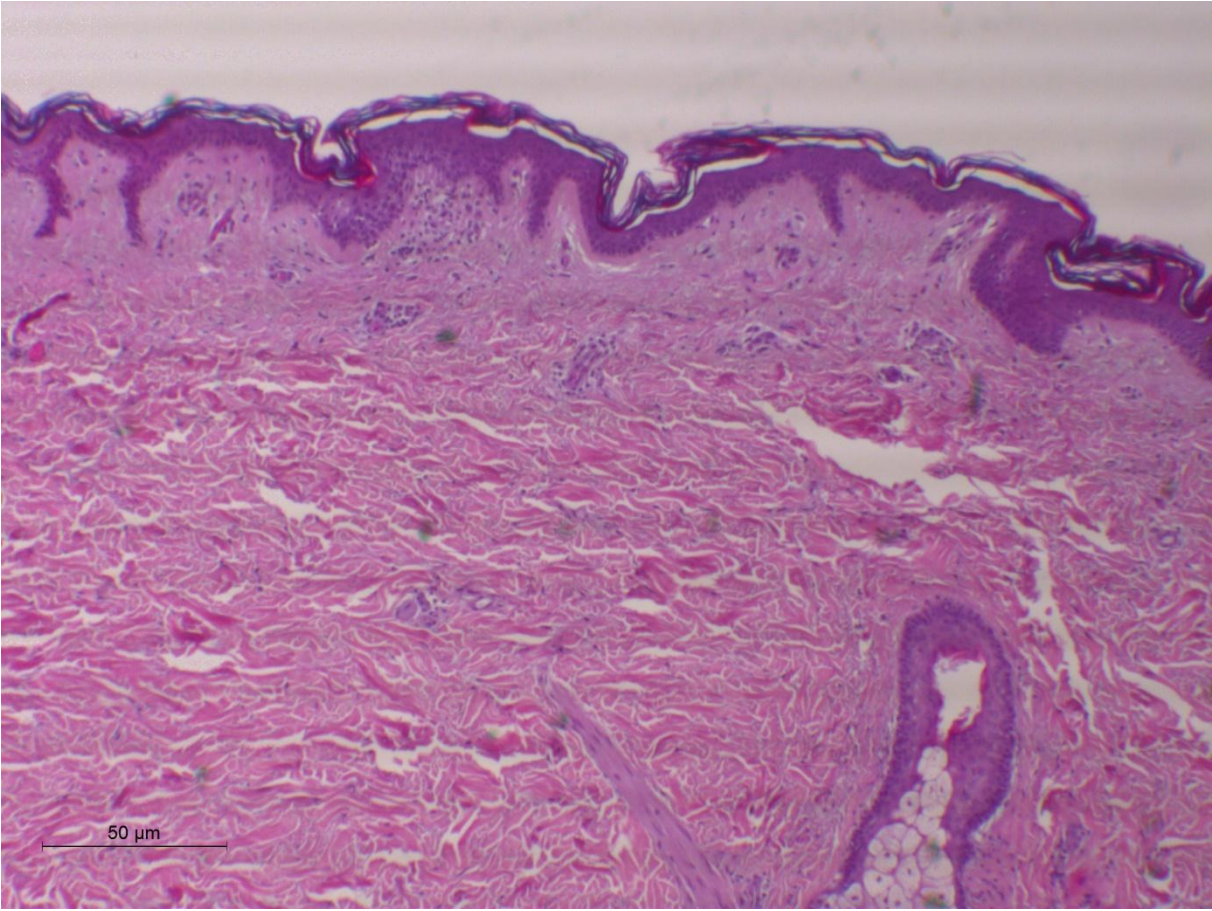
Patient 17



Patient 18



Patient 19



## 9 Tabellen- & Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 AKUTER SCHUB EINER PPG; INTERNATIONAL JOURNAL OF DERMATOLOGY, VOLUME: 53, ISSUE: 6, PAGES: 676-684, FIRST PUBLISHED: 22 AUGUST 2013, DOI: (10.1111/IJD.12070).....	13
ABBILDUNG 2 GENERALIZED PUSTULAR PSORIASIS (A), ACRODERMATITIS CONTINUA OF HALLOPEAU (B), PALMOPLANTAR PUSTULOSIS (C) AND AN UNCLEAR CASE OF A SINGLE EPISODE OF A STERILE, LOCALIZED PUSTULAR ERUPTION THAT WOULD BE CLASSIFIED AS UNDIFFERENTIATED PUSTULOSIS (D).....	13
ABBILDUNG 3 REPRESENTATIVE CLINICAL FEATURES OF THE TWO SUBTYPES OF GENERALIZED PUSTULAR PSORIASIS (GPP): GPP ALONE AND GPP WITH PSORIASIS VULGARIS (PV). (A, B) GPP ALONE PATIENT (PATIENT 2). PUSTULES ON BACKGROUND ERYTHEMA ARE SEEN ON THE TRUNK. (C–E) GPP WITH PV PATIENT (PATIENT 12). BOTH PUSTULAR LESIONS (C, D) AND PSORIATIC PLAQUES (E) ARE OBSERVED ON THE TRUNK AT DIFFERENT TIMES. ....	14
ABBILDUNG 4 HISTOLOGISCHES BILD PSORIATISCH VERÄNDERTER HAUT, A: PROLIFERIERTE KERATINOZYTEN, B: LEUKOZYTEN INFILTRATION UND ANGIOGENESE .....	15
ABBILDUNG 5 ACUTE GENERALIZED EXANTHEMATOUS PUSTULOSIS (AGEP) INDUCED BY AZITHROMYCIN.....	17
ABBILDUNG 6 SCHEMAZEICHNUNG ÜBER DIE BINDUNG VON MONO- UND POLYKLONALEN AK AM ANTIGEN .....	28
ABBILDUNG 7 POLYMERKONJUGATMETHODE .....	30
ABBILDUNG 8: DIE AUSGEWÄHLTEN AK AM BSP. VON CXCR3 BEI PATIENT 14.....	34
ABBILDUNG 9: PATIENT 1; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	37
ABBILDUNG 10: PATIENT 2; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	39
ABBILDUNG 11: PATIENT 3; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	41
ABBILDUNG 12: PATIENT 4; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	43
ABBILDUNG 13: PATIENT 5; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	45
ABBILDUNG 14: PATIENT 6; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	47
ABBILDUNG 15: PATIENT 7; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	49
ABBILDUNG 16: PATIENT 8; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	51
ABBILDUNG 17: PATIENT 9; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	53
ABBILDUNG 18: PATIENT 10; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	55
ABBILDUNG 19: PATIENT 11; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	57
ABBILDUNG 20: PATIENT 12; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	59
ABBILDUNG 21: PATIENT 13; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	61
ABBILDUNG 22: PATIENT 14; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	63
ABBILDUNG 23: PATIENT 15; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	65
ABBILDUNG 24: PATIENT 16; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	67
ABBILDUNG 25: PATIENT 17; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	69
ABBILDUNG 26: PATIENT 18; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	71
ABBILDUNG 27: PATIENT 19; HISTOLOGIE, EIN BILDAUSSCHNITT PRO ANTIKÖRPER .....	73
ABBILDUNG 28: ÜBERBLICKAUFNAHMEN PATIENT 14.....	75
ABBILDUNG 29: ÜBERBLICKAUFNAHMEN PATIENT 11.....	76
TABELLE 1 ANTIKÖRPEREIGENSCHAFTEN .....	24
TABELLE 2 MAKROBEFEHLE IN IMAGEJ .....	36
TABELLE 3 T-TEST (SIGNIFIKANZEN DER UNTERSCHIEDE IN DEN VERSCHIEDENEN GRUPPEN; GEORDET: ABSTEIGEND) .....	80
DIAGRAMM 1: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 1, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	38
DIAGRAMM 2: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 2, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	40
DIAGRAMM 3: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 3, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	42
DIAGRAMM 4: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 4, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	44
DIAGRAMM 5: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 5, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	46

DIAGRAMM 6: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 6, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	48
DIAGRAMM 7: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 7, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	50
DIAGRAMM 8: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 8, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	52
DIAGRAMM 9: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 9, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	54
DIAGRAMM 10: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 10, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	56
DIAGRAMM 11: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 11, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	58
DIAGRAMM 12: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 12, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	60
DIAGRAMM 13: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 13, PPG; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	62
DIAGRAMM 14: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 14, KONTROLLGRUPPE; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER....	64
DIAGRAMM 15: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 15, KONTROLLGRUPPE; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER....	66
DIAGRAMM 16: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 16, KONTROLLGRUPPE; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER....	68
DIAGRAMM 17: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 17, KONTROLLGRUPPE; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER....	70
DIAGRAMM 18: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 18, KONTROLLGRUPPE; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER....	72
DIAGRAMM 19: ABSOLUTE ANTIKÖRPERVERTEILUNG BEI PATIENT 19, KONTROLLGRUPPE; FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER....	74
DIAGRAMM 20: ABSOLUTE ANTIKÖRPERZAHL BEI DER PPG GRUPPE, FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER .....	77
DIAGRAMM 21: ABSOLUTE ANTIKÖRPERZAHL BEI DER KONTROLLGRUPPE, FEHLERINDIKATOR: STANDARDFEHLER.....	78
DIAGRAMM 22: VERGLEICH DER ABSOLUTEN ANTIKÖRPERZAHLEN BEIDER GRUPPEN.....	79

## 10 Literaturverzeichnis

1. Christophers E, Mrowietz U. Psoriasis - ein vielgestaltiges Krankheitsbild. *Dtsch Arztebl International*. 1999;96(36):2220-.
2. Fritsch P, Schwarz T. *Dermatologie Venerologie : Grundlagen. Klinik. Atlas. 3., vollständig überarbeitete Auflage* ed. Berlin2018.
3. *Klinikleitfaden Dermatologie*. In: Dirschka T, Oster-Schmidt C, Schmitz L, editors. *Klinikleitfaden. 4. Auflage* ed. München2021.
4. González-Parra S, Daudén E. Psoriasis and Depression: The Role of Inflammation. *Actas dermo-sifiliograficas*. 2019;110(1):12-9.
5. Mrowietz U, Reich K. Psoriasis – neue Erkenntnisse zur Pathogenese und Therapie. *Dtsch Arztebl International*. 2009;106(1-2):11-9.
6. Hoegler KM, John AM, Handler MZ, Schwartz RA. Generalized pustular psoriasis: a review and update on treatment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2018;32(10):1645-51.
7. Boehner A, Navarini AA, Eyerich K. Generalized pustular psoriasis - a model disease for specific targeted immunotherapy, systematic review. *Experimental dermatology*. 2018;27(10):1067-77.
8. Umezawa Y, Ozawa A, Kawasima T, Shimizu H, Terui T, Tagami H, et al. Therapeutic guidelines for the treatment of generalized pustular psoriasis (GPP) based on a proposed classification of disease severity. *Archives of dermatological research*. 2003;295 Suppl 1:S43-54.
9. Parisi R, Symmons DP, Griffiths CE, Ashcroft DM. Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(2):377-85.
10. Thomsen SF, Skov L, Dodge R, Hedegaard MS, Kjellberg J. Socioeconomic Costs and Health Inequalities from Psoriasis: A Cohort Study. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2019;235(5):372-9.
11. Augéy F, Renaudier P, Nicolas JF. Generalized pustular psoriasis (Zumbusch): a French epidemiological survey. *European journal of dermatology : EJD*. 2006;16(6):669-73.
12. Ohkawara A, Yasuda H, Kobayashi H, Inaba Y, Ogawa H, Hashimoto I, et al. Generalized pustular psoriasis in Japan: two distinct groups formed by differences in symptoms and genetic background. *Acta dermato-venereologica*. 1996;76(1):68-71.
13. Rassner G. *Dermatologie : Lehrbuch und Atlas. Student consult. 8., vollst. überarb. und aktualis. Aufl.* ed. München u. a.2007.
14. Zelickson BD, Muller SA. Generalized pustular psoriasis in childhood. Report of thirteen cases. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1991;24(2 Pt 1):186-94.
15. Schmitt-Egenolf M, Eiermann TH, Boehncke WH, Ständer M, Sterry W. Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigen (HLA) class I side of the extended haplotype Cw6-B57-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*0303: a population- and family-based study. *The Journal of investigative dermatology*. 1996;106(4):711-4.
16. Wuepper KD, Coulter SN, Haberman A. Psoriasis vulgaris: a genetic approach. *The Journal of investigative dermatology*. 1990;95(5 Suppl):2s-4s.
17. Lønnberg AS, Skov L, Skytthe A, Kyvik KO, Pedersen OB, Thomsen SF. Heritability of psoriasis in a large twin sample. *The British journal of dermatology*. 2013;169(2):412-6.
18. Szczerkowska-Dobosz A. Human leukocyte antigens as psoriasis inheritance and susceptibility markers. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2005;53(5):428-33.
19. Gudjonsson JE, Karason A, Antonsdottir A, Runarsdottir EH, Hauksson VB, Upmanyu R, et al. Psoriasis patients who are homozygous for the HLA-Cw\*0602 allele have a 2.5-fold increased risk of developing psoriasis compared with Cw6 heterozygotes. *The British journal of dermatology*. 2003;148(2):233-5.
20. Shah M, Al About DM, Crane JS, Kumar S. *Pustular Psoriasis*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.

21. Baker H, Ryan TJ. Generalized pustular psoriasis. A clinical and epidemiological study of 104 cases. *The British journal of dermatology*. 1968;80(12):771-93.
22. Ogawa E, Sato Y, Minagawa A, Okuyama R. Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. *The Journal of dermatology*. 2018;45(3):264-72.
23. Mueller W, Herrmann B. Cyclosporin A for psoriasis. *The New England journal of medicine*. 1979;301(10):555.
24. Nair RP, Stuart PE, Nistor I, Hiremagalore R, Chia NVC, Jenisch S, et al. Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *American journal of human genetics*. 2006;78(5):827-51.
25. Sagoo GS, Tazi-Ahnini R, Barker JW, Elder JT, Nair RP, Samuelsson L, et al. Meta-analysis of genome-wide studies of psoriasis susceptibility reveals linkage to chromosomes 6p21 and 4q28-q31 in Caucasian and Chinese Hans population. *The Journal of investigative dermatology*. 2004;122(6):1401-5.
26. Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis. *Lancet (London, England)*. 2015;386(9997):983-94.
27. Gardembas-Pain M, Ifrah N, Foussard C, Boasson M, Saint Andre JP, Verret JL. Psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Archives of dermatology*. 1990;126(11):1523.
28. Nestle FO, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells in psoriasis. Autostimulation of T lymphocytes and induction of Th1 type cytokines. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94(1):202-9.
29. Weinstein GD, Van Scott EJ. Autoradiographic analysis of turnover times of normal and psoriatic epidermis. *The Journal of investigative dermatology*. 1965;45(4):257-62.
30. Smith CH, Barker JN. Psoriasis and its management. *BMJ (Clinical research ed)*. 2006;333(7564):380-4.
31. Kurtovic NO, Halilovic EK. Serum Concentrations of Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) in Patients with Psoriasis: Correlation with Clinical Type and Severity of the Disease. *Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*. 2018;72(6):410-3.
32. Yamamoto M, Imai Y, Sakaguchi Y, Haneda T, Yamanishi K. Serum cytokines correlated with the disease severity of generalized pustular psoriasis. *Disease markers*. 2013;34(3):153-61.
33. Szepietowski JC, Bielicka E, Nockowski P, Noworolska A, Wasik F. Increased interleukin-7 levels in the sera of psoriatic patients: lack of correlations with interleukin-6 levels and disease intensity. *Clinical and experimental dermatology*. 2000;25(8):643-7.
34. Johnston A, Xing X, Wolterink L, Barnes DH, Yin Z, Reingold L, et al. IL-1 and IL-36 are dominant cytokines in generalized pustular psoriasis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2017;140(1):109-20.
35. Onoufriadis A, Simpson MA, Pink AE, Di Meglio P, Smith CH, Pullabhatla V, et al. Mutations in IL36RN/IL1F5 are associated with the severe episodic inflammatory skin disease known as generalized pustular psoriasis. *American journal of human genetics*. 2011;89(3):432-7.
36. Sugiura K, Takemoto A, Yamaguchi M, Takahashi H, Shoda Y, Mitsuma T, et al. The majority of generalized pustular psoriasis without psoriasis vulgaris is caused by deficiency of interleukin-36 receptor antagonist. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(11):2514-21.
37. Navarini AA, Burden AD, Capon F, Mrowietz U, Puig L, Köks S, et al. European consensus statement on phenotypes of pustular psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2017;31(11):1792-9.
38. Gooderham MJ, Van Voorhees AS, Lebwohl MG. An update on generalized pustular psoriasis. *Expert review of clinical immunology*. 2019;15(9):907-19.
39. Wang Q, Liu W, Zhang L. Clinical features of von Zumbusch type of generalized pustular psoriasis in children: a retrospective study of 26 patients in southwestern China. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2017;92(3):319-22.
40. Kharawala S, Golembesky AK, Bohn RL, Esser D. The clinical, humanistic, and economic burden of generalized pustular psoriasis: a structured review. *Expert review of clinical immunology*. 2020;16(3):239-52.

41. Jensen P, Skov L. Psoriasis and Obesity. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2016;232(6):633-9.
42. Gerdes S, Mrowietz U, Boehncke WH. [Comorbidity in psoriasis]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2016;67(6):438-44.
43. Raposo I, Torres T. Psoriasis strikes back! Epicardial adipose tissue: another contributor to the higher cardiovascular risk in psoriasis. *Revista portuguesa de cardiologia : orgao oficial da Sociedade Portuguesa de Cardiologia = Portuguese journal of cardiology : an official journal of the Portuguese Society of Cardiology*. 2015;34(10):613-6.
44. Lai YC, Yew YW. Psoriasis as an Independent Risk Factor for Cardiovascular Disease: An Epidemiologic Analysis Using a National Database. *Journal of cutaneous medicine and surgery*. 2016;20(4):327-33.
45. Weiss SC, Kimball AB, Liewehr DJ, Blauvelt A, Turner ML, Emanuel EJ. Quantifying the harmful effect of psoriasis on health-related quality of life. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2002;47(4):512-8.
46. Moon HS, Mizara A, McBride SR. Psoriasis and psycho-dermatology. *Dermatology and therapy*. 2013;3(2):117-30.
47. Dowlatshahi EA, Wakkee M, Arends LR, Nijsten T. The prevalence and odds of depressive symptoms and clinical depression in psoriasis patients: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134(6):1542-51.
48. Kaneko F, Itoh N, Yoshida H, Suzuki M, Ono I. The cell-components and cytokines in the subcorneal microabscess of psoriasis. *Fukushima journal of medical science*. 1991;37(2):103-12.
49. Steffen C. William John Munro and Munro's abscess, and Franz Kogoj and Kogoj's spongiform pustule. *The American Journal of dermatopathology*. 2002;24(4):364-8.
50. Raychaudhuri SK, Maverakis E, Raychaudhuri SP. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmunity reviews*. 2014;13(4-5):490-5.
51. Weisenseel P, Wilsmann-Theis D, Kahl C, Reich K, Mössner R. [Pustular psoriasis]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2016;67(6):445-53.
52. Rønholt K, Iversen L. Old and New Biological Therapies for Psoriasis. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(11).
53. Poulalhon N, Begon E, Lebbé C, Lioté F, Lahfa M, Bengoufa D, et al. A follow-up study in 28 patients treated with infliximab for severe recalcitrant psoriasis: evidence for efficacy and high incidence of biological autoimmunity. *The British journal of dermatology*. 2007;156(2):329-36.
54. Robinson A, Van Voorhees AS, Hsu S, Korman NJ, Lebwohl MG, Bebo BF, Jr., et al. Treatment of pustular psoriasis: from the Medical Board of the National Psoriasis Foundation. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012;67(2):279-88.
55. Albaghdadi A. Current and Under Development Treatment Modalities of Psoriasis: A Review. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2017;17(3):189-99.
56. Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. Compounds of psoriasis with obesity and overweight. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*. 2017;71(1):761-72.
57. Puig L. Obesity and psoriasis: body weight and body mass index influence the response to biological treatment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2011;25(9):1007-11.
58. Blumberg H, Dinh H, Trueblood ES, Pretorius J, Kugler D, Weng N, et al. Opposing activities of two novel members of the IL-1 ligand family regulate skin inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204(11):2603-14.
59. Gabay C, Towne JE. Regulation and function of interleukin-36 cytokines in homeostasis and pathological conditions. *Journal of leukocyte biology*. 2015;97(4):645-52.
60. Zhou L, Todorovic V. Interleukin-36: Structure, Signaling and Function. *Advances in experimental medicine and biology*. 2021;21:191-210.
61. Bachelez H, Choon SE, Marrakchi S, Burden AD, Tsai TF, Morita A, et al. Inhibition of the Interleukin-36 Pathway for the Treatment of Generalized Pustular Psoriasis. *The New England journal of medicine*. 2019;380(10):981-3.

62. Iznardo H, Puig L. Exploring the Role of IL-36 Cytokines as a New Target in Psoriatic Disease. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(9).
63. Choon SE, Lebowitz MG, Marrakchi S, Burden AD, Tsai TF, Morita A, et al. Study protocol of the global Effisayil 1 Phase II, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial of spesolimab in patients with generalized pustular psoriasis presenting with an acute flare. *BMJ open*. 2021;11(3):e043666.
64. Mrowietz U, Burden AD, Pinter A, Reich K, Schäkel K, Baum P, et al. Spesolimab, an Anti-Interleukin-36 Receptor Antibody, in Patients with Palmoplantar Pustulosis: Results of a Phase IIa, Multicenter, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. *Dermatology and therapy*. 2021;11(2):571-85.
65. Wang WM, Jin HZ. Biologics in the treatment of pustular psoriasis. *Expert opinion on drug safety*. 2020;19(8):969-80.
66. Kim CH. FOXP3 and its role in the immune system. *Advances in experimental medicine and biology*. 2009;665:17-29.
67. Song QH, Shen Z, Xing XJ, Yin R, Wu YZ, You Y, et al. An association study of single nucleotide polymorphisms of the FOXP3 intron-1 and the risk of Psoriasis vulgaris. *Indian journal of biochemistry & biophysics*. 2012;49(1):25-35.
68. Gao L, Li K, Li F, Li H, Liu L, Wang L, et al. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. *Journal of dermatological science*. 2010;57(1):51-6.
69. Kuang Y, Zhang H, Zhu W, Wu L, Chen W, Lu Y, et al. [Effect of methotrexate on regulation for the number of regulatory T cells and expression of Foxp3 in psoriasis]. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences*. 2018;43(8):835-42.
70. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 1994;56(5):559-64.
71. Xiaoling Y, Chao W, Wenming W, Feng L, Hongzhong J. Interleukin (IL)-8 and IL-36 $\gamma$  but not IL-36Ra are related to acrosyringia in pustule formation associated with palmoplantar pustulosis. *Clinical and experimental dermatology*. 2019;44(1):52-7.

## 11 Danksagung

## 12 Lebenslauf