

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Matthias Goebeler

Keratinozyten und neutrophile Granulozyten als wichtige Quelle
entzündungsfördernder Mediatoren bei der Acne inversa

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Ana Luiza G. C. A. Lima
aus Fortaleza, Brasilien

Würzburg, Oktober 2016



Referent: Prof. Dr. med. Matthias Goebeler

Korreferentin: Prof. Dr. med. Martina Prelog

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2017

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

1.1 Definition	1
1.2 Ätiologie.....	1
1.3 Epidemiologie.....	2
1.4 Risikofaktoren.....	2
1.5 Klinik.....	3
1.6 Pathogenese	6
1.6.1 Interleukin-17	9
1.6.2 Caspase-1 und IL-1 β	9
1.6.3 S100A8 und S100A9	10
1.7 Therapie der Acne inversa	11
1.8 Ziele der Arbeit.....	12

2. Material und Methoden

2.1 Gewebeproben.....	15
2.2 Hämatoxilin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	16
2.3 Mikroskopische Untersuchung und Auswahl der Schnitte für weitere Färbungen bei Gewebeproben aus läsionaler Haut	16
2.4 Immunhistochemie	16
2.4.1 Vorbehandlung mit der „Heat-Induced Epitope Retrieval“-Methode (HIER-Methode).....	16
2.4.2 Immunhistochemische Färbung mittels „Labeled-Streptavidin-Biotin- Methode“ (LSAB)	17
2.4.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen	17
2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	22
2.6. Immunfluoreszenz	23
2.7 Western Blot.....	23
2.7.1 Proteinextraktion aus der Epidermis	27
2.7.2 Elektrophoretische Auftrennung und Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose.....	27
2.8 Statistik.....	29

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl des Patientenkollektivs	30
---	----

INHALTSVERZEICHNIS

3.2 Patientenbezogene Daten	30
3.3 IL-17-positive Zellen sind in der periläsionalen und läsionalen AI-Haut nachweisbar	33
3.4 NLRP3 ist in periläsionaler und läsionaler Epidermis von AI-Patienten aufreguliert und das Inflammasom in läsionaler AI-Haut aktiviert.	34
3.4.1 Immunhistologische Färbung gegen NLRP3	35
3.4.2 Immunhistologische Färbung gegen Caspase 1	35
3.4.3 Western Blot-Analyse der aktiven Caspase 1	36
3.5 S100A8/S100A9-Proteine liegen in der läsionalen Epidermis von AI-Patienten aufreguliert vor	37
3.5.1 Immunhistologische Analyse von S100A8 und S100A9	38
3.5.2. Western Blot-Analyse	39
3.6 Hyperplasie der Epidermis ist bereits in periläsionaler AI-Haut nachweisbar und zeigt sich ausgeprägter in läsionaler AI-Haut.	40
3.7 Die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats früher und später Phasen der Erkrankung zeigt signifikante Unterschiede	41
3.7.1 Das perifollikuläre Infiltrat der AI beinhaltet hauptsächlich T-Lymphozyten	45
3.7.2 Im tiefen Infiltrat dominieren Zellen der natürlichen (angeborenen) Immunität	45
3.8 IL-17-positive neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten.	57
4. Diskussion	
4.1. Patientenbezogene Daten	59
4.2. IL-17-positive Zellen sind in der periläsionalen und läsionalen AI-Haut vermehrt	61
4.3. Keratinozyten sind eine wesentliche Quelle proentzündlicher Moleküle in der AI	63
4.4. Das tiefe Infiltrat besteht hauptsächlich aus Zellen der angeborenen Immunität	66
4.5. Neutrophile Granulozyten stellen eine wichtige Quelle von IL-17 im tiefen Infiltrat dar.	68
5. Zusammenfassung	71

INHALTSVERZEICHNIS

6. Literaturverzeichnis.....	73
7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	77
8. Danksagung	
9. Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

1.1 Definition

Die Acne inversa (AI) ist eine chronisch-entzündliche, abszedierende und fistulierende, rekurrende Erkrankung der Haarfollikel, vorwiegend im Bereich der intertriginösen Areale [1-4]. Die bisher in weiten Teilen ungeklärte Pathophysiologie führte zu einer Reihe von synonym gebrauchten Krankheitsbegriffen, wobei die Bezeichnung „Hidradenitis suppurativa“ vor allem im englischen Sprachraum am gebräuchlichsten ist; daneben existieren die Krankheitsbegriffe „Verneuil’s disease“, „Pyoderma fistulans significa“ und „smoker’s boils“ [1-4]. Im Rahmen des zweiten internationalen Symposiums der „Hidradenitis Suppurativa Foundation“ im März 2009 wurde folgende allgemeine Definition der Acne inversa formuliert:

„Die Hidradenitis suppurativa (HS) ist eine chronisch-entzündliche, rekurrende, mit Einschränkungen einhergehende, follikuläre Hauterkrankung, die typischerweise nach der Pubertät auftritt, und mit tiefsitzenden entzündlichen Läsionen in den apokrine Drüsen tragenden Regionen des Körpers, am häufigsten im axillären, inguinalen, und anogenitalen Bereich, einhergeht“ (aus dem Englischen übersetzt nach [5]).

1.2 Ätiologie

Erstmalig wurde die AI im Jahr 1854 von Verneuil beschrieben. Auf Grund seiner damaligen Annahme, dass es sich um eine mit Entzündung der apokrinen Schweißdrüsen einhergehende Erkrankung handele, erhielt sie 1865 die französische Bezeichnung „hidrosadénite phlegmoneuse“ – latinisiert „Hidradenitis suppurativa [1, 3, 6]. Im Jahr 1955 konnten Shelley und Cahn durch experimentelle Okklusion epilierter axillärer Haut bei gesunden Probanden zeigen, dass dies bei 25% der Patienten zu Acne inversa-artigen Läsionen führt. Die dabei durchgeführten histologischen Untersuchungen zeigten eine Okklusion der Haarfollikel durch Keratinpfropfe mit Beteiligung der

1. EINLEITUNG

Ausführungsgänge der apokrinen Drüsen [7]. Diese Befunde wurden später von Yu und Cook [8] sowie Plewig und Kligman [9] bestätigt. Aus heutiger Sicht stellt die folliculäre Okklusion mit infundibulärer Hyperkeratose und Dilatation des Infundibulums den ersten wesentlichen Schritt für die Entwicklung einer AI dar [10].

1.3 Epidemiologie

Die Prävalenz der AI wird in der Literatur zwischen 0,3-4% angegeben, wobei die höheren Prävalenzzahlen in Schwerpunktzentren für Diagnostik und Therapie der AI ermittelt wurden und somit möglicherweise einem Bias unterliegen [1, 2, 6, 11]. In der europäischen Population konnte eine Prävalenz von 1% gezeigt werden [1, 12, 13]. Vor der Pubertät und nach der Menopause hat die AI eine niedrigere Inzidenz, üblicherweise beginnt die Erkrankung zwischen der zweiten und dritten Lebensdekade [2, 6]. Die Inzidenz in Europa wird auf etwa 1,1% der Gesamtbevölkerung pro Jahr geschätzt. Frauen sind insgesamt häufiger betroffen als Männer, mit einem Geschlechterverhältnis von 2:1 bis 5:1 [11], wobei der perineale Befall bei Männern häufiger ist, Frauen dagegen vornehmlich im Genitalbereich betroffen sind [2, 6, 11].

1.4 Risikofaktoren

Wesentliche Risikofaktoren der AI sind Nikotinabusus und Adipositas [2, 11, 12, 14, 15], wobei ein Zusammenhang zwischen Schwere der Adipositas und Ausprägung der AI beschrieben wurde und Adipositas somit einen echten Risikofaktor darstellt [12, 13]. Obwohl eine signifikante Assoziation zwischen Nikotinabusus und AI besteht, sind die hierfür verantwortlichen Pathomechanismen bisher nicht bekannt [13]. Als mögliche Ursache wird die durch Nikotin verursachte Steigerung der Schweißproduktion diskutiert; denn die resultierende Hyperhidrose könnte mitverantwortlich sein für die Entstehung der Keratinplugs im Bereich der Haarfollikel und für die daraus folgende

1. EINLEITUNG

Entzündungsreaktion [16]. Weitere Risiko- bzw. Triggerfaktoren sind eine positive Familienanamnese und hormonelle Einflüsse [1, 17, 18]. Obwohl die Rolle der Hormone bei der Pathogenese der AI noch nicht abschließend geklärt ist, so liefern die weibliche Prädominanz der Erkrankung, die prämenstruale Verschlechterung und die Besserung unter anti-androgenetischer Therapie doch einen Hinweis darauf, dass androgenetische Trigger einen Einfluss auf die Erkrankung haben [11, 18].

1.5 Klinik

Die AI manifestiert sich zunächst mit entzündlichen, schmerzhaften, subkutan gelegenen Knoten in den intertriginösen Arealen. Diese können entweder spontan abheilen oder chronisch-entzündlich fortbestehen beziehungsweise rezidivieren. Klassischerweise abszedieren die Knoten im Verlauf und es kann zu teils kontinuierlicher Entleerung von Eiter, Blut und übel riechendem Sekret kommen. Im weiteren Verlauf können die Läsionen fistulieren, fibrosieren und hypertrophe Narben ausbilden. Obwohl es zum Auftreten offener Komedonen von teilweise beträchtlicher Größe (so genannte „tomb stone comedos“) kommen kann, entstehen bei der AI im Gegensatz zur Acne vulgaris keine geschlossenen Komedonen. Die Diagnose einer AI wird an Hand der charakteristischen Läsionen, der typischerweise betroffenen Areale und des Verlaufs klinisch gestellt [1-3, 6].

Der Schweregrad der AI wird im klinischen Alltag nach dem Hurley-Score (Tabelle 1) eingeteilt; für wissenschaftliche Untersuchungen stehen darüber hinaus detailliertere Scoring-Systeme wie der Satorius-Score (Tabelle 2) zur Verfügung [19, 20].

1. EINLEITUNG

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Hurley (1989) [19]

Stadium I	Solitäre oder multiple Abszesse
Stadium II	Rezidivierende Abszesse mit einzelnen oder multiplen Strang- und Narbenbildungen
Stadium III	Diffuser Befall mit multiplen Narbensträngen, Bewegungseinschränkung durch Kontrakturen

Tabelle 2: Schweregrad nach Sartorius et al. (2003) [20]

Betroffene anatomische Regionen	3 Punkte pro betroffener Region: <ul style="list-style-type: none"> - Axillär - Inguinal - Gluteal oder submammär oder andere Regionen
Gewichtete Anzahl der Läsionen aller Regionen	pro <ul style="list-style-type: none"> - Knoten 2 Punkte - Fistel 4 Punkte - Narbe 1 Punkt - sonstige Veränderung 1 Punkt
Größter Abstand zweier relevanter Läsionen, d. h. von Knoten oder Fisteln; Größe, falls nur eine Läsion	Pro Region <ul style="list-style-type: none"> - < 5 cm: 2 Punkte - < 10 cm: 4 Punkte - > 10 cm: 8 Punkte
Gesunde Haut zwischen allen Läsionen?	Pro Region <ul style="list-style-type: none"> - Ja: 0 Punkte - Nein: 6 Punkte

Differentialdiagnostisch muss in frühen Stadien an Furunkulose, Karbunkel, infizierte Zysten sowie Schweißdrüsenabszesse gedacht werden [1, 3]. In späteren Stadien kommen als Differentialdiagnose Fistelbildung bei granulomatösen Prozessen wie Tuberculosis cutis colliquativa, tiefe Trichophytien, Analfisteln und Fisteln bei Morbus Crohn in Frage [6, 21]. Weitere wichtige Differentialdiagnosen umfassen Bartholinitis, Lymphogranuloma venereum, Skrophuloderm und Aktinomykose [6, 21]. Auf Grund der manchmal schwierigen differentialdiagnostischen Abgrenzbarkeit wird die Diagnose einer AI gelegentlich erst mit zeitlicher Verzögerung gestellt.

1. EINLEITUNG

Der Verlauf der AI kann in schweren Fällen von Komplikationen gekennzeichnet sein, wobei am häufigsten eine lokale Vernarbung auftritt. Seltener kommt es zu Infektionen wie Phlegmone oder septischen Verläufen [6]. Die teils ausgeprägten Narbenstränge und Fibrosierungen älterer AI-Läsionen können eine Bewegungseinschränkung verursachen, was insbesondere in der Axilla beeinträchtigend sein kann [6]. Vernarbung und Entzündung im Genitalbereich können zudem zu Strikturen der Urethra, des Anus oder Rektums führen [22]. Eine weitere seltene, aber bedeutsame Komplikation ist die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms [1, 3, 6]. Tabelle 3 führt die häufigsten Komplikationen der AI auf [6].

Tabelle 3: Mit AI assoziierte Komplikationen

Anal-, Urethral- und Rektalfisteln
Kontrakturen und Bewegungseinschränkung
Plattenepithelkarzinom
Lumbosacralabszesse
Bakterielle Osteomyelitis
Generell erhöhtes Malignomrisiko
Anämie

Die AI ist eine Erkrankung der sogenannten „follikulären Okklusionstetrade“. Hierunter werden neben der AI die ebenfalls chronisch rezidivierenden, suppurativen Erkrankungen Acne conglobata, Sinus pilonidalis und Perifolliculitis abscedens et suffodiens subsummiert [1, 3]. Ein gehäuftes Auftreten der AI wurde bei genetischen Erkrankungen wie z. B. dem Keratitis-ichthyosis-deafness (KID)-Syndrom [23], dem Morbus Dowling-Degos und dem Down-Syndrom beschrieben [1, 3, 6]. Bei weiteren Syndromen, wie z. B. beim Synovitis-Acne-Pustulosis-Hyperostosis-Osteitis (SAPHO)-Syndrom, kann die AI ein Teilsymptom darstellen. Zudem bestehen Assoziationen zu weiteren chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie dem Pyoderma gagraenosum und dem Morbus Crohn [1, 3, 6, 21].

1. EINLEITUNG

1.6 Pathogenese

Die genauen pathogenetischen Abläufe bei der AI sind bis heute nur unzureichend verstanden. Insbesondere ist von vielen bei AI beobachteten Krankheitsprozessen nicht geklärt, ob sie ursächlich zur Pathogenese beitragen oder lediglich Folgephänomene darstellen.

Ursprünglich ging Verneuil von einer Entzündung der apokrinen Schweißdrüsen aus [1, 3, 6, 11]. Von Shelley und Cahn wurde später eine Beteiligung der Ausführungsgänge der apokrinen Drüsen mit Ausbildung von Keratinpfropfen als Ursache für die AI vermutet [7]. Aus heutiger Sicht geht die am weitesten akzeptierte Hypothese von einer Okklusion des Haarfollikels mit infundibulärer Hyperkeratose und Dilatation des Infundibulums als dem ersten wesentlichen Schritt für die Entwicklung einer AI aus [10]. In der aktuellen Literatur wird als Folge der Follikeldilatation die Ruptur des Follikels mit nachfolgender Versprengung des Inhalts einschließlich Keratinozyten, Keratin, Haaranteilen und Bakterien in das umliegende Gewebe mit hieraus resultierender Entzündungsreaktion beschrieben [16, 24]. Diese Entzündungsreaktion wiederum kann in schweren Fällen zur Ausbildung von Fisteln führen [16, 24].

Die histologische Analyse der AI durch Boer und Weltevreden zeigte eine Perifollikulitis und Keratinpfropfe in Biopsien von 17 neu diagnostizierten AI-Patienten [25]. Jemec und Hansen sowie von Laffert et al. bestätigten diese Befunde und fanden zusätzlich eine psoriasiforme Hyperplasie und Verbreitung des entzündlichen Infiltrats in die Dermis und Subkutis [10, 26]. Zusätzlich hat die Gruppe um von Laffert auch die Zusammensetzung des perifollikulären Infiltrats analysiert. Die Ergebnisse zeigten ein vorwiegend aus T-Lymphozyten (CD3), T-Killer-Lymphozyten (CD8), B-Lymphozyten (CD79) und Makrophagen (CD68) bestehendes Infiltrat [10].

Van der Zee verglich in einer semiquantitativen immunhistologischen Analyse gesunde Haut mit periläsionalen AI-Arealen, akuten läsionalen AI-Arealen und chronischen läsionalen AI-Arealen [24]. Psoriasiforme Hyperplasie,

1. EINLEITUNG

Keratinpfropfe und entzündliche Infiltrate wurden in akuten und chronischen läsionalen AI-Arealen gefunden. Periläsionale Haut dagegen zeigte nur psoriasiforme Hyperplasie und Keratinpfropfe, jedoch kein signifikantes Entzündungsinfiltrat. Das Infiltrat der akuten läsionalen Haut zeigte dendritische Zellen (CD11+), Monozyten (CD14+), Makrophagen (CD68+), dermale dendritische Zellen (FXIIIa+) und Langerhans-Zellen (CD1a+) mit einem signifikanten Unterschied zu der gesunden Haut [24]. Im Vergleich zum akuten Stadium der AI zeigten sich im chronischen Stadium vermehrt CD3-, CD4-, CD8-, CD11-, CD14-, CD1a-, CD20- und CD79-positive Zellen [24].

Die vorbeschriebenen histologischen Befunde zeigen unter anderem Auffälligkeiten im Bereich der epidermalen Zellen. Keratinozyten haben bei verschiedenen Hauterkrankungen eine immunmodulatorische Funktion, die auch im Zusammenhang mit der Pathogenese der AI wichtig sein könnte.

So spielten Keratinozyten eine wichtige Rolle in der Immunregulation und Entzündung der Haut durch die Synthese verschiedener Chemokine und Zytokine [27, 28]. Darüber hinaus besitzen Keratinozyten unterschiedliche immunologisch relevante Rezeptoren, wie Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und den Interleukin(IL)-1-Rezeptor (IL-1R), deren Aktivierung zu einer Entzündungsreaktion führt [29, 30]. Die Stimulation dieser Rezeptoren aktiviert die NF- κ B-Kaskade, welche durch Aktivierung der Transkription verschiedener Moleküle unter anderem eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen spielt [11].

Aktuelle Studien beschreiben den Einfluss zahlreicher weiterer Komponenten des Immunsystems auf die Pathogenese der AI, von denen die Wichtigsten im Folgenden erwähnt werden sollen.

Schlapbach et al. haben eine Aufregulation von IL-17 in der läsionalen AI-Haut nachgewiesen [31]. IL-17A ist der Hauptvertreter der IL-17-Familie und spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung von entzündlichen Prozessen [32]. IL-

1. EINLEITUNG

IL-17A kann durch eine Aktivierung von Keratinozyten verschiedene proinflammatorische Mechanismen anstoßen [33, 34]. IL-17A induziert in Keratinozyten die Aktivierung proinflammatorischer Chemokine, wie z.B. IL-1 β , und die Produktion antimikrobieller Peptide wie β -Defensin, S100A7, S100A8 und S100A9 [35].

Van der Zee hat in seiner Studie eine Aufregulation von IL-1 β in läsionaler Haut von AI-Patienten gezeigt [36]. IL-1 β ist ein potentes proinflammatorisches Molekül und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Hauterkrankungen wie z. B. der Psoriasis, der Vitiligo und der Kontaktdermatitis [30]. Aktuelle Studien zeigen, dass die Keratinozyten die Hauptquelle von IL-1 β in der Haut darstellen [30, 37]. IL-1 β reguliert die Expression einiger Gene, deren Aktivität zu lokaler Inflammation sowie zur Einwanderung und Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems führt [34].

Bechara et al. beschrieben eine Aufregulation von h β -Defensin-2 und LL-37 (Cathelicidin) in läsionaler AI-Haut [38]. Gleichfalls wurde eine Aufregulation von hBD-2 und Psoriasin in läsionaler Haut von AI-Patienten aufgezeigt [39]. Im Serum von AI-Patienten wurden erhöhte Werte von S100A8- und S100A9-Proteine nachgewiesen [40].

Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs), Pathogen-associated molecular pattern molecules (PAMPs) und Alarmine, wie z.B. β -Defensine, Psoriasin und Cathelicidin, sind bei Entzündungsreaktionen der Haut durch Keratinozyten-Aktivierung involviert und könnten zur Chronifizierung der AI beitragen [11]. Zellschäden induzieren die Produktion von Alarminen und DAMPs, was in der Folge zu einer Stimulation von TLR-Rezeptoren und zur Aktivierung von Keratinozyten und Makrophagen führen kann [11, 41]. Dies wiederum verursacht die Produktion weiterer chemotaktischer und proentzündlicher Chemokine und Zytokine und könnte so zu einem klassischen Circulus vitiosus und somit zu einem chronischen Entzündungsprozess führen.

1. EINLEITUNG

1.6.1 Interleukin-17

Die IL-17-Zytokin-Familie besteht aus 6 verschiedene Zytokinen, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E und IL-17F, welche als Homodimere oder Heterodimere wirken können [32, 42]. IL-17A ist der Hauptvertreter und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von entzündlichen Prozessen [32]. IL-17A hat unterschiedliche Homologien mit den anderen Mitgliedern der IL-17-Familie, z. B. zu 55% mit IL-17F [42]. Trotz dieser Homologien hat IL-17A eine höhere Affinität zu dem entsprechenden Rezeptor [32]. Die IL-17-Rezeptor-Familie besteht aus 5 Mitgliedern: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD und IL-17RE [32, 35, 42]. IL-17RA ist der Hauptrezeptor des IL-17A-Signals und ist in verschiedenen Zelllinien und Geweben exprimiert [32], allerdings kann IL-17A auch den Rezeptor IL-17RC binden [42]. Die Bindung von IL-17A mit dem ansprechenden Rezeptor (IL-17RA, IL-17RC) führt zur Aktivierung der NF- κ B-Transkription, die zu einer proinflammatorischen Kaskade führt [35, 42]. IL-17 induziert die Aktivierung proinflammatorischer Chemokine, Produktion hämatopoetischer Zytokine und antimikrobieller Substanzen [35]. Schlapbach et al. haben mittels PCR eine Hochregulation von IL-17 in der läsionalen AI-Haut nachgewiesen [31]. Durch immunhistochemische Färbung wurde dieser Befund bestätigt und eine Vermehrung von IL-17-positiven Zellen in der papillaren und retikularen Dermis gezeigt [31]. Mithilfe von Doppelimmunfluoreszenz wurde Positivität für Th17-Zellen gezeigt [31].

1.6.2 Caspase-1 und IL-1 β

Das Inflammasom ist ein multimerer zytosolischer Proteinkomplex, der die Abspaltung von IL-1 β aus der inaktiven Vorform Pro-IL-1 β kontrolliert. Es existiert eine Reihe verschiedener Inflammasomkomplexe, die sich durch jeweils spezifische Sensoren zur Erkennung von DAMPs und PAMPs, den NOD-Like-Rezeptoren (NLRs), unterscheiden. Allen Inflammasomkomplexen ist gemein, dass letztlich Caspase-1 durch Abspaltung aus Pro-Caspase-1 aktiviert wird, die ihrerseits aus Pro-IL-1 β IL-1 β abspaltet. [41, 43]. IL-1 β wird

1. EINLEITUNG

größtenteils von myeloischen Zellen (wie z. B. Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen), aber auch von Zellen nicht-myeloischer Herkunft wie z. B. Keratinozyten exprimiert [44]. Durch Induktion von Fieber, Aktivierung der Lymphozyten und Chemotaxis reguliert IL-1 β die systemische und lokale Reaktion bei Infektionen und immunologischen Prozessen [43]. IL-1 β -Aktivität spielt eine wichtige Rolle in entzündlichen und allergischen Hauterkrankungen [30]. Keratinozyten produzieren pro-IL-1 β bereits physiologischerweise, eine Aktivierung, d. h. Abspaltung und Freisetzung von IL-1 β , findet jedoch nur im Rahmen entzündlicher Prozesse statt [30]. Die epidermale Stimulation mit IL-1 β führt zur Produktion proinflammatorischer Moleküle, wie z.B. β -Defensin-1, LL-37, S100A8, S100A9, CXCL1, CXCL5 und CXCL8 [34]. Van der Zee hat in einer Studie eine Aufregulierung von IL-1 β in lässionaler Haut von AI-Patienten gezeigt, wobei die Quelle des Zytokins nicht identifiziert werden konnte [36].

1.6.3 S100A8 und S100A9

S100A8 (Calgranulin A, migration inhibitory factor-related protein 8, MRP-8) und S100A9 (Calgranulin B, migration inhibitory factor-related protein 14, MRP-14) sind zwei Proteine aus der Familie der Calcium-bindenden Proteine, die in Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Keratinozyten exprimiert werden [45-47]. Wie die meisten S100-Proteine können S100A8 und S100A9 Homodimere ausbilden, sind aber auch in der Lage, Heterodimere zu bilden [48]. Diese Proteine werden als DAMPs klassifiziert und ihre Expression wurde bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen beschrieben, wie z. B. bei Morbus Crohn, rheumatoider Arthritis, multipler Sklerose, inflammatorischen Dermatosen und speziell in der Psoriasis [45, 46]. S100A8- und S100A9-Proteine können zur Expression verschiedener Chemokine und zur Produktion proentzündlicher Zytokine führen, sowie eine Hyperproliferation der Keratinozyten induzieren [48]. Diesen Molekülen kommt daher vermutlich eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse

1. EINLEITUNG

in der Haut zu [48]. Sie können auch den Multiproteinkomplex des Inflammasoms aktivieren, wodurch es Caspase-1-vermittelt zur Aktivierung von IL-1 β durch Abspaltung aus der inaktiven Vorform Pro-IL-1 β kommt [11, 41, 43]. S100A8- und S100A9-Proteine wurden im Serum von AI-Patienten hochreguliert nachgewiesen, allerdings fand sich keine Korrelation zum Schweregrad der Erkrankung [40].

1.7 Therapie der Acne inversa

Die Therapie der Acne inversa kann medikamentös (topisch, systemisch) oder chirurgisch erfolgen. Die Wahl der Therapie ist vor allem von der Schwere der Erkrankung (Hurley- oder Sartorius-Grad) abhängig, aber auch von der Häufigkeit der Exazerbationen und insbesondere von den Präferenzen der Betroffenen [1].

Die Effektivität verschiedener Therapieformen wurde in mehreren klinischen Studien überprüft. Bei initialen und leichten Formen der AI (Hurley-Grad I) oder als adjuvante Therapie ist eine Behandlung mit topischen Antibiotika (wie z.B. Clindamycin 1%-Lösung) und Peeling-Agenzien (wie z.B. 15% Resorcinol) mit Erfolg durchgeführt worden [49]. Gener et al. und Mendonca und Griffiths haben eine erfolgreiche Systemtherapie mit Clindamycin in Kombination mit Rifampicin („Mendonca-Schema“) beschrieben [50, 51]. Ebenso sind systemisch verabreichte Tetrazykline (Minozyklin oder Doxyzyklin) auf Grund ihrer immunmodulatorischen, antientzündlichen Wirkmechanismen in der Therapie der AI anwendbar [11].

Da ein hormonaler Einfluss auf die Erkrankung beschrieben wurde, wird von einzelnen Autoren bei weiblichen Patienten eine orale antiandrogene Therapie mit Ethinylestradiol/Cyproteronacetat empfohlen [52].

1. EINLEITUNG

Auch oral applizierte Retinoide wie Acitretin oder Isotretinoin wurden mit Erfolg in der Behandlung der AI eingesetzt [53].

Da es sich bei der AI um eine chronisch-entzündliche Erkrankung handelt, ist eine systemische Therapie mit immunsuppressiven bzw. immunmodulatorisch wirksamen Substanzen wie Kortikosteroiden oder Cyclosporin A erwogen worden [54]. Einige Arbeiten konnten eine Aufregulation von TNF- α und IL-1 β in von AI betroffener Haut zeigen [36], was Haslund et al. dazu bewogen hat, TNF- α -Inhibitoren in der Therapie der AI einzusetzen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigen ein gutes Ansprechen auf diese Therapie [55]. Ebenso konnte in ersten Arbeiten ein Ansprechen der Erkrankung auf Anakinra (IL-1-Rezeptorantagonist) und Canakinumab (gegen humanes IL-1 β gerichteter monoklonaler Antikörper) gezeigt werden, wobei diese Ergebnisse in weiteren randomisierten Studien überprüft werden sollen [56].

Da auch eine Beteiligung von Interleukin-17-bildenden Th-17-Zellen in der Pathogenese der AI beschrieben wurde, deren Expression von Interleukin-23 (IL-23) abhängig ist, wurde von Gulliver et al. eine Studie zur Wirksamkeit einer Therapie mit dem Interleukin-12/23-Antagonisten Ustekinumab durchgeführt [57]. Die Ergebnisse zeigten sich in etwa mit der Wirksamkeit der TNF- α -Antagonisten vergleichbar.

Die operative Behandlung ist in den Hurley-Stadien II und III derzeit die einzige kurative Therapie. In den Stadien Hurley I bis II können lokalisierte Knoten und Abszesse exzidiert werden. Bei Hurley-Grad II bis III ist die radikale Exzision die Therapie der Wahl und zeigt eine niedrige Rezidivhäufigkeit [58].

1.8 Ziele der Arbeit

Mehrere histologische Vorarbeiten haben eine Beteiligung der Epidermis bei AI gezeigt. Van der Zee et al., Jemec und Hansen sowie von Laffert konnten eine

1. EINLEITUNG

psoriasiforme Hyperplasie und Keratinfröpfe nachweisen [10, 24, 26, 59]. Dabei ist unklar, ob die Epidermis lediglich auf einen entzündungsbedingten Wachstumsreiz hin proliferiert oder ob diese Veränderungen im Zusammenhang mit inflammatorischen Mechanismen innerhalb der Epithelzellen stehen, wie sie von anderen chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen bekannt sind. IL-17 ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, das zur Aktivierung des Inflammasoms und zur Produktion proentzündlicher Moleküle in den Keratinozyten führt [34]. In der periläsionalen AI-Haut wurden epidermale Veränderung bzw. Hyperproliferation nachgewiesen, ohne dass bisher eine Analyse über die Expression von IL-17 in diesem Bereich durchgeführt wurde. S100A8 und S100A9 können in Keratinozyten exprimiert werden und nehmen eine zentrale Rolle in der Produktion von Chemokinen und Zytokinen ein. Hierdurch haben sie einerseits Auswirkung auf die Proliferation und Differenzierung der Epidermis, andererseits wirken sie aber auch proentzündlich auf inflammatorische Prozesse der Haut. Unter anderem steht S100A8/A9 regulativ mit dem zentralen proinflammatorischen Zytokin IL-1 β in Zusammenhang. IL-1 β wird intrazellulär durch Caspase-1 aktiviert. Um die Beteiligung der Epidermis an der inflammatorischen Pathogenese der Acne inversa zu überprüfen, wurden daher im Rahmen dieser Promotionsarbeit Experimente durchgeführt, die die Regulation und Expression von S100A8, S100A9 und Caspase-1 bzw. IL-1 β in entzündlich veränderter AI-Haut im Vergleich zu nicht betroffener Haut charakterisieren sollten. Hierzu wurde zunächst mittels immunhistochemischer Methoden überprüft, in welchen Hautpartien die entsprechenden Proteine am stärksten exprimiert werden. Anschließend wurden die Proteine aus der entsprechenden Gewebefraktion gewonnen und mittels Western Blot genauer untersucht.

Die am weitesten akzeptierte Hypothese zur Entstehung der Acne inversa geht davon aus, dass es initial zu einer Okklusion des Haarfollikels mit infundibulärer Hyperkeratose, Dilatation des Infundibulums und nachfolgender Ruptur des Haarfollikels kommt. Dieser soll eine in die Tiefe abszedierende

1. EINLEITUNG

Entzündungsreaktion folgen (10, 17, 26). Damit würde der Pathogenese der Acne inversa eine Dynamik zu Grunde liegen, die mit einer Entzündungsreaktion in der Nähe eines Haarfollikels als Perifollikulitis beginnt (frühe Phase) und sich dann in das tiefere Gewebe ausbreitet (spätere Phase). Als weiterer Teil dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung der Entzündungsinfiltrate der angenommenen frühen Phase im Bereich des Follikels und der angenommenen späten Phase im tiefen Infiltrat miteinander verglichen, um eventuelle Unterschiede herauszuarbeiten, die diese Dynamik in der Entwicklung des Krankheitsgeschehens verdeutlichen. Dazu wurden histologische Präparate, in denen sowohl perifollikuläres als auch tiefes Infiltrat vorhanden waren, mittels (immun)histochemischer Methoden so aufgearbeitet, dass das jeweilige inflammatorische Infiltrat deskriptiv analysiert werden konnte.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Gewebeproben

Die Durchführung dieser Promotionsarbeit wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Würzburg genehmigt.

Für diese Arbeit wurden Gewebeproben von 22 Patienten mit AI Hurley-Grad II-III untersucht, die im Zeitraum von Oktober 2013 bis März 2014 in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg mittels radikaler Exzision operativ behandelt wurden. Das Gewebe wurde intraoperativ aus axillär, genital, inguinal oder gluteal betroffener Haut entnommen. Bei 12 Patienten wurden neben Gewebeproben aus klinisch betroffener Haut auch solche aus periläsionaler, klinisch nicht betroffener Haut für Vergleichsuntersuchungen gewonnen. Für die histologische Untersuchung wurden Gewebeproben von 17 Patienten analysiert, die Proben der weiteren 5 Patienten wurden für Western Blot-Analysen benutzt. Die Auswertung der Daten erfolgte pseudonymisiert.

Als Kontrollgruppe wurden Gewebeproben aus drei tumorfreien Präparatespitzen von Exzidaten epithelialer Hauttumoren bei ansonsten gesunden Patienten herangezogen.

Alle histologischen Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme in Formalinlösung fixiert und anschließend im dermatohistopathologischen Labor der Hautklinik entwässert und paraffiniert. Jeder Paraffinblock wurde mit einer Pseudonymisierungsnummer beschriftet.

Die Paraffinblöckchen wurden dann auf -9°C abgekühlt, mittels Mikrotom (Microm HM 355 Microtome, MICROM International GmbH, Deutschland) in serielle Präparateschnitte von einer Dicke von $3\ \mu\text{m}$ zugeschnitten und anschließend für wenige Sekunden in ein Wasserbad von 42°C gegeben. Danach wurden die Schnitte auf einen mit dem Pseudonymisierungscode versehenen Objektträger aufgezogen und weiteren Färbungen unterzogen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Die vorliegenden Paraffinschnitte wurden in einem Objektträger-Schnelltrockner (TDO 66, MEDITE, U.S.A.) zweimal für jeweils fünfzehn Minuten bei 70°C getrocknet. Anschließend erfolgte in einen Färbeautomaten (Leica Autostainer XL ST5010, Leica Microsystems IR GmbH, Deutschland) die Entparaffinisierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe und die Hämatoxylin-Eosin-(H.-E.)-Färbung.

2.3 Mikroskopische Untersuchung und Auswahl der Schnitte für weitere Färbungen bei Gewebeproben aus läSIONALER HAUT

Die H.E.-gefärbten Schnitte wurden mit dem Mikroskop Olympus BH2 (Olympus, Japan) begutachtet. Von den 17 Gewebeproben aus läSIONALER HAUT wurden 10 Präparate, bei denen sowohl ein entzündliches Infiltrat in der Haarfollikelumgebung als auch zusätzlich ein tiefes dermales Infiltrat vorlagen, für weitere immunhistochemische Färbungen verwendet, um die Unterschiede zwischen früher perifollikulärer und später dermaler inflammatorischer Reaktion herausarbeiten zu können.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Vorbehandlung mit der „Heat-Induced Epitope Retrieval“-Methode (HIER-Methode)

Die immunhistologische Färbung beruht auf der Erkennung einer Antigenstruktur (Epitop) durch einen spezifischen Antikörper im Gewebe. Der Antikörper ist dabei an ein Detektionssystem gekoppelt, mit dessen Hilfe die Antigen-Antikörper-Reaktion farblich dargestellt werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

Eine Formalinfixierung kann durch Crosslinking von Proteinen zur Maskierung des Epitops führen und so eine Antigen-Antikörper-Reaktion behindern. Daher ist zunächst eine Vorbehandlung zur Demaskierung der Epitopstruktur erforderlich. Bei der „HIER“-Methode wird dies durch Erhitzen des entparaffinierten Schnitts auf über 100°C in einem Puffer (unten aufgeführte Puffer mit pH 6,0 bzw. pH 9,0) mit nachfolgend langsamer Abkühlungsphase erzielt.

2.4.2 Immunhistochemische Färbung mittels der „Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode“ (LSAB)

Bei der Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode wird ein mit Biotin konjugierter Zweitantikörper benutzt, welcher durch Erkennung des Fc-Anteils des Primärantikörpers eine Bindung an den Erstantikörper erlaubt und durch Bindung an den Streptavidin-Peroxidase-Komplex dessen Visualisierung gestattet. Die hierzu verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 detailliert aufgeführt.

Die entparaffinierten und vorbehandelten Schnitte werden zunächst mit dem Erstantikörper und nachfolgend mit dem biotinylierten Zweitantikörper inkubiert. Anschließend wird durch eine Peroxidase-blockierende Lösung (HP-Block) eine unspezifische Reaktion durch endogene Peroxidase-Aktivität verhindert. Danach wird das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (HRP) hinzugegeben. Im nächsten Schritt erfolgt durch die Zugabe des Chromogens 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) die Bildung eines farbigen Endprodukts. Durch Gegenfärbung mit H.E.-Lösung wird abschließend eine verstärkte Kontrastierung der spezifischen immunhistochemischen Färbung erzielt.

2.4.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Die folgenden Schritte wurden im Labor für Autoimmundiagnostik der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

In jeder der zehn untersuchten Gewebeproben aus läsionaler Haut konnte ein H.E.-gefärbter Schnitt mit entzündlichem Infiltrat sowohl in der Haarfollikelumgebung als auch in der tiefen Dermis gefunden werden. Die jeweils seriell nachfolgenden Schnittebenen wurden für die immunhistochemischen Färbungen verwendet.

Primärantikörper gegen folgende Epitope wurden eingesetzt: CD1a, CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, CD68, Mastzelltryptase, Faktor XIIa, PAN-Zytokeratin (AE1-AE3), IL-17, NLRP3, Caspase 1, S100A8, S100A9 und Zytokeratin 5 und 6 (CK5/6). Tabelle 4 listet für jeden der verwendeten Primärantikörper den zur Anwendung kommenden Klon, die Art der Vorbehandlung und die verwendete Verdünnung auf. Bei den gegen S100A8 und S100A9 gerichteten Antikörpern handelte es sich um monospezifische, affinitätsgereinigte Kaninchenseren, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. J. Roth, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Münster, zur Verfügung gestellt wurden.

Für die Markierung der neutrophilen Granulozyten wurde eine Chloracetatesterase-Färbung durchgeführt.

Tabelle 4: Für immunhistologische Färbung verwendete Primärantikörper

Antikörper	markierte Zellen	Vorbehandlung/ Dauer	Verdünnung	Hersteller	Klon / Spezie
CD1a	Langerhanszellen	Target Retrieval Solution pH 6 (S1699, Dako, Dänemark) / 20 min	gebrauchsfertig	Dako, Dänemark IS069	010 / Maus
CD3	Pan-T- Lymphozyten- Marker	Target Retrieval Solution pH 9 (S2367, Dako, Dänemark) / 20 min	1:20	Dako, Dänemark M7254	F7.2.38 / Maus

2. MATERIAL UND METHODEN

CD4	T-Helfer-Lymphozyten	Target Retrieval Solution pH 9 (S2367, Dako, Dänemark) / 20 min	gebrauchsfertig	Dako, Dänemark IS649	4B12 / Maus
CD8	zytotoxische T-Lymphozyten	Target Retrieval Solution pH 6 (S1699, Dako, Dänemark) / 20 min	1:100	Dako, Dänemark M7103	C8/144B / Maus
CD20	B-Lymphozyten	Target Retrieval Solution pH 6 (S1699, Dako, Dänemark) / 20 min	gebrauchsfertig	Dako, Dänemark IS604	L26 (1,4) / Maus
CD56	NK-Zellen	Target Retrieval Solution pH 9 (S2367, Dako, Dänemark) / 20 min	1:100	Dako, Dänemark M7304	123C3 / Maus
CD68	Makrophagen	Target Retrieval Solution pH 9 (S2367, Dako, Dänemark) / 20 min	gebrauchsfertig	Dako, Dänemark IS613	PG-M1 / Maus
Mastzelltr.	Mastzellen	Target Retrieval Solution pH 6 (S1699, Dako, Dänemark) / 20 min	1:100	Dako, Dänemark M7052	AA1 / Maus
AE1-AE3	Panzytokeratin	Target Retrieval Solution pH 6 (S1699, Dako, Dänemark) / 20 min	gebrauchsfertig	Dako, Dänemark IS053	AE1/AE3 / Maus
Faktor XIIIa	Dendritische Zellen	Target Retrieval Solution pH 9 (S2367, Dako, Dänemark) / 20 min	1:75	Novocastra, Deutschland	E980.1 / Maus

2. MATERIAL UND METHODEN

IL-17		Target Retrieval Solution pH 6 (S1699, Dako, Dänemark) / 20 min	1:200	R&D, U.S.A; AF-317-NA	Ile20-Ala 155 / Goat
NLRP3		Target Retrieval Solution pH6 (S1699, Dako, Dänemark) / 20 min	1:50	Abcam, U.K.; Ab17267	nalpy3-b / Maus
Caspase 1		PBS	1:200	Imgenex, U.S.A.	14F468 / Kaninchen
S100A8	Neutrophile, Monozyten/Makrophagen, aktivierte Keratinozyten	Ohne	1:500	siehe oben	siehen oben
S100A9	Neutrophile, Monozyten/Makrophagen, aktivierte Keratinozyten	Ohne	1:1000	siehen oben	siehen oben
Zytokeratin 5/6	Cytokeratin 5 und Cytokeratin 6	Target Retrieval Solution pH 9 (S2367, Dako, Dänemark) / 20 min	1:100	Dako, Dänemark; M7237	D5/16 B4 / Maus

Die ausgewählten Paraffinschnitte wurden auf SuperFrost®Plus-Objektträger (R. Langenbrinck, 25mm x 75mm x 1,0mm, Deutschland) aufgezogen und analog zu 2.2 getrocknet und entparaffiniert.

Danach wurden die Präparate mit den in Tabelle 4 dargestellten verschiedenen Pufferlösungen (pH 6: Target Retrieval Solution S1699; pH 9: Target Retrieval Solution S2367, Dako, Dänemark) vorbehandelt. Dabei wurden die Puffer

2. MATERIAL UND METHODEN

jeweils 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und in einem Dampfkochtopf (Multi Gourmet Dampfgarer, Fa. Braun, Deutschland) für 5 Minuten erhitzt. Nachfolgend wurden die Schnitte für 20 Minuten in der entsprechenden Pufferlösung gekocht und kühlten danach 15 Minuten bei Raumtemperatur ab.

Die manuelle immunhistochemische Färbung wurde mit dem Dako Real Detections System-Kit K5003 (Dako, Dänemark) durchgeführt. Nach der wie oben beschrieben durchgeführten Vorbehandlung wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gespült und für 10 Minuten in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gestellt. Im Folgenden wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 15 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde eine 25-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (K5003 oder P0449, Dako, Dänemark) bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einem 15-minütigen Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte mit Peroxidase-Blocking-Lösung (S2023, Dako, Dänemark) für 8 Minuten bei Raumtemperatur blockiert und daraufhin erneut für 15 Minuten mit PBS gewaschen. Eine Inkubation mit der Streptavidin-HRP-Lösung wurde für 25 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem nächsten 15-minütigen PBS-Waschgang wurden die Schnitte mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol/AEC-Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Waschen mit Aqua dest. wurden die Schnitte mit Hämalaun-Lösung (S3301, Dako Dänemark) für 1 Minute bei Raumtemperatur behandelt; dann erneutes Waschen in Aqua dest.. Zuletzt wurden die Schnitte mit Aquatex (Merck, Deutschland) und Deckgläschen (R. Langenbrinck, Deutschland) eingedeckt.

Nach Etablierung der Methode wurden ein Teil der nachfolgenden immunhistochemischen Färbungen im Dako-Färbeautomat (Dako Autostainer Plus, Dako, Dänemark) durchgeführt. Nach der Vorbehandlung und den Waschsritten, wie für die manuelle immunhistochemische Färbung dargestellt, wurden die Schnitte in den Färbeautomat eingebracht, in dem die weiteren Schritte automatisiert entsprechend des oben aufgeführten Protokolls

2. MATERIAL UND METHODEN

abliefern. Nach erfolgter automatischer Färbung wurden die Schnitte wieder entnommen, in Aqua dest. gestellt und mit Aquatex und Deckgläschen eingedeckt.

Abweichend von obigem Protokoll wurde bei der Färbung für IL-17, NLRP3 und Caspase-1 der Erstantikörper über Nacht inkubiert, um die notwendige Bindung an das Zielepitop zu erreichen; die weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Da die immunhistochemischen Untersuchungen mit IL-17, NLRP3, Caspase-1 S100A8, S100A9 und CK5/6 auf Unterschiede zwischen läsionaler und nicht-läsionaler Epidermis ausgerichtet waren, wurden sie an histologischen Schnitten durchgeführt, für die das Kriterium eines vorhandenen perifollikulären und tieferen Entzündungsinfiltrats nicht zwingend notwendig war. Stattdessen wurden für diese Untersuchungen 14 Gewebeproben von 7 betroffenen Patienten aus jeweils läsionalen und periläsionalen Hautarealen der Axillär- und Inguinalregion ausgewählt.

2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die aktuelle Literatur zur AI geht davon aus, dass der Entzündungsprozess im Haarfollikel beginnt. Hierauf stützt sich die Hypothese dieser Arbeit, die von einer frühen Phase der Entzündung in Form einer Perifollikulitis und einer späten Phase der Entzündung in Form eines tiefen dermalen Infiltrates ausgeht. Um einen Unterschied zwischen diesen beiden Phasen erfassen zu können, wurden vergleichende Auszählungen der Entzündungsinfiltrate in den Bereichen "perifollikuläres Infiltrat" versus "tiefes dermales Infiltrat" durchgeführt.

Hierfür wurden in jedem Präparat drei repräsentative Areale ausgewählt und unter dem Lichtmikroskop (Olympus BH2, Olympus, Japan) bei 400-facher Vergrößerung (Okular 10-fach, Objektiv 40-fach) ausgewertet. Die positiven

2. MATERIAL UND METHODEN

Zellen wurden in einem quadratischen Raster quantitativ ausgezählt. Die Zellen am Rand des Rasters wurden als positive Zellen mitberücksichtigt. Die Anzahl der Zellen wurde über die jeweils drei ausgewerteten Bereiche gemittelt, um Abweichungen in der Auszählung zu minimieren.

2.6 Immunfluoreszenz

Die Paraffinschnitte für die Immunfluoreszenz wurden wie oben beschrieben prozessiert. Nach der Entparaffinierung und Vorbehandlung wurden die Primärantikörper Anti-IL-17 (AF-317-NA; R&D, U.S.A), Anti-CD4 (SC59034, Klon BC1/F6; Santa Cruz, U.S.A.) und Anti-Myeloperoxidase (MPO, A0398; Dako, Dänemark) bei 4°C über Nacht inkubiert. Doppelfärbungen wurden entweder mit der Kombination Anti-IL-17 + Anti-CD4 oder Anti-IL-17 + Anti-MPO durchgeführt. Bei Doppelfärbungen wurden beide Erstantikörper gemeinsam inkubiert. Danach wurden die Präparate für 15 Minuten in PBS gewaschen und mit den entsprechenden Zweitantikörpern behandelt: Alexa Fluor 488 Anti-Goat (für IL-17 Färbung: A21467, Life technologies, U.S.A.), Alexa Fluor 568 Anti-Rabbit (für MPO Färbung: ab175471, Abcam, U.K.) und Alexa Fluor 568 Anti-Mouse (für CD4 Färbung: ab175473, Abcam, U.K.). Eine 45-minütige Inkubation mit dem ersten Sekundärantikörper wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einem 15-minütigen Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit dem zweiten Sekundärantikörper für 45 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präparate wurden mit Glycerin-Lösung (jeweils 1:5 Aqua destillata) und Gläschen eingedeckt. Die Positivität wurde unter dem Immunfluoreszenzmikroskop Nikon-Ti bewertet.

2.7 Western Blot

Die in den Experimenten benutzen Materialien und Geräte sind in den Tabellen 5-7 im Detail aufgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 5: Für die Western-Blot-Untersuchungen verwendete Materialien

Materialien	Referenznummer	Hersteller
Donkey anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Sekundärantikörper	6440-05	Southern Biotech, U.S.A.
Goat anti-Mouse IgG1-HRP Sekundärantikörper	1070-05	Southern Biotech, U.S.A.
SeeBlue® Plus2 Prestained Standard	LC5925	Invitrogen, U.S.A.
Benzonase	1.01654.0001	Merck KgaA, Deutschland
Complete Protease Inhibitor (Cocktail Tablets)	11697498001	Roche, Deutschland
NuPAGE® Antioxidant	NP0005	Life Technologies, U.S.A.
NuPAGE® Transfer-Puffer (20x)	NP0006-1	Life Technologies, U.S.A.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (10x)	14200-067	gibco® by Life Technologies Corporation, Schottland
Tween®20	8.22184.0500	Merck KgaA, Deutschland
MES-Hydrate	M8250	Sigma-Aldrich, U.S.A.
TRIS Base	0188.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
SDS Ultra Pure	2326.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	ED4SS	Sigma-Aldrich, U.S.A.

2. MATERIAL UND METHODEN

Methanol	32213	Sigma-Aldrich, U.S.A.
NaCl	31434	Sigma-Aldrich, U.S.A.
Glycerin	1.04092.1000	Merck KgaA, Deutschland
Triton X-100	T-9284	Sigma-Aldrich, U.S.A.
Bromphenolblau	B8026	Sigma-Aldrich, U.S.A.
β-Mercaptoethanol	M-3148	Sigma-Aldrich, U.S.A.
ECL	32209	Thermo Scientific, U.S.A.

Tabelle 6: Puffer

Puffer	Substanzen
DISC-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - 30mL 1M TRIS Base pH7,4; - 60mL 2M NaCl; - 100mL Glycerin; - 10mL Triton X-100; - 800mL Aqua destillate
DISC-Complete-Benzonase-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - DISC-Puffer 12,5mL - Benzonase 1:100 - Complete 1 Tablette
4x-Lämmli-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - 5mL 20% SDS-Lösung - 5mL Glycerin - 5mL β-Mercaptoethanol - 3mL 1M TRIS pH 6,8 - 1 Spatelspitze Bromphenolblau - 32mL Aqua dest.
NuPAGE®MES-SDS-Runnings-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - 50mM MES - 50mM Tris Base - 0,1% SDS - 1mM EDTA - pH 7,3

2. MATERIAL UND METHODEN

Transfer-Puffer 10%	<ul style="list-style-type: none"> - 50mL NuPAGE® Transfer Puffer (20x) - 1mL NuPAGE® Antioxidant - 100mL Methanol - 849mL Aqua dest.
Transfer-Puffer 20%	<ul style="list-style-type: none"> - 50mL NuPAGE® Transfer Puffer (20x) - 1mL NuPAGE® Antioxidant - 200mL Methanol - 749mL Aqua dest.
PBS-0,05%Tween®	<ul style="list-style-type: none"> - 100mL PBS (10x) - 900mL Aqua dest. - 0,5mL Tween®20

Tabelle 7: Geräte

Gerät	Firma
Mixer 5432	Eppendorf-Nethel-Hinz GmbH, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf-Nethel-Hinz GmbH, Deutschland
Biofuge Fresco Zentrifuge	Heraeus, Deutschland
Heidolph Polymax 1040 Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
BioRad PowerPAC 300 Stromgeber	BioRad, U.S.A.
Protec OPTIMAX Röntgenfilm-Entwicklungsgerät Modell: 1170-1-0000	Protec Medizintechnik GmbH & Co. KG, Deutschland

2. MATERIAL UND METHODEN

2.7.1 Proteinextraktion aus der Epidermis

Die Hautproben wurden unmittelbar nach der operativen Entnahme kryokonserviert (-80°C). Zur Abtrennung der Epidermis von der Dermis wurde das Kryomaterial für 1 Stunde in 1 M NaCl-Lösung gerührt und danach für 12 Stunden in dieser Lösung inkubiert, was zu einer artifiziellen Spaltbildung in Höhe der Basalmembran führt. Nach dieser Vorbehandlung konnte die Epidermis mechanisch von den tieferliegenden Gewebsschichten abgezogen und mit einem Skalpell zerkleinert werden. Zur Zellyse wurde die abgezogene und zerkleinerte Epidermis mit 75 µL DISC-Complete-Benzonase-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 6) für 80 min bei 4°C im Schüttelinkubator inkubiert. Im Anschluss an die Lysepufferbehandlung wurden die Proben für 15 Minuten gekühlt zentrifugiert (4°C; 13.000 UPM). 73 µL des Überstands der Proben wurden entnommen und in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach einer zweiten Zentrifugation (15 Min; 4°C; 13.000 UPM) wurden 71 µL der Probe in ein neues Eppendorf-Röhrchen übertragen; das Zellpellet am Boden des Röhrchens wurde verworfen.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford und wurde mit 1 µL Probe + 99 µL Aqua dest. + 900 µL Bradford-Puffer durchgeführt.

Die Proben wurden in 4x-Lämmli-Puffer (1:1) aufgenommen, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, anschließend für weitere 15 Minuten gekühlt zentrifugiert und dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.7.2 Elektrophoretische Auftrennung und Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose

Die Auftrennung und der Elektrotransfer der Proteine erfolgte mit dem XCell SureLock™ Elektrophoresis Cell (Novex® Mini-Cell, Invitrogen, U.S.A.) System unter Verwendung von NuPAGE® Bis-Tris Gelen (Novex®, Invitrogen, U.S.A.). Das Elektrophorese-System wurde mit NuPAGE® MES-SDS-Runningpuffer (Novex®, Invitrogen, U.S.A.) und 500 µL NuPAGE® Antioxidant (Novex®,

2. MATERIAL UND METHODEN

Invitrogen, U.S.A.) gefüllt, um die aufgebrauchten Proteine während der Elektrophorese in reduziertem Zustand zu halten. Die Gelkammern wurden gespült und mit 15 µg Protein der Probenlösung beladen. Als Längenstandard wurden 4 µL SeeBlue® Plus2 Prestained Standard zur Identifizierung der aufgetrennten Proteinbanden benutzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 5 Minuten bei 100 Volt und danach für 60 Minuten bei 160 Volt.

Zum Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Gele in das Xcell II™ Blot Module (Blottingkammer, Novex®, Invitrogen, U.S.A.) eingebracht. Dieses ist folgendermaßen aufgebaut: Kathode – Schwamm – Whatman-Papier – Trenngel – Nitrozellulosemembran – Whatman-Papier – Schwamm – Anode. Das System wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und die Proteine anschließend durch Anlegen einer Spannung von 30 Volt über 60 Minuten bei Raumtemperatur auf die Nitrozellulose-Membrane (Protran BA85; 10.401196; GE Healthcare, Life Sciences, Deutschland) überführt ("Blotting"). Nach dem Blotting wurden die Membranen mit 8% Magermilch in PBS-0,05%Tween® für 1 Stunde blockiert, um unspezifische Bindungen der anschließend aufzubringenden Antikörper an die Membranen zu verhindern und danach 3 Mal für 15 Minuten in PBS-0,05%Tween® gewaschen. Die Inkubation mit den Primärantikörpern Anti-Caspase 1 – p10 (sc-515; Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.), S100A8-Antiserum, S100A9-Antiserum und Anti-α-Tubulin (Klon DM1A; Kat.Num. #05-829; Millipore, U.S.A.) erfolgte bei 4°C über Nacht. Die Membranen wurden wieder 3 Mal für 15 Minuten in PBS-0,05%Tween® gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (Anti-Mouse für α-Tubulin und Anti-Rabbit für Caspase-1, S100A8 und S100A9) bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-0,05%Tween® wurden die Membranen auf ECL-Substrat inkubiert. Danach erfolgte die Exposition auf Röntgenfilmen in der Dunkelkammer, die anschließend unter Verwendung einer Filmentwicklungsmaschine entwickelt wurden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.8 Statistik

Das Statistikprogramm IBM *Statistical Package for Social Sciences* (IBM SPSS; Version 21) wurde für die Auswertung der Daten verwendet.

Für die Auswertung der perifollikulären versus tiefen Infiltrate wurde der für verbundene Stichproben geeignete Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test eingesetzt.

Zum Vergleich zur normalen gesunden Haut wurde der Mann-Whitney-U-Test für die Analyse unabhängiger Stichproben benutzt.

Für jeden einzelnen immunhistologischen Marker wurde der Mittelwert der Auszählung als Parameter für die Analyse verwendet.

Befunde mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant bewertet.

3. ERGEBNISSE

Die Beteiligung der Epidermis an der inflammatorischen Pathogenese der Acne inversa wurde in dieser Promotionsarbeit überprüft. Die Regulation und Expression von S100A8, S100A9 und Caspase-1 bzw. IL-1 β wurde in entzündlich veränderter AI-Haut im Vergleich zu nicht betroffener Haut charakterisiert. Darüber hinaus wurde die Zusammensetzung der Entzündungsinfiltrate der angenommenen frühen Phase im Bereich den Haarfollikel und der angenommenen späten Phase im tiefen Infiltrat der Dermis miteinander verglichen.

3.1 Auswahl des Patientenkollektivs

HE-Färbungen wurden an Gewebeproben von 22 AI-Patienten durchgeführt; von diesen erfüllten 10 Fälle die Auswahlkriterien (s. Material und Methode) für die weitere Analyse der Infiltrate mit immunhistologischen Färbungen. Periläsionale und läsionale Proben von weiteren 7 Patienten wurden für die immunhistochemischen Färbungen gegen IL-17, NLRP3, Caspase 1, S100A8, S100A9 und CK5/6 ausgewählt. Gewebeproben von weiteren 5 AI-Patienten wurden zunächst kryoasserviert (-80°C) und später für die Western Blot-Analyse benutzt. Alle Patienten wurden im Zeitraum von Oktober 2013 bis März 2014 in der Universitäts-Hautklinik Würzburg operiert. Die Patientendaten wurden während der histologischen Analyse pseudonymisiert und erst nach Erhalt der histologischen Ergebnisse zur Auswertung der epidemiologischen Daten freigegeben.

3.2 Patientenbezogene Daten

Die patientenbezogenen Daten wurden von den oben genannten 22 AI-Patienten analysiert. Dabei handelte es sich um Proben von 12 Frauen (55%) und 10 Männern (45%).

3. ERGEBNISSE

Das Alter bei Erstdiagnose und zum Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens der Erkrankung war in den meisten Fällen nicht eindeutig bekannt. Stattdessen wurde das Alter zum Zeitpunkt der Entnahme der Gewebeprobe (Operationsdatum) herangezogen. Das mittlere Alter der Gesamtpopulation lag bei 38,2 Jahre (min.: 19 Jahre; max.: 60 Jahre).

Der Großteil der Patienten wurden in der axillären Region (13 Patienten; 59%) operiert. Bei den übrigen Patienten wurden entweder genitale (18%), inguinale (18%) oder gluteale (5%) Areale exzidiert.

Die Schwere der AI wurde nach Hurley I bis III graduiert. Neun (41%) Patienten befanden sich im Stadium Hurley II, 13 (59%) Patienten im Stadium Hurley III.

Bei den analysierten Patienten fiel eine hohe Anzahl von Rauchern auf. Bei 16 Patienten (73%) lag aktiver Nikotinkonsum vor. Ebenso zeigte eine hohe Prävalenz für Adipositas. 10 Patienten (45%) litten unter Adipositas und weitere 5 Patienten (23%) wurden als übergewichtig klassifiziert.

Bei 4 Patienten (18%; 3 Frauen, 1 Mann) war in der Vorgeschichte die Diagnose eines Sinus pilonidalis gestellt worden. Bei einem Patienten fand sich ein Morbus Crohn. Drei Patienten (14%) hatten eine positive Familienanamnese bezüglich AI.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 8: Patientenbezogene Daten

Patient	Geschlecht	Alter	Hurley-Stadium	Adipositas	BMI	Nikotinkonsum	OP-Stelle	Familienanamnese	Nebendiagnosen	durchgeführte Analyse
P1	W	27	3	Ja	33,8	Ja	axillär	positiv		Immunhistologie
P2	M	38	2	Ja	30,3	Nein	axillär			Immunhistologie
P3	M	25	3	Nein		Ja	gluteal			Immunhistologie
P4	M	19	3	Ja	31,8	Nein	genital			Immunhistologie
P5	W	42	2	Übergewicht	27,1	Nein	axillär		Sinus pilonidalis	Immunhistologie
P6	W	24	2	Nein		Ja	genital			Immunhistologie
P7	M	37	2	Ja	43,5	Ja	genital			Immunhistologie
P8	M	45	3	Ja	40,1	Nein	axillär			Immunhistologie
P9	W	26	3	Nein		Ja	axillär			Immunhistologie
P10	W	38	3	Ja	36,1	Ja	axillär		Sinus pilonidalis	Immunhistologie
P11	M	36	3	Übergewicht	26,9	Ja	axillär			Immunhistologie
P12	W	54	2	Nein		Ja	inguinal			Immunhistologie
P13	W	33	2	Ja	38,9	Ja	axillär			Immunhistologie
P14	M	35	3	Nein		Ja	axillär			Immunhistologie
P15	M	60	3	Übergewicht	28,9	Nein	axillär		M. Crohn	Immunhistologie
P16	M	26	2	Übergewicht	27,3	Ja	axillär		Sinus pilonidalis	Immunhistologie
P17	M	36	2	Ja	31,9	Nein	genital	positiv		Immunhistologie
P18	W	45	3	Ja	36,0	Ja	inguinal			Western Blot
P19	W	50	2	Nein		Ja	inguinal			Western Blot
P20	W	49	3	Übergewicht	29,4	Ja	inguinal			Western Blot
P21	W	47	3	Ja	33,9	Ja	axillär			Western Blot
P22	W	49	3	Nein		Ja	axillär	positiv	Sinus pilonidalis	Western Blot

3. ERGEBNISSE

3.3 IL-17-positive Zellen sind in der periläsionalen und läsionalen AI-Haut nachweisbar

IL-17 induziert die Aktivierung proinflammatorischer und hämatopoetischer Zytokine sowie die Produktion antimikrobieller Substanzen [35]. Schlapbach et al. haben mittels immunhistochemischer Färbung eine erhöhte Anzahl von IL-17⁺-Zellen in der läsionalen AI-Haut nachgewiesen [31]. Van der Zee et al. beschrieben eine psoriasiforme Hyperplasie und folliculäre Keratinpfropfe in der periläsionalen AI-Haut [24]. Von diesen Befunden ausgehend nahmen wir an, dass epidermale Alterationen schon in der periläsionalen AI-Haut bestehen, beziehungsweise dass sich proinflammatorische Ereignisse in diesem Bereich abspielen. Um die Rolle von IL-17 in der periläsionalen AI-Haut zu untersuchen, wurden immunhistologische Färbungen gegen IL-17 durchgeführt.

Die Immunhistologie gegen IL-17 zeigte eine Positivität für IL-17⁺-Zellen in der periläsionalen und in der läsionalen AI-Haut. Mittels quantitativer Auszählung konnte eine signifikante Vermehrung dieser Zellen im Vergleich zur gesunden Haut in beiden Bereichen aufgezeigt werden. Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen periläsionaler und läsionaler AI-Haut.

3. ERGEBNISSE

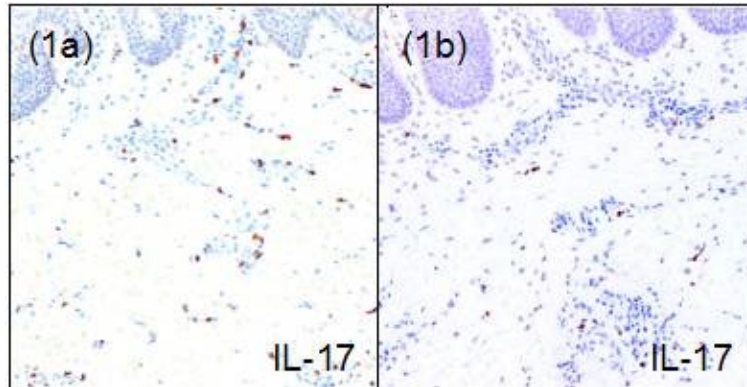


Abbildung 1: Immunhistologische Färbungen zeigen IL-17⁺-Zellen in periläsionaler und läsionaler AI-Haut. (1a) periläsionale Haut; (1b) läsionale Haut; (1a, 1b) 100x-Vergrößerung; (1a, 1b) Immunhistologische Färbung mit polyklonalem Antikörper gegen IL-17.

3.4 NLRP3 ist in periläsionaler und in läsionaler Epidermis von AI-Patienten aufreguliert und das Inflammasom ist in läsionaler AI-Haut aktiviert.

Cho et al. haben nachgewiesen, dass eine Stimulation mit IL-17 in Keratinozyten zur Aktivierung des NLRP3-Caspase1-Inflammasoms führt, was zur Freisetzung von IL-1 β erlaubt [34]. Bei verschiedenen entzündlichen und allergischen Hauterkrankungen ist die Aktivität von IL-1 β bekannt [30]. Van der Zee hat in einer Studie eine vermehrte Expression von IL-1 β in läsionaler Haut von AI-Patienten gezeigt, ohne dass die zelluläre Herkunft dieses Zytokins untersucht wurde [36]. Um eine mögliche Aktivität von IL-17 in der AI-Epidermis zu untersuchen, wurden immunhistologische Färbungen mit anti-NLRP3- und anti-Caspase-1-Antikörpern sowie Western Blots zum Nachweis aktivierter Caspase-1 durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.4.1 Immunhistologische Färbung gegen NLRP3

Obwohl NLRP3 in gesunder Epidermis exprimiert wird, zeigte sich in der periläsionalen und läsionalen Epidermis bei AI eine stärkere Expression von NLRP3 im Vergleich zur gesunden Haut.

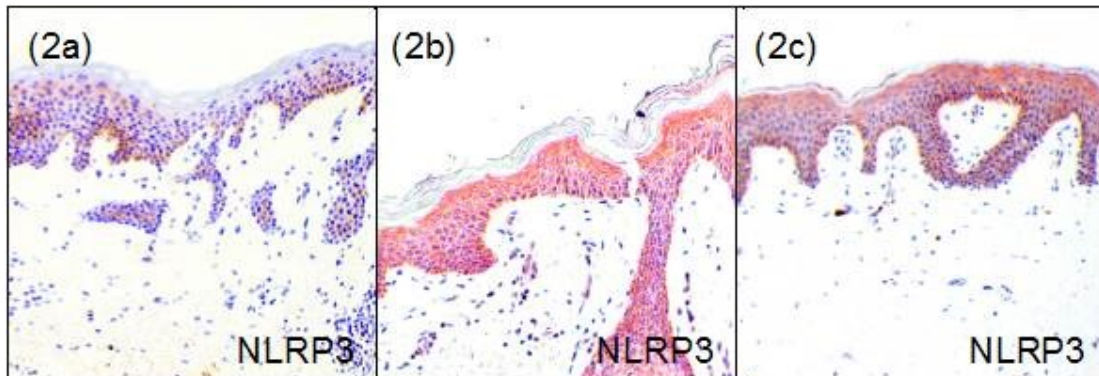


Abbildung 2: Der Vergleich zwischen periläsionaler und läsionaler AI-Haut und gesunder Haut zeigt eine erhöhte Expression von NLRP3 in AI-Epidermis. (2a) gesunde Haut; (2b) periläsionale AI-Haut; (2c) läsionale AI-Haut; (2a, 2b, 2c) 100-fache Vergrößerung; (2a, 2b, 2c) Immunhistologische Färbung mit Antikörper gegen NLRP3.

3.4.2 Immunhistologische Färbung gegen Caspase-1

Ähnlich der NLRP3-Färbung stellte sich auch die Expression von Caspase-1 größtenteils in der Epidermis dar. Da der benutzte Antikörper die aktive Caspase-1 ebenso wie die inaktive Form Pro-Caspase-1 erkennt, wurde die Expression der aktiven Form der Caspase-1 anschließend mittels Western Blot analysiert. Die immunhistologische Färbung zeigte eine stärkere Positivität des Markers in der läsionalen Haut.

3. ERGEBNISSE

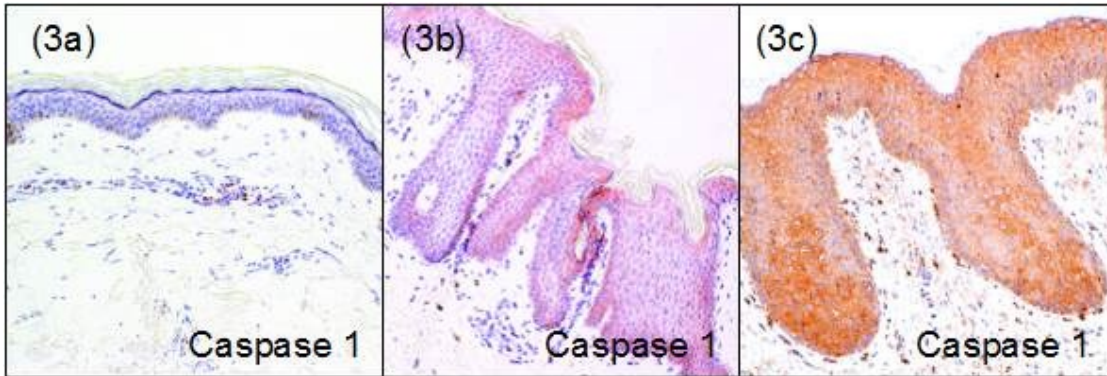


Abbildung 3: In der läSIONalen Epidermis zeigt sich eine verstärkte Expression von Caspase-1. (3a) gesunde Haut; (3b) periläsionale Haut; (3c) läSIONale Haut; (3a, 3b, 3c) 100-fache Vergrößerung; (3a, 3b, 3c) Immunhistologische Färbung mittels anti-Caspase 1-Antikörper.

3.4.3 Western Blot-Analyse zur Expression der aktiven Caspase-1

Aufgrund der immunhistologisch schwierigen quantitativen Auswertung und der fehlenden Spezifität des immunhistologischen Antikörpers für die aktivierte Form der Caspase-1 wurden die Expression und Aktivierung des Proteins mittels Western Blot analysiert und läSIONale mit periläsionaler Epidermis verglichen. Die Western Blot-Untersuchungen wurden durchgeführt, um die epidermale Expression von aktiver Caspase-1 (Caspase-1 p10) in der periläsionalen und läSIONalen Epidermis von AI-Patienten zu untersuchen. Fünf AI-Fälle wurden analysiert. Die Ergebnisse bestätigten die immunhistologischen Analysen und zeigten eine verstärkte Expression aktiver Caspase-1 in läSIONaler Epidermis.

3. ERGEBNISSE

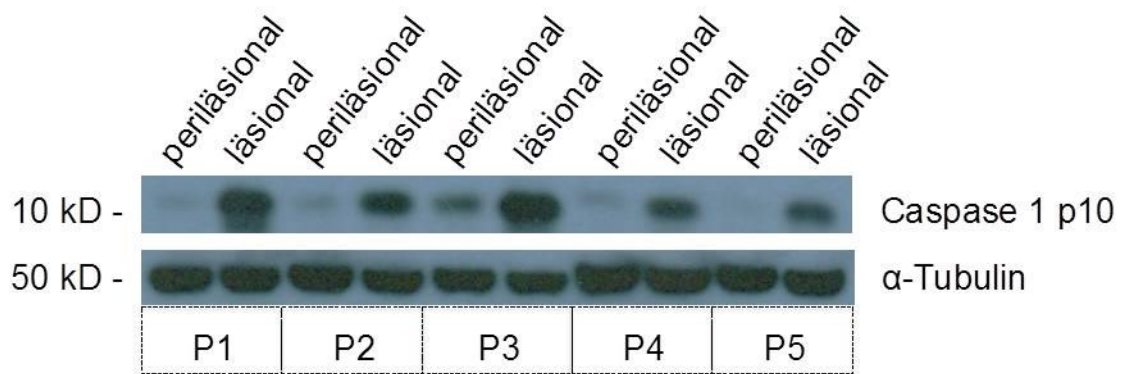


Abbildung 4: Vermehrte Expression aktiver Caspase 1 in läsionaler Epidermis von AI-Patienten. Western Blot-Untersuchungen wurden mit Zelllysaten von läsionaler und perilesionaler Epidermis fünf verschiedener AI-Patienten (P1, P2, P3, P4 und P5) durchgeführt. Nach dem Blotten wurde die Membran mit anti-Caspase-1-p10-Antikörper inkubiert. α-Tubulin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung verwendet.

3.5 S100A8/S100A9-Proteine liegen in der läsionalen Epidermis von AI-Patienten aufreguliert vor

Ebenso wie für das NLRP3-Inflammasom haben Cho et al. nachgewiesen, dass eine Stimulation mit IL-17 zur Produktion von S100A8 und S100A9 in Keratinozyten führt [34]. S100A8 und S100A9 induzieren die Expression verschiedener Chemokine, die Produktion proentzündlicher Zytokine und eine Hyperproliferation der Keratinozyten [45]. Diese Moleküle wurden von Wieland et al. im Serum von AI-Patienten in erhöhter Konzentration nachgewiesen, wobei die Quelle der Proteine nicht identifiziert wurde [40]. Im Rahmen dieser Dissertation wurden immunhistologische Färbungen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt, um zu überprüfen, ob bei der AI Keratinozyten als Quelle dieser Proteine in Frage kommen und somit die Epidermis möglicherweise an der inflammatorischen Pathogenese der AI beteiligt ist.

3. ERGEBNISSE

3.5.1 Immunhistologische Analyse von S100A8 und S100A9

In der läSIONalen Epidermis zeigte sich eine ausgeprägte Expression von S100A8 und S100A9, während sich die periläsionale Epidermis deutlich schwächer anfärbte.

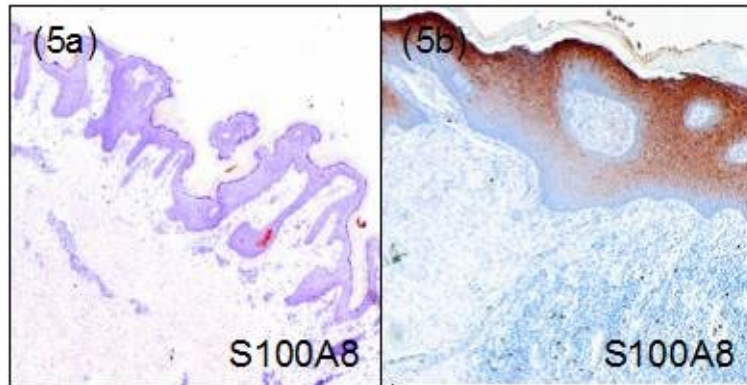


Abbildung 5: Im Vergleich zwischen periläsionaler und läSIONaler AI-Haut stellt sich eine höhere Expression von S100A8 in den läSIONalen Keratinozyten dar. (5a) periläsionale Haut; (5b) läSIONale Haut; (5a, 5b) 100-fache Vergrößerung; Immunhistologische Färbung mit monospezifischen affinitätsgereinigten Kaninchensera gegen S100A8.

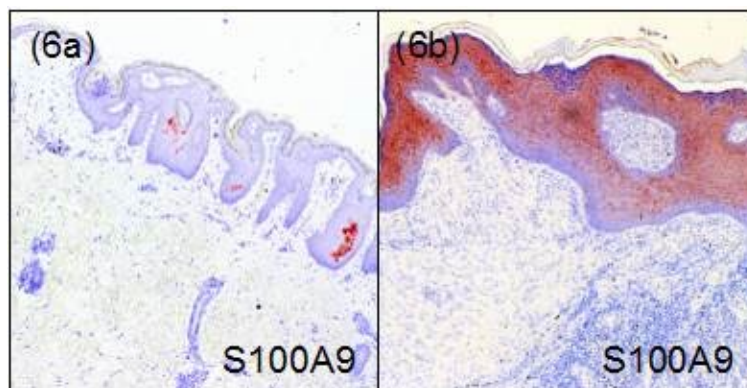


Abbildung 6: Im Vergleich zu periläsionaler AI-Haut zeigt die läSIONale AI-Haut eine höhere Expression für S100A9 in Keratinozyten. (6a) periläsionale Haut; (6b) läSIONale Haut; (6a, 6b) 100-fache Vergrößerung; Immunhistologische Färbung mit monospezifischen affinitätsgereinigten Kaninchensera gegen S100A9.

3. ERGEBNISSE

3.5.2 Western Blot-Analyse

Da eine Quantifizierung der epidermalen Expression von S100A8/A9 immunhistologisch schlecht möglich ist, erfolgte eine Untersuchung epidermaler Proben von fünf Patienten mittels Western Blot. Die Western Blot-Untersuchungen für S100A8- und S100A9-Proteine wurden von läsionaler und periläsionaler epidermaler Haut nach Abtrennen des

dermalen Gewebes durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigten die Befunde der immunhistologischen Färbung. Der intraindividuelle Vergleich von läsionaler zu periläsionaler Epidermis konnte eine Aufregulation dieser Proteine in der läsionalen Haut nachweisen.

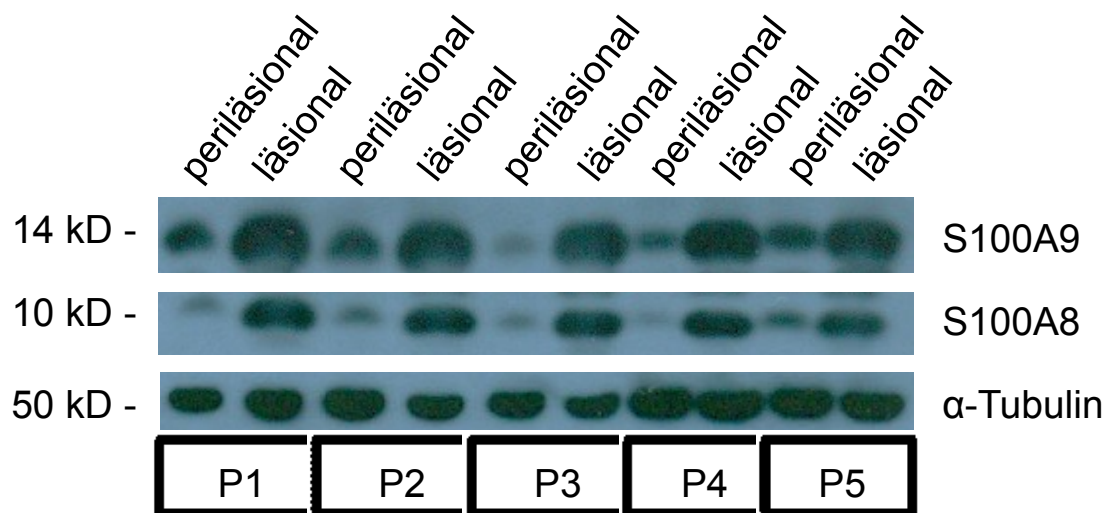


Abbildung 7: Verstärkte Expression von S100A8 und S100A9 in läsionaler Epidermis. Der Western Blot wurde mit Zelllysaten von läsionaler und perilesionaler Epidermis fünf verschiedener AI-Patienten (P1, P2, P3, P4 und P5) durchgeführt. Nach dem Blotten wurden die Membranen mit monospezifischen affinitätsgereinigten Kaninchenseren gegen S100A8 und S100A9 inkubiert. α-Tubulin diente als interne Kontrolle zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Beladung.

3. ERGEBNISSE

3.6 Die Hyperplasie der Epidermis ist bereits in periläsionaler AI-Haut nachweisbar und zeigt sich ausgeprägter in läsionaler AI-Haut.

Van der Zee et al. beschrieben psoriasiforme Hyperplasie und folliculäre Keratinpfropfe in der periläsionalen AI-Haut [24]. CK6 ist ein suprabasales Zytokeratin, das konstitutiv in geschichteten Epithelien exprimiert ist, wie z.B. in oraler und vaginaler Schleimhaut und im Ösophagus [60]. Zudem zeigt sich CK6 in der hyperproliferativen Epidermis aufreguliert, so z.B. bei der Psoriasis, der Wundheilung und in Hauttumoren [60]. Da die Expression der S100A8/A9-Proteine mit einer Hyperproliferation der Epidermis einhergehen kann, erfolgten immunhistochemische Färbungen mit anti-CK5/6. Die Expression von Zytokeratin 6 weist auf eine Hyperproliferation der Epidermis hin. In der Immunhistochemie zeigte sich eine starke Expression von CK5/6 sowohl in der periläsionalen als auch in der läsionalen Epidermis von AI-Patienten.

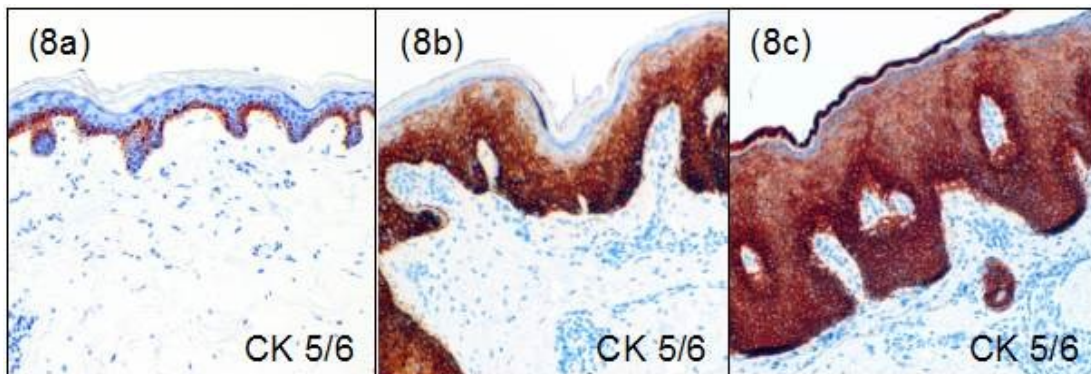


Abbildung 8: Hyperproliferation der Epidermis ist in periläsionaler und läsionaler AI-Haut nachweisbar. (8a) gesunde Haut; (8b) periläsionale AI-Haut; (8c) läsionale AI-Haut; (8a, 8b, 8c) 100-fache Vergrößerung; Immunhistologische Färbung mit Antikörper gegen CK5/6.

3. ERGEBNISSE

3.7 Die Zusammensetzung des entzündlichen Infiltrats früher und später Phasen der Erkrankung zeigte signifikante Unterschiede

Bei der Pathogenese der Acne inversa wird eine zu Grunde liegende Dynamik angenommen, die mit einer Entzündungsreaktion in der Nähe eines Haarfollikels als Perifollikulitis beginnt (frühe Phase) und sich dann in das tiefere Gewebe ausbreitet (spätere Phase). Die Daten des ersten Teils der vorliegenden Arbeit zeigen eine erhöhte Expression proinflammatorischer Moleküle in der Epidermis von AI Patienten. Diese Moleküle stimulieren unter anderem die Chemotaxis verschiedener Zelllinien, insbesondere von neutrophilen Granulozyten. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung der Entzündungsinfiltrate der angenommenen frühen Phase im Bereich des Follikels und der angenommenen späten Phase im tiefen Infiltrat miteinander verglichen, um eventuelle Unterschiede herauszuarbeiten, die diese Dynamik in der Entwicklung des Krankheitsgeschehens verdeutlichen.

Die in den jeweiligen immunhistologischen Färbungen für CD1a, CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, CD68, FXIIIa und für Mastzelltryptase positiven Zellen und die in der Chrolacetat-Färbung nachgewiesenen neutrophilen Granulozyten wurden in perifollikulären und tiefen Infiltraten an jeweils drei repräsentativen Stellen mit Hilfe eines quadratischen Rasters bei 400-facher Vergrößerung quantifiziert.

Die folgende Tabelle (Tab. 9) führt die Mittelwerte der Auszählungen der Zellzahlen inklusive Minimal- und Maximalwerten sowie den Standardfehler der Auszählungen auf.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 9: Quantitative Auszählung der immunhistologisch positiven Zellen pro Gesichtsfeld in perifollikulären und tieferen Infiltraten bei 10 AI-Patienten

Zelltyp	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardfehler
Langerhans-Zellen (CD1a)				
- perifollikulär	0	40	4,2	4,5
- tief	0	10	2,4	1,7
T-Lymphozyten (CD3)				
- perifollikulär	5	123	34,1	19,6
- tief	53	653	299	125,4
T-Helferzellen (CD4)				
- perifollikulär	9	91	38,4	20,9
- tief	131	382	252,3	47
Zytotoxische T-Lymphozyten (CD8)				
- perifollikulär	3	36	11,7	8,3
- tief	14	176	77,5	46
B-Lymphozyten (CD20)				
- perifollikulär	0	21	5,5	6,2
- tief	213	701	371,1	90,2
Natural-Killer-Zellen (CD56)				
- perifollikulär	0	8	1,4	1,8
- tief	0	10	2,2	2,9
Makrophagen (CD68)				
- perifollikulär	9	89	33,6	18,1
- tief	60	321	145,8	43,2

3. ERGEBNISSE

Mastzellen (Mastzelltryptase)				
- perifollikulär	1	57	26,2	10,3
- tief	6	33	11,9	5,9
Dendritische Zellen (Faktor XIIIa)				
- perifollikulär	0	20	9,1	6,0
- tief	1	50	12,1	7,3
Neutrophile Granulozyten (Chloracetatesterase Färbung)				
- perifollikulär	0	4	0,5	0,7
- tief	172	747	384,1	165,1

Als Kontrollen wurden drei Proben gesunder Haut von Patienten mit benignen Hauttumoren herangezogen. Das untersuchte Gewebe stammte aus den Präparatespitzen der Tumorexzisionen (Ausgleichsdreiecke aus gesunder Haut), die Auswertung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Aufgrund der Abwesenheit eines tieferen Infiltrates in diesen Hautpräparaten wurden die Auszählungen nur in der Nähe eines Haarfollikels durchgeführt (Tab. 10).

Tabelle 10: Quantitative Auszählung der immunhistologisch positiven Zellen in der gesunden Haut

Zelltyp	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardfehler
Langerhans-Zellen (CD1a)				
	0	16	6,9	3,5
T-Lymphozyten (CD3)				
	5	15	8,7	3,8
T-Helferzellen (CD4)				
	0	4	2,2	0,7

3. ERGEBNISSE

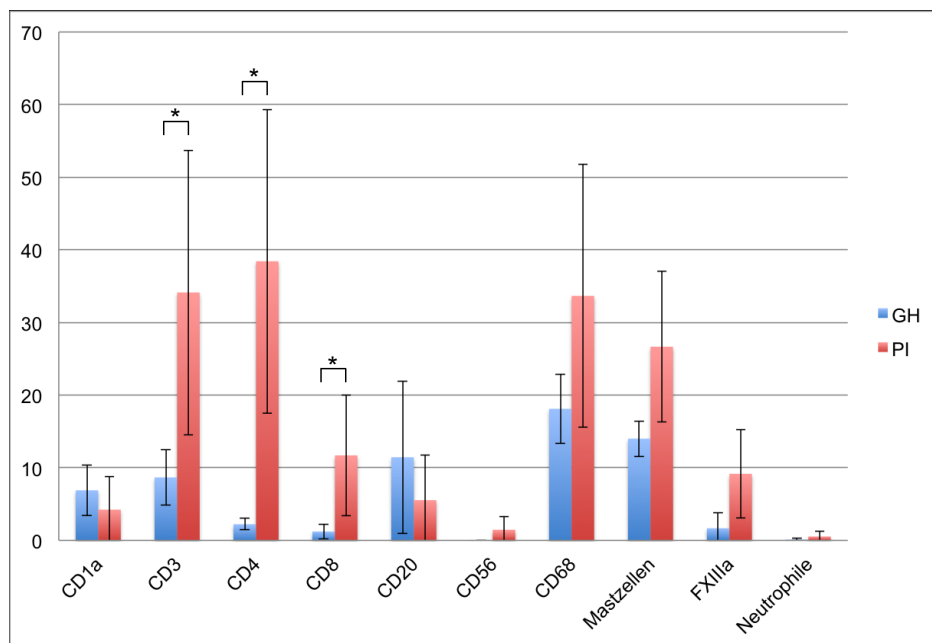
Zytotoxische T-Lymphozyten (CD8)				
	0	5	1,2	1,0
B-Lymphozyten (CD20)				
	0	51	11,4	10,4
Natural-Killer-Zellen (CD56)				
	0	0	0	0
Makrophagen (CD68)				
	9	28	18,1	4,8
Mastzellen (Mastzelltryptase)				
	10	18	14	2,4
Dendritische Zellen (Faktor XIIIa)				
	0	6	1,7	2,1
Neutrophile Granulozyten (Chloracetat Färbung)				
	0	1	0,1	0,1

Die Ergebnisse der Auszählungen wurden mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests verglichen. Die Mittelwerte der gesamten Auszählung pro Marker wurden als Parameter für die Analyse genommen.

3. ERGEBNISSE

3.7.1 Das perifollikuläre Infiltrat der AI beinhaltet hauptsächlich T-Lymphozyten

Im Vergleich zur gesunden Haut zeigte das perifollikuläre Infiltrat ein ausgeprägtes Infiltrat von CD3-, CD4- und CD8-Zellen (Grafik 1). Die Verteilung der Zellen im Bereich der Perifollikulitis war homogen. Die Epidermis wurde in dieser Analyse nicht beurteilt, es fiel jedoch auf, dass in diesem Bereich die Langerhans-Zellen (CD1a⁺) vermehrt angetroffen werden (Abbildungen 9).



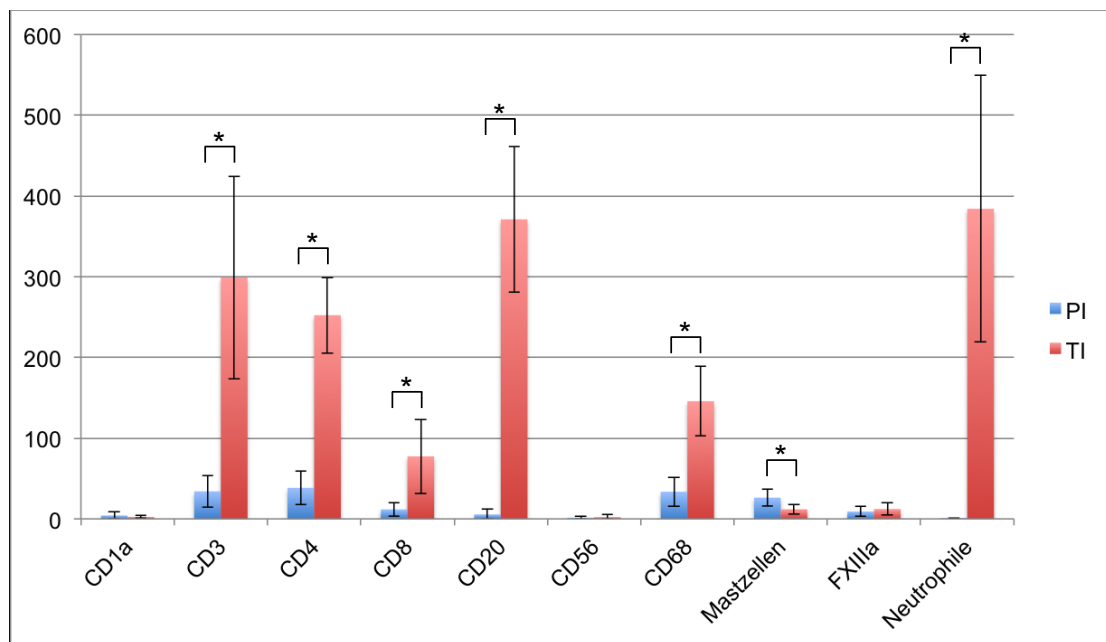
Grafik 1: T-Lymphozyten sind die dominanten Infiltratzellen des perifollikulären Infiltrats. Die quantitative Auswertung des perifollikulären Infiltrates bei AI zeigte eine Dominanz von T-Lymphozyten im Vergleich zur normalen Haut, wobei insbesondere CD3-, CD4- und CD8-Zellen vermehrt vorlagen. * = $p \leq 0,05$ (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test); GH – gesunde Haut; PI – perifollikuläres Infiltrat.

3.7.2 Im tiefen Infiltrat dominieren Zellen der natürlichen (angeborenen) Immunität

Die vergleichende Analyse zwischen den perifollikulären und tieferen Entzündungsinfiltraten zeigte einen signifikanten Unterschied in der Zahl der T-

3. ERGEBNISSE

Lymphozyten (CD3-, CD4- und CD8-Zellen), B-Lymphozyten (CD20-Zellen), Makrophagen (CD68-Zellen) und neutrophilen Granulozyten (Grafik 2). Eine geringere Anzahl von Mastzellen wurde im tieferen Infiltrat nachgewiesen. Obwohl ein Anstieg der B-Lymphozyten nachgewiesen wurde, lagen diese Zellen gruppiert vor und zeigten die von van der Zee et al. beschriebenen „pseudo lymphoid follicles“, die in der Literatur durch eine sekundäre bakterielle Infektion erklärt werden [24]. Die neutrophilen Granulozyten stellten in der Auszählung die größte Zellpopulation des tieferen Infiltrats dar.



Grafik 2: Im Vergleich zum perifollikulären Infiltrat liegen im tieferen Infiltrat vermehrt T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten vor. Die Auswertung der ausgezählten Zellen in den perifollikulären und tieferen Infiltraten zeigte eine Vermehrung von CD3-, CD4-, CD8-, CD68-Zellen und neutrophilen Granulozyten. Die Mastzellen waren im tieferen Infiltrat verringert. * = $p \leq 0,05$ (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test); PI – perifollikuläres Infiltrat; TI – tiefes Infiltrat.

Die folgenden Abbildungen illustrieren den histologischen Unterschied zwischen dem perifollikulären und dem tieferen Infiltrat bezüglich der verschiedenen Marker.

3. ERGEBNISSE

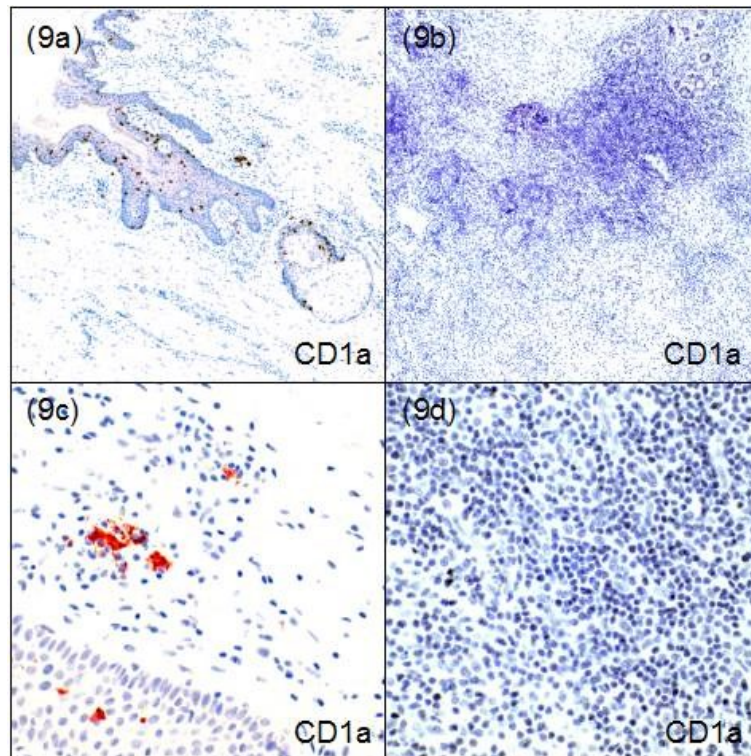


Abbildung 9: Zwischen perfollikulären und tiefen Infiltraten besteht kein signifikanter Unterschied in der CD1a-Färbung. Die Anzahl der CD1a-positiven Zellen zeigte sich in der Perifollikulitis im Vergleich zum tieferen Infiltrat erhöht, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,401$). Eine Positivität der Langerhans-Zellen wurde in der Epidermis gezeigt. Perifollikuläres Infiltrat: 9a (40x), 9c (200x). Tieferes Infiltrat: 9b (40x), 9d (200x). Immunhistologische Färbung mit anti-CD1a-Antikörper.

3. ERGEBNISSE

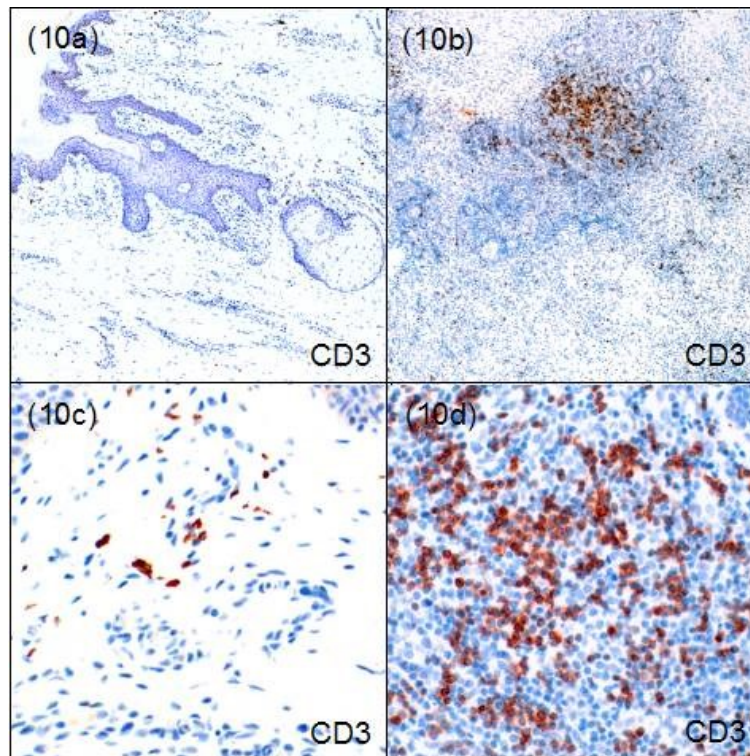


Abbildung 10: Im Vergleich zum perfollikulären Infiltrat finden sich vermehrt T-Lymphozyten im tiefen Infiltrat. Im perfollikulären Infiltrat ergab sich eine signifikante Vermehrung der T-Lymphozyten im Vergleich zur normalen Haut. Die vergleichende Analyse der AI-Infiltrate zeigte eine erhöhte Zahl von T-Lymphozyten im tiefen Infiltrat verglichen mit dem perfollikulären Infiltrat. Perfollikuläres Infiltrat: 10a (40x), 10c (200x). Tieferes Infiltrat: 10b (40x), 10d (200x). Immunhistologische Färbung mit anti-CD3-Antikörper.

3. ERGEBNISSE

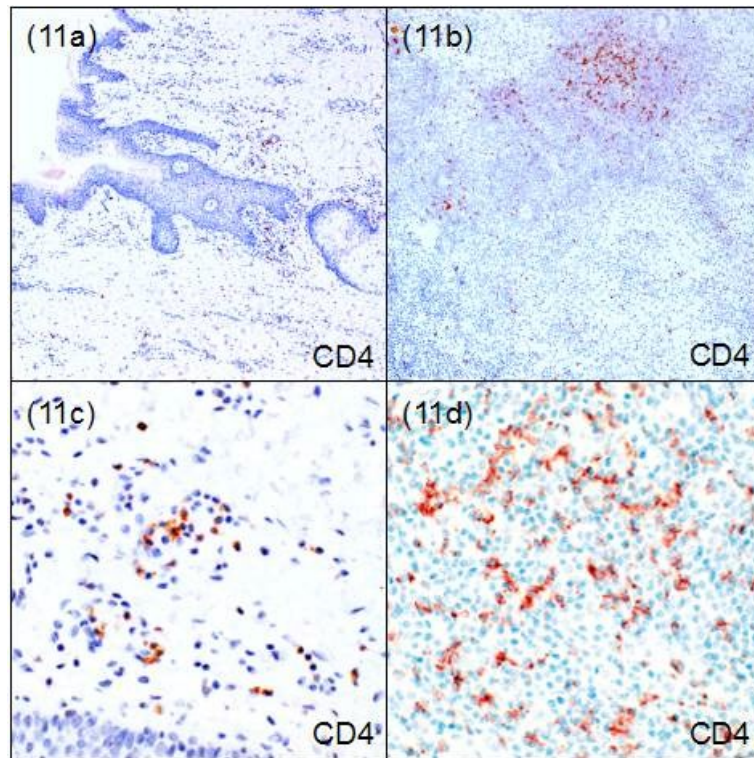


Abbildung 11: T-Helferzellen werden im tiefen Infiltrat vermehrt angetroffen. Ebenso wie bei der CD3-Färbung zeigten sich die T-Helfer-Lymphozyten im tiefen Infiltrat vermehrt mit einem signifikanten Unterschied zwischen dem perifollikulären und dem tiefen Infiltrat. Das perifollikuläre Infiltrat enthält dennoch signifikant mehr T-Helferzellen als normale Haut. Perifollikuläres Infiltrat: 11a (40x), 11c (200x). Tiefes Infiltrat: 11b (40x), 11d (200x). Immunhistologische Färbung mit anti-CD4-Antikörper.

3. ERGEBNISSE

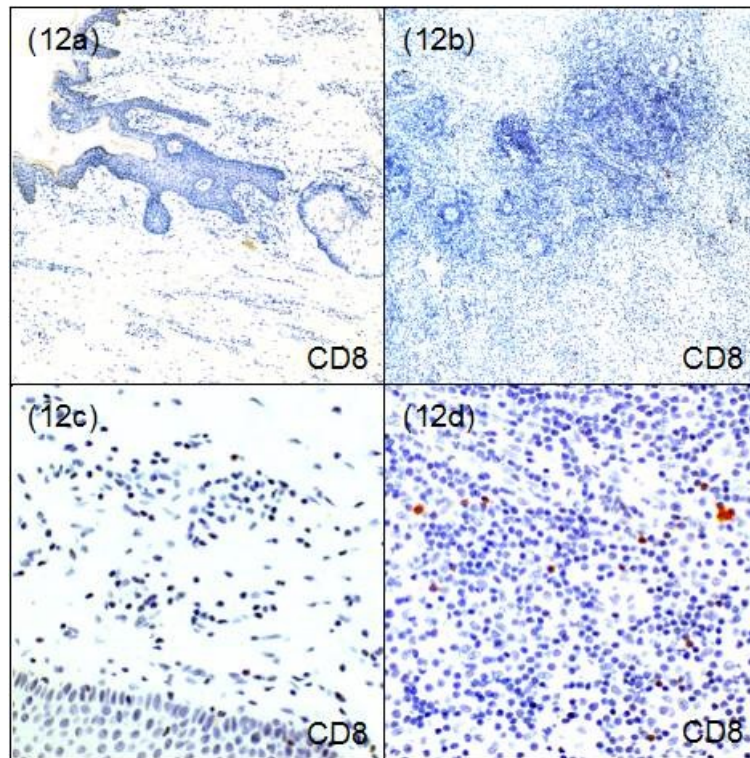


Abbildung 12: Zytotoxische T-Lymphozyten sind überwiegend im tiefen Infiltrat präsent. Die zytotoxischen T-Lymphozyten zeigten sich dezent positiv in beiden Infiltraten. Allerdings war der CD8-Marker im tieferen Infiltrat stärker positiv und es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Infiltraten. Perifollikuläres Infiltrat: 12a (40x), 12c (200x). Tieferes Infiltrat: 12b (40x), 12d (200x). Immunhistologische Färbung mit anti-CD8-Antikörper.

3. ERGEBNISSE

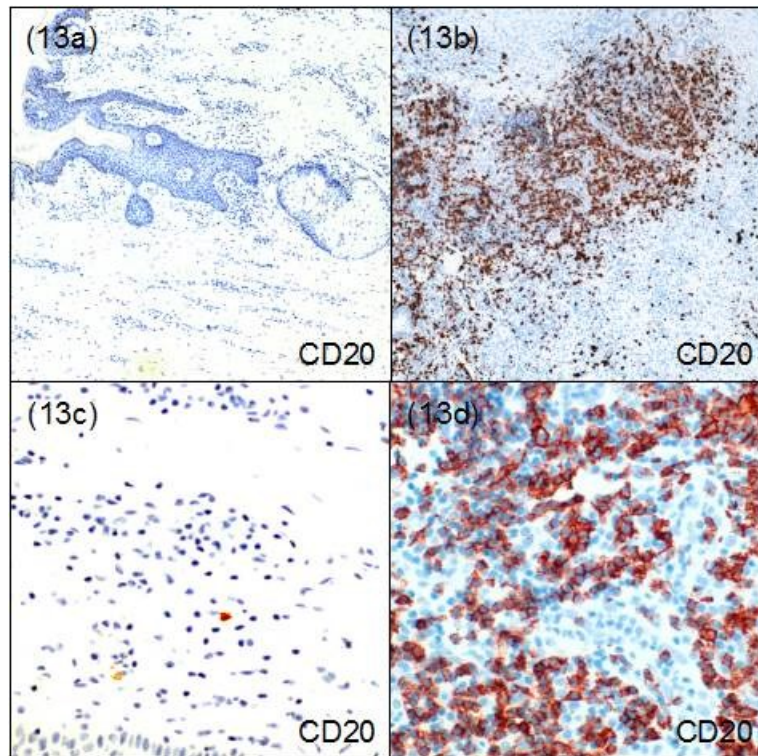


Abbildung 13: Die B-Lymphozyten liegen im tiefen Infiltrat besonders stark vermehrt vor. Eine deutliche Vermehrung der B-Lymphozyten wurde im tiefen Infiltrat nachgewiesen. Die B-Lymphozyten waren im tieferen Infiltrat gruppiert und als „pseudo lymphoid follicles“ organisiert, wie von van der Zee beschrieben [24]. Perifollikuläres Infiltrat: 13a (40x), 13c (200x). Tieferes Infiltrat: 13b (40x), 13d (200x). Immunhistologische Färbung mit anti-CD20-Antikörper.

3. ERGEBNISSE

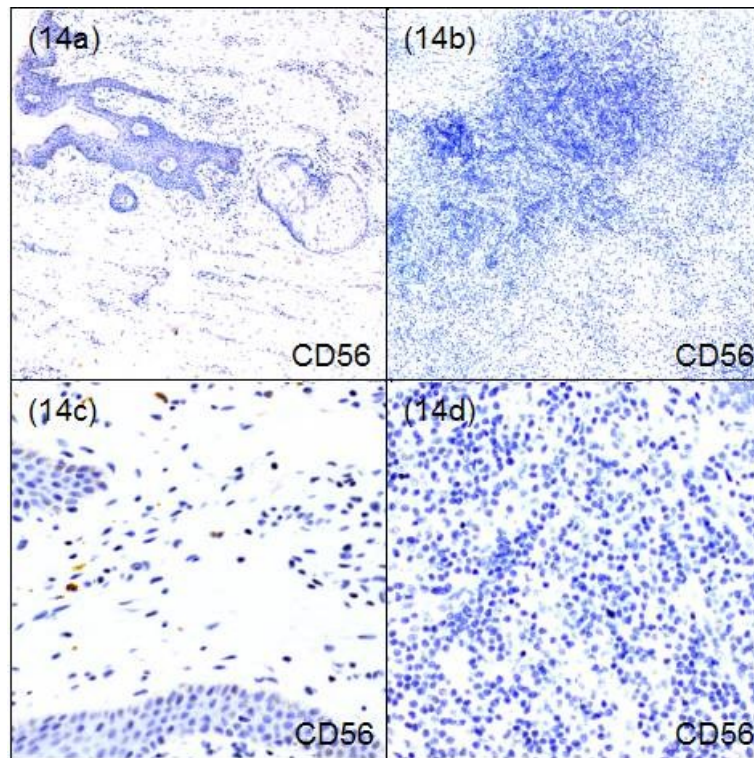


Abbildung 14: Einzelne Natural-Killer(NK)-Zellen sind in perfollikulären und tiefen Infiltraten erkennbar. Die NK-Zellen waren in beiden Infiltrate nur vereinzelt zu erkennen. Der *p*-Wert ($p = 0,400$) war nicht signifikant. Perfollikuläres Infiltrat: 14a (40x), 14c (200x). Tiefes Infiltrat: 14b (40x), 14d (200x). Immunhistologische Färbung mit anti-CD56-Antikörper.

3. ERGEBNISSE

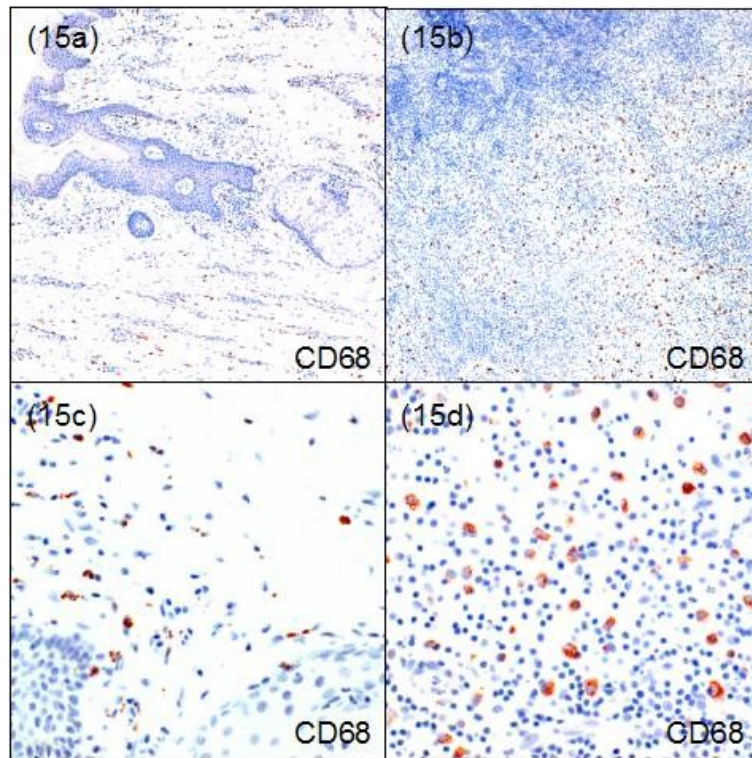


Abbildung 15: Die Makrophagen finden sich im tiefen Infiltrat in erhöhter Zahl. Es zeigte sich eine erhöhte Anzahl der Makrophagen im tiefen Bereich und ein signifikanter Unterschied zwischen den Infiltraten war erkennbar. Perifollikuläres Infiltrat: 15a (40x), 15c (200x). Tieferes Infiltrat: 15b (40x), 15d (200x). Immunhistologische Färbung mit anti-CD68-Antikörper.

3. ERGEBNISSE

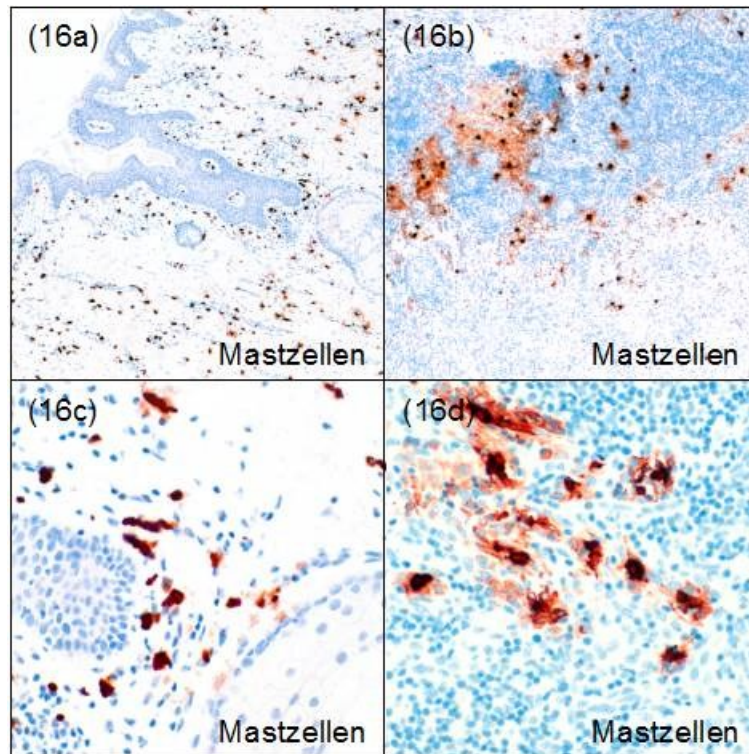


Abbildung 16: Die Mastzellen sind im Bereich der Perifollikulitis vermehrt anzutreffen. Eine signifikante Vermehrung der Mastzellen war im perifollikulären Infiltrat erkennbar. Perifollikuläres Infiltrat: 16a (40x), 16c (200x). Tiefes Infiltrat: 16b (40x), 16d (200x). Immunhistologische Färbung mit anti-Mastzelltryptase-Antikörper.

3. ERGEBNISSE

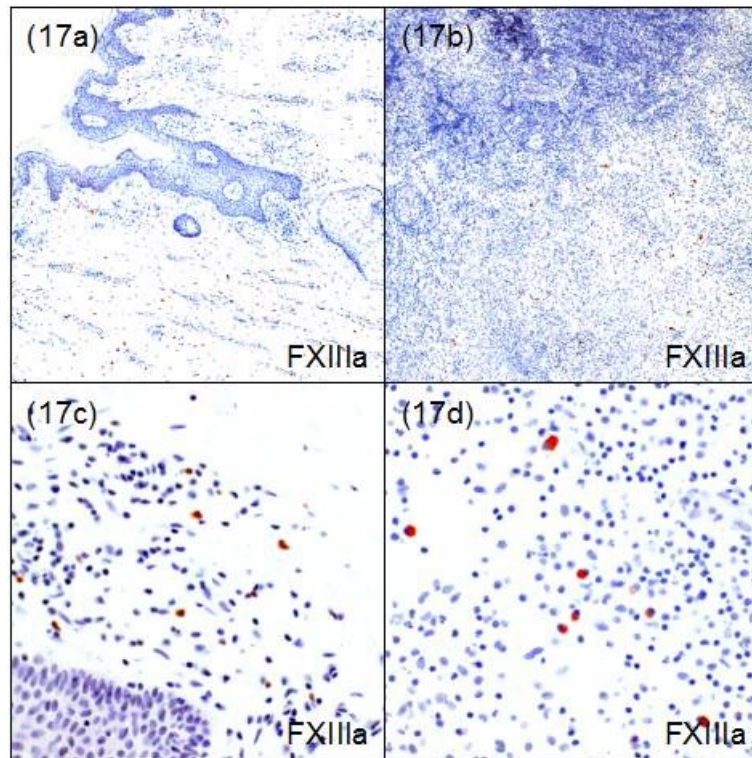


Abbildung 17: Die dendritischen Zellen liegen in ähnlicher Anzahl in perifollikulären und tiefen Infiltraten vor. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der dendritischen Zellen in beiden Bereichen. Perifollikuläres Infiltrat: 17a (40x), 17c (200x). Tiefes Infiltrat: 17b (40x), 17d (200x). Immunhistologische Färbung mit anti-FaktorXIIIa-Antikörper.

3. ERGEBNISSE

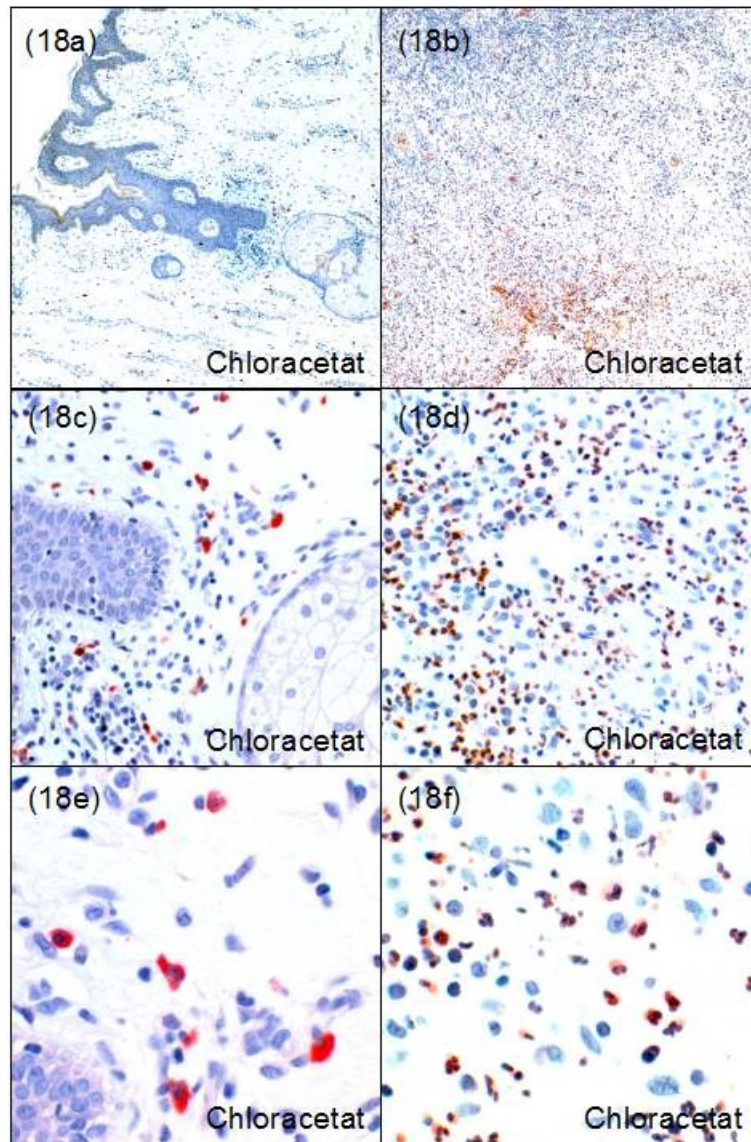


Abbildung 18: Eine deutliche Vermehrung der Neutrophilen ist im tiefen Infiltrat zu erkennen. Anhand der segmentierten Zellkerne konnte der Zelltyp eindeutig identifiziert werden. In der Perfollikulitis zeigte sich eine Anfärbung von überwiegend Mastzellen und wenigen Neutrophilen. Im Gegensatz dazu waren die neutrophilen Granulozyten der quantitativ häufigste Zelltyp im tieferen Infiltrat. Perifollikuläres Infiltrat: 18a (40x), 18c (200x), 18e (400x). Tiefes Infiltrat: 18b (40x), 18d (200x), 18f (400x). Chloracetatesterase-Färbung.

3. ERGEBNISSE

3.8 IL-17-positive neutrophile Granulozyten und T-Lymphozyten.

Da wir mehrere kleine rundkernige IL-17⁺-Zellen in der papillären und retikularen Dermis nachgewiesen haben und die immunhistologische Färbung auch zahlreichende IL-17⁺-Zellen mit segmentierten Kernen im tiefen Infiltrat zeigte, führten wir Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit jeweils CD4- und IL17-Antikörpern oder mit MPO- und IL17-Antikörpern durch, um zwischen Th17-Zellen und IL-17-produzierenden neutrophilen Granulozyten zu unterscheiden.

Die Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchung mit CD4- und IL17-Antikörpern zeigte eine Doppel-Positivität mehrerer Zellen in der papillaren und retikularen Dermis und wies somit die Anwesenheit von Th17-Zellen in diesem Bereich nach. Die Doppel-Färbung mit MPO und IL-17 zeigte zahlreiche doppel-positive Zellen im Bereich des tiefen Infiltrats, entsprechend IL-17-produzierenden Neutrophilen.

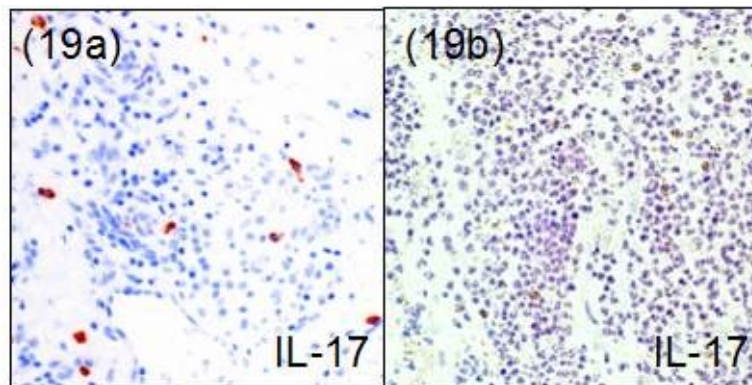


Abbildung 19: In der papillären und retikularen Dermis zeigten sich mehrere kleine rundkernige IL-17⁺-Zellen. Im Bereich des tiefen Infiltrats finden sich zahlreiche IL-17⁺-Zellen mit segmentierten Kernen. (19a) obere Dermis; (19b) tiefes Infiltrat; (19a, 19b) 200-fache Vergrößerung; Immunhistologische Färbung mit polyklonalem Antikörper gegen IL-17.

3. ERGEBNISSE

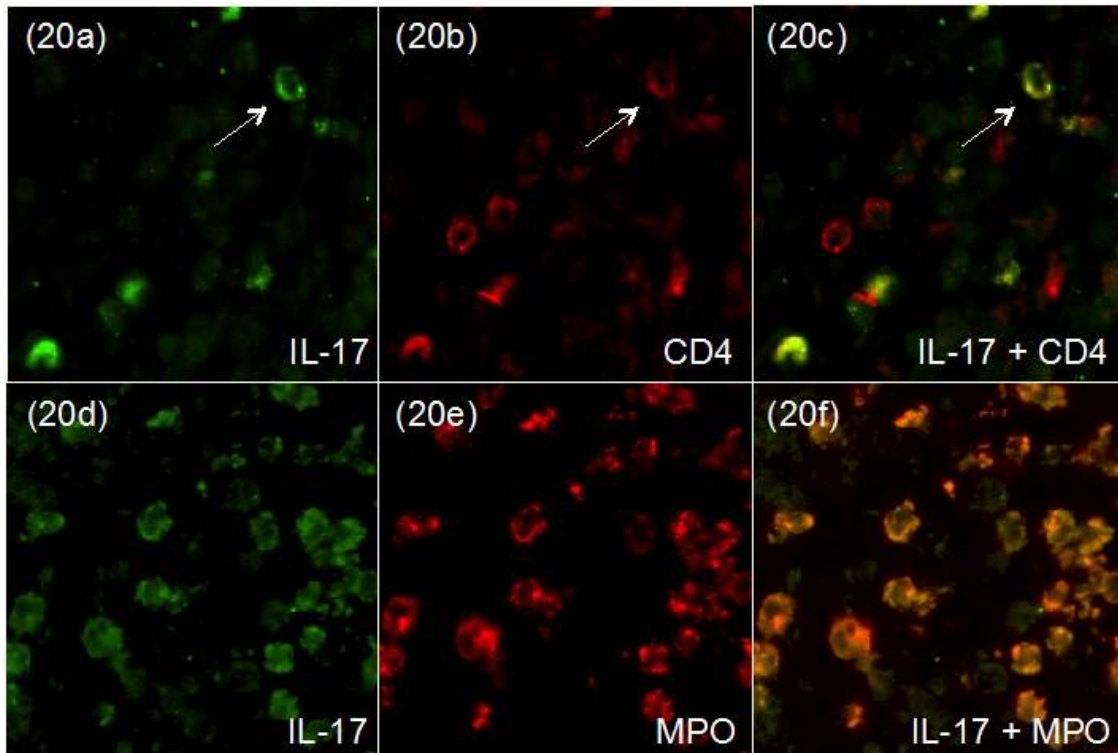


Abbildung 20: In der oberen Dermis finden sich Th17-Zellen. Im Gegensatz dazu sind zahlreiche IL-17-produzierende neutrophile Granulozyten im tiefen Infiltrat erkennbar. Es ergab sich eine erhöhte Anzahl an Th17-Zellen im oberen Bereich mit starker Anfärbung für IL-17. Im Bereich des tiefen Infiltrats wurden dagegen zahlreichende IL-17-produzierende neutrophile Granulozyten nachgewiesen und weniger Th17-Zellen. (20a, 20b, 20c, 20d, 20e, 20f): 400-fache Vergrößerung; (20a, 20d) Immunfluoreszenz-Färbung mit anti-IL17-Antikörper; (20b) Immunfluoreszenz Färbung mit anti-CD4-Antikörper; (20c) Doppel-Färbung CD4+IL-17; (20e) Immunhistologische Färbung mit anti-MPO-Antikörper; (20f) Doppel-Färbung MPO+IL-17.

4. DISKUSSION

Die Acne inversa ist eine chronisch-entzündliche, abszedierende und fistulierende, rekurrende Erkrankung der Haarfollikel, vorwiegend im Bereich der intertriginösen Areale [1-4]. Die genauen pathologischen Mechanismen der AI sind derzeit noch unklar. Die ursprüngliche Hypothese, die von einer primären Beteiligung der apokrinen Drüsen ausging, gilt heute als widerlegt. Diese Hypothese wurde von Verneuil aufgestellt und durch Shelley und Cahn in Studien beschrieben [1, 3, 6]. Aus heutiger Sicht stellt viel mehr die Okklusion der Haarfollikel durch infundibuläre Hyperkeratosen den ersten wesentlichen Schritt für die Entwicklung der AI dar [4, 10]. Dem zufolge würde eine Follikeldilatation mit anschließender Ruptur und Verbreitung seines Inhalts in das umgebende Gewebe in eine daraus resultierende Entzündungsreaktion münden [4, 16, 24].

4.1 Patientenbezogene Daten

Ein Zusammenhang zwischen Adipositas und AI ist in unserem Kollektiv evident. Zehn Patienten (45%) litten unter Adipositas und weitere 5 Patienten (23%) wurden mit Übergewicht klassifiziert. Adipositas ist als Risikofaktor für die AI in der Literatur belegt [12, 13]. Verschiedene Gründe für den Einfluss von Adipositas auf die Pathogenese der AI wurden beschrieben. Adipositas-Patienten haben breitere intertriginöse Areale [11]. Auf Grund dessen haben diese Patienten größerflächige Haut-zu-Haut-Kontakt-Areale mit damit einhergehender erhöhter mechanischer Friktion, was durch reaktive Hyperkeratose und Ausbilden von Keratinpfropfen ein Trigger für die Entwicklung der AI-Läsionen darstellt [4, 11, 61]. Erhöhte Transpiration und Schweiß-Retention bei adipösen Patienten können zu Hautreizungen führen und die AI-Läsionen verschlechtern [11]. Schwitzen kann zu Keratin-Hydratation beitragen, was zum Aufquellen der Zellen und damit zu einer Verkleinerung des Follikelinfundibulums bis hin zu dessen Verschluss führen kann [62]. Zudem sind bei Adipositas verschiedene proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1 β , IL-6, TNF- α , CRP) systemisch aufreguliert [63]. Diese

4. DISKUSSION

Aufregulation proentzündlicher Zytokine könnte auch eine Verschlechterung bei AI bewirken [11].

In unserem Kollektiv bestand eine erhöhte Prävalenz für Rauchen bei AI-Patienten. Sechzehn der 22 ausgewerteten Patienten gaben aktiven Nikotinkonsum zum Zeitpunkt der Operation an. Nikotinkonsum ist in der heutigen Literatur als Risikofaktor für die Entwicklung der AI nachgewiesen [1, 6, 13, 64], allerdings konnte kein unmittelbar zeitlicher oder dosisabhängiger Zusammenhang gezeigt werden [13]. Der genaue pathophysiologische Einfluss des Nikotins auf die Entwicklung der AI ist aktuell noch nicht vollständig geklärt [1, 4, 11].

Vier der analysierten Patienten wiesen in der Vorgeschichte einen Sinus pilonidalis auf. Der Sinus pilonidalis wird von einigen Autoren als lokalisierte Form der Acne inversa aufgefasst, er liegt jedenfalls häufig mit AI assoziiert vor [21]. Die sogenannte „follikuläre Okklusion-Tetrade“ beschreibt ein Zusammentreffen von vier verschiedenen Erkrankungen: Acne inversa, Acne conglobata, Sinus pilonidalis und Perifollikulitis abscedens et suffodiens [6, 21]. Für die Diagnosestellung sollen mindestens zwei der vier Kriterien vorliegen [6, 21].

Einer der AI-Patienten unseres Kollektivs litt an Morbus Crohn (MC). Eine Assoziation zwischen AI und MC wurde in verschiedenen Studien und Fallberichten diskutiert [6, 21].

Drei unserer Patienten hatten eine positive Familienanamnese für AI. In der Literatur wird eine positive familiäre Belastung in 30-40% der AI-Fälle beschrieben [1, 11]. Die ursächlichen Gene, die zu einer Prädisposition für AI führen, sind zur heutigen Zeit noch nicht vollständig entschlüsselt, es wird eine genetisch heterogene Erkrankung mit verschiedenen Mutationen in unterschiedlichen Genloci angenommen [1].

4. DISKUSSION

4.2 IL-17 positive Zellen sind in der periläsionalen und läsionalen AI-Haut vermehrt

Die genauen pathophysiologischen Abläufe der AI sind noch weitgehend unverstanden. Verschiedene Vermutungen zur Pathogene der AI wurden angestellt, wobei jeweils unklar ist, welche Faktoren ursächlich sind und welche eher Folgephänomene darstellen.

In unserer Studie haben wir die periläsionale und läsionale AI-Haut auf Positivität von IL-17⁺-Zellen analysiert. Die immunhistologischen Befunde zeigten eine signifikante Positivität für IL-17⁺-Zellen in der periläsionalen und in der läsionalen AI-Haut im Vergleich zur gesunden Haut. Ein signifikanter Unterschied zwischen periläsionaler und läsionaler AI-Haut fand sich nicht. Die meisten positiven IL-17-Zellen waren in der papillären Dermis und in der Nähe der Haarfollikel. Um diese IL-17-positiven Zellen genauer zu charakterisieren, haben wir weitere Untersuchungen mittels Doppel-Immunfluoreszenz durchgeführt. Es zeigten sich insbesondere vermehrte CD4⁺-IL17⁺-Zellen (Th17-Zellen) in der papillären Dermis, u.a. im perifollikulären Bereich.

IL-17A ist das Hauptmolekül der IL-17-Familie und spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung von entzündlichen Prozessen [32]. Nach Bindung von IL-17 an den entsprechenden Rezeptor wird der NFκB-Signalweg aktiviert und eine daraus resultierende proinflammatorische Kaskade angestoßen [35, 42]. Th17-Zellen sind CD4⁺-Zellen, die hauptsächlich IL-17 produzieren [32, 35, 42]. Diese Zellen spielen aus aktueller Sicht eine wichtige Rolle bei der Pathogenese verschiedener inflammatorischer und autoimmunologischer Hauterkrankungen [32, 35, 42]. Obwohl Th17-Zellen die wesentliche Quelle von IL-17A sind, können auch andere Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems IL-17A produzieren [42].

Schlapbach et al. haben die Rolle des IL-17-Zytokins in der AI analysiert [31]. Mittels PCR wurde eine Hochregulation von IL-17 in läsionaler AI-Haut nachgewiesen [31]. Immunhistochemische Färbungen haben diesen Befund

4. DISKUSSION

bestätigt und eine Vermehrung von IL-17⁺-Zellen in der papillaren und retikularen Dermis gezeigt [31]. Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigten die Positivität von Th17-Zellen in diesen Bereichen [31]. Die periläsionale Haut wurde in dieser Studie nicht untersucht.

IL-17 induziert die Aktivierung proinflammatorischer Chemokine und die Produktion hämatopoetischer Zytokine und antimikrobieller Substanzen [35]. IL-17 reguliert den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) und den G-CSF-Rezeptor hoch, was zu Chemotaxis neutrophiler Granulozyten führt [35]. Außerdem kann IL-17 zur Produktion von β -Defensinen, Muzinen und S100-Proteinen führen [35]. In der Haut spielt IL-17 eine wichtige Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen bei verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. bei Psoriasis [33] und bullösem Pemphigoid [65].

IL-17A kann durch Einwirkung auf Keratinozyten verschiedene Prozesse anstoßen [33, 34]. IL-17A induziert eine Hochregulation des Chemokins CCL20 in den Keratinozyten, was zur Chemotaxis von C-C-Chemokin-Rezeptor-Typ-6 (CCR6)⁺-Zellen führt [33]. Dadurch werden dendritische Zellen und Th17-Zellen angelockt [33]. Darüber hinaus induziert IL-17 eine Aufregulation der Expression von antimikrobiellen Peptiden, wie z.B. β -Defensin(BD)-2, S100A7, S100A8 und S100A9. Dies kann weitere proentzündliche Prozesse induzieren [33]. Außerdem reguliert IL-17 die Expression Neutrophilen-chemotaktischer Liganden hoch, wie z.B. der Chemokine CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6 und CXCL8, und führt so zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten [33].

Cho et al. haben die Aktivitäten von IL-17 auf Keratinozyten (HaCaT-Zellen) beschrieben [34]. Stimulation mit IL-17 aktivierte das NLRP3-Caspase1-Inflammasom in den Keratinozyten, was zur Freisetzung von IL-1 β führte [34]. Darüber hinaus führte diese Stimulation zur Produktion von BD1, LL-37, S100A8, S100A9, CXCL1, CXCL5 und CXCL8 in HaCaT-Zellen [34]. Des Weiteren haben Cho et al. die Wirkung von IL-1 β auf Keratinozyten untersucht

4. DISKUSSION

[34]. Wie bei der IL-17-Stimulation führte die Stimulation mit IL-1 β zur Produktion proinflammatorischer Moleküle wie z.B. BD1, LL-37, S100A8, S100A9, CXCL1, CXCL5 und CXCL8 [34]. Zusammenfassend kann man konstatieren, dass IL-17 durch eine Aktivierung von Keratinozyten zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt, was die Freisetzung von IL-1 β zur Folge hat, dessen Aktivität die epidermale proinflammatorische Kaskade weiter potenziert [34].

4.3 Keratinozyten sind eine wesentliche Quelle proentzündlicher Moleküle in der AI

Verschiedene histologische Arbeiten haben eine Beteiligung der Epidermis bei AI gezeigt. Van der Zee et al., Jemec und Hansen sowie von Laffert konnten eine psoriasiforme Hyperplasie, Keratinpfropfe und Perifollikulitis als wichtige histologische Zeichen einer AI nachweisen [10, 24-26, 59]. Die aktuell akzeptierte Hypothese zur Pathogenese der AI besagt, dass eine epidermale Störung vorliegt, die zur Hyperplasie der Epidermis mit daraus resultierenden Keratinpfropfen führt. Dies wurde von van der Zee schon in der periläsionalen AI-Haut beschrieben [24].

In unserer Arbeit haben wir immunhistologische Färbungen mit anti-NLRP3- und anti-Caspase1-Antikörpern durchgeführt. Für diese Marker wurde eine verstärkte Positivität in der Epidermis nachgewiesen. Mittels Western Blot konnte die Positivität der Caspase-1 bestätigt werden und darüber hinaus gespaltene, also aktivierte Caspase-1 in der läsionalen AI-Haut nachgewiesen werden. Damit stellte sich in der läsionalen Haut betroffener Patienten eine Aktivierung dieser Protease dar, was auf die Freisetzung von aktivem IL-1 β durch Abspaltung aus pro-IL-1 β in der Epidermis hinweist.

Das Inflammasom ist ein großer zytosolischer Multiproteinkomplex, dessen Aktivierung zur Spaltung und Freisetzung der Caspase-1 führt. Die Caspase-1 aktiviert IL-1 β durch Spaltung der inaktiven Vorstufe pro-IL-1 β . Das von

4. DISKUSSION

humanen Keratinozyten synthetisierte pro-IL-1 β bleibt physiologischerweise mangels aktivierter Caspase-1 inaktiviert [30]. Das Inflammasom besteht aus 3 Molekülen: 1. einem NOD-Like Rezeptor (NLR), dessen Bindung an seinen Liganden zur Aktivierung des Inflammasoms führt; 2. dem Adaptorprotein ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD); 3. der Pro-Caspase 1, die bei Aktivierung des Komplexes aus ihrem Substrat Pro-IL-1 β aktives IL-1 β abspaltet [41]. Unter den verschiedenen im Inflammasom-Komplex auftretenden NOD-like-Rezeptoren nimmt NLRP3 eine zentrale Rolle ein. Die Aktivierung von NLRP3 erfolgt als Antwort auf verschiedene Interleukine, DAMPs und PAMPs [66].

Van der Zee et al. haben eine signifikante Hochregulation von IL-1 β , TNF- α und IL-10 in läsionaler Haut von AI-Patienten nachgewiesen und auch eine Vermehrung von IL-1 β in periläsionaler Haut gezeigt [36]. In dieser Arbeit wurden Probenbiopsien von AI-Patienten kultiviert und die von den Proben *ex vivo* in den Überstand abgegebenen Proteine durch „Cytometric bead arrays“ bestimmt [36]. Da die Proben als Ganzes kultiviert wurden, inklusive Epidermis, Dermis und Fettgewebe, konnte die genaue zelluläre Quelle der nachgewiesenen Moleküle nicht angegeben werden.

Unsere Untersuchungen zeigten eine Hochregulation der S100A8- und S100A9-Expression in läsionaler Haut bei AI. In den immunhistologischen Färbungen stellte sich eine starke Positivität dieser Marker in der Epidermis dar. Dieses Ergebnis wurde mittels Western Blots von Lysaten betroffener Epidermis verifiziert. Es zeigte einen deutlichen Unterschied in der Expression dieser Moleküle zwischen betroffener läsionaler Epidermis und periläsionaler Epidermis.

S100A8 und S100A9 sind zwei Alarmine, bzw. DAMP-Moleküle, die von Granulozyten (insbesondere neutrophilen Granulozyten), aber auch Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten und Keratinozyten produziert werden können [48]. Diese Moleküle wurden als wesentlich für die Initiierung und die

4. DISKUSSION

Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse in der Pathogenese verschiedener inflammatorischer Erkrankungen, insbesondere bei Psoriasis, beschrieben [45]. S100A8/S100A9 sind in Keratinozyten von Psoriasisplaques deutlich hochreguliert[45].

Wieland et al. haben eine Hochregulation der S100A8/A9-Proteine im Serum von AI-Patienten nachgewiesen [40]. Eine signifikante Korrelation mit dem Hurley-Grad war jedoch nicht nachweisbar [40]. Dieser Befund weist darauf hin, dass diese Proteine potentielle Mediatoren in der Pathogenese der AI sein könnten [40]. Eine genaue zelluläre Quelle von S100A8/A9 konnten Wieland et al. nicht identifizieren.

Unter inflammatorischen Bedingungen liegt S100A8/A9 hochreguliert vor und stimuliert die Proliferation von Keratinozyten [46]. Cytokeratin 6 ist ein Marker für die Hyperproliferation der Keratinozyten und ist in der Epidermis bei hyperproliferativen Zuständen aufreguliert, wie z.B. bei Hauttumoren, der Psoriasis und bei der Wundheilung [60]. Unsere Daten zeigen eine gering verstärkte Positivität von CK5/6 in periläsionaler AI-Epidermis und eine deutlich verstärkte Expression in läsionaler AI-Epidermis, was eine abnorme Hyperproliferation der Keratinozyten in der AI anzeigt. Diese Hyperproliferation könnte zur Ausbildung folliculärer Keratinpfropfe beitragen, was als erster wesentlicher Schritt in der Pathogenese der AI angesehen wird.

Neben ihrem Einfluss auf das Wachstum der Keratinozyten können die S100A8/A9-Proteine auch die Produktion proentzündlicher Zytokine und Chemotaxis induzieren [46, 48]. S100A8/A9-Moleküle wirken in endothelialen Zellen und stimulieren dort die Immigration inflammatorischer Zellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten [48]. Außerdem können diese Proteine durch die Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) zur Produktion von TNF- α und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-1 β und IL-12, führen [40, 47, 48].

4. DISKUSSION

Die genauen Mechanismen des positiven Feedbacks zwischen S100A8/A9-Molekülen und IL-1 β sind noch unklar [47]. Insbesondere ist noch nicht bekannt, welche Moleküle am Beginn des Entzündungsprozesses stehen und welche Moleküle durch die Entzündung erst sekundär stimuliert werden.

Unsere Befunde zeigen, dass das Epithel eine wichtige Quelle proentzündlicher Moleküle in der AI darstellt. Es scheint plausibel, dass IL-17 in der AI zur Produktion und Aktivierung proinflammatorischer Moleküle in der Epidermis führt, welche ihrerseits zum Progress des Entzündungsprozesses beitragen. Damit rücken sie die Epidermis als möglichen wichtigen Trigger in der Pathogenese der AI in den Fokus.

4.4 Das tiefe Infiltrat besteht hauptsächlich aus Zellen der angeborenen Immunität

Ausgehend von der aktuell führenden Hypothese zur Pathophysiologie der Acne inversa kann man folgern, dass in der frühen Phase der Pathogenese eine Perifollikulitis auftritt und die tiefe Entzündungsreaktion im dermalen Gewebe ein späteres, sekundäres Phänomen darstellt [4, 10]. In unserer Arbeit wurde erstmals eine genaue histologische Analyse mit Vergleich dieser beiden Bereiche des entzündlichen Geschehens durchgeführt. Dadurch sollte der sequentielle Ablauf des Entzündungsprozesses in der Pathogenese der AI analysiert werden. Histologische krankheitsspezifische Merkmale der Epidermis, wie z. B. die vorbeschriebene psoriasiforme Hyperplasie und das Auftreten von Keratinpfropfen, wurden dabei in unserer Analyse nicht berücksichtigt. Die genaue zelluläre Zusammensetzung der perifollikulären und tiefen dermalen Infiltrate wurde quantitativ mittels Immunhistologie untersucht.

Unsere Befunde zeigten eine signifikante Vermehrung der CD3-, CD4- und CD8-Zellen in der Perifollikulitis im Vergleich zur gesunden Haut. Die CD4/CD8-Ratio lag bei 3,3:1. In Zusammenschau mit dem Befund unserer immunhistologischen Färbung gegen IL-17 ist zu vermuten, dass ein Teil dieser

4. DISKUSSION

Zellen Th17-Zellen sind. Diese Befunde bestärkten die Hypothese, dass der Entzündungsprozess in der Nähe eines Haarfollikels eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AI spielt [10].

Im Vergleich zur Perifollikulitis zeigte sich im tiefen Infiltrat eine Vermehrung von CD3-, CD4-, CD8-, CD20-, CD68-positiven Zellen und insbesondere von neutrophilen Granulozyten. Ausgehend von einer Krankheitsdynamik, die mit einer Perifollikulitis beginnt, scheint im Entzündungsprozess die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten erst zu einem späten Zeitpunkt zu erfolgen.

Makrophagen und neutrophile Granulozyten sind zwei wichtige Zellgruppen der angeborenen Immunität. Die Vermehrung von Makrophagen in der Haut fördert die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α [67]. Daneben produzieren die neutrophilen Granulozyten selbst die proentzündliche Moleküle IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α [67].

Von Laffert et al. beschrieben 2009 eine Hyperkeratose des terminalen Haarfollikels (82%), Hyperplasie des follikulären Epitheliums (77%), Perifollikulitis (68%), ein subepidermales inflammatorisches Infiltrat (78%) und eine epidermale psoriasiforme Hyperplasie (58%) bei den von ihnen untersuchten AI-Patienten [10]. Das perifollikuläre und subepidermale inflammatorische Infiltrat wurde durch Immunhistologie analysiert [10]. Das perifollikuläre Infiltrat bestand aus einer gemischten lymphozytären Population, mit einer CD4/CD8-Ratio von 2,1:1 [10]. Ebenso war das subepidermale Infiltrat reich an T-Lymphozyten, mit einer CD4/CD8 Ratio von 1,4:1 [10].

Van der Zee et al. verglichen normale gesunde Haut mit klinisch akuter und klinisch chronischer läsionaler AI-Haut und mit periläsionaler AI-Haut [24]. Psoriasiforme Hyperplasie und Keratinpfröpfe wurden schon in der periläsionalen Haut nachgewiesen [24]. In diesem Bereich gab es eine Vermehrung der CD3-, CD138-, FXIIIa-positiven Zellen und der Mastzellen im

4. DISKUSSION

Vergleich zur normalen Haut [24]. In den klinisch akut entzündlichen AI-Proben zeigten sich eine psoriasiforme Hyperplasie (50%) und Keratinpfropfe (100%) [24]. In diesen Proben zeigte sich eine Vermehrung von CD8-, CD11c-, CD14-, CD68- und FXIIIa-positiven Zellen [24]. Ebenfalls wie in der klinisch akuten Phase wurden psoriasiforme Hyperplasie (100%) und Keratinpfropfe (100%) in der klinisch chronischen Phase beschrieben [24]. Eine Vermehrung der CD1a-, CD3-, CD4-, CD8-, CD11c-, CD14-, CD20-, CD79-, CD138-Zellen und Mastzellen wurde in dieser Phase nachgewiesen [24]. Gleichfalls wie bei unseren Befunden wurde eine vermehrte Infiltration von B-Lymphozyten (CD20-Zellen) von der Gruppe um van der Zee beschrieben [24]. Dessen Studie beschreibt eine atypische Verteilung der B-Lymphozyten als „pseudo lymphoid“ in der Dermis und diskutiert diese Vermehrung als Nebeneffekt des chronischen Entzündungsprozesses oder als Reaktion auf bakterielle Kolonisation [24].

4.5 Neutrophile Granulozyten sind eine wichtige Quelle von IL-17 im tiefen Infiltrat.

Im tiefen Infiltrat haben wir vermehrt neutrophile Granulozyten nachgewiesen. Interessanterweise wurden im selben Bereich auch zahlreiche IL-17-positive Zellen nachgewiesen. Diese Zellen zeigten sich kugelförmig und mit segmentalen Kernen. Nach morphologischen Gesichtspunkten lag es nahe, dass diese IL-17-positiven Zellen neutrophilen Granulozyten entsprechen. Wir führten daher Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchungen durch, um die IL-17-positiven Zellen genauer zu charakterisieren. Die Doppel-Immunfluoreszenz-Untersuchung mit den Markern IL-17 und MPO konnte eine Vielzahl von IL-17⁺-Neutrophilen im tiefen Infiltrat nachweisen. In der papillären und retikulären Dermis gab es dagegen einige CD4⁺-IL17⁺-Zellen ohne Nachweis IL-17-positiver neutrophiler Granulozyten. Schlapbach et al. haben mittels PCR eine Hochregulation von IL-17 in der läsionalen AI-Haut nachgewiesen [31]. Durch immunhistochemische Färbung wurde dieser Befund bestätigt und eine Vermehrung von IL-17⁺ Zellen in der papillären und retikulären Dermis gezeigt [31]. Mithilfe von Doppelimmunfluoreszenz wurde eine Positivität für Th17-

4. DISKUSSION

Zellen gezeigt [31]. Unser Befund untermauert die Beobachtungen von Schlapbach et al. und zeigt eine weitere Quelle für die Hochregulation von IL-17 in läSIONALER AI-HAUT [31].

Die Rolle von IL-17-produzierenden neutrophilen Granulozyten in entzündlichen Erkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschung, sie wurden beispielsweise nachgewiesen bei Psoriasis und bullösem Pemphigoid [65, 68].

Die IL-17-Positivität bei den neutrophilen Granulozyten wurde zunächst als Folge einer Aufnahme dieses Zytokins durch die Neutrophilen interpretiert [68, 69]. Durch den Nachweis einer Koexpression von IL-17 mRNA und ROR γ t, einem IL-17-assoziierten Transkriptionsfaktor, konnten Keijsers et al. zeigen, dass neutrophile Granulozyten selbst eine Quelle von IL-17 sein können [69].

In unserer Studie konnten wir nachweisen, dass die Epidermis und die neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AI spielen. IL-17⁺-Zellen wurden in der periläsionalen und läSIONALen AI-HAUT nachgewiesen. Das Epithel ist eine wesentliche Quelle proinflammatorischer Moleküle, insbesondere von S100A8, S100A9 und aktivierter Caspase 1. Darüber hinaus stellen sich neutrophile Granulozyten als eine zusätzliche Quelle von IL-17 dar. Die vorgestellten Daten reichen nicht aus, um den pathophysiologischen Mechanismus der AI vollständig zu erklären. So ist nicht klar, ob die epidermalen Veränderungen als 'primum movens' der Erkrankung auftreten und zu einer Chemotaxis entzündlicher Zellen führen oder ob die Einwanderung proentzündlicher Zellen, wie z.B. Th17-Zellen, zu einer epidermalen Störung mit deren Aktivierung und Ausbildung entsprechender Veränderungen in der Folge führt. Daher werden weitere Studien notwendig sein, um noch besser die Pathophysiologie der Acne inversa zu verstehen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Die pathogenetischen Mechanismen der chronisch-entzündlichen Hauterkrankung Acne inversa (AI) beinhalten epidermale Störungen wie psoriasiforme Hyperplasie und Keratinpfropfe. Bei verschiedenen entzündlichen Hauterkrankungen sind die Keratinozyten eine wichtige Quelle proinflammatorischer Moleküle und können von IL-17⁺-Zellen stimuliert werden.

Ziele und Methoden: Um die mögliche Rolle des Epithels in der Pathogenese der AI zu erforschen, führten wir immunhistochemische Färbungen sowie Western Blot-Analysen durch. Mithilfe dieser Untersuchungen wurde die Expression entzündungsassoziierter Moleküle wie Interleukin(IL)-17, der Inflammasom-Komponenten Caspase-1 und NLRP3, und der danger-associated molecular pattern (DAMP)-Moleküle S100A8 und S100A9 (Calprotectin) analysiert. Um eine mögliche Wirkung dieser proinflammatorischen Zytokine auf den entzündlichen Verlauf der AI zu untersuchen, wurde die Zusammensetzung der perifollikulären und tiefen Infiltrate verglichen.

Ergebnisse: Die Zahl der IL-17⁺-Zellen ist in läsionaler und periläsionaler AI-Haut erhöht. Die Epidermis produziert proinflammatorische Moleküle und zeigt eine hochregulierte Expression von NLRP3, aktivierter Caspase-1 und S100A8/A9. Zusätzlich zeigt sich im Verlauf des AI-Entzündungsprozesses ein Zustrom von Zellen des angeborenen Immunsystems, insbesondere von IL-17-exprimierenden neutrophilen Granulozyten.

Schlussfolgerungen: IL-17-produzierende Zellen sind in läsionaler und periläsionaler AI-Haut vermehrt und können die Einleitung des entzündlichen Prozesses beeinflussen. Die Epidermis stellt sich als eine wesentliche Quelle proinflammatorischer Zytokine dar und zeigt eine vermehrte Expression von S100A8/S100A9 sowie eine Aktivierung des Inflammasoms; hierdurch wird möglicherweise die Ausbreitung der Entzündung signifikant beeinflusst. Eine deutliche Zunahme von IL-17-exprimierenden neutrophilen Granulozyten wurde im tiefen Infiltrat beobachtet.

5. SUMMARY

Background: The pathogenesis of the chronic inflammatory skin disease acne inversa (AI, also known as hidradenitis suppurativa) involves epidermal alterations such as psoriasiform epidermal hyperplasia and keratin pluggings. Keratinocytes are an important source of proinflammatory molecules in inflammatory skin diseases and can be stimulated by IL-17⁺ cells.

Objectives and Methods: To explore the possible role of the epithelium in the pathogenesis of AI, we performed immunohistochemical stainings and Western blot experiments to investigate localization and expression of inflammation-associated molecules, including the cytokine interleukin (IL)-17, components of the inflammasome including caspase-1 and the endogenous danger-associated molecular pattern (DAMP) molecules S100A8 and S100A9 (calprotectin). To examine a possible effect of upregulated proinflammatory cytokines on the inflammatory infiltrate, differences in the cellular composition of perifollicular and deep dermal infiltrates were analyzed.

Results: The number of IL-17⁺ cells is increased in lesional and perilesional AI skin. The epidermis produces proinflammatory molecules and shows an upregulated expression of components of the NLRP3-inflammasome, activated caspase-1 and expression of S100A8/A9. Additionally, the course of the inflammatory process in AI involves influx of innate immune cells, particularly IL-17-expressing neutrophils.

Conclusions: IL-17-producing cells are present in lesional and perilesional AI skin and may contribute to the initiation of inflammatory processes. Furthermore, the epidermis is a source of proinflammatory cytokines, shows inflammasome activation and expresses S100A8/S100A9, thereby possibly contributing to the propagation of inflammation. A massive influx of IL-17-expressing neutrophils is observed in the deep infiltrate.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Revuz, J., *Hidradenitis suppurativa*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2009. **23**(9): p. 985-98.
2. Jemec, G.B., *Clinical practice. Hidradenitis suppurativa*. N Engl J Med, 2012. **366**(2): p. 158-64.
3. Wollina, U., et al., *Acne inversa (Hidradenitis suppurativa): A review with a focus on pathogenesis and treatment*. Indian Dermatol Online J, 2013. **4**(1): p. 2-11.
4. van der Zee, H.H., et al., *Hidradenitis suppurativa: viewpoint on clinical phenotyping, pathogenesis and novel treatments*. Exp Dermatol, 2012. **21**(10): p. 735-9.
5. *Hidradenitis suppurativa foundation*. 2009. San Diego, California 92129.
6. Alikhan, A., P.J. Lynch, and D.B. Eisen, *Hidradenitis suppurativa: a comprehensive review*. J Am Acad Dermatol, 2009. **60**(4): p. 539-61; quiz 562-3.
7. Shelley, W.B. and M.M. Cahn, *The pathogenesis of hidradenitis suppurativa in man; experimental and histologic observations*. AMA Arch Derm, 1955. **72**(6): p. 562-5.
8. Yu, C.C. and M.G. Cook, *Hidradenitis suppurativa: a disease of follicular epithelium, rather than apocrine glands*. Br J Dermatol, 1990. **122**(6): p. 763-9.
9. Plewig, G., Klingman, A. M., *Acne, Morphogenesis and Treatment*, Springer, Editor. 1975: Berlin. p. 192-193.
10. von Laffert, M., et al., *Hidradenitis suppurativa (acne inversa): early inflammatory events at terminal follicles and at interfollicular epidermis*. Exp Dermatol, 2010. **19**(6): p. 533-7.
11. Nazary, M., et al., *Pathogenesis and pharmacotherapy of Hidradenitis suppurativa*. Eur J Pharmacol, 2011. **672**(1-3): p. 1-8.
12. Naldi, L., *Epidemiology*, in *Hidradenitis suppurativa*, Springer, Editor. 2006, Jemec, G., Revuz, J., Leyden, J., eds. p. 58-64.
13. Revuz, J.E., et al., *Prevalence and factors associated with hidradenitis suppurativa: results from two case-control studies*. J Am Acad Dermatol, 2008. **59**(4): p. 596-601.
14. Sartorius, K., et al., *Objective scoring of hidradenitis suppurativa reflecting the role of tobacco smoking and obesity*. Br J Dermatol, 2009. **161**(4): p. 831-9.
15. Konig, A., et al., *Cigarette smoking as a triggering factor of hidradenitis suppurativa*. Dermatology, 1999. **198**(3): p. 261-4.
16. Parks, R.W. and T.G. Parks, *Pathogenesis, clinical features and management of hidradenitis suppurativa*. Ann R Coll Surg Engl, 1997. **79**(2): p. 83-9.
17. Prasad, P.V., et al., *Familial acne inversa with acne conglobata in three generations*. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2008. **74**(3): p. 283-5.
18. Barth, J.H., A.M. Layton, and W.J. Cunliffe, *Endocrine factors in pre- and postmenopausal women with hidradenitis suppurativa*. Br J Dermatol, 1996. **134**(6): p. 1057-9.
19. Hurley, H.J., in *Dermatologic surgery, principles and practice*, M. Dekker, Editor. 1989: New York.

6. LITERATURVERZEICHNIS

20. Sartorius, K., et al., *Suggestions for uniform outcome variables when reporting treatment effects in hidradenitis suppurativa*. Br J Dermatol, 2003. **149**(1): p. 211-3.
21. Fimmel, S. and C.C. Zouboulis, *Comorbidities of hidradenitis suppurativa (acne inversa)*. Dermatoendocrinol, 2010. **2**(1): p. 9-16.
22. Wiseman, M.C., *Hidradenitis suppurativa: a review*. Dermatol Ther, 2004. **17**(1): p. 50-4.
23. Maintz, L., et al., *Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome in association with follicular occlusion triad*. Eur J Dermatol, 2005. **15**(5): p. 347-52.
24. van der Zee, H.H., et al., *Alterations in leucocyte subsets and histomorphology in normal-appearing perilesional skin and early and chronic hidradenitis suppurativa lesions*. Br J Dermatol, 2012. **166**(1): p. 98-106.
25. Boer, J. and E.F. Weltevreden, *Hidradenitis suppurativa or acne inversa. A clinicopathological study of early lesions*. Br J Dermatol, 1996. **135**(5): p. 721-5.
26. Jemec, G.B. and U. Hansen, *Histology of hidradenitis suppurativa*. J Am Acad Dermatol, 1996. **34**(6): p. 994-9.
27. Nestle, F.O., et al., *Skin immune sentinels in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 679-91.
28. Williams, I.R. and T.S. Kupper, *Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system*. Life Sci, 1996. **58**(18): p. 1485-507.
29. Kollisch, G., et al., *Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes*. Immunology, 2005. **114**(4): p. 531-541.
30. Feldmeyer, L., et al., *Interleukin-1, inflammasomes and the skin*. Eur J Cell Biol, 2010. **89**(9): p. 638-44.
31. Schlapbach, C., et al., *Expression of the IL-23/Th17 pathway in lesions of hidradenitis suppurativa*. J Am Acad Dermatol, 2011. **65**(4): p. 790-8.
32. Gu, C., L. Wu, and X. Li, *IL-17 family: cytokines, receptors and signaling*. Cytokine, 2013. **64**(2): p. 477-85.
33. Girolomoni, G., U. Mrowietz, and C. Paul, *Psoriasis: rationale for targeting interleukin-17*. Br J Dermatol, 2012. **167**(4): p. 717-24.
34. Cho, K.A., et al., *IL-17 and IL-22 enhance skin inflammation by stimulating the secretion of IL-1beta by keratinocytes via the ROS-NLRP3-caspase-1 pathway*. Int Immunol, 2012. **24**(3): p. 147-58.
35. Gaffen, S.L., *An overview of IL-17 function and signaling*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 402-7.
36. van der Zee, H.H., et al., *Elevated levels of tumour necrosis factor (TNF)-alpha, interleukin (IL)-1beta and IL-10 in hidradenitis suppurativa skin: a rationale for targeting TNF-alpha and IL-1beta*. Br J Dermatol, 2011. **164**(6): p. 1292-8.
37. Feldmeyer, L., et al., *The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes*. Curr Biol, 2007. **17**(13): p. 1140-5.
38. Bechara, F.G., et al., *Acne inversa: evaluating antimicrobial peptides and proteins*. Ann Dermatol, 2012. **24**(4): p. 393-7.

6. LITERATURVERZEICHNIS

39. Schlapbach, C., N. Yawalkar, and R.E. Hunger, *Human beta-defensin-2 and psoriasin are overexpressed in lesions of acne inversa*. J Am Acad Dermatol, 2009. **61**(1): p. 58-65.
40. Wieland, C.W., et al., *Myeloid marker S100A8/A9 and lymphocyte marker, soluble interleukin 2 receptor: biomarkers of hidradenitis suppurativa disease activity?* Br J Dermatol, 2013. **168**(6): p. 1252-8.
41. Yazdi, A.S., S.K. Drexler, and J. Tschopp, *The role of the inflammasome in nonmyeloid cells*. J Clin Immunol, 2010. **30**(5): p. 623-7.
42. Lynde, C.W., et al., *Interleukin 17A: toward a new understanding of psoriasis pathogenesis*. J Am Acad Dermatol, 2014. **71**(1): p. 141-50.
43. Lamkanfi, M., L. Vande Walle, and T.D. Kanneganti, *Deregulated inflammasome signaling in disease*. Immunol Rev, 2011. **243**(1): p. 163-73.
44. Yazdi, A.S. and S.K. Drexler, *Regulation of interleukin 1alpha secretion by inflammasomes*. Ann Rheum Dis, 2013. **72 Suppl 2**: p. ii96-9.
45. Kerkhoff, C., et al., *Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology*. Exp Dermatol, 2012. **21**(11): p. 822-6.
46. Lee, Y., et al., *S100A8 and S100A9 are messengers in the crosstalk between epidermis and dermis modulating a psoriatic milieu in human skin*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **423**(4): p. 647-53.
47. Frosch, M., et al., *The myeloid-related proteins 8 and 14 complex, a novel ligand of toll-like receptor 4, and interleukin-1beta form a positive feedback mechanism in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(3): p. 883-91.
48. Ehrchen, J.M., et al., *The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(3): p. 557-66.
49. Boer, J. and G.B. Jemec, *Resorcinol peels as a possible self-treatment of painful nodules in hidradenitis suppurativa*. Clin Exp Dermatol, 2010. **35**(1): p. 36-40.
50. Gener, G., et al., *Combination therapy with clindamycin and rifampicin for hidradenitis suppurativa: a series of 116 consecutive patients*. Dermatology, 2009. **219**(2): p. 148-54.
51. Mendonca, C.O. and C.E. Griffiths, *Clindamycin and rifampicin combination therapy for hidradenitis suppurativa*. Br J Dermatol, 2006. **154**(5): p. 977-8.
52. Kraft, J.N. and G.E. Searles, *Hidradenitis suppurativa in 64 female patients: retrospective study comparing oral antibiotics and antiandrogen therapy*. J Cutan Med Surg, 2007. **11**(4): p. 125-31.
53. Boer, J. and M. Nazary, *Long-term results of acitretin therapy for hidradenitis suppurativa. Is acne inversa also a misnomer?* Br J Dermatol, 2011. **164**(1): p. 170-5.
54. Buckley, D.A. and S. Rogers, *Cyclosporin-responsive hidradenitis suppurativa*. J R Soc Med, 1995. **88**(5): p. 289P-290P.
55. Haslund, P., R.A. Lee, and G.B. Jemec, *Treatment of hidradenitis suppurativa with tumour necrosis factor-alpha inhibitors*. Acta Derm Venereol, 2009. **89**(6): p. 595-600.

6. LITERATURVERZEICHNIS

56. Hsiao, J.L., et al., *Hidradenitis suppurativa and concomitant pyoderma gangrenosum: a case series and literature review*. Arch Dermatol, 2010. **146**(11): p. 1265-70.
57. Gulliver, W.P., G.B. Jemec, and K.A. Baker, *Experience with ustekinumab for the treatment of moderate to severe hidradenitis suppurativa*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012. **26**(7): p. 911-4.
58. Ellis, L.Z., *Hidradenitis suppurativa: surgical and other management techniques*. Dermatol Surg, 2012. **38**(4): p. 517-36.
59. von Laffert, M., et al., *Hidradenitis suppurativa/acne inversa: bilocated epithelial hyperplasia with very different sequelae*. Br J Dermatol, 2011. **164**(2): p. 367-71.
60. Navarro, J.M., J. Casatorres, and J.L. Jorcano, *Elements controlling the expression and induction of the skin hyperproliferation-associated keratin K6*. J Biol Chem, 1995. **270**(36): p. 21362-7.
61. Jansen, T. and G. Plewig, *What's new in acne inversa (alias hidradenitis suppurativa)?* J Eur Acad Dermatol Venereol, 2000. **14**(5): p. 342-3.
62. Attanoos, R.L., M.A. Appleton, and A.G. Douglas-Jones, *The pathogenesis of hidradenitis suppurativa: a closer look at apocrine and apoecrine glands*. Br J Dermatol, 1995. **133**(2): p. 254-8.
63. Coppack, S.W., *Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 349-56.
64. Yazdanyar, S. and G.B. Jemec, *Hidradenitis suppurativa: a review of cause and treatment*. Curr Opin Infect Dis, 2011. **24**(2): p. 118-23.
65. Le Jan, S., et al., *Innate Immune Cell-Produced IL-17 Sustains Inflammation in Bullous Pemphigoid*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(12): p. 2908-17.
66. Contassot, E., H.D. Beer, and L.E. French, *Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13590.
67. Sweeney, C.M., A.M. Tobin, and B. Kirby, *Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis*. Arch Dermatol Res, 2011. **303**(10): p. 691-705.
68. Lin, A.M., et al., *Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 490-500.
69. Keijsers, R.R., et al., *In vivo induction of cutaneous inflammation results in the accumulation of extracellular trap-forming neutrophils expressing RORgammat and IL-17*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(5): p. 1276-84.

7. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

7.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Hurley (1989) [19]	4
Tabelle 2: Schweregrad nach Sartorius et al. (2003) [20]	4
Tabelle 3: Mit AI assoziierte Komplikationen.....	5
Tabelle 4: Für immunhistologische Färbung verwendete Primärantikörper	18
Tabelle 5: Für die Western-Blot-Untersuchungen verwendete Materialien	24
Tabelle 6: Puffer	25
Tabelle 7: Geräte	26
Tabelle 8: Patientenbezogene Daten.....	32
Tabelle 9: Quantitative Auszählung der immunhistologisch positiven Zellen pro Gesichtsfeld in perifollikulären und tieferen Infiltraten bei 10 AI-Patienten..	42
Tabelle 10: Quantitative Auszählung der immunhistologisch positiven Zellen in der gesunden Haut.....	43

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunhistologische Färbung mit polyklonalem Antikörper gegen IL-17.....	34
Abbildung 2: Immunhistologische Färbung mit Antikörper gegen NLRP3.....	35
Abbildung 3: Immunhistologische Färbung mit anti-Caspase 1-Antikörper. ...	36
Abbildung 4: Western Blot mit anti-Caspase-1-p10-Antikörper.	37
Abbildung 5: Immunhistologische Färbung mit monospezifischen affinitätsgereinigten Kaninchenantisera gegen S100A8.....	38
Abbildung 6: Immunhistologische Färbung mit monospezifischen affinitätsgereinigten Kaninchenantisera gegen S100A9.....	38
Abbildung 7: Western Blot mit monospezifischen affinitätsgereinigten Kaninchenantiseren gegen S100A8 und S100A9	39
Abbildung 8: Immunhistologische Färbung mit Antikörper gegen CK5/6.....	40
Abbildung 9: Immunhistologische Färbung mit anti-CD1a-Antikörper.	47
Abbildung 10: Immunhistologische Färbung mit anti-CD3-Antikörper.	48
Abbildung 11: Immunhistologische Färbung mit anti-CD4-Antikörper.	49
Abbildung 12: Immunhistologische Färbung mit anti-CD8-Antikörper.	50
Abbildung 13: Immunhistologische Färbung mit anti-CD20-Antikörper.	51
Abbildung 14: Immunhistologische Färbung mit anti-CD56-Antikörper.	52
Abbildung 15: Immunhistologische Färbung mit anti-CD68-Antikörper.	53

7. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 16: Immunhistologische Färbung mit anti-Mastzelltryptase-Antikörper.....	54
Abbildung 17: Immunhistologische Färbung mit anti-Faktor XIIIa-Antikörper.	55
Abbildung 18: Chloracetatesterase-Färbung.....	56
Abbildung 19: Immunhistologische Färbung mit polyklonalem Antikörper gegen IL-17.....	57
Abbildung 20: Immunfluoreszenz-Färbung mit anti-IL17-, anti-CD4- und anti-MPO-Antikörper	58

Die Ergebnisse dieser Arbeit (Abb. 1-8; 10-13; 15; 18-20; Grafik 2) fanden Eingang in die Publikation „Lima, A.L., Karl, I., Giner, T., Poppe, H., Schmidt, M., Presser, D., Goebeler, M. and Bauer, B. (2016), Keratinocytes and neutrophils are important sources of proinflammatory molecules in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*, 174: 514–521. doi:10.1111/bjd.14214“.

8. DANKSAGUNG

Mein besonders herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Matthias Goebeler für die Überlassung des Themas, für die Durchsicht dieser Arbeit, für die wertvollen Verbesserungsvorschläge und insbesondere für die Betreuung während der Erstellung der Arbeit.

Frau Prof. Dr. med. Martina Prelog danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt Herrn Dr. med. Boris Bauer und Frau Dr. med. Dagmar Presser für die Betreuung und Unterstützung bei der Probensammlung.

Ich danke Frau Dr. med. Lidia Poppe und Herrn Dr. med. Heiko Poppe, die mir bei auftretenden Problemen stets hilfreich und aufmunternd zur Seite standen. Danke für die dermatologische und insbesondere für die emotionale Unterstützung.

Frau Dr. med. Tina Giner, Herrn Dr. rer. nat. Ingolf Karl, Herrn Prof. Dr. Marc Schmidt, Helga Sennefelder und Martina Joßberger-Werner möchte ich herzlich für ihre Hilfe bei vielen Fragen, die die praktische Durchführung der Arbeit mit sich brachte, danken.

Bei den Mitarbeiterinnen der histologischen und autoimmunologischen Labore der Universitäts-Hautklinik Würzburg (Andrea Achsnich, Birgit Klingert, Silvana Noll, Christa Knaus, Petra Kosmol, Heike Krenig, Ulrike Kuhn, Maria Kulpa, Nataliya Zabolotna) möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung und für die angenehme Zusammenarbeit herzlich bedanken.

Herzlichen Dank auch an das Programm „Wissenschaft ohne Grenzen“ (Programa Ciências Sem Fronteiras – CNPq/DAAD – Doutorado Integral no Exterior) für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken: meinen Eltern und der Familie für das große Verständnis meine Abwesenheit betreffend, meinen brasilianischen Freunden für die Unterstützung und stets offenen Ohren unabhängig von der Distanz und den deutschen Freunden mit Familien, insbesondere Lidia, Heiko, Renate, Wolfgang, Natalie, Christian (Pater) und Valeria, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Leonhard und Benjamin danke ich schließlich für die entspannenden und erholsamen Tage. Muito obrigada!

9. LEBENSLAUF

Ana Luiza Guimaraes Correa de Araújo Lima,
***05.04.1987 in Fortaleza, Brasilien**
Staatsangehörigkeit: brasilianisch

- SCHULLAUFBAHN: 1994 – 2004
Grundschule und Gymnasium Colégio Antares, Fortaleza, Brasilien
- STUDIUM: 01/2006 – 12/2011
Staatliche Universität Ceará (Universidade Federal do Ceará), Campus do Pici, Fortaleza, Humanmedizin
- PRAKTISCHE JAHRE: 01/2010 – 04/2010
Innere Medizin
Hospital César Cals de Oliveira, Staatliche Universität Ceará, Fortaleza, Brasilien
- 05/2010 – 08/2010
Pädiatrie
Hospital Albert Sabin, Staatliche Universität Ceará, Fortaleza, Brasilien
- 10/2010 – 12/2010
Chirurgie
Universitätsklinikum Gießen
Allgemeinchirurgie; Herz- und Gefäßchirurgie
- 01/2011 – 02/2011
Dermatologie
Universitätsklinikum Gießen
Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
- 03/2011
Dermatologie
Universitätsklinikum Würzburg
Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
- 04/2011 – 06/2011
Gynäkologie und Geburtshilfe
Hospital César Cals de Oliveira, Staatliche Universität Ceará, Fortaleza, Brasilien
- 07/2011
Infektiologie
Universitätsklinikum der Staatlichen Universität Ceará, Fortaleza, Brasilien
- 08/2011
Kardiologie
Hospital Dr. Carlos Alberto Gomes, Staatliche Universität Ceará, Fortaleza, Brasilien

9. LEBENS LAUF

09/2011 – 11/2011

Hausarztpraxis

Fortaleza und Hinterland (Jericoacoara), Brasilien

FAMULATUREN:

08/2006 – 12/2009

**Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der
Staatlichen Universität Ceará, Brasilien**

01/2008 – 02/2008

**Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und
Allergologie**

Universitätsklinikum Würzburg

Onkologische Station

01/2009 – 02/2009

**Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und
Allergologie**

Universitätsklinikum Würzburg

Allgemeinstation

07/2009

**Immunologie und Rheumatologie an der Staatlichen
Universität Sao Paulo, Brasilien**

07/2010

**Hautklinik an der Staatlichen Universität Sao Paulo,
Brasilien**

EXPERIMENTELLE
DOKTORARBEIT:

09/2012 – 01/2015

**Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und
Allergologie, Universitätsklinikum Würzburg**

Thema: „Keratinocyten und neutrophile Granulozyten als
wichtige Quelle entzündungsfördernder Mediatoren bei der
Acne inversa“ (Doktorvater: Prof. Dr. M. Goebeler)

BERUFSERFAHRUNG:

seit 04/2016

**Assistenzärztin an der Klinik für Hautkrankheiten des
Universitätsklinikums Jena**

02/2015 – 03/2016

**Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für
Dermatologie, Allergologie und Venerologie des
Universitätsklinikums Schleswig-Holstein – Campus
Lübeck**

01/2012 - 07/2012

**Landärztin in Fortim und Horizonte (Grundversorgung in
Innerer Medizin und Notfallmedizin), Brasilien**

2007-2010

**Leistungskurslehrerin in Biologie für Abiturienten am
Privatgymnasium Farias Brito, Fortaleza, Brasilien**

9. LEBENSLAUF

PUBLIKATIONEN:

„Keratinocytes and neutrophils are important sources of proinflammatory molecules in hidradenitis suppurativa“ – British Journal of Dermatology (Volume 174, Issue 3, March 2016, Pages 514-521); doi: 10.1111/bjd.14214

„Pemphigoid gestationis: Toward a better understanding of the etiopathogenesis“ - Clinics in Dermatology (Volume 34, Issue 3, May-June 2016, Pages 378-382); doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.010

„Value of BIOCHIP Technology in the Serological Diagnosis of Pemphigoid Gestationis“ – Acta Dermato-Venereologica (Epub ahead of print); doi: 10.2340/00015555-2460

STIPENDIEN:

09/2012 – 01/2015

Stipendiatin des **„Wissenschaft ohne Grenzen“** - Programms für Promovierende (Programa Ciencias Sem Fronteiras – CNPq/DAAD – Doutorado Integral no Exterior)

08/2010 – 02/2011

Stipendiatin des **Erasmus Mundus 17** - Programms an der Justus-Liebig-Universität Gießen

01/2008 – 01/2009

Stipendiatin der **Staatlichen Universität Ceará für Forschung** am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Bolsa de Iniciacao Científica CNPq – Universidade Federal do Ceará)

SPRACHKENNTNISSE:

Portugiesisch (Muttersprache)

Deutsch (C1-Oberstufe 1, verhandlungssicher)

Englisch (verhandlungssicher)

Spanisch (Grundkenntnisse)

Jena, 10.10.2016

