

Aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Eine immunhistologische Charakterisierung
potentieller diagnostischer Biomarker
bei Urtikariavaskulitis und autoinflammatorischen Erkrankungen
der Haut

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hanna Thiathild Bonnekoh

aus Köln

Datum der Promotion:

09. September 2016

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT auf Deutsch/Englisch

1	<u>EINLEITUNG</u>	8
1.1	URTICAE – EIN HÄUFIGES SYMPTOM IN DER KLINISCHEN PRAXIS	8
1.2	URTIKARIA: EIN ÜBERBLICK	8
1.2.1	EPIDEMIOLOGIE, DEFINITION UND KLINISCHES BILD	8
1.2.2	KLASSIFIKATION.....	9
1.2.2.1	Chronische spontane Urtikaria.....	9
1.3	DIFFERENTIALDIAGNOSEN DER URTIKARIA	12
1.4	SYSTEMISCHE ERKRANKUNGEN MIT URTIKARIELEM EXANTHEM.....	12
1.4.1	URTIKARIAVASKULITIS.....	12
1.4.2	AUSGEWÄHLTE AUTOINFLAMMATORISCHE ERKRANKUNGEN DER HAUT	13
1.4.2.1	Cryopyrin-assoziiertes periodisches Syndrom	16
1.4.2.2	Schnitzler-Syndrom.....	19
1.4.2.3	Adulter Morbus Still.....	21
1.5	CHARAKTERISTISCHE KLINISCHE UNTERSCHIEDE URTIKARIELLER HAUTERSCHEINUNGEN BEI CHRONISCHER SPONTANER URTIKARIA, URTIKARIAVASKULITIS UND AUTOINFLAMMATORISCHEN ERKRANKUNGEN DER HAUT.....	22
1.6	HISTOLOGIE UND DIAGNOSTISCHE BIOMARKER BEI CHRONISCHER SPONTANER URTIKARIA, URTIKARIAVASKULITIS UND AUTOINFLAMMATORISCHEN ERKRANKUNGEN DER HAUT	23
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	26
2	<u>METHODEN</u>	27
2.1	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	27
2.1.1	PATIENTEN UND GEWEBEPROBEN	27
2.1.2	MATERIALIEN, REAGENZIEEN UND GERÄTE.....	28
2.1.3	HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN UND ENTPARAFFINIERUNG	31
2.1.4	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG (NACH ROUTINE-STANDARD-PROTOKOLL).....	31
2.1.5	ANFÄRBUNG DER MASTZELLEN	31
2.1.6	IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN.....	32
2.1.7	IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNGEN.....	34
2.2	AUSWERTUNG DER HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN.....	36
2.2.1	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG: SEMIQUANTITATIVE HISTOMORPHOMETRIE	36
2.2.2	FÄRBUNG DER MASTZELLEN: QUANTIFIZIERUNG DURCH ZELLZÄHLUNG	37
2.2.3	IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN.....	38
2.2.3.1	Semiquantitative Histomorphometrie	38
2.2.3.2	Quantifizierung der Färbungen durch Zellzählung	38
2.2.3.3	Quantifizierung der Färbungen durch Planimetrie mittels der Software ImageJ.....	39
2.2.4	IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNGEN.....	39
2.3	PROTEINISOLIERUNG UND PROTEINNACHWEIS	40
2.3.1	PATIENTEN UND GEWEBEPROBEN	40
2.3.2	MATERIALIEN, REAGENZIEEN UND GERÄTE.....	40
2.3.3	DURCHFÜHRUNG DER PROTEINISOLIERUNG.....	41
2.3.4	PROTEINNACHWEIS MITTELS ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	41
2.4	ERFASSUNG UND AUSWERTUNG ERGÄNZENDER PATIENTENDATEN.....	42
2.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG UND DOKUMENTATION	42
3	<u>ERGEBNISSE</u>	43
3.1	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	43
3.1.1	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG.....	43

3.1.2	MASTZELLEN	46
3.1.3	MYELOPEROXIDASE (MPO) ALS MARKER FÜR NEUTROPHILE GRANULOZYTEN	48
3.1.4	INTERLEUKIN-1BETA (IL-1BETA)	50
3.1.5	INTERLEUKIN-6 (IL-6).....	52
3.1.6	INTERLEUKIN-18 (IL-18).....	54
3.1.7	INFLAMMASOMMARKER	56
3.1.7.1	Apoptosis Speck Protein (ASC)	56
3.1.7.2	Caspase-1	58
3.1.7.3	Nucleotide-binding Domain-like Receptor Protein 3 (NLRP3)	60
3.1.8	ANDERE UNTERSUCHTE IMMUNHISTOLOGISCHE MARKER	60
3.1.8.1	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	60
3.1.8.2	Interleukin-17 (IL-17).....	62
3.1.9	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN ZUR ANALYSE DER KOLOKALISATION AUF ZELLULÄRER UND EXTRAZELLULÄRER EBENE	62
3.2	PROTEINNACHWEIS	66
3.2.1	INTERLEUKINE UND CASPASE-1.....	66
3.3	KORRELATIONSANALYSEN	67
3.3.1	IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	67
3.3.2	ZY TOKINKONZENTRATIONEN IN LÄSIONALER HAUT UND ERGÄNZENDE LABORPARAMETER ...	67
4	<u>DISKUSSION</u>	<u>69</u>
4.1	WERTENDE ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	69
4.2	POTENTIELLE BIOMARKER	70
4.2.1	ZELLULÄRES INFILTRAT UND MPO.....	70
4.2.2	INTERLEUKIN-1BETA, INTERLEUKIN-6 UND INTERLEUKIN-18.....	72
4.2.3	ASC.....	75
4.2.4	CASPASE-1	75
4.3	WEITERE UNTERSUCHTE PARAMETER.....	76
4.4	LIMITATIONEN	78
4.5	AUSBlick	79
5	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>81</u>
6	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>89</u>
7	<u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	<u>91</u>
8	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>92</u>
9	<u>PUBLIKATIONS LISTE</u>	<u>93</u>
10	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>94</u>

ABSTRACT auf Deutsch

Einleitung: Urtikariavaskulitis (UV) und autoinflammatorische Erkrankungen der Haut (AIH), wie Cryopyrin-assoziiertes periodisches Syndrom (CAPS), Schnitzler-Syndrom (SchS) und adulter Morbus Still (AOSD), sind seltene Erkrankungen. Das dabei charakteristische urtikarielle Exanthem unterscheidet sich klinisch oft nicht von den Urticae der deutlich häufigeren chronischen spontanen Urtikaria (csU).

Ziel: Ziel der Arbeit ist die Untersuchung läsionaler Haut bei AIH und UV auf potentielle diagnostische Biomarker zur Abgrenzung gegen csU.

Methodik: Es wurden histologische (HE, Toluidinblau als Mastzell-Marker), immunhistologische (Myeloperoxidase [MPO] als Neutrophilen-Marker, Interleukine [IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18], Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF] und die Inflammationmarker Nucleotide-binding Domain-like Receptor Protein 3 [NLRP3], Apoptosis Speck Protein [ASC] und Caspase-1) sowie Immunfluoreszenz- (MPO, Histon H2A, Cathelicidin, DAPI, Interleukine, Avidin-FITC) Färbungen an formalinfixiertem Hautgewebe durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten an läsionaler Haut von Patienten mit SchS (n=9), CAPS (n=3), AOSD (n=1), UV (n=18) und csU (n=10) sowie an gesunden Kontrollen (n=10) und wurden mithilfe (semi-)quantitativer Histomorphometrie analysiert. Eine Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels ELISA für Interleukine und Caspase-1 an kryo-konservierten Hautproben bei SchS (n=6), UV (n=10), csU (n=5) und Gesunden (n=11).

Ergebnisse: Die immunhistologischen Untersuchungen an läsionaler Haut zeigten eine Erhöhung von IL-1 β , IL-6, IL-18, ASC und Caspase-1 sowie VEGF bei AIH und UV im Vergleich zu csU und Gesunden. Der Unterschied von SchS gegenüber csU ($p \leq 0,05$) und Gesunden ($p \leq 0,001$) war für IL-6 und ASC signifikant. Bestätigend hierzu fand sich im ELISA-Proteinnachweis für die Interleukine sowie Caspase-1 eine signifikante Erhöhung bei SchS vergleichend zu csU ($p \leq 0,05$). Durch Immunfluoreszenz-Kolokalisationsfärbungen wurden Mastzellen (IL-1 β , IL-6) und neutrophile Granulozyten (IL-1 β , IL-18) als Interleukin-Produzenten identifiziert. Hinsichtlich der Mastzellendichte bestand kein signifikanter Unterschied. Ein erhöhtes dermales MPO-positives Infiltrat wurde bei AIH und UV im Vergleich zu csU und Gesunden beobachtet, mit

signifikantem Unterschied zwischen SchS zu csU und Gesunden ($p \leq 0,05$). Läsionale Haut von AIH, nicht aber von csU, zeigte Hinweise für das Vorhandensein von Neutrophil Extracellular Traps (NETs).

Schlussfolgerung: IL-1-assoziierte Zytokine und Inflammasomkomponenten sind in läSIONALER Haut bei AIH aufreguliert und werden von Mastzellen (IL-1 β , IL-6) und Neutrophilen (IL-6, IL-18) produziert. IL-1 β und IL-6 wurden neben IL-18, Caspase-1, ASC sowie MPO im Sinne eines Biomarker-Profiles als besonders robuste Marker zur Differenzierung der AIH von csU identifiziert. Die UV nahm eine Stellung zwischen den AIH und der csU ein, hinweisend auf eine mögliche autoinflammatorische Komponente in einer UV-Subpopulation. Diese Ergebnisse sollten an größeren Patientenzahlen weiter untersucht werden.

ABSTRACT in English

Introduction: Urticarial vasculitis (UV) and autoinflammatory skin diseases (AISD) i.e. Cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS), Schnitzler's syndrome (SchS) and Adult Onset Still's Disease (AOSD) are rare diseases. Thereby it is often difficult to distinguish their characteristic urticarial exanthema from hives caused by the more frequent chronic spontaneous urticaria (csU).

Objective: Aim of this study is to examine lesional skin of patients with AISD and UV for potential diagnostic biomarkers allowing to differentiate these patients from csU patients.

Methods: Histological (HE, toluidine blue for mast cells), immunohistological (myeloperoxidase [MPO] for neutrophils, interleukins [IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18], vascular endothelial growth factor [VEGF] and the inflammasome markers nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 [NLRP3], apoptosis speck protein [ASC] and caspase-1) as well as immunofluorescence (MPO, histone H2A, cathelicidin, DAPI, interleukins, Avidin-FITC) stainings of formalin-fixed lesional skin were performed. Lesional skin of patients with SchS (n=9), CAPS (n=3), AOSD (n=1), UV (n=18) and csU (n=10) as well as healthy controls (n=10) was examined and analyzed by (semi-)quantitative histomorphometry. Determination of protein concentration was performed by ELISA for interleukins and caspase-1 in cryo-preserved skin samples for SchS (n=6), UV (n=10), csU (n=5) and controls (n=11).

Results: Immunohistological examination of lesional skin showed an increase of IL-1 β , IL-6, IL-18, VEGF, ASC and caspase-1 for AISD and UV compared to csU and controls. There was a significant difference for IL-6 and ASC between SchS and both csU ($p \leq 0,05$) and healthy controls ($p \leq 0,001$). ELISA confirmed a significant difference for interleukins and caspase-1 between SchS and csU ($p \leq 0,05$). Immunofluorescence-colocalization identified mast cells (IL-1 β , IL-6) and neutrophils (IL-1 β , IL-18) as interleukin producers. No statistical significance was observed for mast cell numbers. High neutrophilic infiltration in AISD and UV compared to csU and healthy controls was demonstrated with significant difference between SchS and both csU and controls

($p \leq 0.05$). AISD lesional skin showed structures indicative for neutrophil extracellular traps (NETs) while csU did not.

Conclusion: IL-1-related cytokines and inflammasome components are upregulated in lesional AISD skin and produced by mast cells (IL-1 β , IL-6) and neutrophils (IL-6, IL-18). We identified IL-1 β and IL-6 as especially robust markers besides IL-18, caspase-1, ASC and MPO as a biomarker profile to differentiate AISD from csU. UV took an intermediate position between AIH and csU, indicating a possible autoinflammatory component in a UV-subpopulation. These results should be further explored in larger patient numbers.

1 EINLEITUNG

1.1 Urticae – ein häufiges Symptom in der klinischen Praxis

Quaddeln (Urticae) gehören zu den häufigsten Primäreffloreszenzen der Haut, mit denen sich Patienten in der täglichen klinischen Praxis der Allergologie, Dermatologie und Pädiatrie vorstellen.^{1,2} Es handelt sich um oberflächliche, flüchtige, hautfarbene bis rötliche Hautschwellungen unterschiedlicher Größe, die oft mit Juckreiz einhergehen und sich meist innerhalb von Minuten (min) bis zu einigen Stunden (h) zurückbilden.³ Sie treten beispielsweise durch Kontakt mit Brennnesseln oder als Reaktion auf einen Insektenstich auf.⁴ Urticae sind wesentlicher Bestandteil einer der häufigsten Hauterkrankungen, der Urtikaria, welche im Volksmund auch Nesselsucht genannt wird.^{2,3} Die urtikariellen Hautveränderungen können aber auch Ausdruck eher seltener schwerer Krankheitsbilder wie Urtikariavaskulitis (UV) und autoinflammatorischer Erkrankungen der Haut (AIH) sein, deren korrekte Diagnosestellung aufgrund von unzureichenden klinischen Unterscheidungsmerkmalen und Unkenntnis oft stark verzögert ist.^{1,5}

1.2 Urtikaria: ein Überblick

1.2.1 Epidemiologie, Definition und klinisches Bild

Nahezu einer von vier Menschen leidet in seinem Leben mindestens einmal an Urtikaria, wobei der Hauptmanifestationsgipfel im mittleren Erwachsenenalter mit Bevorzugung des weiblichen Geschlechts liegt.² Es handelt sich um eine Gruppe von uneinheitlichen Krankheitsbildern, denen das Vorhandensein von Urticae und in 30 bis 50 % der Fälle das zusätzliche oder selten auch isolierte Auftreten von Angioödemen gemeinsam ist.^{2,3} Die Quaddeln können begleitet von einem lokalen Reflexerythem, Juckreiz und Brennen auftreten (**Abbildung (Abb.) 1A**).³ Bei der Entstehung dieser Symptomatik spielt die Aktivierung und Degranulation der Mastzellen mit konsekutiver Ausschüttung von Histamin und anderen Mediatoren die entscheidende Rolle.⁶ Insbesondere ist den Quaddeln ihre Flüchtigkeit charakteristisch: die Primäreffloreszenzen bilden sich am Entstehungsort innerhalb von 1-24 h zurück.³ Beim Angioödem kommt es zur Schwellung der tieferen Dermis/Subcutis (**Abb. 1B**), welche meist eher von Schmerzen als von Juckreiz begleitet wird.^{3,7} Dabei findet Histaminausschüttung statt, an der Schmerzentstehung ist vorrangig das Gewebshormon Bradykinin beteiligt.⁷ Die komplette Rückbildung kann bis zu 72 h

dauern.³ Häufig sind beim Angioödem die Schleimhäute betroffen, bei Befall dieser im Bereich der Atemwege kann es zu lebensbedrohlichen Obstruktionen kommen.³ Die Urtikaria ist nicht nur deshalb eine durchaus ernst zu nehmende Erkrankung, sondern auch, weil sie mit Schlafstörungen, Angstzuständen oder Depressionen assoziiert ist, und somit zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität führt.²

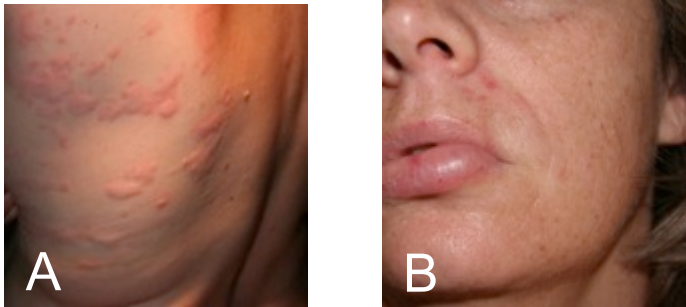


Abb. 1: Klinisches Bild A) der Urtikaria und B) des Angioödems. Bildautorschaft: mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe Marcus Maurer Allergie-Centrum-Charité, Berlin

1.2.2 Klassifikation

Die Urtikaria wird nach aktueller Leitlinie in eine spontane Form und zahlreiche unterschiedlich induzierbare Formen unterteilt, die sich in physikalische und andere induzierbare Subgruppen gliedern (**Tabelle (Tab.) 1**).³

Spontane Urtikaria	Induzierbare Urtikaria	
	Physikalische Urtikaria	Andere induzierbare Urtikariaformen
akute spontane Urtikaria (Dauer < sechs Wochen)		
chronische spontane Urtikaria (csU) (Dauer > sechs Wochen)	Kältekontakturtikaria	Aquagene Urtikaria
	Wärmekontakturtikaria	Cholinergische Urtikaria
	Verzögerte Druckurtikaria	Kontakturtikaria
	Lichturtikaria	Anstrengungs- induzierte Urtikaria/ Anaphylaxie
	Urticaria factitia/symptomatischer urtikarieller Dermographismus	
	Vibratorische Urtikaria/Angioödem	

Tab. 1: Klassifikation der Urtikaria (adaptiert nach Zuberbier et al.)³

1.2.2.1 Chronische spontane Urtikaria

Definition

Die chronische spontane Urtikaria (csU) ist definiert als eine Urtikaria-Unterform (**Tab. 1**), die scheinbar ohne Auslöser („aus heiterem Himmel“) auftritt und im Gegensatz zur akuten Form mehr als sechs Wochen besteht. Ursachen für die csU können chronische

Infekte, Nahrungs- und Arzneimittelunverträglichkeiten und autoimmune/autoreaktive Prozesse sein.⁸

Die Lebenszeitprävalenz der csU beträgt 1,8 %.⁹ Die Angaben zu den Häufigkeiten der Ursachen variieren in der Literatur. So liegen Arzneimittelunverträglichkeiten bei 4 bis 9 % der Patienten vor.^{10,11} Nahrungsmittelunverträglichkeiten als Ursache finden sich bei bis zu ca. 20 % der csU Patienten.¹¹ Die Angaben zu chronischen Infekten schwanken. In einer Studie zu csU Patienten in China lagen bei 7,3 % eine chronische Gastritis, bei 2,7 % eine chronische Hepatitis C, bei 1,6 % eine Tonsillitis oder eine Otitis media sowie bei 0,7 % der Patienten eine Urethritis oder Vaginitis vor.¹¹ Andere Studien zeigten das Auftreten von Infekten bei bis zu 31 % der Patienten mit chronischer Urtikaria.¹² Autoimmune/autoreaktive Prozesse im Sinne von beispielsweise Schilddrüsen-Auto-Antikörpern (AK) oder IgG-anti-IgE-Auto-AK zeigen sich bei etwa 40 bis 45 % der csU Patienten.¹³

Pathophysiologie

Pathophysiologische Grundlage der Urtica ist die Aktivierung und Degranulation von in der Haut residenten Mastzellen.^{6,14} Ein wesentlicher Mechanismus der Rezeptoraktivierung ist die Bindung von Immunglobulin E (IgE) an hochaffine FcεRI-Rezeptoren auf der Mastzelle mit nachfolgender Quervernetzung.^{6,14} Daneben gibt es eine Mastzellaktivierung über IgG-anti-IgE-Auto-AK und IgG-anti-FcεRI-Rezeptoren-AK.¹⁴ Nach Durchlaufen intrazellulärer Signalkaskaden folgt die Ausschüttung bzw. Synthese proinflammatorischer Mastzell-Mediatoren wie Histamin, Prostaglandine, Leukotriene und Zytokine.^{6,15} Dadurch kommt es zur Gefäßerweiterung und konsekutiven Ödembildung.⁶ Durch Chemotaxis infiltrieren eosinophile und/oder neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T-Helferzellen.^{3,14} Freigesetztes Histamin bindet an H1-Rezeptoren der freien Hautnervenendigungen mit Juckreiz als Folge.¹⁶

Diagnostik und Ätiologie

In der Regel handelt es sich bei der Urtikaria um eine Blickdiagnose. Selbstverständlich erfolgt im Rahmen der Diagnostik der Urtikaria eine ausführliche Anamnese sowie eine allgemeine körperliche Untersuchung.³ Handelt es sich um eine akute spontane Urtikaria, sind Folgeuntersuchungen gemäß Leitlinie nicht notwendig, da eine Spontanheilung in mehr als 90 % der Fälle zu erwarten ist.³ Liegt eine csU vor, so werden befundadaptiert zur Ursachensuche ergänzende Untersuchungen durchgeführt

(Tab. 2).³ Als mögliche Ursachen der csU sind wie bereits oben erwähnt die drei Gruppen autoimmune/autoreaktive Prozesse, Infekte und Intoleranz/Allergie zu nennen, wobei es sich bei letztgenannter Ursache hauptsächlich um Nahrungsmittelintoleranzen handelt und Allergien sehr selten ursächlich für eine csU sind.³

Mögliche Ursachen der csU	Infekte/Infektionen	Intoleranz/Allergie	Autoimmune/ autoreaktive Prozesse
Diagnostik	<ul style="list-style-type: none"> - (Differential-) Blutbild - Bestimmung von C-reaktivem Protein (CRP), Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) - Suche nach Infektherd (z.B. Infektion mit <i>Helicobacter pylori</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - pseudo-allergenarme Karenz-Diät (Nahrungsmittelintoleranz) - Untersuchung auf Typ-I-Allergie (Prick-Test, spezifisches IgE) 	<ul style="list-style-type: none"> - Schilddrüsenautoantikörper und Schilddrüsenhormone - autologer intrakutaner Serumtest (ASST) (autoreaktive Urtikaria)

Tab. 2: Untersuchungen zur Diagnostik der csU bezüglich potentieller Ursachen³

Therapie

Bei der csU sollte zunächst eine Auslöser meidende Strategie (z.B. pseudoallergene Diät) oder eine Elimination der Ursache (z.B. Therapie eines Infektherdes) angestrebt werden.³ Liegt jedoch keine fassbare Ursache für das Auftreten der Urtikaria vor, ist eine symptomatische Therapie zu empfehlen.³ Hier stellen die nicht-sedierenden H₁-Antihistaminika der zweiten Generation leitliniengerecht die Therapie der ersten Wahl dar.³ Bei nicht ausreichendem Ansprechen auf die Standarddosis des Antihistaminikums, welches dauerhaft und nicht bedarfsweise eingenommen werden soll, kann die Dosierung bis auf das Vierfache gesteigert werden.³ Bei Unwirksamkeit ist dann als Thirdline-Therapie die subkutane Omalizumab-Medikation zugelassen.³ Andere, wenn auch nicht zugelassene, Thirdline-Therapieoptionen sind Montelukast und Ciclosporin.³

Auf eine Therapie mit der Standarddosis nicht-sedierender H₁-Antihistaminika sprachen in einer Studie 44 % der n=390 Urtikaria-Patienten, in einer anderen Studie nur ca. 10 % der csU Patienten gut an.^{17,18} In Arbeiten zur Aufdosierung des Antihistaminikums bis auf das Vierfache der Standarddosis zeigte sich bei 5 bis 75 % der Patienten ein gutes Ansprechen.^{17,19} Unter Omalizumab-Therapie fand sich bei bis zu 70,4 % der H₁-Antihistaminika-resistenten csU Patienten eine Beschwerdefreiheit.²⁰

1.3 Differentialdiagnosen der Urtikaria

In den meisten Fällen handelt es sich beim Auftreten von persistierenden Urticae um eine csU.² Bei urtikariellen Hauterscheinungen, die nicht ausreichend auf Antihistaminika ansprechen und mit Symptomen wie Gelenkschmerzen, Fieber und allgemeiner Abgeschlagenheit einhergehen, sollten seltene Differentialdiagnosen der Urtikaria in Betracht gezogen werden.¹ Hier sind die systemischen Krankheitsbilder UV und die Gruppe der AIH zu nennen.⁵ Aufgrund ihrer Seltenheit und der damit verbundenen Unkenntnis sowie der unzureichenden klinischen Unterscheidungskriterien dieser ernstzunehmenden Erkrankungen kann es zu verzögerter Diagnosestellung und damit zu schweren Krankheitsfolgen kommen.¹

1.4 Systemische Erkrankungen mit urtikariellem Exanthem

1.4.1 Urtikariavaskulitis

Epidemiologie, Definition und klinisches Bild

Als eine im Vergleich zur csU relativ seltene Erkrankung manifestiert sich die Urtikariavaskulitis (UV) definitionsgemäß klinisch mit rezidivierenden urtikariellen Effloreszenzen, die charakteristischerweise länger als 24 h bestehen.²¹ Die oft mit Brennen und Schmerzen verbundenen Hauterscheinungen können hämorrhagisch sein und heilen häufiger als Hyperpigmentierungen ab.²¹ In bis zu 20 % der Biopsien aus läsionaler Haut bei klinischer Verdachtsdiagnose einer chronischen Urtikaria können sich Zeichen der UV finden lassen.²¹ Histologisch zeigt sich bei UV meist das Bild einer leukozytoklastischen Vaskulitis.²¹ Vor allem erkrankt das weibliche Geschlecht im mittleren Lebensalter.²¹ Neben Gelenksbeschwerden können Entzündungssymptome an anderen Organsystemen (z.B. Augen, Atemtrakt, Magen-Darm-Trakt, Nieren) und Allgemeinsymptome (z.B. Müdigkeit, Schwäche, Fieber) mit höherer Inzidenz bei der hypokomplementämischen Variante auftreten.²¹ Assoziationen von UV unter anderem mit körperlicher Anstrengung, Medikamenteneinnahme, Infektionskrankheiten und Kollagenosen (Lupus erythematoses) sind bekannt; meist wird jedoch keine Ursache der Erkrankung gefunden.²¹⁻²³

Diagnostik und Ätiologie

Die eindeutige Diagnosestellung der UV erfolgt histologisch aus einer Biopsie läsionaler Haut durch Nachweis einer leukozytoklastischen Vaskulitis.²¹ Hierbei handelt es sich

vermutlich um eine auf einer Immunkomplex-Reaktion basierenden Zersetzung der kleinen Gefäße mit Endothelschwellung, Zellnekrosen und Fibrinablagerungen; die Leukozytoklasie beschreibt die begleitende charakteristische Fragmentierung der neutrophilen Granulozyten.^{21,24}

Pathophysiologie

Eine Immunkomplex-Reaktion (Typ-III-Immunreaktion) wird als Pathomechanismus der UV vermutet.²⁴ Bei einem Teil der Patienten sind zirkulierende Immunkomplexe im Blut nachweisbar.²¹ Im Sinne eines sog. Komplementverbrauches können die Serum-Spiegel von C3 und C4 erniedrigt sein; so wird zwischen normokomplementämischer und hypokomplementämischer UV unterschieden.²² Letztere ist seltener und auch als Sonderform unter dem Begriff hypokomplementämisches UV-Syndrom (HUVS) bekannt.²⁵⁻²⁷ Die initiale Ablagerung von C3 und Immunkomplexen in postkapillären Venolen zunächst klinisch gesunder Haut mit nachfolgender Komplementaktivierung wurde beschrieben.²⁴ Die in der Haut abgelagerten Komplement-Komponenten tragen möglicherweise zu Chemotaxis für neutrophile und eosinophile Granulozyten, Mastzelldegranulation und Gefäßdilatation bei.^{21,24} Es gibt somit begrenzte Erklärungsansätze zur Pathophysiologie der UV, vieles ist jedoch ungeklärt.

Therapie

Zur Behandlung der UV können bei milden Formen Antihistaminika und Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) zur Symptomlinderung eingesetzt werden.²¹ Bei schwereren Verläufen sind folgende Therapieoptionen - mit jedoch relevanten Nebenwirkungsprofilen - beschrieben: systemische Steroide, Colchicin, Hydroxychloroquin, Dapson, Methotrexat (MTX), Azathioprin oder Ciclosporin A.²¹ Neue Therapieerfolge sind in Einzelfällen für Omalizumab, Canakinumab und Anakinra publiziert, was insgesamt auf eine komplexere und heterogene Pathophysiologie hindeutet.²⁸⁻³⁰

1.4.2 Ausgewählte autoinflammatorische Erkrankungen der Haut

Die AIH sind Ausdruck eines intermittierenden oder chronischen multisystemischen Entzündungsgeschehens, wobei die Haut neben inneren Organsystemen und Bewegungsapparat häufig betroffen ist.³¹ Der Begriff der autoinflammatorischen

Syndrome wurde im Jahr 1999 erstmals verwendet, um diese Erkrankungsgruppe von anderen Entitäten und Syndromen allergischer, autoimmuner oder immundefizienzgeprägter Genese abzugrenzen.^{32,33} Die AIH sind durch Entzündungsepisoden ohne Nachweis hochtitriger Autoantikörper oder antigen-spezifischer T-Zellen charakterisiert.^{32,33} Grundlage dieser Erkrankungen ist eine pathologisch gesteigerte Entzündungsreaktion, die von den Zellen des angeborenen Immunsystems wie Granulozyten, Monozyten und Makrophagen getragen wird.³⁴ Dabei spielen proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und IL-18 eine entscheidende Rolle.^{34,35} Das erworbene Immunsystem scheint nur nachgeordnet beteiligt zu sein.³⁴ Zu den AIH werden sowohl monogenetische, als auch polygenetische Syndrome gezählt.³² Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem i) monogenetischen Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrom (CAPS) - mit den drei Unterformen familiäre Kälteurtikaria (FCAS), Muckle-Wells-Syndrom (MWS) und Chronisch-infantiles-neurologisch-kutanes-artikuläres Syndrom (CINCA/NOMID) - sowie ii) dem Schnitzler-Syndrom (SchS) und iii) dem adulten Morbus Still (AOSD), wobei letztere polygenetisch sind. CAPS, SchS und AOSD ist das Auftreten von urtikariellen Hautveränderungen gemein, weshalb sie relevante Differentialdiagnosen der csU darstellen. Die wesentlichen Charakteristika dieser Krankheitsbilder aus der Gruppe der AIH sind im Folgenden (**Tab. 3, 4**) zusammengefasst.

Monogenetische AIH	CAPS		
	Krankheitsschwere		
	LEICHT		SCHWER
	←—————→		
	FCAS	MWS	CINCA/NOMID
Erkrankungsgruppe	hereditäres Fiebersyndrom		
Gen	NLRP3		
Protein	NLRP3/Cryopyrin		
Erbgang	autosomal dominant	autosomal dominant	autosomal dominant/ de novo
Lebensalter zu Erkrankungsbeginn	<1. Lebensjahr	variabel	<1. Lebensmonat
Dauer der rekurrenden Inflammations-/Fieberepisoden	<1 Tag	1 bis 2 Tage oder chronisch	chronisch
Haut-/Schleimhautbeteiligung	urtikarielles Exanthem, kälteinduziert, Konjunktivitis bei Uveitis	urtikarielles Exanthem, Konjunktivitis bei Uveitis	urtikarielles Exanthem, Konjunktivitis bei Uveitis
Skelettbeteiligung	Arthralgien		
ZNS-Beteiligung	Kopfschmerz	Taubheit	Taubheit, Meningitis, Optikusatrophie, mentale Retardierung
Sonstige Organbeteiligung	Uveitis, Lymphadenopathie, Splenomegalie	Amyloidose, Uveitis, Lymphadenopathie, Splenomegalie	Uveitis, Lymphadenopathie, Splenomegalie

Tab. 3: Übersicht über die Charakteristika der monogenetischen AIH: FCAS, MWS und NOMID/CINCA als Unterformen des CAPS (adaptiert nach Stojanov et al. sowie nach Kümmerle-Deschner et al.)^{35,36}

Polygenetische AIH	SchS	AOSD
Erkrankungsgruppe	idiopathisches Fiebersyndrom	idiopathisches Fiebersyndrom
Gen	komplex	komplex
Protein	-	-
Erbgang	unbekannt	unbekannt
Lebensalter zu Erkrankungsbeginn	Erwachsenenalter (um ca. 50. Lebensjahr)	variabel, besonders junge Erwachsene
Dauer der rekurrenden Inflammations-/Fieberepisoden	variabel	variabel
Haut-/Schleimhautbeteiligung	urtikarielles Exanthem	lachsfarbenes, makulopapulöses bis urtikarielles Exanthem
Skelettbeteiligung	Arthralgien, Knochenschmerzen	Arthralgien, Arthropathien, Minderwuchs
ZNS-Beteiligung	Kopfschmerz	Kopfschmerz, Meningitis
Sonstige Organbeteiligung	monoklonale IgM-Gammopathie, AA-Amyloidose, lymphoproliferative Erkrankungen; Lymphadenopathie, Splenomegalie	Lymphadenopathie, Splenomegalie

Tab. 4: Übersicht über die Charakteristika der polygenetischen AIH: SchS und AOSD (adaptiert nach Stojanov et al.)³⁵

1.4.2.1 Cryopyrin-assoziiertes periodisches Syndrom

Epidemiologie, Definition und klinisches Bild

Das CAPS gehört mit einer Inzidenz von ca. ein bis drei Patienten auf eine Million Menschen zu den sehr seltenen Krankheitsbildern.³⁶ Die drei unterschiedlichen Formen des CAPS (**Tab. 3**) haben einen autosomal-dominant variabel penetrant vererbten Gendefekt des Nucleotide-binding Domain-like Receptor Protein 3 (NLRP3) gemeinsam.^{37,38} Das CAPS hat je nach Unterform eine unterschiedliche Krankheitsaktivität (**Tab. 3**): die FCAS zeigt sich meist mit milder Symptomatik, das MWS weist eine moderate Klinik auf, und schwerste Symptome sind bei NOMID/CINCA bekannt.³⁶ In dem Spektrum dieser Erkrankungen zeigt sich das klinische Bild neben dem chronisch-persistierenden urtikariellen Exanthem (**Abb. 2**) variabel mit teils täglichen Allgemeinsymptomen (Müdigkeit, Schwäche, Kopf- und Bauchschmerzen, Fieber, muskuloskelettale und Augenbeschwerden).³⁶ Auftreten können gravierende Folgeerkrankungen der inneren Organe (AA-Amyloidose mit konsekutiver Niereninsuffizienz), des Skeletts (Wachstumsretardierung, Osteopenie, Knochen- und Gelenkfehlbildungen) und des zentralen Nervensystems (sensineurale Taubheit, Visusverlust, kognitive Beeinträchtigungen) (**Tab. 3**).³⁶



Abb. 2: Urtikarielles Exanthem bei MWS Patient. Bildautorschaft: mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe Marcus Maurer Allergie-Centrum-Charité, Berlin

Diagnostik

CAPS tritt meist bereits bei Patienten im frühen Kindesalter auf, muss aber aufgrund des Vorhandenseins von milden Krankheitsverläufen und der Seltenheit bzw. Unbekanntheit dieser Diagnose ebenso bei Patienten im Erwachsenenalter differentialdiagnostisch bedacht werden.³⁶ Ein vom Patienten geführtes Symptomtagebuch sowie das Ausfüllen standardisierter Fragebögen unterstützen die korrekte Diagnosestellung.³⁶ Bei verdächtigem klinischen Befund in der körperlichen

Untersuchung und entsprechender (Familien-)Anamnese sollten die folgenden labormedizinischen Untersuchungen durchgeführt werden: CRP als unspezifischer Entzündungsmarker, Serum-Amyloid A (SAA) bei Verdacht auf Amyloidose und als laborchemischer Marker der klinischen Aktivität unter Therapie, sowie S100A12 als allgemeiner Entzündungs-Surrogatmarker und Therapieverlaufskontrollparameter.^{39,40} Bei positiven Entzündungsmarkern im Blut folgt die meist zielführende molekulardiagnostische Analyse auf einen NLRP3-Gendefekt.³⁶ Symptomadaptiert sind weitere laborchemische und apparative Untersuchungen durchzuführen. Bei negativer genetischer Analyse, was bis zu 40 % der Patienten betrifft, sind nach „The Eurofever clinical diagnostic/classification criteria“ für die Diagnose CAPS erforderlich: „das Auftreten typischer Fieberepisoden ohne Vorhandensein rekurrerender Infekte oder anderer Komorbiditäten, die spezifischen klinischen Symptome urtikarielles Exanthem, Konjunktivitis und sensineuronale Taubheit, sowie die Abwesenheit von exsudativer Pharyngitis und Bauchschmerz“.^{36,41} Die Unterscheidung zwischen FCAS, MWS und NOMID/CINCA als CAPS-Unterformen kann mittels klinischer Diagnosekriterien erfolgen (**Tab. 3**). In den Fällen, wo eine exakte Zuordnung nicht möglich ist, spricht man von Übergangsformen (sog. Overlap-Syndrome).^{36,42} Insgesamt sind bislang keine sicheren bzw. allgemeingültigen Diagnosekriterien für die exakte Abgrenzung der CAPS-Unterformen FCAS, MWS und NOMID/CINCA verfügbar.

Pathophysiologie

CAPS beruht auf einer Mutation des Cryopyrin-Protein codierenden NLRP3-Gens und gilt als Modell der hereditären periodischen Fiebersyndrome.^{37,38} Das Protein gehört zu den NOD-like-Rezeptoren (NLR) und spielt eine Schlüsselrolle bei der Erkennung von zellulären Gefahrensignalen und der konsekutiven Immunantwort.⁴³ Cryopyrin bildet zusammen mit Apoptosis Speck Protein (ASC) und Pro-Caspase-1 das Inflammasom.⁴⁴ Hierbei handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, der beim Gesunden entweder exogen durch Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs, z.B. mikrobielle Komponenten), Danger-associated molecular patterns (DAMPs, z.B. Uratkristalle) oder endogen (z.B. Kalium-Ausstrom bei Zelltod) aktiviert wird (**Abb. 3**).^{44,45} Da das Protein Cryopyrin aufgrund der NLRP3-Genmutation bei CAPS überaktiviert ist, kommt es unabhängig von exogenen PAMPs und DAMPs zur pathologisch verstärkten und spontanen Aktivierung des Inflammasoms.^{44,45} Dabei läuft folgende Reaktionskaskade ab: das überaktivierte NLRP3-Protein interagiert mit ASC, das daraufhin mit Pro-

Caspase-1 reagiert.^{44,46} Die nun durch die Interaktion von ASC und Procaspase-1 in die aktive Form umgewandelte Caspase-1 überführt die Interleukin-Vorformen Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 in die aktiven Zytokine IL-1 β und IL-18 (**Abb. 3**).^{44,46} Pro-IL-1 β wird abhängig von Nuclear factor kappa B über die vorausgehende Stimulation von Toll-like Rezeptoren gebildet.^{44,45} Diese Prozesse finden vorrangig in Monozyten des Blutes und in Gewebsmakrophagen statt.⁴⁷

IL-1 β vermittelt im Körper die Synthese von unter anderem Cyclooxygenase 2, Phospholipase A2, induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthase, Prostaglandin E2, plättchenaktivierendem Faktor und Stickstoffmonoxid.⁴⁷ Hierdurch entstehen Symptome wie Fieber, Vasodilatation, Hypotension und erhöhte Schmerzempfindlichkeit.⁴⁷ Außerdem bewirkt IL-1 β eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen an beispielsweise mesenchymalen oder Endothelzellen sowie die Produktion anderer Zytokine wie IL-6 zur Extravasation immunkompetenter Zellen.^{47,48} Weiterhin ist IL-1 β an der Angiogenese beteiligt.⁴⁹ IL-18 spielt bei der TH1- und TH2-Antwort eine Rolle und ist dabei an der zellulären sowie humoralen Immunität beteiligt.^{47,50} Auch steigert IL-18 die Aktivität natürlicher Killerzellen.⁴⁷

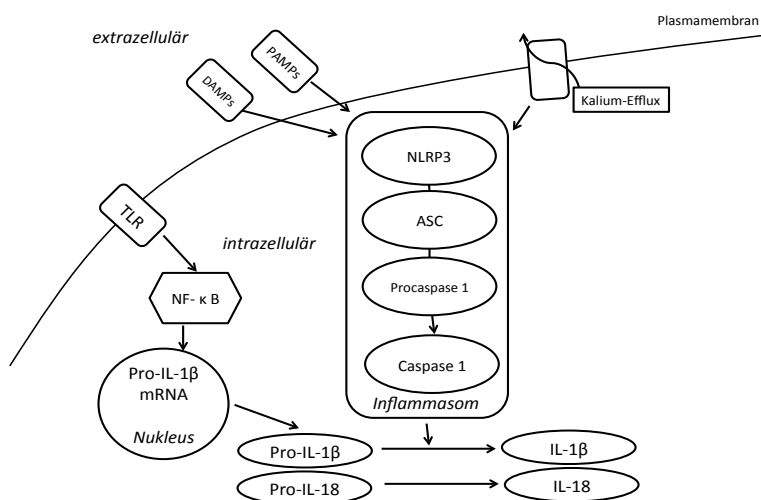


Abb. 3: Die NLRP3 - Inflammasomreaktion (adaptiert nach Krause et al.)⁴⁵

Therapie

Die Therapie des CAPS beschränkte sich in der Vergangenheit auf allgemein entzündungshemmende Medikamente wie NSAR, Glukokortikoide und Antihistaminika.³⁶ Dieser Therapieansatz war jedoch in seiner Wirksamkeit begrenzt.³⁶ Ein anhaltender Rückgang von Symptomatik und Entzündungsreaktion wurde dann erfolgreich durch die IL-1-Antagonisten Canakinumab (für CAPS zugelassen), Anakinra

(für CAPS zugelassen) und Riloncept (für FCAS und MWS nur in den USA zugelassen) erreicht.⁵¹⁻⁵⁴ Die IL-1-Antagonisten können auch einen günstigen Einfluss auf assoziierte Folgeerkrankungen wie die Beeinträchtigung des Hörvermögens und das Amyloidoserisiko nehmen.⁵⁵⁻⁵⁸

1.4.2.2 Schnitzler-Syndrom

Epidemiologie, Definition und klinisches Bild

Das SchS gehört mit weltweit ca. 300 Fallbeschreibungen zu den sehr seltenen Krankheiten.⁵⁹ Männer sind etwas häufiger als Frauen betroffen, der Hauptmanifestationsgipfel liegt im 5. Lebensjahrzehnt.⁶⁰ Das Syndrom ist durch ein chronisches rezidivierendes urtikarielles Exanthem (**Abb. 4**) und eine monoklonale Gammopathie (IgM, seltener IgG) definiert.⁵⁹ Begleitend können Gelenkbeschwerden, Knochen- und Muskelschmerzen, Fieberschübe sowie geschwollene Lymphknoten auftreten.⁵⁹ Bei 15 bis 20 % der SchS Patienten kommt es zu lymphoproliferativen Erkrankungen wie Multiplem Myelom oder Morbus Waldenström; in Einzelfällen ist das Auftreten einer AA-Amyloidose beschrieben.⁵⁹⁻⁶¹



Abb. 4: Urtikarielles Exanthem bei SchS Patientin. Bildautorschaft: mit freundlicher Genehmigung der Arbeitsgruppe Marcus Maurer Allergie-Centrum-Charité, Berlin

Diagnostik

Die Diagnosestellung des SchS erfolgt durch die Strasbourg-Kriterien (**Tab. 5**): nach Ausschluss anderer Erkrankungen müssen jeweils die beiden Hauptkriterien chronisches urtikarielles Exanthem und monoklonale Gammopathie sowie bei monoklonaler Gammopathie vom Typ IgM zusätzlich mindestens zwei Nebenkriterien und bei monoklonaler Gammopathie Typ IgG mindestens drei Nebenkriterien erfüllt sein.⁵⁹ Eine sog. wahrscheinliche Diagnose wird gestellt, wenn die beiden Hauptkriterien und zusätzlich bei Typ IgM mindestens ein Nebenkriterium und bei Typ IgG mindestens zwei Nebenkriterien erfüllt sind.⁵⁹ Die Diagnostik erfordert ausführliche

Anamnese, klinische Untersuchung, Laboruntersuchungen des Blutes (CRP, Blutbild, Immunfixation) und Urins, ggf. eine Hautbiopsie sowie weitere befundadaptierte apparative Untersuchungen wie Knochenszintigrafie und Magnetresonanztomografie.⁵⁹

Hauptkriterien	- chronisches urtikarielles Exanthem - monoklonale Gammopathie (IgM oder IgG)
Nebenkriterien	- wiederkehrendes Fieber (> 38 Grad Celsius (°C)), ohne auffindbare andere Ursache - Veränderungen im Knochenaufbau festgestellt mittels Knochenszintigrafie, MRT oder Erhöhung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase - neutrophilenreiches Zellinfiltrat in der Hautbiopsie - Leukozytose oder CRP-Erhöhung

Tab. 5: *Strasbourg-Kriterien zur Diagnostik des SchS (adaptiert nach Simon et al.)*⁵⁹

Pathophysiologie

Die Ursachen und die Pathophysiologie des SchS sind letztlich weitgehend ungeklärt. Es wurde bei SchS gezeigt, dass mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) *ex vivo* auf Stimulation hin vermehrt IL-1 β und IL-6 produzieren.⁶² Nach Anakinra-Therapie ließ sich bei zwei SchS Patienten eine Verringerung der IL-1 β - und IL-6-Produktion der PBMC beobachten.⁶³ Eine erhöhte IL-18-Serum-Konzentration wurde bei einigen SchS Patienten festgestellt.^{64,65} Dies deutet darauf hin, dass es sich beim SchS pathophysiologisch um eine überschießende Inflammation handelt. In diesem Sinne konnte eine Inflammation-Dysfunktion in PBMC eines SchS Patienten nachgewiesen werden.⁶⁶ Dabei zeigte sich im Vergleich zur gesunden Kontrolle eine deutliche Überexpression des - für die Inflammationstimulation notwendigen plasmamembranständigen - P2X₇-Rezeptors in den PBMCs sowie eine erhöhte spontane und Lipopolysaccharid-induzierte IL-1 β -Sekretion, mit Normalisierung nach Prednison-Therapie.⁶⁶ Auch die klinischen Ähnlichkeiten des SchS zu CAPS sprechen für eine autoinflammatorische Genese. In Einzelfällen wurden SchS Patienten mit einer Mutation (Polymorphismus bzw. somatische Mutation) im NLRP3-Gen beschrieben.⁶⁷⁻⁶⁹

Therapie

Für SchS gibt es keine zugelassene Therapie. Bei Patienten mit definitivem oder wahrscheinlichem SchS wird - bei beeinträchtigter Lebensqualität und dauerhafter Erhöhung der Entzündungsparameter - der IL-1 Antagonist Anakinra empfohlen, der sich in Einzelfallberichten und Patientenkohorten mit SchS als erfolgreiche Therapieform erwies.⁵⁹ Ebenso stellen Rilonacept und Canakinumab effektive

Therapieoptionen dar.^{70,71} Bei Nichtansprechen kommt eine Behandlung mit dem Anti-IL-6-AK Tocilizumab in Betracht.^{59,72}

1.4.2.3 Adulter Morbus Still

Epidemiologie, Definition und klinisches Bild

Mit einer Inzidenz von ein bis drei Fällen pro eine Million Einwohner gehört der AOSD zu den seltenen Krankheitsbildern, wobei das weibliche Geschlecht häufiger betroffen ist.^{73,74} Es handelt sich um eine Erkrankung mit fluktuierendem Fieber, schweren Gelenkbeschwerden und einem lachsfarbenen makulopapulösen bis urtikariellen Exanthem.^{73,74} Des Weiteren können Polyserositis, Pharyngitis/ Halsschmerzen, Lymphadenopathie und Splenomegalie auftreten (**Tab. 4**).⁷⁴

Diagnostik

Die AOSD-Diagnose ist nach Yamaguchi et al. bei Erfüllung von fünf Kriterien, davon mindestens zwei Hauptkriterien, gestellt (**Tab. 6**).^{73,75}

Hauptkriterien	<ul style="list-style-type: none"> - Arthralgien mit einer Dauer > zwei Wochen - intermittierendes Fieber > 39 °C, Dauer ≥ eine Woche - Exanthem - Leukozytose
Nebenkriterien	<ul style="list-style-type: none"> - Halsschmerzen - Lymphadenopathie oder Splenomegalie - auffälliger Leberfunktionstest - negative antinukleäre AK und negative Rheumafaktoren

Tab. 6: Kriterien zur Diagnosestellung des AOSD nach Yamaguchi⁷⁵ (adaptiert nach Kadavath et al.)⁷³

Pathophysiologie

Die genaue Pathophysiologie des AOSD ist derzeit ungeklärt. Das therapeutische Ansprechen auf IL-6- und IL-1-Antagonisten sowie der Nachweis erhöhter IL-1β-, IL-6- und IL-18-Konzentrationen in Blut und Gewebe legt die Vermutung nahe, dass auch bei AOSD eine Inflammasom-Reaktion beteiligt ist.^{73,76} Makrophagen und Neutrophile wurden als am Entzündungsgeschehen beteiligte Zellen identifiziert.⁷⁶

Therapie

Systemische Steroide mit ihrem bekannten Nebenwirkungsprofil gelten derzeit als Erstlinientherapie des AOSD.⁷³ Daneben kann MTX eingesetzt werden.⁷³ Bei Nichtansprechen auf Steroide bzw. MTX oder hierzu ergänzend kann eine

medikamentöse IL-1-, IL-6- und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) α -Blockade eingesetzt werden.⁷³

1.5 Charakteristische klinische Unterschiede urtikarieller Hauterscheinungen bei chronischer spontaner Urtikaria, Urtikariavaskulitis und autoinflammatorischen Erkrankungen der Haut

Sowohl bei den AIH wie CAPS, SchS und AOSD (**Tab. 3, 4**) als auch bei der UV treten urtikarielle Exantheme auf. Bei Befunderhebung ausschließlich durch einmalige Inspektion unterscheiden sich die Hautveränderungen im Rahmen der AIH und UV klinisch häufig nicht von denjenigen bei csU.⁷⁷ Bei Beurteilung im Zeitverlauf und Hinzuziehung weiterer anamnestischer Informationen können einige Unterschiede zwischen den Hauterscheinungen bei AIH, UV und csU auffallen.⁷⁷ Dabei sind die Hauterscheinungen bezüglich der betroffenen Lokalisation bei den AIH und UV meist zeitlich deutlich konstantere Läsionen als bei der csU, die sich durch ihre Flüchtigkeit auszeichnen.⁷⁷ Urtikarielle Effloreszenzen bei UV bestehen oft länger als 24 h, während die Urticae bei csU nur einige min bis h an einer Körperstelle persistieren.^{5,77} Bei den AIH können die urtikariellen Läsionen eine tageszeitliche Dynamik zeigen: sie erscheinen meist am späten Nachmittag, erreichen dann in ihrer Ausprägung am späten Abend ihren Höhepunkt und verschwinden über Nacht.^{77,78} Die Effloreszenzen sind bei AIH eher symmetrisch verteilt und meist an Stamm und/oder Extremitäten anzutreffen, der Kopf ist meist ausgespart.⁷⁷ Bei der csU treten die Urticae asymmetrisch verteilt auf und können sich überall am Körper befinden.⁷⁷ Die Hautveränderungen bei csU zeichnen sich durch starken Juckreiz aus; bei AIH kann Juckreiz fehlen oder nur minimal vorhanden sein, es wird aber auch ein Brennen der Haut beschrieben.^{60,77,79} Das urtikarielle Exanthem bei AIH zeigt im Vergleich zur csU meist kein Ansprechen auf Antihistaminika.⁷⁷ Im Rahmen der csU ist das Auftreten von Angioödemen häufig; für die AIH ist dies eine Seltenheit.^{3,60}

Auch wenn diese besonderen klinischen Charakteristika des Hautbefundes einen Hinweis auf das Vorhandensein einer AIH geben können, sind sie keinesfalls beweisend. Aufgrund ihrer Seltenheit und Unbekanntheit werden die AIH oft erst mit einer Verspätung von mehreren Jahren diagnostiziert.⁷⁷

Eine verschleppte Diagnosestellung ist auch kritisch angesichts der bereits geschilderten möglichen Begleit- und Folgeerkrankungen der AIH (z.B. sekundäre

Amyloidose mit konsekutiver Niereninsuffizienz), da diese bei rechtzeitiger, früher Diagnosestellung und adäquater Therapie vermieden werden können.^{58,77}

Es existieren bisher keine diagnostischen Biomarker der Haut und im Serum nur sehr begrenzt aussagekräftige Biomarker (S100A12 als allgemeiner Entzündungs-Surrogatmarker bei CAPS⁴⁰), die zu einer früheren Diagnosestellung beitragen können. Damit besteht angesichts der Diagnoseverzögerung und der schweren Folgeerkrankungen der AIH ein hoher Bedarf, neue diagnostische Verfahren zu entwickeln.

1.6 Histologie und diagnostische Biomarker bei chronischer spontaner Urtikaria, Urtikariavaskulitis und autoinflammatorischen Erkrankungen der Haut

Histologie

Das histologische Bild der csU ist durch ein Ödem der oberen und mittleren Dermis, ödematöse Auflockerung der Epidermis, sowie eine Erweiterung von postkapillären Venolen und Lymphgefäßen des oberflächlichen und tiefen dermalen Plexus gekennzeichnet.^{3,80} Ein gemischtzelliges Infiltrat, vorrangig bestehend aus Eosinophilen und/oder Neutrophilen, Makrophagen, Monozyten und CD4-positiven T-Lymphozyten findet sich bei verstärkter Kapillarisation perivaskulär mit unterschiedlichem, meist geringem Ausprägungsgrad.^{3,80-83} Eine Erhöhung der Mastzellzahl ist in einigen Fällen beschrieben, in anderen Fällen jedoch nicht.^{80,81,84}

Die UV zeigt histologisch hingegen eine Zersetzung der kleinen Gefäße mit Endothelschwellung, Zellnekrosen und Fibrinablagerungen.²⁴ Im Gegensatz zur csU werden Leukozytoklasie, welche die charakteristische Fragmentierung der neutrophilen Granulozyten in sog. „nuclear dust“ bezeichnet, und perivaskuläre Erythrozytenextravasate beobachtet.²¹ Das perivaskuläre Zellinfiltrat ist von neutrophilen Granulozyten dominiert, es können auch eosinophile Granulozyten und Lymphozyten beobachtet werden.²¹ In der direkten Immunfluoreszenz sind Ablagerungen von Komplement und Immunglobulin in den Gefäßen der Dermis sichtbar.²¹

Bislang wurden nur wenige CAPS Patienten dermatohistologisch untersucht, sodass es keine diesbezüglichen Daten von größeren Patientenkohorten oder gar histologische Kriterien bzw. Biomarker zur Diagnosestellung gibt. Für die läsionale Haut einzelner

CAPS Patienten ist ebenfalls wie bei der UV ein an neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen reiches Zellinfiltrat beschrieben.⁸⁵⁻⁸⁷ Das Infiltrat bei CAPS zeigt im Gegensatz zur klassischen Urtikaria weniger Lymphozyten und eosinophile Granulozyten.⁸⁷

Wie bei CAPS ist beim SchS histologisch bei den meisten Patienten ein dermales, an neutrophilen Granulozyten reiches Infiltrat vorhanden, welches als ein Nebenkriterium bei der Diagnosestellung gemäß der Strasbourg-Kriterien (s.o.) aufgeführt ist.⁵⁹ In einigen Fällen wurde eine spongiöse Dermatitis, bei 25% der Patienten eine leukozytoklastische Vaskulitis beschrieben.⁶⁰

Histologisch wurde für den AOSD ein in der perivaskulären und interstitiellen Dermis ebenfalls an neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten reiches Infiltrat gezeigt.^{73,85}

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich das histologische Bild der csU durch ein Ödem und ein meist eher geringgradig ausgeprägtes gemischtzelliges Infiltrat auszeichnet, bei der UV vor allem die Leukozytoklasie vorherrschend ist und bei den AIH oft ein neutrophilenreiches entzündliches Zellinfiltrat beschrieben wird. Insgesamt gibt es bezüglich der AIH und UV nur wenige histologische Untersuchungen an größeren Patientenzahlen, außerdem wurde das histologische Bild der AIH und UV bislang nicht direkt mit dem der csU verglichen bzw. eine Quantifizierung der im Infiltrat vorherrschenden Zellen vorgenommen.

Biomarker

Auf histologischer Ebene wurde nachgewiesen, dass die TH-2-assoziierten Zytokine IL-4 und IL-5 sowie IL-33, IL-25 und Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in läSIONALER Haut von csU Patienten verstärkt exprimiert sind.⁸³ Des Weiteren wurde die erhöhte Expression von Calcitonin gene-related peptide und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in läSIONALER Haut mittels Immunohistologie gezeigt.⁸⁸ Vergleiche zu anderen Diagnosegruppen wurden nicht angestellt. Auch konnte für die csU in Abgrenzung zu AIH und UV bislang kein diagnostischer Serum-Marker identifiziert werden. Weder Histamin, TNF, C5a, IL-6, -9, -18, -31, -33, TSLP, Neopterin, noch VEGF zeigten sich bei csU Patienten im Serum erhöht.⁸⁹ Im Vergleich zu gesunden Probanden wurde in anderen Studien eine Erhöhung der IL-1 β , IL-6 und IL-18-Konzentration im Serum bei csU nachgewiesen.⁹⁰⁻⁹²

Bezüglich hochregulierter Marker-Proteine in läSIONALER Haut bei UV sind keine Untersuchungen bekannt. Bislang wurden nur Untersuchungen des Serums auf

potentielle Marker beschrieben; die Bestimmung der Komplementkomponenten C3 und C4 im Serum kann herangezogen werden, um die normo- und hypokomplementämischen Unterformen abzugrenzen (s.o.).²² Es wurden Anti-C1q-AK im Serum nachgewiesen.²¹ Kürzlich wurden deutlich erhöhte Konzentrationen von IL-6 und IL1-Rezeptorantagonist im Serum bei UV Patienten gezeigt.²⁸

Immunhistologische Untersuchungen bezüglich verschiedener Interleukine an CAPS Patienten sind bekannt: nach Kälteprovokation wurde bei einzelnen FCAS Patienten eine Akkumulation von IL-1 β und IL-6 immunhistologisch dargestellt.⁵¹ Es konnte gezeigt werden, dass dermale Mastzellen bei Patienten mit CAPS IL-1 β produzieren.⁹³ Bei einem Patienten mit FCAS ließen sich IL-17-positive Zellen im dermalen Infiltrat identifizieren.⁹⁴ Dabei wurde postuliert, dass es u.a. durch IL-1 β zur Aktivierung von TH-17-Zellen mit IL-17-Produktion kommen könnte.⁹⁴ IL-17 soll zur Extravasation neutrophiler Granulozyten führen, welche ebenfalls IL-17 produzieren.⁹⁴

Ebenso wie bei CAPS wurden IL-1 β in läsionaler Dermis in einem SchS-Einzelfallbericht sowie IL-1 β -positive Mastzellen bei SchS nachgewiesen.^{95,96} Die Verwendung von VEGF als Serum-Marker wurde beim SchS zur Diagnostik und zur Therapie-Verlaufskontrolle vorgeschlagen, da die Werte bei n=13 SchS Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht waren und nach erfolgreicher Therapie abfielen.⁹⁷

Bei einzelnen AOSD Patienten war die mRNA-Expression von IL-6, IL-18 und IL-8 in der läsionalen Haut signifikant höher als bei gesunden Kontrollen.⁹⁸ In der Blut-Diagnostik sind CRP-Erhöhung, BSG-Beschleunigung, eine Neutrophilie und erhöhte Serum-Ferritin-Spiegel für einen AOSD typisch.⁷⁶ Erhöhte IL-1 β -, IL-6-, und IL-18-Serum-Konzentrationen wurden für einzelne AOSD Patienten beschrieben.^{76,98}

In Zusammenschau dieser Ergebnisse aus der Literatur wird deutlich, dass kein diagnostischer Biomarker existiert, welcher die csU von AIH und UV in der histologischen Untersuchung abgrenzen könnte. Die verstärkte Expression einiger Proteine in läsionaler Haut bzw. im Serum bei den einzelnen Krankheitsbildern ist in Einzelfällen beschrieben, ihr Potential als diagnostischer Biomarker in diesem Kontext jedoch bislang nicht weiter untersucht.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Klinisch unterscheiden sich urtikarielle Hauterscheinungen bei autoinflammatorischen Erkrankungen wie CAPS, SchS und AOSD und bei UV oft nicht oder nur wenig von denjenigen bei csU. Auch sind zur diesbezüglichen Differenzierung bislang keine diagnostischen dermatohistologischen Biomarker verfügbar. Die Diagnosestellung erfolgt daher oft deutlich verzögert. Vor diesem Hintergrund soll die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse zu histologischen Charakteristika der läsionalen Haut und diesbezüglichen potentiellen Biomarkern erbringen, um die Diagnosestellung zukünftig zu optimieren.

Ziel der Arbeit ist es,

1. - das Vorhandensein und die zelluläre Lokalisation des Entzündungsgeschehens für ausgewählte Interleukine und Inflammasom-Marker mittels Histologie, Immunhistologie und Immunfluoreszenz in der befallenen Haut von Patienten mit urtikariellen AIH, UV und csU zu charakterisieren,
2. - den immunhistologisch gewonnenen Daten quantitative Proteinbestimmungen ausgewählter Zytokine/Inflammasommarker aus läsionaler Haut gegenüberzustellen,
3. - durch diese Daten ein potentielles Biomarker-Profil der läsionalen Haut für urtikarielle AIH (CAPS, SchS und AOSD) sowie UV in Abgrenzung zur csU zu beschreiben,
4. - diese Ergebnisse im Kontext der derzeitigen wissenschaftlichen Literatur kritisch zu diskutieren.

2 METHODEN

2.1 Histologische Untersuchungen

2.1.1 Patienten und Gewebeproben

Sämtliche Proben wurden nach ausführlicher Aufklärung über Inhalt und Ziel der Arbeit und schriftlicher Einwilligung der Patienten bzw. Probanden wissenschaftlich untersucht. Die Genehmigung des Forschungsprojektes erfolgte durch die Ethikkommission der Charité unter der Antragsnummer EA4/005/15.

In Paraffin eingebettete Gewebeproben von Hautläsionen unterschiedlicher Körperregionen von drei Patienten mit CAPS (Lokalisation: n=2/3 Oberschenkel, n=1/3 keine Angabe), neun Patienten mit SchS (Lokalisation: n=1/9 Oberarm, n=1/9 Unterarm, n=1/9 Rücken, n=1/9 Oberschenkel und n=5/9 keine Angabe), einem Patient mit AOSD (Lokalisation: n=1/1 keine Angabe), 18 Patienten mit UV (Lokalisation: n=6/18 Oberschenkel, n=3/18 Flanke, n=2/18 Rücken, n=2/18 Unterarm, n=1/18 Hand, n=1/18 Abdomen, n=1/18 Unterschenkel, n=1/18 Kniekehle und n=1/18 keine Angabe) und zehn Patienten mit csU (Lokalisation: n=2/10 Gesäß, n=2/10 Abdomen, n=2/10 Oberarm, n=1/10 Unterarm, n=1/10 Rücken, n=1/10 Oberschenkel und n=1/10 keine Angabe) wurden für die histologischen Untersuchungen verwendet. Die jeweiligen Probenanzahlen pro Diagnose entsprachen dabei den maximal verfügbaren Probenanzahlen. Die Proben stammten von Patienten, die in der Klinik für Dermatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin behandelt wurden. Die Biopsien erfolgten im Rahmen der Routinediagnostik in obiger Klinik und bei einigen Patienten in externen Kliniken, da sie zuvor dort behandelt wurden. Zum Zweck der vorliegenden Arbeit mussten keine neuen bzw. zusätzlichen Biopsien entnommen werden.

Als Kontrolle dienten in Paraffin eingebettete Proben gesunder Haut von zehn Probanden. Die Kontrollproben stammten von bariatrischen und plastischen Operationen (u.a. Brustreduktionen).

Die Etablierung der einzelnen immunhistologischen Färbungen erfolgte an humanen Gewebeproben von Nierenzellkarzinom, Tonsille und Pankreas. Diese wurden vom Institut für Pathologie der Charité zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurden die immunhistologischen Färbungen an Gewebeproben von malignen Melanomen aus der Routinehistologie der Klinik für Dermatologie der Charité etabliert.

2.1.2 Materialien, Reagenzien und Geräte

Paraffinschnitte:

- Mikrotom Shandon Finesse 325, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA
- Mikrotomklingen, S 35 Feather, Osaka, Japan
- Glasobjektträger Super Frost Plus, Firma R. Langenbrinck, Emmendingen
- Wasserbad, GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
- Aqua dest. (Aqua destillata) in Wasserwanne, Pinsel, Bleistift
- Tiefkühlschrank -20°C, Liebherr GmbH, Linthe
- Brutkammer, Heraeus GmbH, Hanau

Immunhistologische Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen

Primärantikörper

Antikörper (AK)	Protokoll (Immunhistologische Färbung; gegebenenfalls Immunfluoreszenzfärbung)	Positivkontrolle
Monoklonaler Maus-anti-Human-IL-1 β AK, LS-C174781, LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA (detektiert nur reife IL-1 β -Form)	1:400, über Nacht, 4 °C; Immunfluoreszenzfärbung: 1:200, über Nacht 4 °C	Melanom
Monoklonaler Maus-anti-Human-IL-6 AK, sc-130326, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA	1:400, 1 h Raumtemperatur (RT); Immunfluoreszenzfärbung: 1:100, 1 h RT	Melanom
Monoklonaler Maus-anti-Human-IL-17 AK, LS-B8323, LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA	1:75, über Nacht 4 °C	Pankreas
Polyklonaler Kaninchen-anti-Human-IL-18 AK, LS-B2809, LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA	1:200, über Nacht 4 °C	Tonsille
Monoklonaler Maus-anti-Human-IL-18 AK, D043-3, MBL International, Woburn, USA	Immunfluoreszenzfärbung: 1:200, über Nacht 4 °C	Tonsille
Monoklonaler Maus-anti-Human-NLRP3 AK, LS-B5028, LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA	1:400, über Nacht 4 °C	Tonsille
Monoklonaler Maus-anti-Human-Caspase-1 AK, LS-B112, LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA	1:200, 1 h RT	Tonsille
Monoklonaler Maus-anti-Human-ASC AK, LS-C175123, LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA	1:400, 1 h RT; Immunfluoreszenzfärbung: 1:200, 1 h RT	Tonsille
Monoklonaler Maus-anti-Human-VEGF AK, 555036, BD Biosciences, San Jose, USA	1:200, 1 h RT	Nierenzellkarzinom
Monoklonaler Maus-anti-Human-Myeloperoxidase (MPO) AK, 392105 MAB3174 R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA	1:400, über Nacht 4 °C	Tonsille
Monoklonaler Kaninchen-anti-Human-Histone H2A AK, LS-C49757, LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA	1:400, 1 h RT	Tonsille
Monoklonaler Maus-anti-Human-Cathelecidin AK, ab87701, abcam, Cambridge, USA	1:100, 1 h RT	Tonsille

Tab. 7: Primärantikörper der immunhistologischen Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen

Sekundärantikörper

- Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse K5005, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), Dako Inc., Glostrup, Dänemark
- Alexa Fluor® 594-conjugated AffiniPure Ziege-anti-Maus IgG, 115-585-062, Jackson Immuno Research, West Grove, USA
- Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Ziege-anti-Maus IgG, 115-545-146, Jackson Immuno Research, West Grove, USA
- Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Ziege-anti-Kaninchen IgG, 111-545-144, Jackson Immuno Research, West Grove, USA
- Alexa Fluor® 594-conjugated AffiniPure Ziege-anti-Kaninchen IgG, 111-585-144, Jackson Immuno Research, West Grove, USA

Chemikalien und Reagenzien

Xylol, Karl Roth GmbH, Karlsruhe; Ethanol (100 Vol.-%, 96 Vol.-%, 70 Vol.-%), Herbeta Arzneimittel, Berlin; Aqua dest.; Citrit-Acid, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis; tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck KGaA, Darmstadt; Tris Base, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis; Tris Salzsäure (HCl), Sigma-Aldrich Inc., St. Louis; Natriumchlorid (NaCl), Sigma-Aldrich Inc., St. Louis; Endogenes Avidin/Biotin Blocking-Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham; fetales Kälberserum (FCS), Biochrom GmbH, Berlin; Hämatoxylin-Lösung, Merck KGaA, Darmstadt; Eindeckmedium Aquatex, Merck KGaA, Darmstadt; AffiniPure Fab Fragment Ziege-anti-Maus IgG (H+L) unconjugated 115-007-003, Jackson Immuno Research, West Grove, USA; 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 10236276001, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim; Serumfree Proteinblock, Dako Inc., Glostrup, Dänemark; Avidin-Fluorescein Isothiocyanat (Avidin-FITC) 405102, BioLegend, San Diego, USA; Goat-Normalserum (GNS), Jackson Immuno Research, West Grove, USA; Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Target Retrieval Solution, Dako Inc., Glostrup, Dänemark; Maus-Normalserum (MNS), Dako Inc., Glostrup, Dänemark; Antibody-Diluent with Background, Dako Inc., Glostrup, Dänemark; FluorPreserve Reagent 345787-25ml, Calbiochem Merck KGaA, Darmstadt; pH-Teststreifen, Karl Roth GmbH, Karlsruhe

Geräte

Mikrowelle, Sharp Electronics GmbH, Hamburg; Laborwaage, Sartorius AG, Göttingen; Kühlschrank 4°C, Electrolux GmbH, Nürnberg; Schüttler Vibramax 100, Heidolph GmbH, Schwabach; Vortex Mixer, neo-Lab GmbH, Heidelberg; Magnetrührer, YellowLine MSH Basic; Zentrifuge, Sprout; Dampfgarer, Tefal Groupe SEB, Offenbach

Sonstiges

Glasküvetten; Objektträgerständer; Pinzetten; Messlöffel; Trichter; Bechergläser; Messbecher; Falcon-Tubes; Inkubationskammern; Pipetten, Eppendorf AG, Hamburg; Pipettenspitzen, Eppendorf AG, Hamburg; Eppendorfgefäße, Eppendorf AG, Hamburg; Deckgläschen Marienfeld, Lauda-Königshofen

HE-Färbung

- Hämatoxylin-Lösung, Merck KGaA, Darmstadt
- Eosin-Lösung, Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
- Limonene, Mount Science Services, München

Mastzell-Färbung

- 0,5 % Toluidinblau in 0,5 Molar HCl, Sigma Aldrich, Steinheim
- Eosin-Lösung, Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
- Limonene, Mount Science Services, München

Auswertung (Mikroskope, Fotodokumentation und Software)

- Licht- und Fluoreszenzmikroskop Axio Plan 2, Carl Zeiss GmbH, Jena
- Kamera Axio Plan, Carl Zeiss GmbH, Jena
- Mikroskop-Software Axio Vision Rel. 4.6, , Carl Zeiss GmbH, Jena
- Primo Star Carl Zeiss GmbH, Jena
- Einhand-Zähler
- Image J Software 1.48v
- IBM SPSS Statistics Version 22
- Excel für Mac 2011, Word für Mac 2011
- Graph Pad Prism 5

2.1.3 Herstellung von Paraffinschnitten und Entparaffinierung

Die Paraffinblöcke wurden im Gefrierschrank bei -20 °C vorgekühlt und dann bei Raumtemperatur (RT) am Mikrotom in 5 µm Dicke geschnitten. In einer mit Aqua dest. gefüllten Wanne (RT) wurden die Schnitte aufgefangen, dann zur Streckung in Aqua dest. bei 50 °C gegeben und auf Objektträger aufgebracht. Zur Optimierung der Haftung wurden die Schnitte auf den Objektträgern in einer Brutkammer bei 37 °C über Nacht gelagert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei RT.

Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgte unter einem Abzug in sog. absteigender Reihe. Dabei wurden die Hautproben nacheinander in entsprechend befüllte Küvetten gegeben: zweimal Xylol für jeweils 10 min, zweimal Ethanol 100 % für je 2 min, Ethanol 96 %, 90 %, 70 % für jeweils 2 min und anschließend Aqua dest für 3 min.

2.1.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (nach Routine-Standard-Protokoll)

Die entparaffinierten Schnitte wurden für 45 s in einer mit Hämatoxylin gefüllten Küvette gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte bei fließendem Leitungswasser gewässert. Die Gewebeschnitte wurden danach kurz in Aqua dest. gestellt, dann für 45 s in einer mit Eosin gefüllten Küvette gefärbt. Es folgte ein gründlicher Waschgang mit Aqua dest., bis der Farbstoff vollständig aus der Waschflüssigkeit entfernt war. Danach schloss sich eine Entwässerung an, unter einem Abzug, für jeweils 3 min in 100 % Ethanol (Küvette I und II) und Xylol (Küvette I und II). Abschließend Eindecken der nun vollständig gefärbten Schnitte mit Limonene unter Deckglas.

2.1.5 Anfärbung der Mastzellen

Die Mastzell-Färbung erfolgte nach einem etablierten Protokoll: Die entparaffinierten Schnitte wurden in frisch filtriertem 0,5 % Toluidinblau in 0,5 Molar HCl in einer abgedeckten Glasküvette über Nacht gefärbt.⁹⁹ Dann wurden die Schnitte in Aqua dest. gewaschen, bis der Farbstoff vollständig aus der Flüssigkeit entfernt war. Es folgte die Gegenfärbung mit frisch filtriertem Eosin für 30 s. Daraufhin Waschschrift in Aqua dest. Dann Entwässerung, wie obig beschrieben, unter Abzug. Eindecken der Schnitte mit Limonene unter Deckglas.

2.1.6 Immunhistologische Färbungen

Die Darstellung von MPO (zytoplasmatisches Enzym, hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten und zu geringerem Anteil in Monozyten⁶⁸), der Interleukine (IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18), der Inflammationmarker (NLRP3, ASC, Caspase-1) sowie VEGF erfolgte mittels immunhistologischer Färbung. Dabei kam die Labeled Streptavidin Biotin- (LSAB) Methode zur Anwendung. Hierbei bindet der Primär-AK (**Tab. 7**) an das im Gewebe nachzuweisende Antigen. Nachfolgend wird ein biotinylierter Sekundär-AK hinzugefügt, der an den Primär-AK bindet. Anschließend folgt die Zugabe des Streptavidin-Enzymkomplexes, welcher sich an das Biotin koppelt. Zuletzt wird eine chromogene Substratlösung aufgebracht, die nach Umsatz durch den Enzymkomplex zu einem spezifischen Farbsignal führt (**Abb. 5**).¹⁰⁰

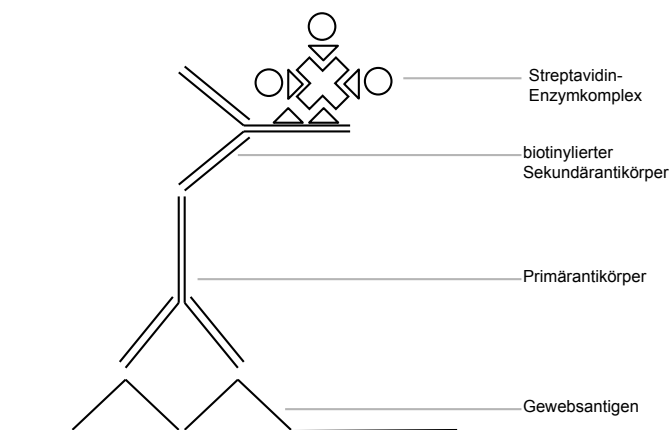


Abb. 5: Schematische Darstellung der Labeled Streptavidin-Biotin Methode (LSAB) (nach DAKO)¹⁰⁰

Spezielle Puffer für die Immunhistologie und Immunfluoreszenz

Citrat-Puffer-Lösung:

540 ml Aqua dest.
60 ml Citrat-Puffer
pH-Wert von 6,0

Citrat-Puffer:

0,5 l Aqua dest.
1,9 g Citrit-Acid
12,05 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat

Tris-gepufferter Saline (TBS, für 3 l):

2,7 g Tris Base
20,55 g Tris HCl
26,34 g NaCl
3 l Aqua dest.
pH-Wert von 7,5

2%ige FCS-Block:

2 % FCS in TBS

Die immunhistologischen Färbungen erfolgten an 5 µm dicken entparaffinierten Gewebeschnitten (s.o.).

Antigen-Demaskierung

Zur Antigen-Demaskierung wurden die Hautschnitte in - für 10 min kochend vorerwärmter - Citrat-Puffer-Lösung in einem Becherglas mittels Mikrowelle für 10 min gekocht. Nach dem Kochvorgang wurden die Schnitte in fließendem Leitungswasser abgekühlt. Währenddessen erfolgte das Ansetzen von Tris-gepufferter Saline (TBS). Die Schnitte wurden in TBS gegeben, wo sie für 5 min aufbewahrt wurden.

Avidin-, Biotin-, FCS-Block

Die Blockierungen dienten der Sättigung möglicher Avidin-, Biotin-, bzw. unspezifischer Bindungsstellen im Gewebe.¹⁰⁰ Dies erfolgte für jeweils 15 min in einer geschlossenen feuchten Kammer (Aqua dest.) bei RT, unterbrochen durch jeweils drei Spülschritte à 5 min in TBS. Die Objektträger wurden aus dem TBS-Puffer genommen, die Flüssigkeit von den Objektträgern abgeklopft und deren Rückseite abgetrocknet. Auf die Präparate wurde die jeweilige Blockierungs-Lösung getropft, sodass das Präparat vollständig bedeckt war.

Primärantikörper-Inkubation

An den FCS-Block schloss sich unmittelbar - das heißt ohne Spülung - die Inkubation mit dem Primärantikörper an. Der FCS-Block wurde abgeklopft und auf die Schnitte wurde mit einer Pipette die bereits angesetzte jeweilige Primär-AK-Lösung getropft, diese bestand aus dem Primär-AK in der in **Tab. 7** angegeben Verdünnung, gelöst in 1 % FCS in TBS. Die Inkubation erfolgte entweder 1 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht (im Kühlschrank), jeweils in der Inkubationskammer. Die adäquaten AK-Verdünnungen in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und -temperatur waren in entsprechenden Vorversuchen bestimmt wurden. Zur technischen Negativkontrolle lief jeweils ein Präparat alle Färbeschritte durch, ohne dass der Primär-AK aufgetragen wurde; stattdessen wurde nur mit TBS inkubiert. Die Primär-AK-Lösung wurde vom Präparat abgeklopft und die Schnitte wurden dreimal für jeweils 7 min mit jeweils frischem TBS auf einem Schüttler gewaschen.

Sekundärantikörper-Inkubation und Streptavidin-Enzymkomplex-Reaktion

Nach Abklopfen von TBS wurde der biotinylierte Sekundärantikörper auf die Präparate pipettiert. Die Einwirkzeit betrug 15 min bei RT in der geschlossenen feuchten Kammer. Darauf folgten drei Waschgänge in frischer TBS auf dem Schüttler für jeweils 5 min. Dann wurde die mit Streptavidin gekoppelte Alkalische Phosphatase (Streptavidin-Enzymkomplex) auf die Präparate gegeben und wirkte für 15 min in der Inkubationskammer ein. Es folgten drei Waschgänge à 5 min in TBS auf dem Schüttler. Schließlich wurde die chromogene Substratlösung laut Herstellungsanleitung angesetzt und auf die Präparate aufgetragen, die Inkubationszeit betrug 20 min. Anschließend folgten vier Waschgänge mit jeweils frischem TBS für jeweils 5 min.

Danach Gegenfärbung mit frisch filtriertem Hämatoxylin für 30 s und Spülung unter fließendem Leitungswasser. Abschließend Eindecken der Schnitte mit Aquatex unter Deckglas und Trocknen bei RT.

2.1.7 Immunfluoreszenzfärbungen

Bei der hier verwendeten indirekten Immunfluoreszenzfärbung bindet ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper, der bereits an das im Gewebe darzustellende Antigen gebunden ist. Die Fluoreszenz wird bei bestimmten Wellenlängen detektiert (Alexa Fluor® 594 bei ca. 594 nm absorbierend und mit ca. 614 nm rot fluoreszierend; Alexa Fluor® 488 bei ca. 488 nm absorbierend und bei ca. 519 nm grün fluoreszierend).¹⁰¹ Durch dieses Verfahren lassen sich Kolokalisationsfärbungen für zwei verschiedene Antigene durchführen. Bei Kolokalisation entsteht ein gelb-oranges Fusionssignal. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-18 in Kolokalisationsfärbung mit MPO bzw. Mastzellen dargestellt, außerdem Cathelicidin sowie die Histonkomponente H2A in Kolokalisation zu MPO (orientiert an Villanueva et al.¹⁰²). Dabei erfolgte die Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (Blau-Fluoreszenz). Diese Untersuchungen wurden an jeweils drei Patienten mit CAPS, SchS, UV und csU sowie an drei gesunden Kontrollen durchgeführt. Sämtliche im Nachfolgenden geschilderten Arbeiten mit den fluoreszierenden Substanzen erfolgten unter adäquater Abdunkelung.

Kolokalisationsfärbungen für IL-1 β , IL-6, IL-18 und ASC mit MPO

Bei diesen Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte die Entparaffinierung der Gewebeschnitte wie oben beschrieben. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte in der Citrat-Puffer-Lösung für 25 min im vorgeheizten Dampfgarer gekocht. Nach Abkühlen und drei Waschgängen für je 10 min in TBS wurde zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen 10%iges GNS in TBS auf die Präparate aufgetragen mit Inkubation für 20 min bei RT. Danach wurde der jeweilige Primärantikörper (für IL-1 β , IL-6, IL-18 sowie ASC (**Tab. 7**)), verdünnt in TBS mit 2 % GNS aufgetragen und in der feuchten Kammer bei RT für 1 h bzw. bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden dreimal für je 10 min in TBS gewaschen. Auftragen des Sekundärantikörpers (Alexa Fluor® 594-conjugated AffiniPure Ziege-anti-Maus IgG, 1:600 in TBS mit 2 % GNS) für eine 30-minütige Inkubation bei RT. TBS-Spülung. Inkubation für 30 min bei RT mit 10 % MNS in TBS; Waschgänge in TBS. Auftragen von Fab Fragment Ziege-anti-Maus IgG (H+L) unconjugated 1:100 und Einwirken für 30 min bei RT, dann weitere Waschgänge in TBS (dreimal). Aufpipettieren des Anti-MPO-AK (1:400 in TBS mit 2 % GNS) mit Inkubieren bei 4 °C über Nacht. Drei Waschgängen in TBS. Inkubationsschritt mit Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Ziege-anti-Maus IgG, 1:600 in TBS mit 2 % GNS) bei RT für 30 min. Anschließend erfolgte die DNA-Gegenfärbung mit DAPI für 5 min bei RT. Drei abschließende Waschgänge in TBS. Das Eindecken wurde mit FluorPreserve Reagent durchgeführt. Lagerung der Gewebeschnitte bei -20 °C im Tiefkühlschrank.

Kolokalisationsfärbungen für IL-1 β , IL-6, IL-18 und ASC mit Mastzellen

Für diese Kolokalisationsfärbung der Zytokine und der Inflammationskomponente ASC mit den Mastzellen entsprach das methodische Vorgehen zunächst dem zuvor obig beschriebenen, und zwar bis einschließlich zu der Inkubation mit dem ersten Sekundärantikörper (d.h. Alexa Fluor® 594-conjugated AffiniPure Ziege-anti-Maus IgG). Anschließend erfolgten drei TBS-Spülungen für jeweils 10 min und eine Inkubation mit Avidin-FITC (1:100 in TBS) bei RT für 30 min. Dabei bindet Avidin an Mastzell-Granula und FITC ist als Grün-Fluoreszenz detektierbar. Dreimalige TBS-Spülung für je 5 min. Die DNA-Gegenfärbung mit DAPI und das Eindecken der Präparate erfolgten wie bereits oben beschrieben.

Kolokalisationsfärbungen für Histon H2A mit MPO

Zunächst Entparaffinierung der Gewebeschnitte. Die Antigen-Demaskierung erfolgte im vorgeheizten Dampfgarer für 25 min. Nach Abkühlen und TBS-Spülung (dreimal) wurde mit serumfreiem Proteinblock (Dako) für 10 min bei RT inkubiert. Jeweils separiert durch drei TBS-Spülungen für 5 min, wurden Inkubationen mit den folgenden vier AK durchgeführt: anti-Histon-H2A-Primär-AK (1:400 in Antibody-Diluent) bei RT für 1 h, anti-MPO-Primär-AK (1:400, Antibody-Diluent) bei 4 °C über Nacht, Sekundärantikörper Alexa Fluor® 594-conjugated AffiniPure Ziege-Anti-Kaninchen IgG (1:400, TBS mit 2 % GNS) bei RT für 30 min, Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Ziege-anti-Maus IgG (1:600 in TBS mit 2 % GNS) bei RT für 30 min. Nach weiteren drei TBS-Waschgängen folgten die DNA-Gegenfärbung mit DAPI und das Eindecken.

Immunfluoreszenzfärbung für Cathelicidin

Nach Entparaffinierung der Gewebeschnitte wurde eine Antigendemaskierung in EDTA (pH-Wert 9) im vorgeheizten Dampfgarer für 25 min durchgeführt. Nach Abkühlen und Spülen folgte das Besetzen unspezifischer Bindungen mit serumfreiem Proteinblock bei RT für 10 min. Nach TBS-Spülung (dreimal) Auftragen des Anti-Cathelicidin-Primärantikörpers (1:100 in AB-Diluent) zur Inkubation bei RT für 1 h. Nach TBS-Spülungen (dreimal) Inkubieren mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor® 594-conjugated AffiniPure Ziege-anti-Maus IgG, 1:600 in TBS mit 2 % GNS) bei RT für 30 min. TBS-Spülung (dreimal). DNA-Gegenfärbung mittels DAPI sowie Eindecken der Präparate.

2.2 Auswertung der histologischen Untersuchungen

Die Auswertung der angefertigten immunhistologischen Färbungen erfolgte stets verblindet ohne Kenntnis der Diagnose durch dieselbe Person (d.h. die Autorin).


2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Semiquantitative Histomorphometrie

Die mit HE angefärbten Hautgewebeschnitte wurden mittels eines Lichtmikroskops bei 200-facher Vergrößerung (20x Objektiv) auf ein zelluläres Infiltrat untersucht. Ein repräsentativer Ausschnitt jedes Schnittes wurde ausgewählt und das zelluläre Infiltrat sowohl in der papillären Dermis, als auch in der retikulären Dermis mit einem Score bewertet. Der Score gestaltete sich folgendermaßen, orientiert an Qin et al.: 0 = kein Infiltrat, 1 = geringes Infiltrat, 2 = moderates Infiltrat, 3 = starkes Infiltrat.¹⁰³ Aus dem

ermittelten Score für papilläres und retikuläres Kompartiment wurde ein Mittelwert (*M*) für die gesamte Dermis gebildet.

2.2.2 Färbung der Mastzellen: Quantifizierung durch Zellzählung

Die Auswertung der Mastzellfärbung erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung (40x Objektiv) durch Zellzählung. Toluidinblau-angefärbte Zellen mit sichtbarem Zellkern und mit \geq fünf zytoplasmatischen Granula wurden gezählt.⁹⁹ Dies erfolgte mittels Durchmusterung des horizontal entlang der Basalmembranzzone ausgerichteten Präparats in sieben horizontalen „Etagen“ von apikal nach basal (**Tab. 8**): obere papilläre Dermis, untere papilläre Dermis, obere retikuläre Dermis, obere mittlere retikuläre Dermis, untere mittlere retikuläre Dermis, untere retikuläre Dermis, obere Subcutis. In jeder Etage wurden bei oben genannter Vergrößerung maximal fünf High power fields (HPF), also in jedem Präparat maximal insgesamt 35 HPF ausgezählt. Diese Vorgehensweise folgte dem von Weber et al. für die anatomische Mastzell-Kartierung beschriebenen Verfahren.⁹⁹ Die mittels Zählung und Mittelwertbildung bestimmte Anzahl der Zellen pro HPF wurde bezüglich der Mikroskop-Vergrößerung unter Division durch $0,19625 \text{ mm}^2$ ($\pi \times \text{Radius}^2 = \text{HPF}; 3,14 \times 0,0625 \text{ mm}^2 = 0,19625 \text{ mm}^2$) auf die Zelldichte im Präparat umgerechnet (Zellzahl/ mm^2). Im Verlauf der Bearbeitung des hier anstehenden Themas wurde die Festlegung getroffen, in die Endauswertung nur die Ergebnisse für die obere papilläre Dermis hinein zu nehmen, da sich dort vorrangig das entzündliche Infiltrat zeigte und um möglichst repräsentative und statistisch robuste Aussagen treffen zu können (gültig für die Analyse der Mastzellen wie auch der immunhistologischen Färbungen, im Folgenden).

apikal	horizontale „Etage“	Zellzahl/HPF				
		A	B	C	D	E
	obere papilläre Dermis					
	untere papilläre Dermis					
	obere retikuläre Dermis					
	obere mittlere retikuläre Dermis					
	untere mittlere retikuläre Dermis					
	untere retikuläre Dermis					
	Subcutis					
	basal					

Tab. 8: Schema zur Auszählung der Mastzellen

2.2.3 Immunhistologische Färbungen

Zur Übersicht wurden alle immunhistologischen Färbungen zunächst mittels semiquantitativer Histomorphometrie ausgewertet. Nach daraus resultierender Relevanz und Möglichkeit wurden weiter differenzierte Auswertungen durch quantitative Histomorphometrie, also Zählung positiver Einzelzellen bzw. Planimetrie bei teils hoher Quantität und teils diffusen Charakter der Anfärbung (schwierige Erkennbarkeit von Zellgrenzen) vorgenommen.

2.2.3.1 Semiquantitative Histomorphometrie

Die Auswertung der angefertigten immunhistologischen Färbungen für IL-17, Caspase-1, NLRP3 und VEGF erfolgte am Lichtmikroskop bei 200-facher Vergrößerung (20x Objektiv) mittels semiquantitativer Histomorphometrie. In einem repräsentativen Areal des Schnittes wurde das zelluläre Infiltrat sowohl in der papillären als auch in der retikulären Dermis mit einem Score, bezogen auf die Immunreaktivität für den jeweiligen Markers, bewertet. Der dabei nach Qin et al. verwendete Score war folgendermaßen kategorisiert: 0 = keine bis minimale Immunreaktivität, 1 = moderate Immunreaktivität, 2 = starke Immunreaktivität.¹⁰³ Aus den Score-Werten wurde insgesamt ein Mittelwert (*M*) für die gesamte Dermis gebildet. Immunreaktivität im Bereich der Epidermis und Adnexe (Talgdrüsen, Schweißdrüsen, Haarfollikel) wurden strikt exkludiert.

2.2.3.2 Quantifizierung der Färbungen durch Zellzählung

Die für IL-1 β , IL-6 und IL-18 immunhistologisch gefärbten Schnitte wurden mit einer 400-fachen Vergrößerung (40x Objektiv) mikroskopiert. Dabei erfolgte die Einteilung der Schnitte zur Zellzählung in bestimmte HPF wie weiter oben beschrieben (siehe **2.2.2**).⁹⁹ Im Einzelnen wurde die Zahl der für einen immunhistologischen Marker - stark bzw. schwach - positiven Zellen erfasst. Es wurde bei der Lokalisation der einzelnen Zellen zwischen zwei Kompartimenten unterschieden: i) vaskuläres Kompartiment (gefäßassoziierte Zellen, definiert als im Gefäßlumen befindliche Zellen, Zellen der Gefäßwand sowie perivaskuläre Zellen, letztere in einer Breite von 3 Zell(kern)en) sowie hierzu „komplementäres“ ii) interstitielles Kompartiment: sämtliche Zellen, die sich nicht dem gefäßassoziierten Kompartiment zuordnen ließen. Stark und schwach positive Zellen wurden pro HPF ausgezählt und dabei dem vaskulären bzw. dem interstitiellen Kompartiment zugeordnet. Die am äußeren Rand der Gewebeschnitte gelegenen Areale wurden nicht in die Untersuchung aufgenommen, um eine mögliche

Verzerrung der Datenerhebung durch die dort gegebene Traumatisierung der Haut bei Biopsieentnahme bzw. präparationsbedingte Ausrissartefakte auszuschließen.⁹⁹ Die Epidermis und die Adnexe (Talgdrüsen, Schweißdrüsen, Haarfollikel) wurden ausgeklammert. Es wurde für jeden Schnitt ein Mittelwert der Zellzahl/HPF für jede „Etage“ gebildet.

2.2.3.3 Quantifizierung der Färbungen durch Planimetrie mittels der Software ImageJ

Für die Analyse der immunhistologischen Färbungen von MPO und ASC bei 100-facher Vergrößerung (10x Objektiv) wurde jeder Schnitt systematisch als HPF in den jeweiligen „Etagen“ der Haut fotodokumentiert (**Tab. 9**). Anhand der Fotos wurde mithilfe des Bildanalyseprogramms Image J nach entsprechender Schwellensetzung der prozentuale Anteil des AK-Signals an der Gesamtfläche des Bildes bestimmt.

Dermis apikal	horizontale „Haut-Etage“	HPF				
		A	B	C	D	E
	1	A1	B1	C1	D1	E1
	2	A2	B2	C2	D2	E2
	3	A3	B3	C3	D3	E3
	4	A4	B4	C4	D4	E4
	5	A5	B5	C5	D5	E5
basal	6	A6	B6	C6	D6	E6

Tab. 9: Schema zur Fotodokumentation der immunhistologischen Färbungen zwecks Auswertung mittels Software ImageJ

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen

Mit dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte bei 200- bzw. 400-facher Vergrößerung eine Durchmusterung der oberen papillären Dermis des Präparates hinsichtlich:

- i) Kolokalisationen von IL-1 β , IL-6 und IL-18 mit Mastzellen bzw. neutrophilen Granulozyten,
- ii) Kolokalisation von Histon H2A mit MPO sowie
- iii) extrazellulärer Cathelicidin-Signale.

Positive Ereignisse wurden bei 200- und 400-facher Vergrößerung fotografisch dokumentiert.

2.3 Proteinisolierung und Proteinnachweis

2.3.1 Patienten und Gewebeproben

Die Proben wurden nach ausführlicher Aufklärung der Patienten bzw. Probanden über Inhalt und Ziel der Studie und deren schriftlicher Einwilligung gewonnen (Genehmigung der Ethikkommission der Charité unter Nummer EA4/005/15). Die für die Proteinkonzentrationsbestimmungen verwendeten Hautbiopsien entstammten teils aus klinischen Studien (EudraCT-Nummer: 2010-024156-28 und 2010-020063-21).

Für die Untersuchungen wurden bei -80 °C gelagerte Hautbiopsien von sechs Patienten mit SchS, zehn Patienten mit UV, fünf Patienten mit csU und von elf gesunden Probanden (plastische Operationen) der Klinik für Dermatologie der Charité verwendet.

2.3.2 Materialien, Reagenzien und Geräte

Proteinisolierung:

- Precellys[®]-Gefäße, Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, France
- Lyse-Puffer, Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, France
- Precellys[®]24-Gerät, Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, France

ELISA:

- 0,05 % Tween 20, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
- Dulbeccos Phosphate Buffered Saline, life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
- Albumin bovine fraction V (BSA) pH 7,0 Serva GmbH, Heidelberg
- MaxiSorp 96 well plates, nunc, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
- Schwefelsäure 2 N, Merck KGaA, Darmstadt
- (TMB) Substrate Reagent Set, BD Opteiat[®] 555214, BD Biosciences, San Jose, USA
- ELISA reader, Dynatech Laboratories, El Paso, USA
- Revelation[®] Software

ELISA-Kits:

- Human IL-1 β , DY201-05, DuoSet ELISA, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
- Human IL-6, DY206, DuoSet ELISA, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
- Human IL-18, BPa DY119 DuoSet ELISA, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA

- Human Caspase-1, DCA 100, DuoSet ELISA, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA

2.3.3 Durchführung der Proteinisolierung

Die bei -80 °C gefrorenen Hautstanzen wurden zur Zellyse in spezielle Precellys®-Gefäße gegeben, die mit kleinen Keramikkügelchen befüllt waren. Es folgte das Lysieren des Gewebes unter Zugabe von jeweils 1 ml Lyse-Puffer pro Probe unter Stickstoff im Precellys® 24 Gerät bei 4 °C. Die Zellyse erfolgte zur Freisetzung der intrazellulären Proteine. Der so gewonnene Überstand wurde aus den Gefäßen abpipettiert und mit einem Dilution Puffer 1:1 verdünnt.

2.3.4 Proteinnachweis mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Konzentration der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-18 sowie von Caspase-1 wurde ein ELISA verwendet. Dieser beruht auf dem Prinzip eines Festphase-gebundenen Antikörpernachweises (**Abb. 6**).

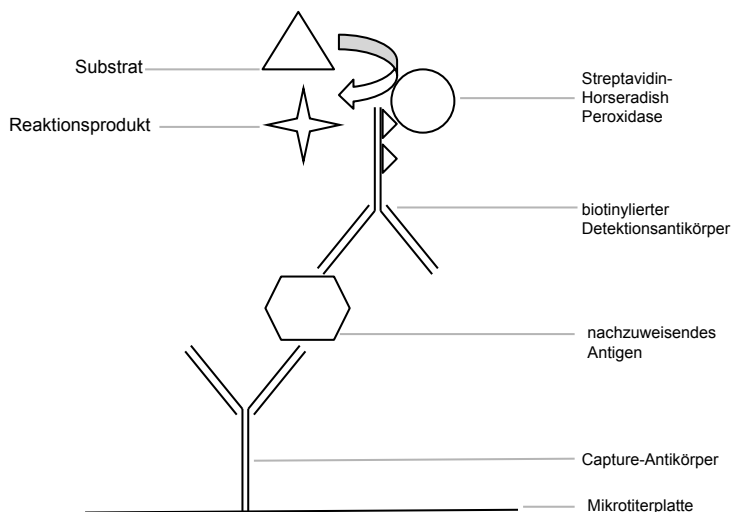


Abb. 6: Schematische Darstellung des ELISA-Prinzips (nach R&D Systems)¹⁰⁴

Für den ELISA wurde die sog. MaxiSorp Platte für die Bestimmungen der Konzentrationen von IL-1 β , IL-6 und IL-18 über Nacht mit dem Capture-AK beschichtet. Für Caspase-1 war die Platte im Kit bereits beschichtet. Nach einem Waschschriff mit Phosphate Buffered Saline (PBS)/Tween 20, folgte ein Blockieren mit Dilution Buffer aus 1 % bovinem Serum-Albumin (BSA) in PBS, worauf ein weiterer Waschschriff folgte. Dann wurden der Proteinstandard und die jeweiligen Lysate auf die Platte aufgetragen. Nach Reaktion von Capture-AK und Antigenen, also den Ziel-Proteinen im

Lysat, schlossen sich drei Waschschritte an. Zugabe von biotinyliertem Detektions-AK, Waschen (dreimal), Zugabe von Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppeltem Streptavidin und dann von TMB-Substrat. Stoppen der Reaktion nach 20 min durch Zugabe von Schwefelsäure. Messen der Signalstärke mittels ELISA-Reader im Bezug auf den Konzentrationsstandard. Insgesamt erfolgten Doppelbestimmungen mit Mittelwertbildungen.

Die Konzentration der nachzuweisenden Proteine (IL-1 β , IL-6, IL-18, Caspase-1) wurde in pg/ml bezogen auf 100 μ g/ml Gesamtprotein angegeben.

2.4 Erfassung und Auswertung ergänzender Patientendaten

Ergänzende Patientendaten (Laborparameter) wurden anhand der entsprechenden Patientenakten des Aktenarchivs der Klinik für Dermatologie, des Zentralarchivs sowie des SAP-Patienten-Programms der Charité erfasst. Die Daten wurden pseudonymisiert in Excel und Word dokumentiert, ausgewertet und dargestellt.

2.5 Statistische Auswertung und Dokumentation

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse kamen die Softwares SPSS und Excel zur Anwendung. Dabei wurden Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Es erfolgten Testungen auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov- und Shapiro-Wilk-Test. Für nicht-normalverteilte Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Als post-hoc Paarvergleich wurde der Mann-Whitney U Test benutzt. Für normalverteilte Stichproben erfolgten die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und als darauffolgende post hoc Paarvergleiche die Tests Tukey, Bonferroni und Sidak. Des Weiteren wurden Korrelationsanalysen für die potentiellen diagnostischen Biomarker nach Spearman durchgeführt.

Fallzahlabhängig wurden die statistischen Analysen mit den Gruppen SchS, UV, csU und den gesunden Probanden durchgeführt. Bei kleiner Fallzahl wurden die CAPS Patienten und der AOSD Patient rein deskriptiv in die Betrachtung aufgenommen, statistische Signifikanzberechnungen erfolgten nicht.

Grafische Darstellungen der Ergebnisse erfolgten mithilfe von Excel, SPSS sowie Graph Pad Prism.

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Untersuchungen

3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Da in der Literatur bei AIH und UV meist ein entzündliches Zellinfiltrat vorbeschrieben ist, während es bei csU eher zu Ödem- und weniger Infiltratbildung kommt, wurde mittels semiquantitativer Histomorphometrie anhand der HE-Färbung (**Abb. 8A-F**) der Ausprägungsgrad des zellulären Infiltrats (Score von 0-3) bestimmt (**Abb. 7**). Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (n=10) mit durchgehend einem Score von 0 fand sich im Median ein signifikant erhöhter Score ($p \leq 0,001$) von 1,0 für SchS (n=9) und von 0,75 für UV (n=18), während es keinen signifikanten Unterschied zwischen SchS und UV zu den csU Patienten (n=10, medianer Score 0,5) gab. Im Median fand sich ein Score von 1 für CAPS (n=3) und ein Score von 2,5 für AOSD (n=1). Anhand der HE-Färbung konnten keine genauen Aussagen über die Zelltypen des Infiltrats getroffen werden.

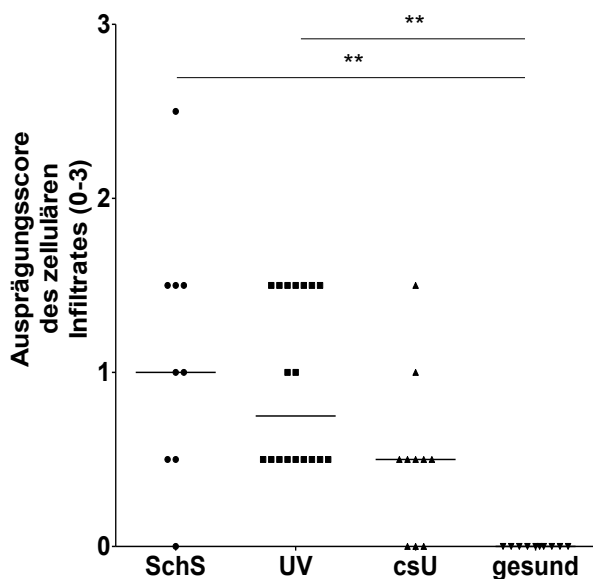


Abb. 7: Score der Ausprägung des zellulären Infiltrats in der Dermis bei den einzelnen Patienten/Probanden (Score 0 bis 3), dargestellt für die Diagnosen SchS, UV, csU und die gesunden Kontrollen. Die Kurz-Balken stellen den Median (Med) der jeweiligen Gruppe dar. ** = $p \leq 0,001$

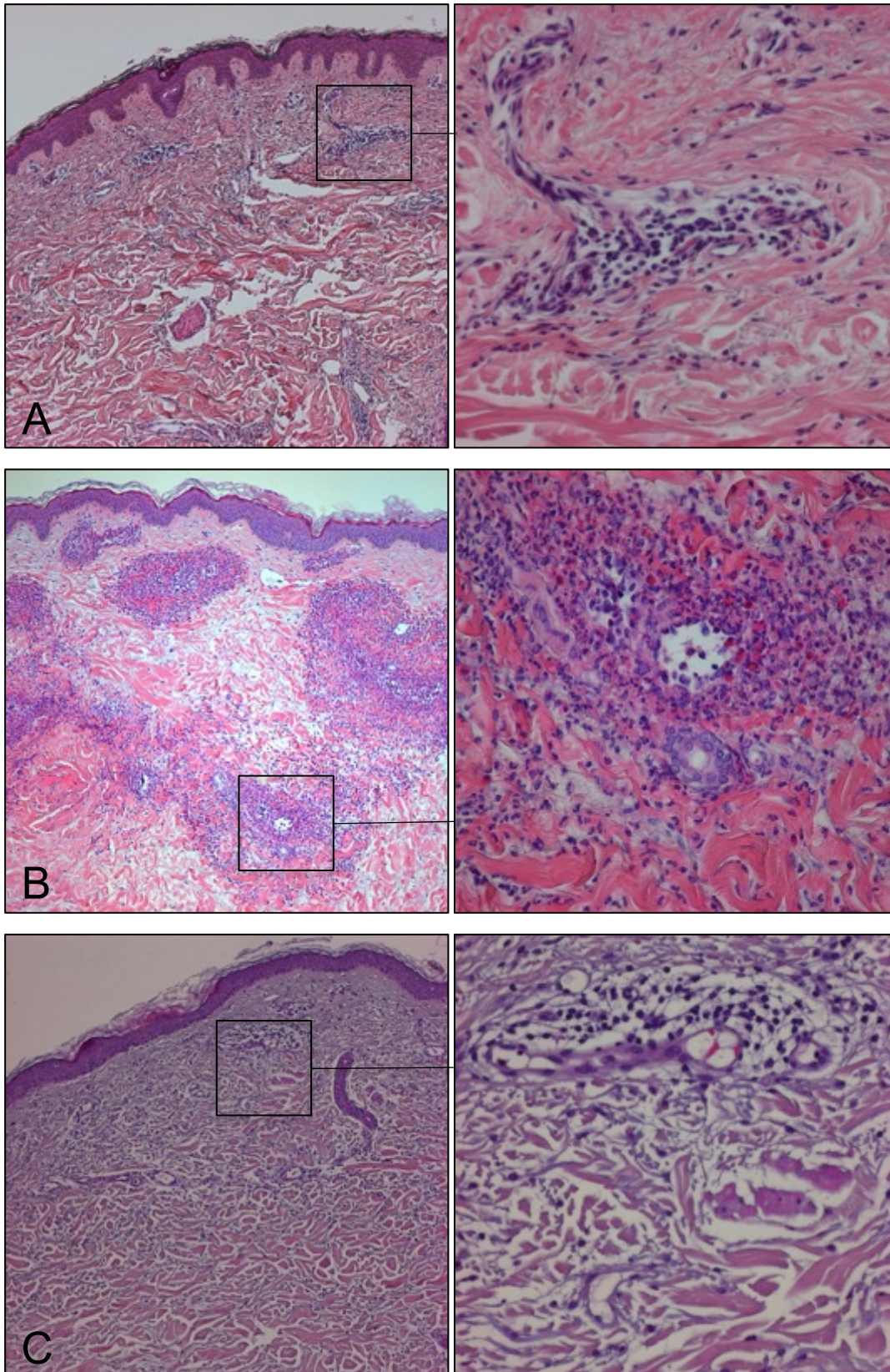


Abb. 8A-C: HE-Färbung (mikroskopische Fotodokumentation, exemplarisch): Moderate Ausprägung des Infiltrats bei Patienten mit A) CAPS und C) AOSD sowie starke Ausprägung des Infiltrats bei B) SchS (Übersicht 50x Vergrößerung, Ausschnitt 200x Vergrößerung)

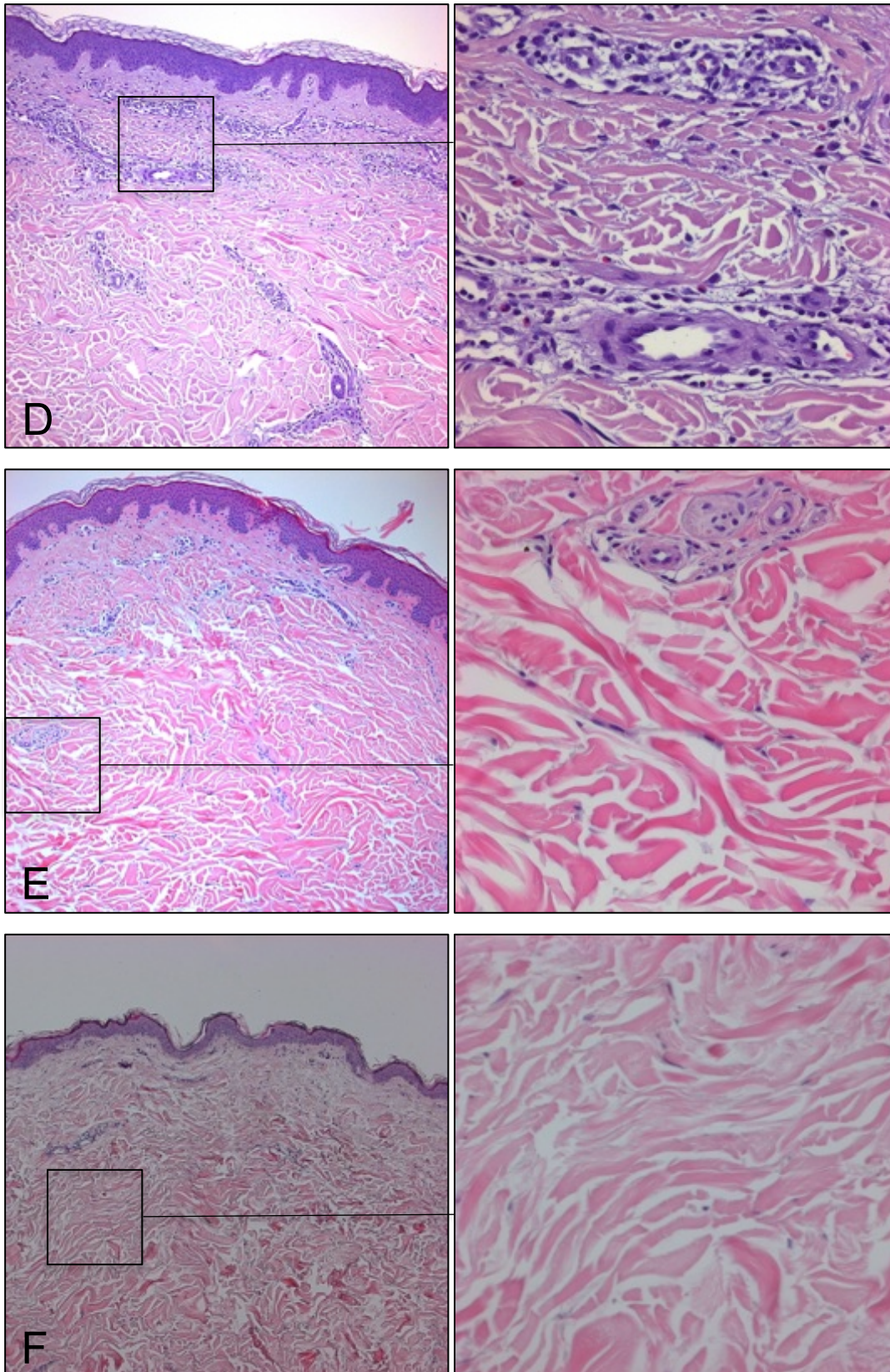


Abb. 8D-F: HE-Färbung (mikroskopische Fotodokumentation, exemplarisch): Moderate Ausprägung des Infiltrats bei Patient mit D) UV; geringes Infiltrat bei E) csU und F) kein zelluläres Infiltrat bei gesundem Probanden (Übersicht 50x Vergrößerung, Ausschnitt 200x Vergrößerung)

3.1.2 Mastzellen

Die mit Toluidinblau angefärbten Schnitte (**Abb. 10**) wurden mittels quantitativer Histomorphometrie, also Zählung positiv angefarbter Zellen/mm², analysiert (**Abb. 9**), um vergleichende Aussagen über die Mastzellzahl bei AIH, UV und csU treffen zu können. Bei den gesunden Kontrollen fand sich im Median eine Mastzelldichte von 39,0 Zellen/mm², im Vergleich hierzu zeigte sich eine Erhöhung der Mastzelldichte maximal für csU (75,2 Mastzellen/mm²), gefolgt von SchS (68,9 Mastzellen/mm²), CAPS (60,5 Mastzellen/mm²), UV (58,2 Mastzellen/mm²) und AOSD (53,8 Mastzellen/mm²). Ein signifikanter Unterschied konnte aber im Gruppenvergleich nicht festgestellt werden.

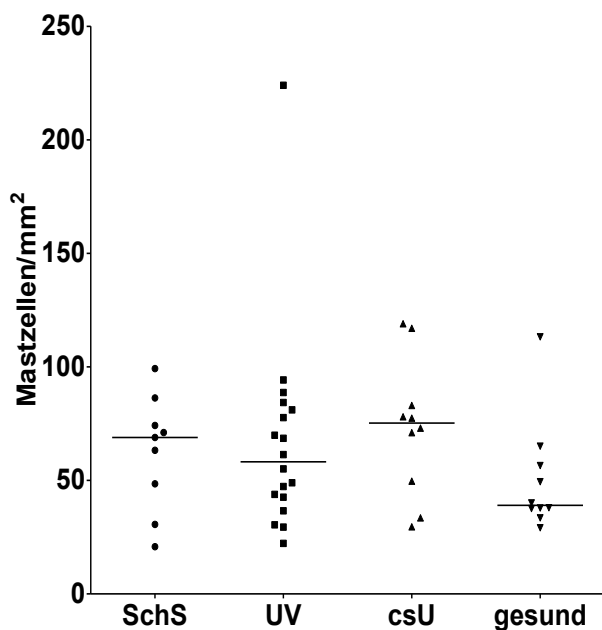


Abb. 9: Anzahl der Mastzellen pro mm² in der oberen papillären Dermis, dargestellt als Einzelergebnisse und Mediane (Kurz-Balken) der untersuchten Individuen.

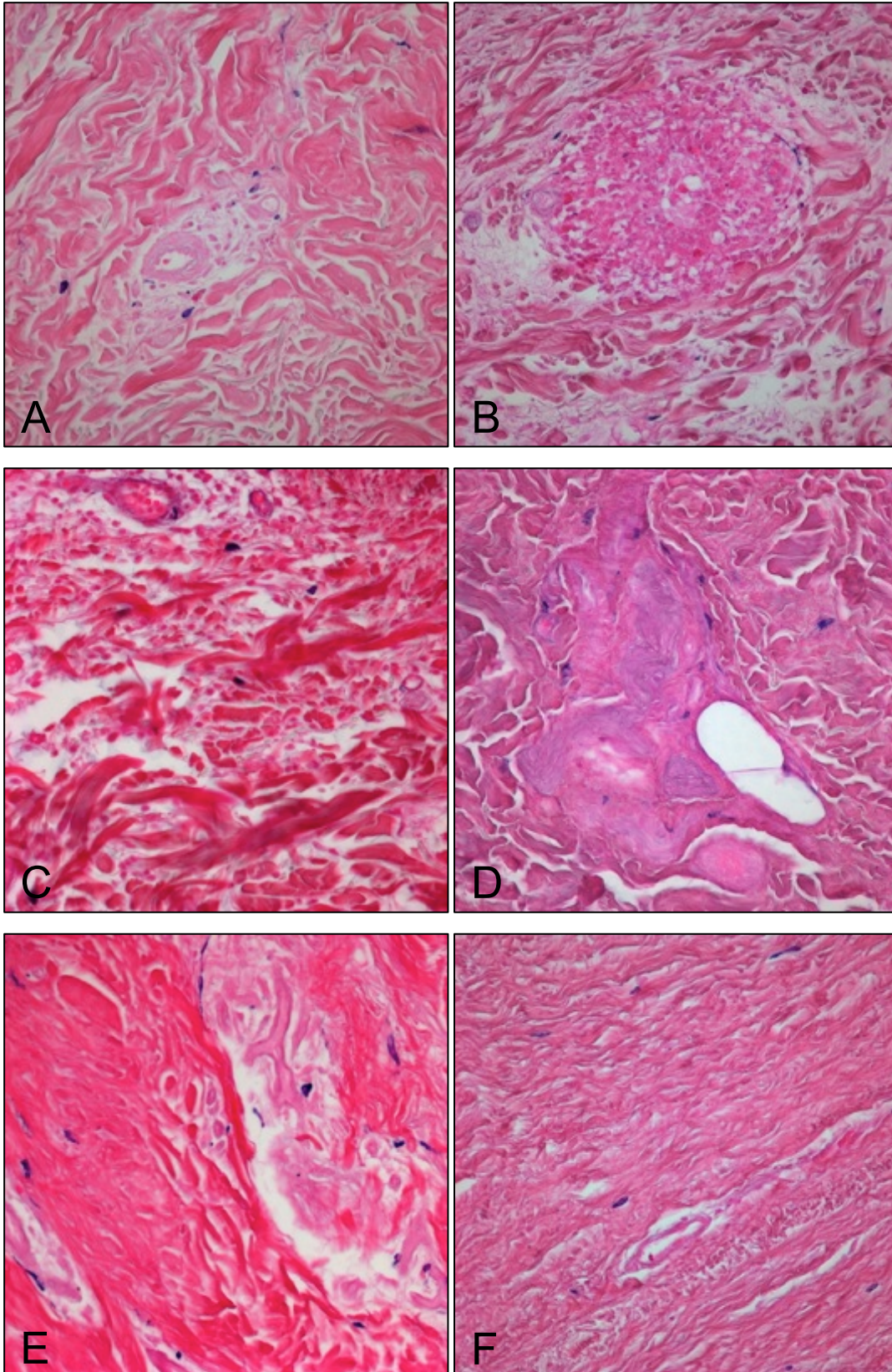


Abb. 10: Toluidinblau-Färbung (mikroskopische Fotodokumentation, exemplarisch): Mastzellen in der Dermis bei Patienten mit A) CAPS, B) SchS, C) AOSD, D) UV, E) csU und bei F) gesundem Probanden (200x Vergrößerung)

3.1.3 Myeloperoxidase (MPO) als Marker für neutrophile Granulozyten

Die Untersuchung der immunhistologischen Anfärbungen mit MPO-AK als Marker für neutrophile Granulozyten erfolgte quantitativ mittels Planimetrie mit der Software ImageJ, da eine Zählung von positiven Einzelzellen aufgrund der teils hohen Quantität und des teils diffusen Charakters der MPO-Anfärbung (schwierige Erkennbarkeit von Zellgrenzen) nicht möglich war (**Abb. 11, 12**). Der Mittelwert der MPO-Immunreaktivität lag mit 10,6 % am höchsten bei SchS und war damit im Vergleich zu csU (Mittelwert 1,8 %) und zu gesunden Probanden (Mittelwert 0 %) signifikant erhöht (jeweils $p \leq 0,05$). Ebenfalls im Vergleich zu csU und gesunden Kontrollen erhöht zeigte sich ein Mittelwert von 5,7 % bei UV sowie von 6,2 % bei CAPS. Bei AOSD fand sich ein Wert von 15,6 %. Nebenbefundlich auffällig waren bei $n=6/9$ SchS Patienten, $n=3/3$ CAPS Patienten und weniger ausgeprägt bei $n=8/18$ UV Patienten faden- und netzförmige extrazelluläre MPO-positive Strukturen. Ähnliche Strukturen sind von sog. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bekannt, dies sind von neutrophilen Granulozyten ausgehende extrazelluläre Formationen, bestehend aus DNA und Proteinen, die bei u.a. entzündlichen Vorgängen sowie der Bakterienabwehr beobachtet wurden.¹⁰⁵ Dieses Phänomen wurde daher weitergehend untersucht (siehe **3.1.9**).

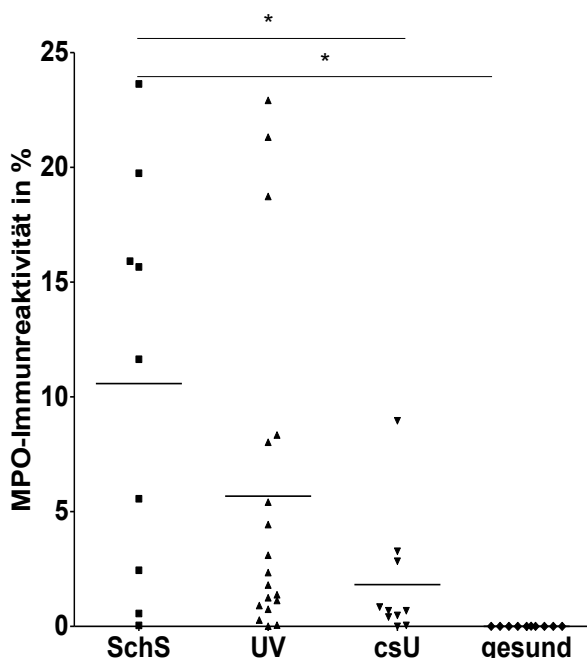


Abb. 11: Anteil der prozentualen MPO-Immunreaktivität an der oberen Dermis, als Einzelergebnisse dargestellt für die Erkrankungen/Kontrollen. Die Kurz-Balken stellen den Mittelwert (M) der jeweiligen Gruppen dar. * = $p \leq 0,05$

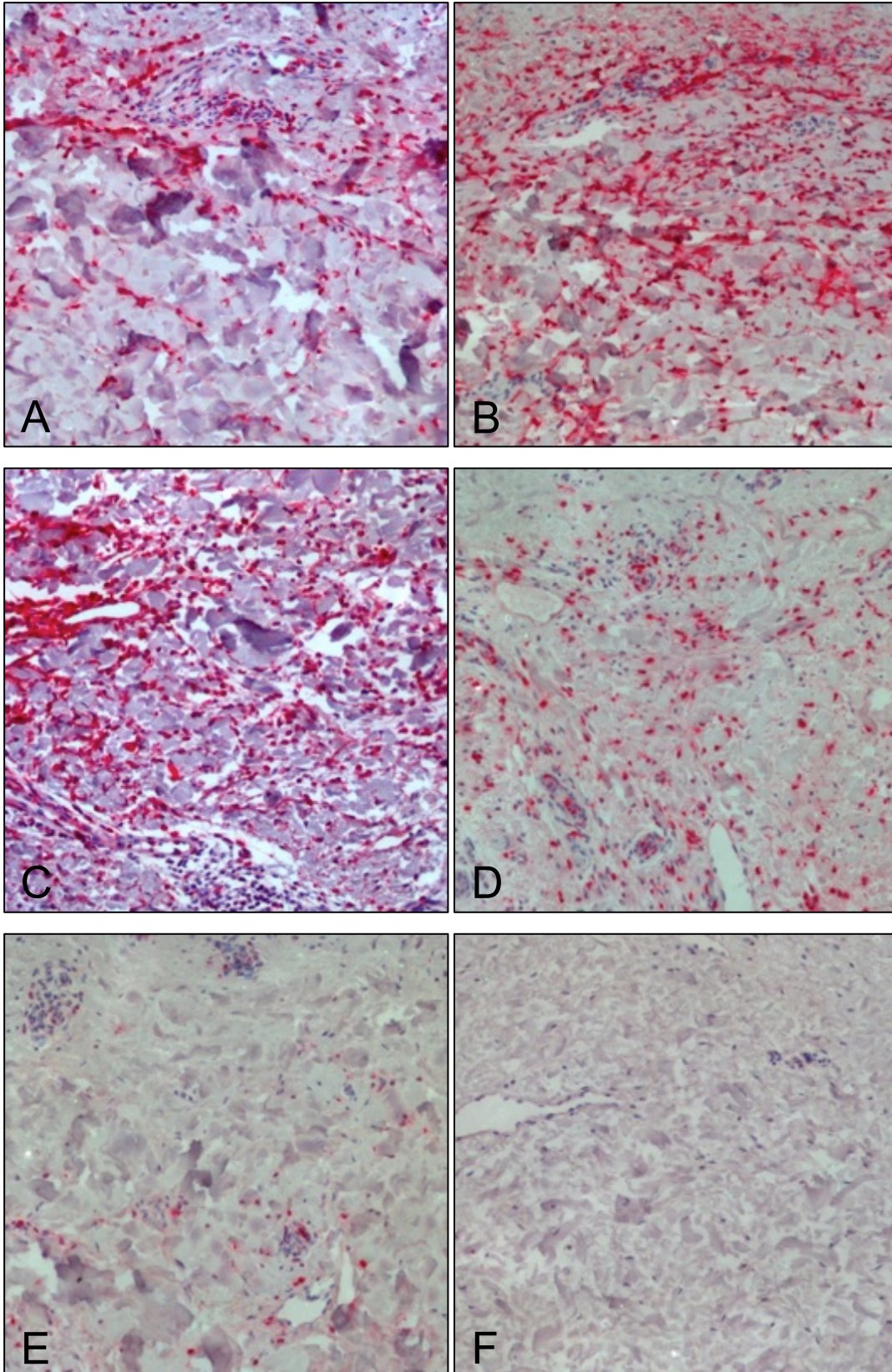


Abb. 12: Darstellung neutrophiler Granulozyten als MPO-positive Zellen in der Dermis (mikroskopische Fotodokumentation, exemplarisch): Patienten mit A) CAPS, B) SchS, C) AOSD, D) UV E) csU. Fehlender MPO-Nachweis bei F) gesunden Probanden (100x Vergrößerung)

3.1.4 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Die immunhistologischen Färbungen mit IL-1 β -AK wurden mittels Zählung positiv angefarbter Zellen/mm² für das vaskuläre und interstitielle dermale Kompartiment sowie insgesamt analysiert (**Abb. 14, Tab. 10**). Im Vergleich zu dem Basalwert gesunder Haut war die mittlere Dichte IL-1 β -positiver Zellen für beide Kompartimente bei CAPS, SchS, AOSSD, UV und csU höher (**Abb 13, Tab. 10**). Dabei war die mittlere Dichte der IL-1 β -positiven Zellen insgesamt (d.h. summativ in beiden Kompartimenten) bei AIH (166,9 bis 201,8 Zellen/mm²) und UV (193,5 Zellen/mm²) substantiell höher als bei csU (94,9/mm²) und gesunden Kontrollen (65,4 Zellen/mm²). Auffällig waren bei AIH höhere IL-1 β -positive Zellzahlen im interstitiellen, bei UV hingegen im vaskulären Kompartiment (**Tab. 10**). Bei relativ großer Variabilität zeigte sich ein signifikanter Unterschied nur für den Vergleich von UV (123,0 Zellen/mm²) und gesunden Kontrollen (42,4 Zellen/mm²) und zwar hinsichtlich des vaskulären Kompartiments ($p \leq 0,05$).

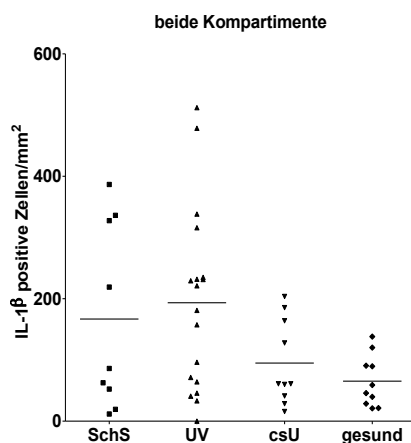


Abb. 13: Anzahl IL-1 β -positiver Zellen/mm² in der oberen papillären Dermis summativ in beiden Kompartimenten, dargestellt als Einzelergebnisse für die untersuchten Individuen. Die Kurz-Balken stellen den Mittelwert (M) dar

Diagnose/ IL-1 β -positive Zellen/mm ²		AIH			UV n=18	csU n=10	gesund n=10
		CAPS n=3	SchS n=9	AOSSD n=1			
Vaskuläres Kompartiment	M	87,0	69,9	58,6	123,0	59,3	42,4
	SD	84,7	60,3	-	101,8	42,7	29,8
Interstitielles Kompartiment	M	103,3	90,5	143,2	70,5	35,6	23,0
	SD	45,4	105,5	-	60,5	27,9	17,2
Beide Kompartimente	M	190,2	166,9	201,8	193,5	94,9	65,4
	SD	119,0	150,8	-	149,8	69,1	42,0

Tab. 10: Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) für die Dichte der IL-1 β -positiven Zellen/mm² in den dermalen Kompartimenten für die Erkrankungen/gesunden Kontrollen

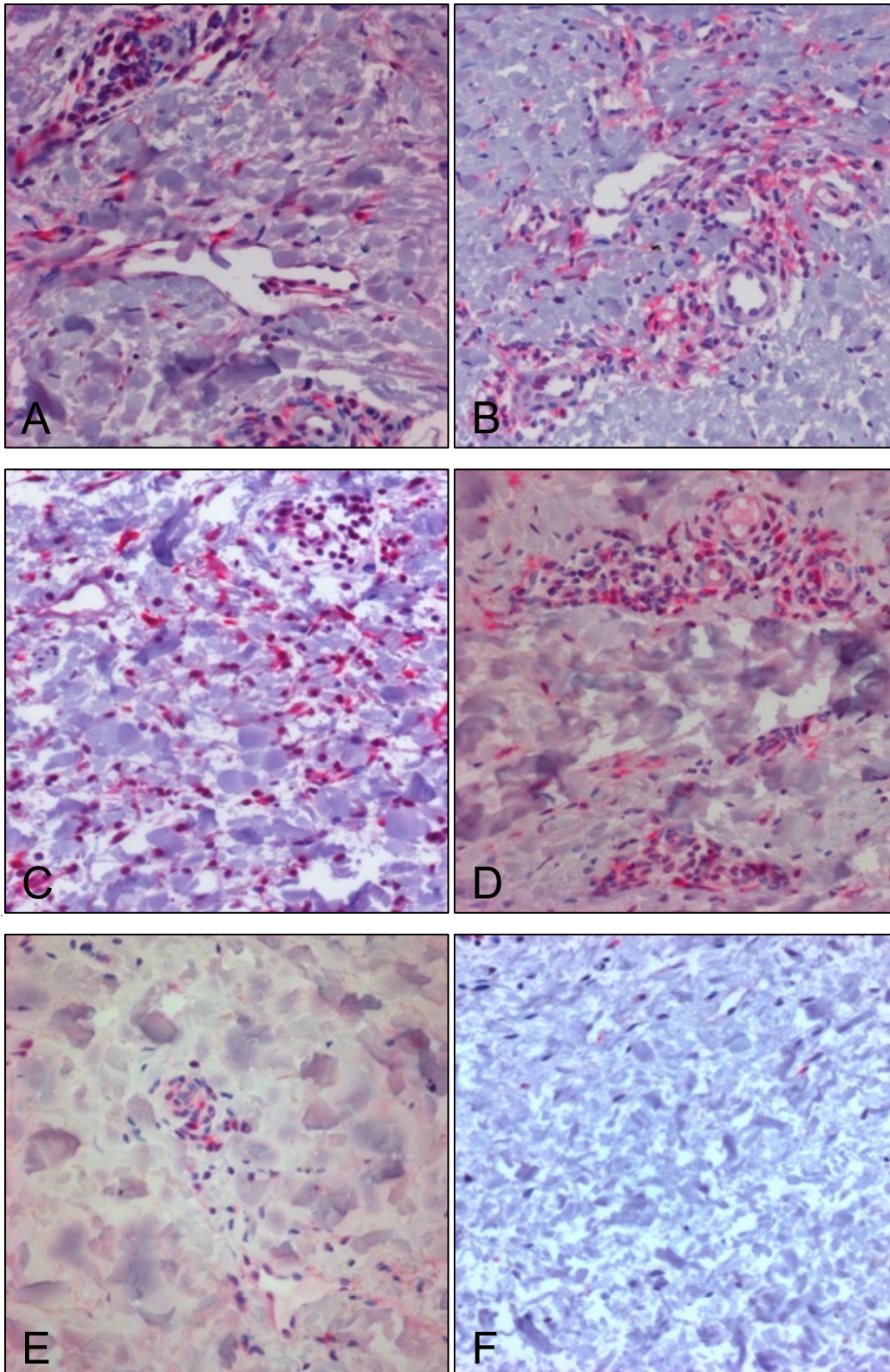


Abb. 14: IL-1 β -positive Zellen in der Dermis (mikroskopische Fotodokumentation, exemplarisch): Höhere Dichte positiver Zellen bei Patienten mit A) CAPS, B) SchS, C) AOSD und D) UV im Vergleich zu E) csU und F) gesunden Probanden (200x Vergrößerung)

3.1.5 Interleukin-6 (IL-6)

Die Analyse der immunhistologischen Färbungen mit IL-6-AK erfolgte mittels Zählung positiv angefärbter Zellen/mm² (**Abb. 15, 16, Tab. 11**). Im Vergleich zu dem Basalwert der gesunden Kontrollen lag die mittlere Dichte IL-6-positiver Zellen in beiden dermalen Kompartimenten bei AIH und UV in einem höheren Bereich als bei csU. So ergab sich eine mittlere summative Dichte IL-6-positiver Zellen in beiden Kompartimenten von 70,1 Zellen/mm² für die gesunden Kontrollen, von 119,8 Zellen/mm² für csU, von 233,4 Zellen/mm² für UV und in einem Bereich von 157,1 Zellen/mm² bis 319,7 Zellen/mm² für AIH. Bei hoher Variabilität fanden sich signifikante Unterschiede beim Vergleich gesunde Kontrollen versus UV ($p \leq 0,05$) und versus SchS ($p \leq 0,001$) für beide Kompartimente sowie beim Vergleich von csU versus SchS für das vaskuläre Kompartiment und die Summation beider Kompartimente ($p \leq 0,05$).

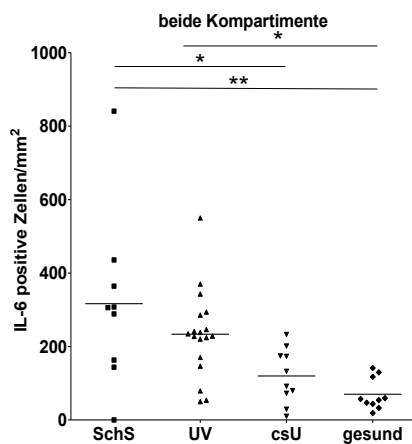


Abb. 15: Anzahl IL-6-positiver Zellen/mm² in der oberen papillären Dermis insgesamt in beiden Kompartimenten, dargestellt als Einzelergebnisse. Die Kurz-Balken stellen den Mittelwert (M) dar. * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,001$

Diagnose/ IL-6-positiv Zellen/mm ²		AIH			UV	csU	gesund
		CAPS n=3	SchS n=9	AOSD n=1	n=18	n=10	n=10
Vaskuläres Kompartiment	M	106,6	192,9	159,2	147,7	74,9	54,8
	SD	16,7	125,7	-	75,7	57,8	33,9
Interstitielles Kompartiment	M	50,5	123,7	160,5	85,7	44,8	15,3
	SD	27,6	120,4	-	55,0	38,6	16,8
Beide Kompartimente	M	157,1	316,6	319,7	233,4	119,8	70,1
	SD	11,6	236,1	-	118,6	74,7	43,1

Tab. 11: Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der Anzahl der IL-6-positiven Zellen/mm² in den dermalen Kompartimenten für die Erkrankungen/gesunden Kontrollen

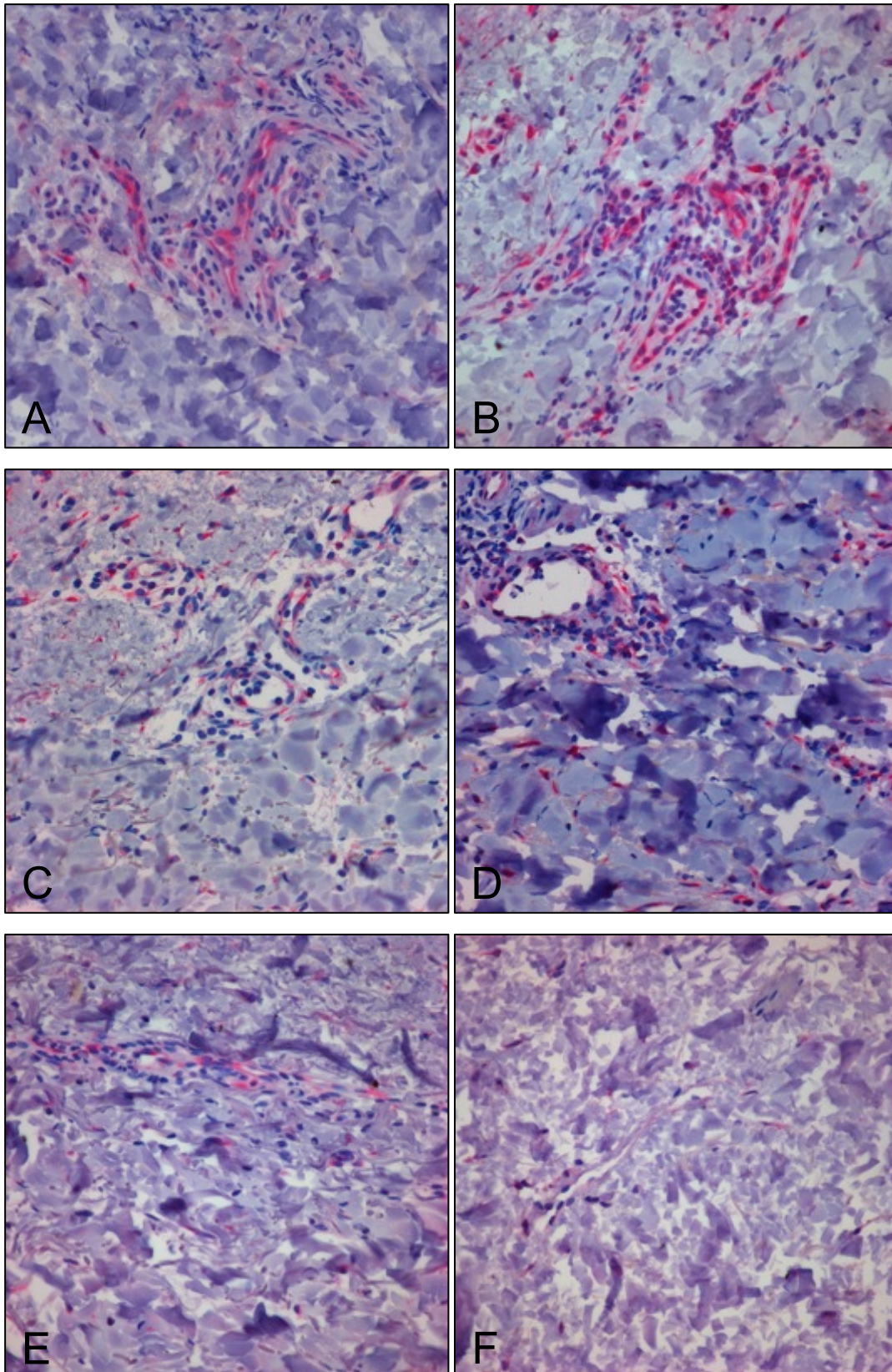


Abb. 16: IL-6-positive Zellen in der Dermis (mikroskopische Fotodokumentation, exemplarisch): Höhere Anzahl positiver Zellen bei Patienten mit A) CAPS, B) SchS, C) AOSD und D) UV im Vergleich zu E) csU und F) gesunden Probanden (200x Vergrößerung)

3.1.6 Interleukin-18 (IL-18)

Die immunhistologischen Färbungen mit IL-18-AK wurden mittels Zählung positiv angefärbter Zellen/mm² analysiert (**Abb. 17, 18, Tab. 12**). Die mittlere Dichte der IL-18-positiven Zellen beider Kompartimente war bei den Patienten mit AIH und UV größer als bei csU, wobei sich niedrigste Werte für die gesunden Kontrollen ergaben. Für beide Kompartimente summativ fand sich die mittlere Dichte IL-18-positiver Zellen am höchsten bei AOSD (528,2 Zellen/mm²), gefolgt von CAPS (152,3 Zellen/mm²), SchS (127,4 Zellen/mm²), UV (108,8 Zellen/mm²), csU (61,7 Zellen/mm²), im Bezug auf gesunde Kontrollen (24,4 Zellen/mm²). Bei hoher Variabilität ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. Bei der Anfärbung mit IL-18 fiel durchgehend ein unspezifischer Hintergrund auf.

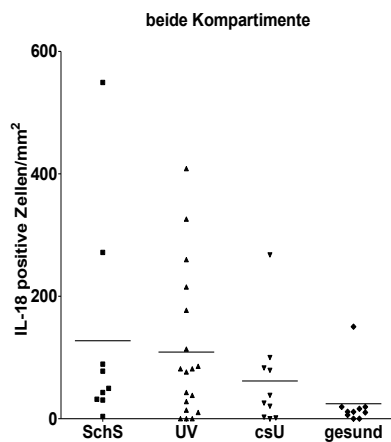


Abb. 17: Anzahl IL-18-positiver Zellen/mm² in der oberen papillären Dermis in beiden Kompartimenten, dargestellt als Einzelergebnisse. Die Kurz-Balken stellen den Mittelwert (M) dar

Diagnose/ IL-18-positive Zellen/mm ²		AIH			UV n=18	csU n=10	gesund n=10
		CAPS n=3	SchS n=9	AOSD n=1			
Vaskuläres Kompartiment	M	74,8	86,9	140,9	56,4	41,5	19,8
	SD	15,5	121,8	-	68,2	61,9	42,5
Interstitielles Kompartiment	M	77,5	58,7	387,3	56,2	20,1	4,7
	SD	55,3	89,3	-	63,3	21,6	4,5
Beide Kompartimente	M	152,3	127,4	528,2	108,8	61,7	24,4
	SD	66,8	176,7	-	121,1	81,0	44,8

Tab. 12: Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der Anzahl der IL-18-positiven Zellen/mm² in den dermalen Kompartimenten für die Erkrankungen/gesunden Probanden

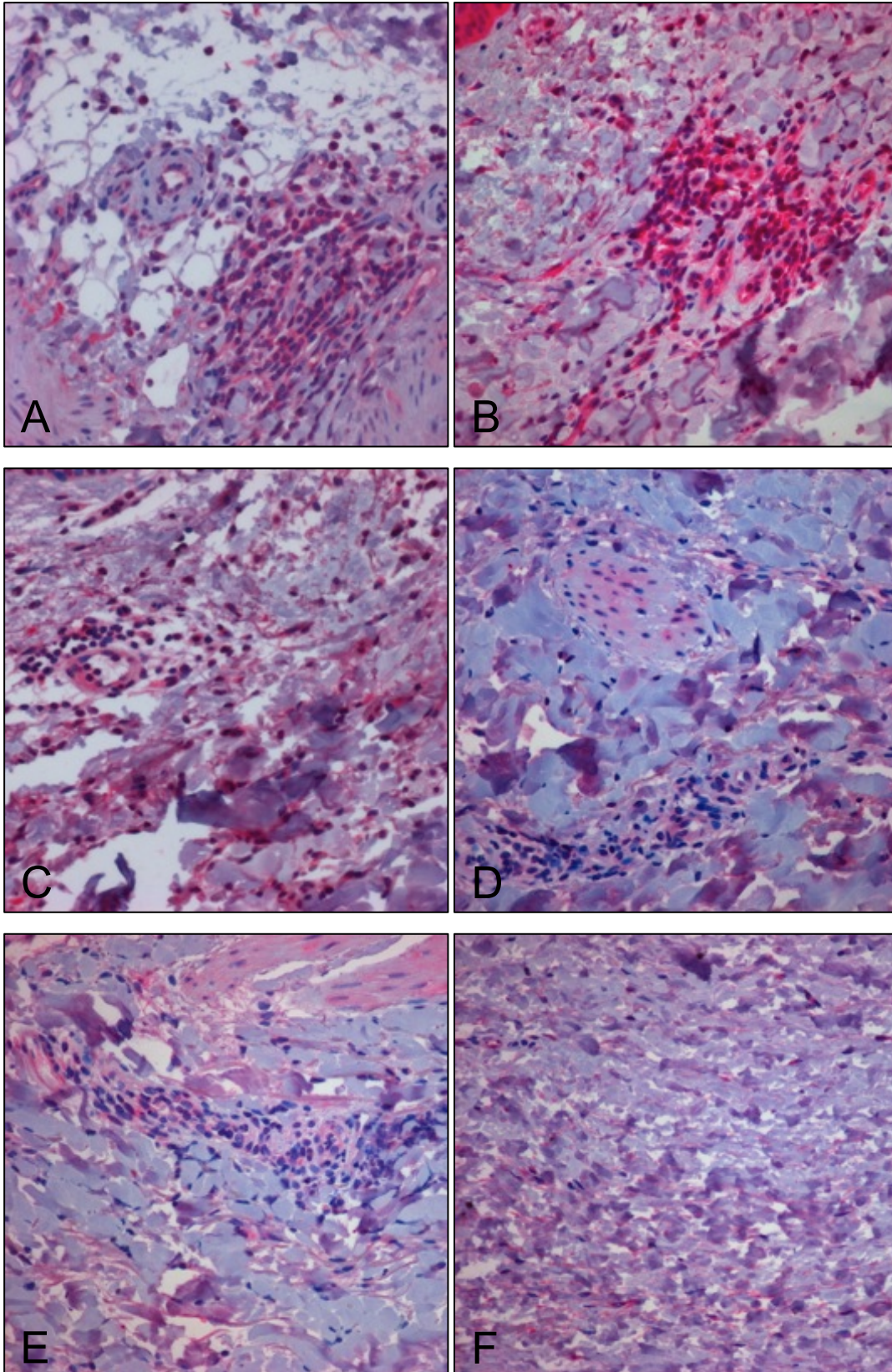


Abb. 18: IL-18-positive Zellen in der Dermis (mikroskopische Fotodokumentation, exemplarisch): Höhere Anzahl positiver Zellen bei Patienten mit A) CAPS, B) SchS, C) AOSD und D) UV im Vergleich zu E) csU und F) gesunden Probanden (teils stärkerer unspezifischer Background, 200x Vergrößerung)

3.1.7 Inflammasommarker

3.1.7.1 Apoptosis Speck Protein (ASC)

Die Auswertung der immunhistologischen Anfärbungen mit ASC-AK (**Abb. 19, 20**) erfolgte quantitativ mittels Planimetrie mit der Software ImageJ. Dies deshalb, da eine Auszählung einzelner positiver Zellen aufgrund der hohen Quantität und teils diffusen Charakters der ASC-Anfärbung nicht möglich war. Die mittlere prozentuale ASC-Immunreaktivität zeigte sich im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (1,8 %) am höchsten bei AOSD (33,8 %) und SchS (15,6 %), gefolgt von csU (6,7 %), UV (6,3 %) und CAPS (5,8 %). Es konnten signifikante Unterschiede im Vergleich von SchS zu gesunden Probanden ($p \leq 0,001$) sowie bemerkenswerterweise zu csU und zu UV (jeweils $p \leq 0,05$) festgestellt werden.

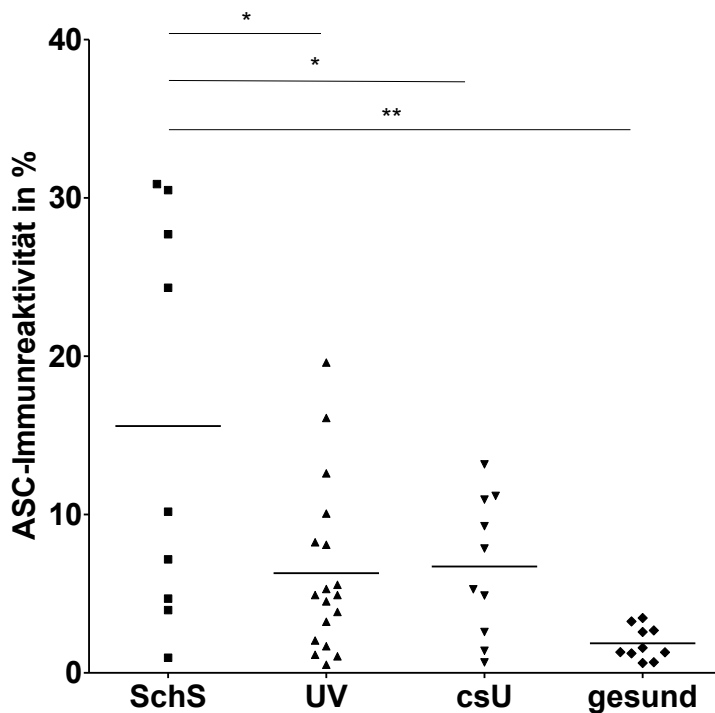


Abb. 19: Anteil der planimetrisch erfassten prozentualen ASC-Immunreaktivität an der oberen Dermis als individuelle Messergebnisse, dargestellt für die unterschiedlichen Diagnosen/gesunden Probanden. Die Kurz-Balken stellen den Mittelwert (M) dar. * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,001$

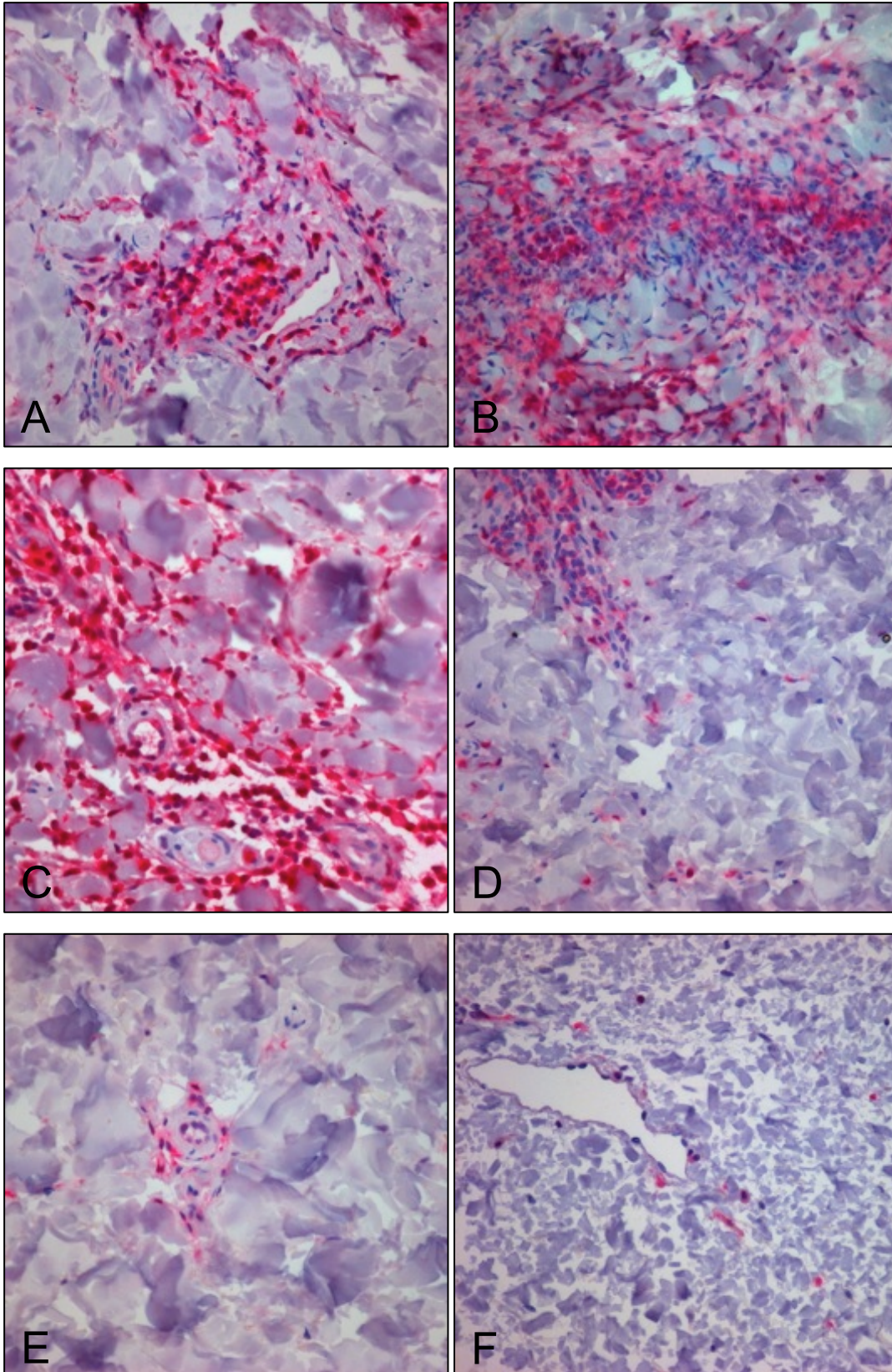


Abb. 20: ASC-positive Zellen in der Dermis (mikroskopische Fotodokumentation, exemplarisch): Höhere Anzahl positiver Zellen bei Patienten mit A) CAPS, B) SchS, C) AOSD und D) UV im Vergleich zu E) csU und F) gesunden Probanden (200x Vergrößerung)

3.1.7.2 Caspase-1

Die Analyse der immunhistologischen Färbungen mit Caspase-1-AK erfolgte durch semiquantitative Histomorphometrie (**Abb. 21, 22**). Die gesunden Probanden zeigten keine Immunreaktivität des zellulären Infiltrats für Caspase-1 im Sinne eines Scores von 0. Eine moderate bis starke mediane Immunreaktivität konnte bei CAPS (Score von 1,5), SchS und UV (jeweils Score von 1,0) beobachtet werden. Für AOSD ergab sich eine stärkere Immunreaktivität (Score von 2,0). Bei den Patienten mit csU war die mediane Immunreaktivität relativ gering (Score von 0,75) und lag damit unter den Werten der AIH (Scores von 1,5 bis 2,0). Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich für den Vergleich von gesunden Probanden mit SchS und mit UV ($p \leq 0,001$) sowie mit csU ($p \leq 0,05$).

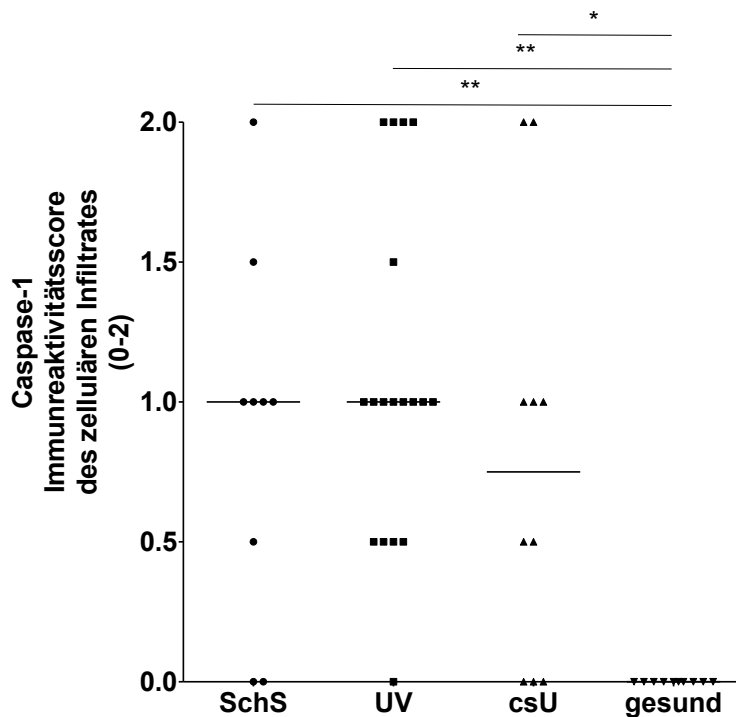


Abb. 21: Immunreaktivitätsscore für Caspase-1 des zellulären Infiltrats in der Dermis als Einzelergebnisse (Score von 0 bis 2), dargestellt für die Diagnosen/Probanden. Die Kurz-Balken stellen den Median dar.
* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,001$

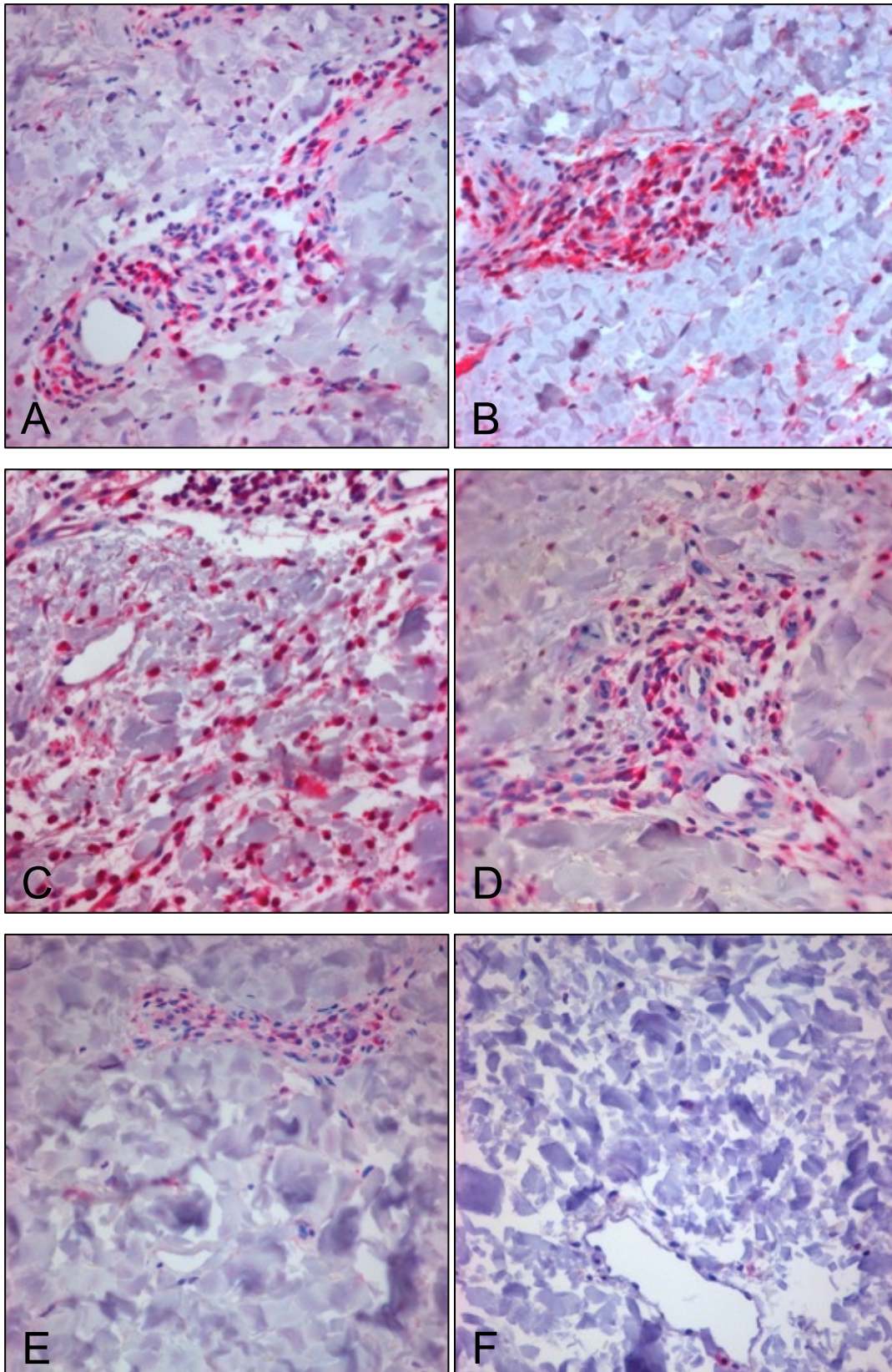


Abb. 22: Caspase-1-positive Zellen in der Dermis (mikroskopische Fotodokumentation, exemplarisch): Starker Immunreaktivitäts-Score bei Patienten mit A) CAPS, B) SchS, C) AOSD und D) UV, geringer Score bei E) csU. F) Kein Nachweis eines zellulären Infiltrats bei gesunden Probanden (200x Vergrößerung)

3.1.7.3 Nucleotide-binding Domain-like Receptor Protein 3 (NLRP3)

Die immunhistologischen Färbungen mit NLRP3-AK waren insgesamt nur sehr schwach, sodass keine Auswertung möglich war.

3.1.8 Andere untersuchte immunhistologische Marker

3.1.8.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Basierend auf den Ergebnissen einer Studie, welche VEGF als Serum-Marker zur Diagnostik und Therapie-Verlaufskontrolle bei SchS vorschlug⁹⁷, sollte VEGF auf seine potentielle Funktion als diagnostischer Biomarker in der Haut untersucht werden. Die immunhistologischen Anfärbungen mit VEGF-AK wurden mittels semiquantitativer Histomorphometrie ausgewertet (**Abb. 23, 24**). Bei den gesunden Kontrollen fand sich keine Reaktivität (Score von 0). Die mediane VEGF-Immunreaktivität zeigte sich im Median am höchsten bei AOSD (Score von 2,0) sowie SchS und UV (jeweils Score von 1,5), wohingegen sich bei csU ein niedriger Wert (Score von 0,75) fand. Es konnten signifikante Unterschiede im Vergleich von gesunden Kontrollen mit SchS ($p \leq 0,001$) und mit UV ($p \leq 0,05$) festgestellt werden.

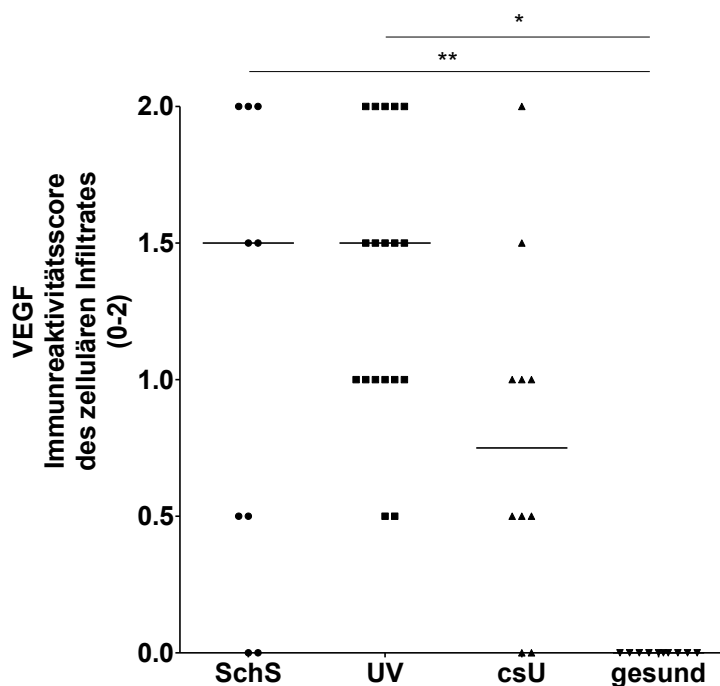


Abb. 23: VEGF-Immunreaktivitätsscore des zellulären Infiltrats in der Dermis als Einzelergebnisse (Score von 0 bis 2), dargestellt als individuelle Messwerte für die unterschiedlichen Diagnosen/gesunden Kontrollen. Die Kurz-Balken stellen den Median dar. * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,001$

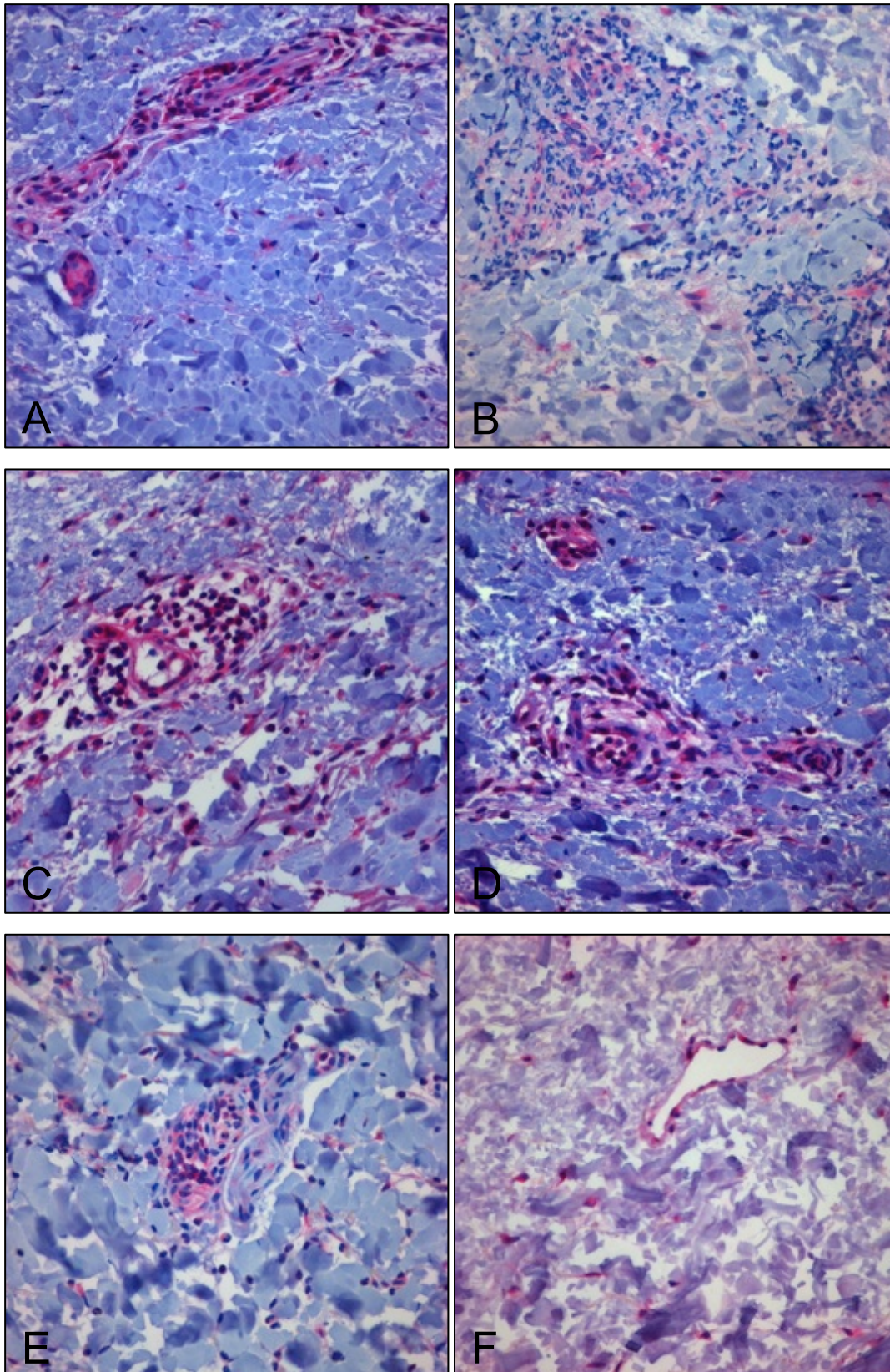


Abb. 24: VEGF-positive Zellen in der Dermis (mikroskopische Fotodokumentation, exemplarisch): Hoher Immunreaktivitäts-Score bei Patienten mit A) CAPS, C) AOSD und D) UV, moderater Score bei B) SchS und E) csU. F) gesunder Proband (200x Vergrößerung)

3.1.8.2 Interleukin-17 (IL-17)

Die Analyse der immunhistologischen Anfärbungen mit IL-17-AK war nicht möglich, da eine starke, unspezifische Hintergrundfärbung vorlag.

3.1.9 Immunfluoreszenzfärbungen zur Analyse der Kolokalisation auf zellulärer und extrazellulärer Ebene

Zur Identifizierung des Ursprungs der Interleukine IL-1 β , IL-6 und IL-18 wurden Kolokalisationsfärbungen dieser mit Mastzellen (Avidin-FITC) und neutrophilen Granulozyten (MPO) angefertigt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden exemplarisch an der läsionalen Haut von jeweils drei Patienten mit CAPS, SchS, UV, csU und an Kontroll-Hautgewebe von drei gesunden Probanden durchgeführt. Die Einzelergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung sind in der Übersicht tabellarisch dargestellt (**Tab. 13**).

Grundsätzlich wurde eine Kolokalisation für dermale Mastzellen mit IL-1 β und IL-6 sowie für dermale MPO-positive neutrophile Granulozyten mit IL-1 β und IL-18 für AIH beobachtet (**Abb. 25**). Hingegen fand sich keine Kolokalisation von Mastzellen mit IL-18 und von neutrophilen Granulozyten mit IL-6. Der Anteil von Fällen mit oben genannten Kolokalisationen war bei den gesunden Kontrollen und csU geringer als bei CAPS, SchS und UV.

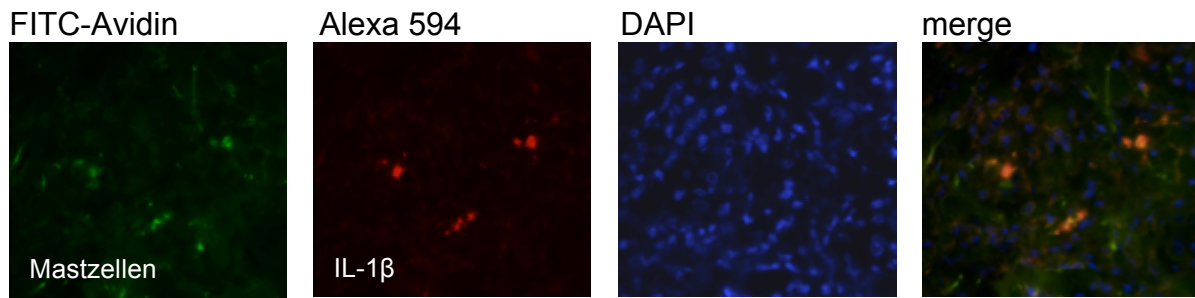
Die obige Beobachtung faden- und netzförmiger extrazellulärer MPO-positiver Strukturen bei n=6/9 SchS Patienten, n=3/3 CAPS Patienten und weniger stark ausgeprägt bei n=8/18 UV Patienten (siehe **3.1.3**, S. 48), gab aufgrund der charakteristischen Morphologie einen Hinweis auf das mögliche Vorhandensein sog. NETs und wurde weiter mittels Immunfluoreszenz-Kofärbungen untersucht. NETs sind im Kontext entzündlicher Vorgänge und der Bakterienabwehr beschrieben.¹⁰⁵ Es handelt sich dabei um von neutrophilen Granulozyten ausgebildete extrazelluläre Strukturen aus Chromatin und Proteinen.¹⁰⁵ Das Enzym MPO oder das antimikrobielle Protein Cathelicidin bilden u.a. den Protein-Anteil der NETs.¹⁰² So wurden zum direkten NETs-Nachweis eine Kolokalisationsfärbung für MPO und Histon H2A (Chromatin-Bestandteil) sowie eine Cathelicidin-Einzelmarkerfärbung jeweils mit DAPI (DNA-Anfärbung) durchgeführt. Dabei ließen sich in der Immunfluoreszenz bei n=3/3 CAPS, n=3/3 SchS (**Abb. 26A**) und n=1/3 UV in der oberen Dermis extrazellulär lokalisierbare Signale für den Neutrophilen-Marker MPO, den Nukleinsäure-Farbstoff DAPI und

Histon H2A nachweisen. Bei den csU Patienten und den gesunden Probanden gelang dieser Nachweis nicht (**Abb. 26B, C**).

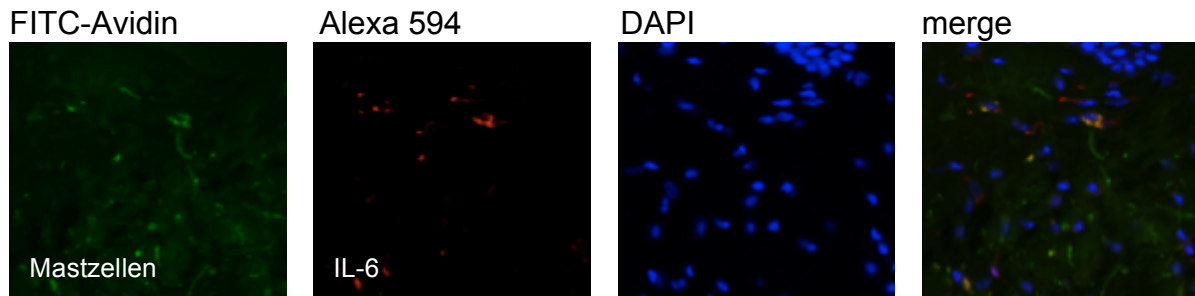
Das Neutrophilen-Protein Cathelicidin war extrazellulär bei allen drei untersuchten Präparaten von SchS (**Abb. 27**), bei n=2/3 von CAPS und bei n=1/3 von UV nachweisbar. Diese Befunde bestätigen qualitativ das Vorkommen von NETs bei obig benannten Erkrankungen.

Untersuchungsbedingungen		AIH		UV	csU	gesund
		CAPS	SchS			
Immunfluoreszenzfärbung						
Kolokalisation:		Patienten-Zahl mit positiver Kolokalisation / Gesamt-Patienten-Zahl				
Mastzellen +	IL-1β	n=3/3	n=3/3	n=3/3	n=1/3	n=1/3
	IL-6	n=3/3	n=1/3	n=2/3	n=1/3	n=1/3
	IL-18	n=0/3	n=0/3	n=0/3	n=0/3	n=0/3
Neutrophile Granulozyten (MPO) +	IL-1β	n=3/3	n=3/3	n=3/3	n=1/3	n=0/3
	IL-6	n=0/3	n=0/3	n=1/3	n=0/3	n=0/3
	IL-18	n=3/3	n=3/3	n=3/3	n=1/3	n=1/3
	Histon H2A	n=3/3	n=3/3	n=1/3	n=0/3	n=0/3
Einzelmarker:		Patienten mit positivem extrazellulären Signal / Gesamt-Patienten-Zahl				
Cathelicidin		n=2/3	n=3/3	n=1/3	n=0/3	n=0/3

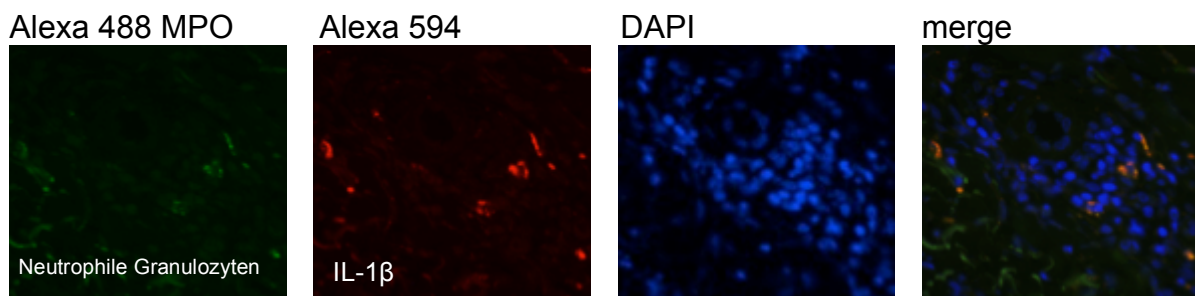
Tab. 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen - Darstellung der jeweiligen Anzahl der Patienten und gesunden Kontrollen mit positiver Kolokalisations- bzw. extrazellulärer Einzelmarker-Färbung



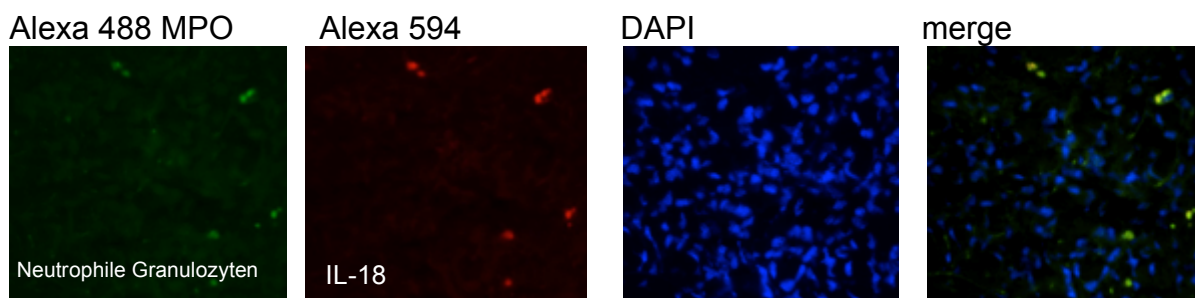
A)



B)

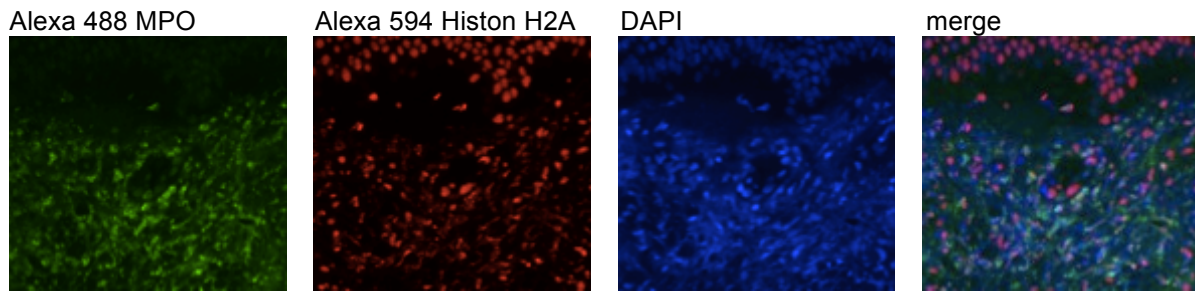


C)

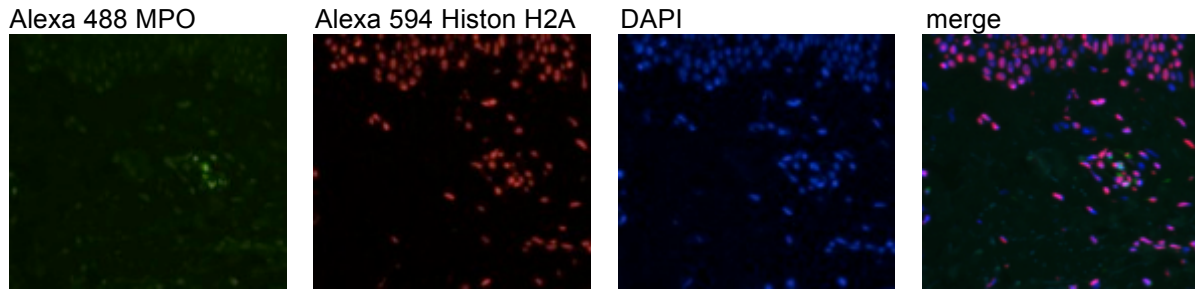


D)

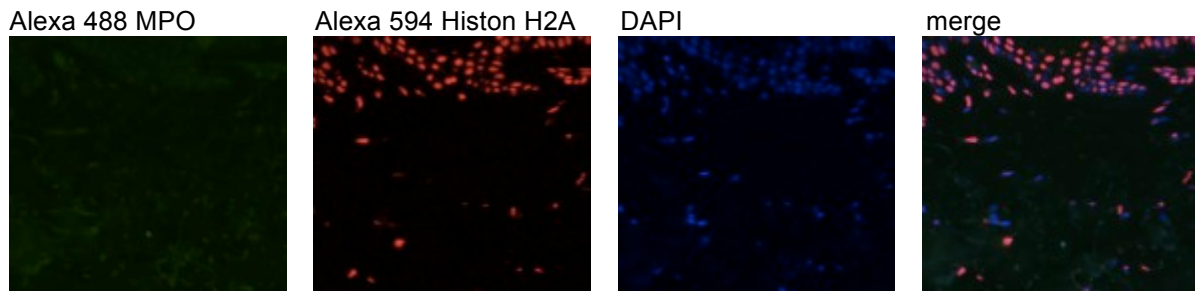
Abb. 25: Immunfluoreszenzfärbungen bei einem Patienten mit SchS (exemplarisch): Kolokalisation von Mastzellen (FITC-Avidin – grün) mit A) IL-1 β (Alexa 594 - rot) und mit B) IL-6 (Alexa 594 - rot). Kolokalisation von neutrophilen Granulozyten (Alexa 488 – grün) mit C) IL-1 β (Alexa 594 – rot) und D) IL-18 (Alexa 594 – rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Kolokalisations-Signal (merge) in gelb-orange. (400x Vergrößerung)



A) SchS

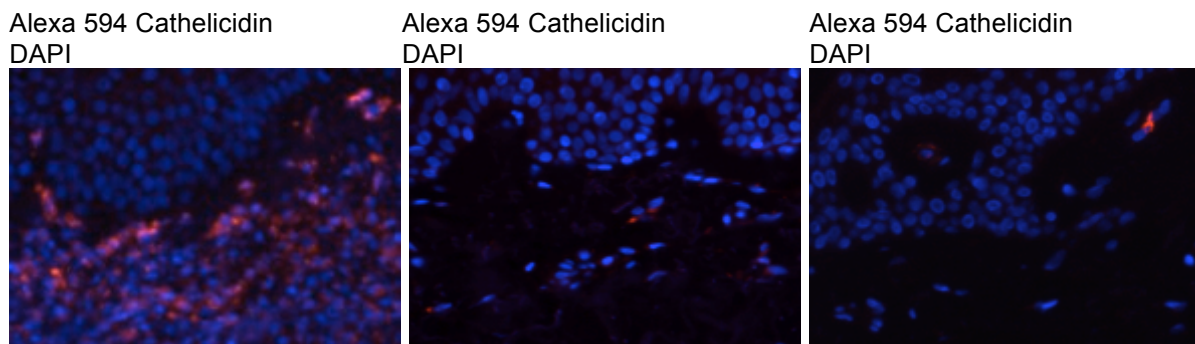


B) csU



C) gesund

Abb. 26: exemplarische Kolokalisationsfärbung von MPO (Alexa 488 –grün) und Histon H2A (Alexa 594 – rot) mit DAPI (Zellkerne, blau) sowie zugehöriges Fusionsbild (merge) bei A) SchS Patient mit kogefärbten extrazellulären Strukturen und bei B) csU Patient und C) gesunder Kontrolle ohne kogefärbte extrazelluläre Strukturen (200x Vergrößerung)



A) SchS

B) csU

C) gesund

Abb. 27: Immunfluoreszenzfärbung für Cathelicidin (Alexa 594 – rot) mit DAPI (Zellkerne, blau) bei exemplarisch A) SchS Patient mit extrazellulärem Signal, bei B) csU Patient und C) gesunder Kontrolle ohne extrazellulärem Signal. (200x Vergrößerung)

3.2 Proteinnachweis

3.2.1 Interleukine und Caspase-1

Die Ergebnisse der vorausgegangenen immunhistologischen Untersuchungen (s. o.) wiesen auf eine potentielle Markerfunktion der Interleukine und Caspase-1 zur Differenzierung der AIH bzw. UV von csU hin, sodass die Konzentrationen dieser in läSIONALER Haut mittels ELISA bestimmt wurden (**Abb. 28**). Im Vergleich zu gesunder Kontrolle, csU und UV zeigten die medianen IL-1 β -, IL-6-, IL-18- und Caspase-1-Konzentrationen eine deutliche Erhöhung bei SchS. Bei csU waren die Werte der Mediane im Vergleich zur gesunden Kontrolle für IL-6 geringgradig höher und für IL-1 β , IL-18 und Caspase-1 geringgradig niedriger.

Statistisch signifikante Vergleiche ergaben sich bezüglich des SchS für IL-1 β mit csU ($p \leq 0,05$), für IL-6 und IL-18 mit gesunder Kontrolle sowie mit csU (jeweils $p \leq 0,05$) und für Caspase-1 mit csU ($p \leq 0,001$) und mit UV ($p \leq 0,05$).

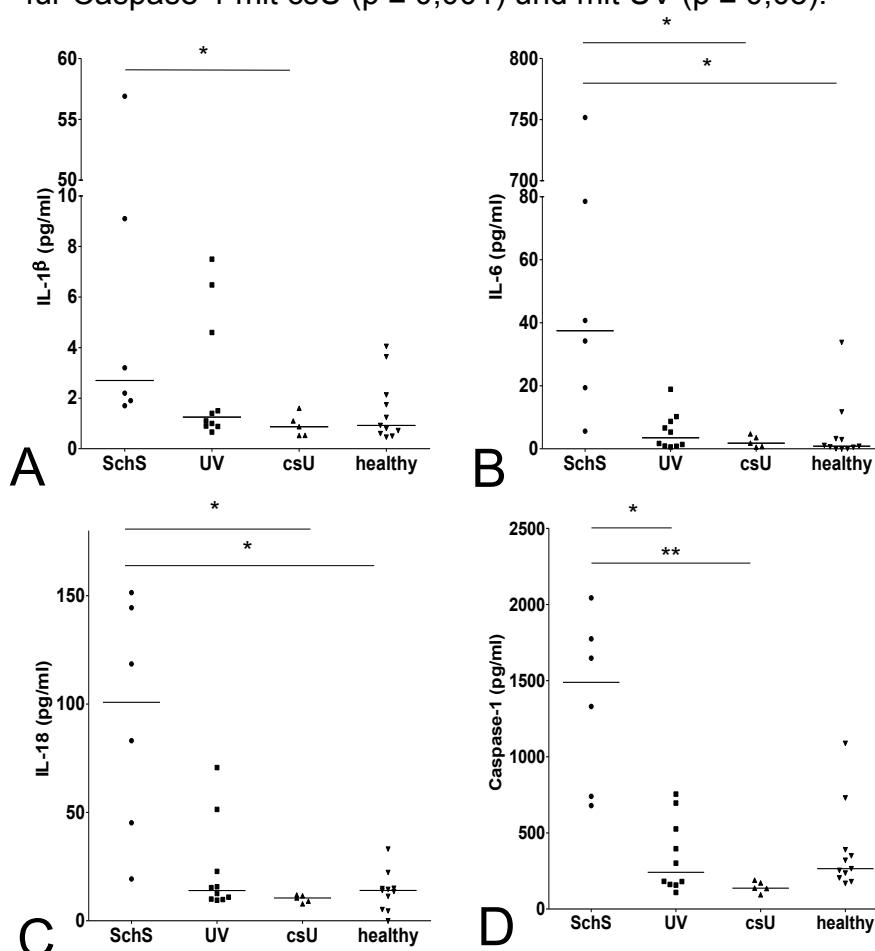


Abb. 28: Proteinkonzentrationen in läSIONALER Haut von Patienten mit SchS, UV, csU und in gesunder Haut. Konzentrationen von A) IL-1 β , B) IL-6, C) IL-18 und D) Caspase-1 gemessen mittels ELISA in pg/ml. Die Kurz-Balken stellen den Median der jeweiligen Gruppe dar. * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,001$

3.3 Korrelationsanalysen

3.3.1 Immunhistologische Untersuchungen

Für die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen wurden bezüglich der Marker IL-1 β , IL-6, IL-18, ASC und MPO Korrelationsanalysen durchgeführt. Signifikante Korrelationen konnten bei SchS Patienten für hohe IL-1 β -positive Zellzahlen mit hohen IL-6-positive Zellzahlen (Korrelationskoeffizient 0,7; $p \leq 0,05$) sowie für hohe IL-18-positive Zellzahlen mit hoher prozentualer MPO-Immunreaktivität (Korrelationskoeffizient 0,75; $p \leq 0,05$) festgestellt werden. Bei UV ergab sich eine signifikante Korrelation für hohe IL-1 β -positive Zellzahlen mit hoher prozentualer ASC-Immunreaktivität (Korrelationskoeffizient 0,649; $p \leq 0,01$). Für csU konnten signifikante Korrelationen zwischen hohen IL-6-positive Zellzahlen und hohen IL-18-positive Zellzahlen (Korrelationskoeffizient 0,764; $p \leq 0,05$) sowie hoher prozentualer MPO-Immunreaktivität und hoher ASC-Immunreaktivität (Korrelationskoeffizient 0,638; $p \leq 0,05$) beobachtet werden.

3.3.2 Zytokinkonzentrationen in läsionaler Haut und ergänzende Laborparameter

Für SchS und UV Patienten mit Zytokin-Bestimmung in den Hautbiopsien wurden zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme bestimmte Laborparameter im Serum bzw. des Blutbildes erhoben (**Tab. 14**). Diese ergänzenden Parameter wurden in die Korrelationsanalysen einbezogen. Zwischen den immunhistologischen Parametern und Zytokinkonzentrationen ließ sich keine Korrelationsanalyse durchführen, da es sich um unterschiedliche Patienten handelte und Laboruntersuchungen nicht zeitgleich mit der Biopsieentnahme erfolgten.

Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergab für die SchS Patienten eine statistisch signifikante Korrelation zwischen hohen IL-1 β -Konzentrationen und hohen IL-6-Konzentrationen (Korrelationskoeffizient 1,0; $p \leq 0,01$), zwischen hohen IL-1 β -Konzentrationen und hohem Serum-CRP (Korrelationskoeffizient 0,829; $p \leq 0,05$) sowie zwischen hohen IL-6-Konzentrationen und hohem Serum-CRP (Korrelationskoeffizient 0,829; $p \leq 0,05$). Für die UV und csU Patienten konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden.

Patient-Nr.	Diagnose	Zytokin-Konzentration in läSIONaler Haut (pg/ml)			Serum-Marker			Blutbild: Neutrophile Granulozyten/nl ⁴
		IL-1 β	IL-6	IL-18	CRP (mg/dl) ¹	SAA (mg/l) ²	S100A12 (ng/ml) ³	
1	SchS	3,2	40,7	45,2	7,96	1,9	230,5	2,43
2	SchS	9,1	78,5	144,4	25,4	12,5	1108,1	7,61
3	SchS	56,9	751,7	19,3	8,57	522	968,8	11,54
4	SchS	1,9	19,4	151,4	6,09	1310	631,3	13,14
5	SchS	2,2	34,2	118,5	8,28	717	1657,0	8,5
6	SchS	1,7	5,6	83,1	7,69	219	1171,2	11,94
7	UV	1,0	8,7	12,6	0,91	9,5	k.A.	4,42
8	UV	4,6	5,3	22,8	6,42	50,9	k.A.	3,25
9	UV	1,4	10,2	51,4	2,37	26,9	k.A.	7,74
10	UV	1,1	0,9	70,7	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
11	UV	0,9	1,7	15,7	0,24	197	k.A.	6,09
12	UV	1,5	0,6	10,9	2,08	24,7	k.A.	7,02

Referenzbereiche Labor Berlin:
¹CRP < 0,5 mg/dl; ²SAA < 6,4 mg/l; ³S100A12 < 200 ng/ml ; ⁴neutrophile Granulozyten 1,8-7,7 /nl

Tab. 14: Mittels ELISA bestimmte Zytokin-Konzentrationen (IL-1 β , IL-6 und IL-18) in läSIONaler Haut sowie zum Zeitpunkt der Entnahme der Hautbiopsie erfasste Laborwerte (CRP, SAA, S100A12 sowie neutrophile Granulozyten im peripheren Blut) bei Patienten mit SchS und UV. k.A. = keine Angabe

4 Diskussion

4.1 Wertende Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmalig läsionale Haut von Patienten mit den sehr seltenen AIH (CAPS, SchS, AOSD) und der seltenen UV hinsichtlich potentieller Biomarker zur Differenzierung gegenüber der häufigeren und differentialdiagnostisch in der täglichen dermatologischen Praxis wichtigen Erkrankung csU.

In den immunhistologischen Untersuchungen an läsionaler Haut wurde gezeigt, dass die IL-1-assoziierten Zytokine (IL-1 β , IL-6 und IL-18), die Inflammasombestandteile ASC und Caspase-1 sowie VEGF bei den AIH und UV im Vergleich zu csU und gesunden Kontrollen hochreguliert waren. Ein signifikanter Unterschied von SchS gegenüber csU war für IL-6 und ASC feststellbar. Die immunhistologischen Ergebnisse wurden bezüglich IL-1-assoziiertes Zytokine und Caspase-1 mittels ELISA-Proteinnachweis bestätigt, hier fand sich jeweils eine signifikante Erhöhung der Marker bei SchS im Vergleich zu csU. Bei den ELISA-Parametern zeigte sich sowohl für hohe IL-1 β -Werte als auch für hohe IL-6-Werte eine Korrelation mit hohem Serum-CRP sowie eine Korrelation dieser beiden Zytokine untereinander in der Immunhistologie und im ELISA-Proteinnachweis, was auf eine Funktion als Krankheitsaktivitätsmarker dieser hinweist und IL-1 β und IL-6 als potentielle Hautbiomarker charakterisiert.

Als einen Ursprung der verstärkten Entzündungsreaktion in läsionaler Haut bei AIH und UV konnten mittels Kolokalisationsfärbungen durch Immunfluoreszenz Mastzellen als Produzenten von IL-1 β und IL-6 sowie neutrophile Granulozyten als Produzenten von IL-1 β und IL-18 identifiziert werden. Die Zytokin-Produktion durch neutrophile Granulozyten wurde durch die Korrelation von hoher MPO-Immunreaktivität als Zell-Marker mit Erhöhung von IL-18 in der Immunhistologie bestätigt.

Für die Mastzellendichte bestand im Vergleich der Erkrankungsgruppen einschließlich der gesunden Kontrollen kein signifikanter Unterschied. Daraus lässt sich schließen, dass die Mastzellanzahl bei den AIH und UV geringe pathophysiologische Relevanz besitzt, hingegen deren Zytokinproduktion bedeutsam erscheint.

Ein im Vergleich zu csU und gesunden Kontrollen signifikant erhöhtes entzündliches neutrophilen-reiches MPO-positives Infiltrat in der Dermis zeichnete die SchS Patienten aus. CAPS und AOSD zeigten ähnliche Werte wie SchS, die UV nahm dabei eine Stellung zwischen AIH und csU ein. Die neutrophilen Granulozyten scheinen nicht nur durch ihre deutliche Zellzahl-Erhöhung und Produktion von IL-1-assoziierten Zytokinen

eine bedeutende Rolle bei der Entzündungsreaktion zu spielen, sondern ebenfalls durch die Ausbildung von NET-ähnlichen Strukturen, die bei SchS, CAPS und weniger stark ausgeprägt bei UV aufgrund charakteristischer Morphologie und der Kolo-kalisation von MPO, Histon H2A, DAPI und Cathelicidin in der Immunfluoreszenz exemplarisch nachgewiesen wurden.

Zusammenfassend wurden die IL-1-assoziierten Zytokine (IL-1 β , IL-6 und IL-18), die Inflammasomkomponenten Caspase-1 und ASC sowie MPO als Marker für neutrophile Granulozyten zur Differenzierung der AIH von csU im Sinne eines Biomarker-Profiles identifiziert. IL-1 β und IL-6 erweisen sich als besonders robuste Biomarker. Die UV nahm dabei eine Stellung zwischen den AIH und csU ein, was auf eine autoinflammatorische Komponente bei zumindest einem Teil der UV Patienten hinweist.

4.2 Potentielle Biomarker

4.2.1 Zelluläres Infiltrat und MPO

Die Stärke des dermalen zellulären Infiltrats in der HE-Färbung wurde auf einer semiquantitativen Skala erfasst. Dabei zeigt das Infiltrat eine Abstufung von einer maximalen Ausprägung bei SchS (medianer Score von 1,0) über UV (0,75) bis zu einer geringen Stärke bei csU (0,5) in Relation zu gesunden Kontrollen (0). Signifikante Unterschiede bestehen für die Kontrolle im Vergleich zu SchS und UV. In der Literatur findet sich keine entsprechende direkt vergleichende Quantifizierung des läsional-kutanen Infiltrats bei den hier untersuchten Krankheitsbildern. Um genauere Aussagen bezüglich des Infiltrats treffen zu können, wurde eine für neutrophile Granulozyten spezifische MPO-Färbung durchgeführt. Die vorliegende Arbeit quantifiziert erstmalig die Infiltration des läsionalen Hautgewebes durch neutrophile Granulozyten bei AIH und UV im Vergleich zu csU und gesunden Probanden mittels Planimetrie der MPO-Anfärbung. Dabei zeigt sich eine signifikant höhere mittlere prozentuale MPO-Immunreaktivität für SchS (10,6 %) gegenüber csU (1,8 %) und den Kontrollen (0 %).

Das aus früheren Fallbeschreibungen bekannte Vorherrschen eines neutrophilen-reichen Zell-Infiltrats bei AIH wird also bestätigt.⁸⁵ Wie in der jetzigen Studie wurde von anderen Autoren bei zwei SchS Patienten mittels MPO-Färbung eine kutan-läsionale Akkumulation von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen.⁶⁸ Alternativ fand die neutrophile Elastase als Marker des Infiltrats in läsionaler Haut bei n=14 NOMID/CINCA Patienten Verwendung, mit negativer Reaktion in nicht-läsionaler Haut und nach Anti-

IL-1-Therapie.⁸⁷ Auch CD-15 wurde als Marker zur Darstellung neutrophiler Granulozyten in läsionaler Haut bei einem AOSD-Fall verwendet.¹⁰⁶ Bei der Anfärbung für MPO ist neben der Neutrophilen-Darstellung eine gewisse Mitreaktion für Monozyten zu berücksichtigen, was als Limitation der Spezifität anzuführen ist, wenngleich sich nur sehr wenige Monozyten in der Dermis befinden.⁶⁸ Aber auch die neutrophile Elastase und CD15 können keine absolute Spezifität für neutrophile Granulozyten aufweisen.^{87,106}

Bei der hier untersuchten UV Patientenkohorte zeigte sich eine mittlere prozentuale MPO-Immunreaktivität von 5,7 % ohne Signifikanz im statistischen Vergleich. Für UV wurde vielfach ein neutrophilenreiches Infiltrat beschrieben, und zwar vor allem bei der hypokomplementämischen Variante.²⁵

In der Literatur finden sich zwei Studien, die eine signifikant vermehrte Neutrophilen-Infiltration bei csU im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen konnten.^{107,108}

Des Weiteren wird in der vorgelegten Schrift mittels Immunfluoreszenz zur Kolokalisation belegt, dass neutrophile Granulozyten in der läsionalen Haut bei SchS, CAPS und UV IL-1 β und IL-18, nicht jedoch IL-6, enthalten.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse scheint der Einfluss von neutrophilen Granulozyten in der Pathophysiologie bei den AIH quantitativ im Sinne signifikant erhöhter Zelldichte und qualitativ durch deren Produktion von IL-1 β und IL-18 größer als bei csU zu sein. Die UV nimmt dabei eine Zwischenstellung bezüglich der Zelldichte zwischen AIH und csU ein, wobei auch hier die neutrophilen Granulozyten als Interleukin-Produzenten ausgemacht wurden.

NETs – In den eigenen Untersuchungen zeigen sich bei n=6/9 SchS Patienten, den n=3/3 CAPS Patienten und weniger ausgeprägt bei n=8/18 UV Patienten streifige, netzartige MPO-positive extrazelluläre Strukturen (siehe **Abb. 12** auf S.49). Durch die Kolokalisation dieser Strukturen mit den nukleären Markern Histon H2A und DAPI sowie Cathelicidin (als von Neutrophilen synthetisiertem antimikrobiellen Peptid) sind die eigenen Immunfluoreszenz-Untersuchungen vereinbar mit dem Nachweis von NETs in der Haut bei CAPS, SchS und weniger stark ausgeprägt bei UV. Dabei handelt es sich um von neutrophilen Granulozyten extrudierte netzartige Strukturen aus Chromatin und zytoplasmatischen Proteinen, die auf bestimmte Stimuli hin entstehen.¹⁰⁵ Die Erstbeschreibung von NETs geht auf Brinkmann et al. im Jahr 2004 im Kontext der Bakterienabwehr zurück.¹⁰⁵ Aubert et al. zeigten neutrophile Granulozyten mit extrazellulären Netzstrukturen einschließlich Immunfluoreszenzfärbung (DAPI und

neutrophile Elastase) in läsionaler Haut bei CAPS, mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmend, und äußerten den Verdacht auf NETs.⁸⁷ NETs wurden - mittels der in vorliegender Arbeit verwendeten Darstellungstechnik - bereits bei systemischem Lupus erythematoses beschrieben.¹⁰² Des Weiteren konnte die Beteiligung von NETs bei der autoinflammatorischen Entzündungsreaktion im Blut bei familiärem Mittelmeerfieber (FMF) gezeigt werden.¹⁰⁹

4.2.2 Interleukin-1 β , Interleukin-6 und Interleukin-18

Untersuchungen von Hautgewebe

Durch die hier erhobenen Daten wird die schon von anderen Autoren zuvor in kleinen Fallzahlen beschriebene Erhöhung von IL-1 β bei SchS^{95,96} und CAPS^{51,96} sowie von IL-6 bei CAPS^{51,87} und AOSD⁹⁸ in läsionaler Haut bestätigt. Die bereits bekannte Kolo-kalisation von IL-1 β mit Mastzellen bei CAPS⁹³ und SchS⁹⁶ wird mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigt, darüber hinaus wird nun eine Kolo-kalisation der Mastzellen mit IL-6 gezeigt, nicht jedoch mit IL-18. Somit bestehen deutliche Hinweise für die Produktion von IL-1 β und IL-6 durch Mastzellen bei AIH. Bezüglich IL-18 ist die Literaturlage für die AIH-Gruppe heterogen mit im Vergleich zu Kontrollen bei AOSD verstärkter⁹⁸ und bei CAPS verringerter⁸⁷ Expression in läsionaler Haut. Mittels Immunhistologie konnte nun in der eigenen Arbeit deskriptiv-statistisch eine IL-18-Erhö-hung bei AOSD bestätigt und bei CAPS im Gegensatz zu einer früheren Untersuchung⁸⁷ gezeigt werden. Insbesondere ließ sich nun in der vorliegenden Arbeit erstmalig für IL-18 mittels ELISA-Proteinbestimmung in läsionaler Haut eine signifikante Erhöhung bei SchS im Vergleich zu csU und gesunden Kontrollen beobachten.

Auch konnte im Rahmen der vorliegenden Studie erstmalig eine Kolo-kalisation von IL-18 und IL-1 β mit neutrophilen Granulozyten sowie eine positive Korrelation von IL-18 mit dem Neutrophilen-Marker MPO demonstriert werden, als Hinweis auf den entsprechenden zellulären Ursprung dieser Zytokine.

Untersuchungen von Serum bei AIH, UV und csU

Die Schwierigkeit des Nachweises von freiem, ungebundenem IL-1 β im Serum mittels konventionellem ELISA ist in der Literatur bekannt, sodass Studienergebnisse mit erhöht gemessenen IL-1 β -Serum-Konzentrationen zurückhaltend bewertet werden sollten, da IL-1 β lokal produziert und schnell degradiert wird.^{110,111} Dennoch wurden

erhöhte IL-1 β -Serum-Konzentrationen und in einigen Fällen ein diesbezüglicher Abfall nach Anti-IL-1-Therapie sowohl bei CAPS¹¹⁰ (IL-1 β -Canakinumab-Komplex), SchS¹¹²⁻¹¹⁴ als auch AOSD^{115,116} (freies IL-1 β) gemessen. Häufiger jedoch war IL-1 β nicht erhöht bzw. nicht nachweisbar bei SchS^{64,72,112,117} und CAPS¹¹¹. Dies traf auch für AOSD^{118,119} zu.

Erhöhungen von IL-6-Serum-Konzentrationen wurden mit Ausnahmen eines CAPS-Falls¹¹¹ in sämtlichen AIH-Publikationen berichtet.^{61,72,110,111,113-121}

Bei UV Patienten, zu denen bislang keine publizierten Daten zu IL-1 β vorliegen (s.o.), wurden erhöhte IL-6-Serum-Konzentrationen gezeigt.^{28,122} Aufgrund therapeutischer Erfolge bei UV mittels Anti-IL-1^{28,30} bzw. Anti-IL-6^{122,123} wurde über eine autoinflammatorische Komponente bei dieser Erkrankung spekuliert. In Übereinstimmung dazu zeigen auch die hier erarbeiteten immunhistologischen und ELISA-Protein-Daten eine signifikante Erhöhung von IL-1 β und IL-6 bei UV im Vergleich zu gesunden Kontrollen (s.o.).

Für IL-18 verhielt es sich ähnlich wie bei IL-6, meist wurde von erhöhten IL-18-Serum-Werten bei SchS⁶⁵, CAPS¹¹¹ und AOSD^{115,116,124-126}, seltener von unauffälligen IL-18-Werten¹¹¹ berichtet. IL-18 ist hochreguliert und besitzt eine besondere pathogenetische Relevanz bei AOSD (s.o.) und seinem Pendant, der im Kindesalter auftretenden systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis¹²⁷, was die vorliegende Arbeit in den Untersuchungen bezüglich IL-18 an läsionaler Haut bei einem Fall von AOSD bestätigen konnte.

Für csU Patienten wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Serum-Konzentrationen für IL-1 β ⁹⁰, IL-6^{90,91,128,129} und IL-18^{92,130} bestimmt. Hingegen konnten von Autoren⁸⁹ des Allergie-Centrum-Charité keine signifikanten Erhöhungen für IL-6 und IL-18 bei csU festgestellt werden. Die hier vorliegende Arbeit findet bezüglich des Nachweises von IL-6 und IL-18 im Hautgewebe ebenfalls keine signifikanten Erhöhungen.

Einflussfaktoren bezüglich der Interleukin-Serum-Spiegel

Verschiedene Einflussfaktoren hinsichtlich der messbaren Zytokinkonzentrationen konnten identifiziert werden, so zeigte sich bei zwei MWS Patienten ein zirkadianer Rhythmus der IL-6-Serum-Konzentrationen und klinischen Symptomatik (Quaddeln, Fieber).⁷⁸ Wie bereits obig für einige Fälle zitiert, beeinflusst die Therapie die Serum-Interleukin-Spiegel, einerseits mit Absinken von IL-1 β , IL-6 und IL-18 bei AIH.^{110,114,120}

Andererseits wurde in Studien zur therapeutischen Interleukin-Blockade bei SchS und AOSD ein Anstieg der IL-6-Konzentration nach Therapiebeginn beobachtet.^{72,124,125} Als Ursache wurde die Konkurrenz von IL-6 und IL-6-Rezeptor-Blocker um IL-6-Rezeptor-Bindungsstellen diskutiert.⁷² In diesem Zusammenhang wurden Unterschiede in der Interleukin-Dominanz und dem interindividuellen Interleukin-Profil bei AIH gezeigt; so sprachen SchS Patienten - mit normwertigen IL-1 β -Konzentrationen (produziert durch LPS-stimulierte Monozyten) - therapeutisch nicht auf Anti-IL-1, nachfolgend aber auf Anti-IL-6 an.⁷²

Die Interleukin-Spiegel scheinen vor allem die Krankheitsaktivität zu reflektieren: bei einem Patienten mit SchS kam es im Fieberschub zu einer Erhöhung von IL-1 β und IL-6 im Serum, bei einem weiteren SchS Patienten ließ sich die Krankheitsaktivität mit der IL-6-Serum-Konzentration korrelieren.^{113,117}

Bei den eigenen Untersuchungen zeigt sich eine relativ große Variabilität der Einzelmesswerte in den Erkrankungsgruppen, was zum Teil durch die o.g. Faktoren (Tagesrhythmik, Krankheitsaktivität, Bestehensdauer der Läsion, mögliche therapeutische Einflüsse) bedingt sein mag.

Hinsichtlich der Abhängigkeit von Krankheitsaktivität und Serum-Marker ist auf den Befund der hier vorliegenden Studie einer nachweisbaren positiven Korrelation zwischen hohem Serum-CRP als allgemeinem Entzündungsparameter (Akute-Phase-1-Protein) und dem erhöhtem kutan-läsionalen Nachweis von IL-1 β und IL-6 für SchS hinzuweisen. IL-1 β und IL-6 stellen deshalb durchaus robuste Biomarker dar. Die enge Verknüpfung der beiden potentiellen diagnostischen Biomarker wird durch die Tatsache hervorgehoben, dass hohe IL-1 β -Werte mit hohen IL-6-Werten in den immunhistologischen Untersuchungen und ebenfalls in den ELISA-Proteinbestimmungen miteinander korrelieren. Diese Verbindung vom pathophysiologischen Schlüsselmolekül IL-1 β mit dem nachgeordneten Zytokin IL-6 bei autoinflammatorischen Erkrankungen ist bekannt.⁴⁷ Außerdem ermöglicht IL-6 hier sowohl in der Immunhistologie als auch im Protein-ELISA eine statistisch signifikante Differenzierung zwischen SchS und csU, was die Funktion von IL-6 als stabiler diagnostischer Biomarker unterstreicht. Im Protein-ELISA ließ sich SchS durch statistisch signifikant erhöhte IL-1 β -Konzentrationen von csU unterscheiden, aufgrund hoher interindividueller Variabilität der IL-1 β -Werte war dies in der Immunhistologie nicht möglich. IL-1 β als Schlüsselmolekül der Autoinflammation stellt nicht nur erfolgreiches Therapieziel¹³¹ sondern erstmalig auch zusammen mit dem assoziierten

IL-6 einen diagnostischen Biomarker zur Identifizierung autoinflammatorischer Erkrankungen dar.

4.2.3 ASC

Die Inflammasomkomponente ASC kommt in der vorliegenden Arbeit erstmalig zur immunhistologischen Untersuchung im Vergleich von AIH, UV und csU im Bezug auf gesunde Kontrollen. Dabei zeigt sich die mittlere prozentuale ASC-Immunreaktivität für SchS am höchsten (15,6 %) mit signifikantem Unterschied zu jeweils UV (6,3 %), csU (6,7 %) und Kontrollen (1,8 %).

Kürzlich ließen sich im Serum von CAPS Patienten ASC-Proteinaggregate in signifikant höherer Konzentration als bei gesunden Probanden und in höherer Konzentration als bei Patienten mit FMF und TNF-Rezeptor-assoziierten periodischen Syndrom nachweisen.¹³² Bei den eigenen CAPS Patienten lag die mittlere kutan-läsionale ASC-Immunreaktivität mit 5,8 % deutlich über dem Wert der gesunden Kontrollen von 1,8 % (s.o.). Insgesamt sprechen also die eigenen Befunde und diejenigen der Literatur für eine Aufregulation vom Inflammasombestandteil ASC bei AIH. Dies passt ins Bild der erhöhten Interleukin-Konzentrationen in läsionaler Haut bei AIH, welche Folge der Inflammasomaktivierung sind.

4.2.4 Caspase-1

Wie in der hier vorliegenden Studie gezeigt, ergibt sich eine signifikante Erhöhung für den Inflammasombestandteil Caspase-1 in der kutan-läsionalen ELISA-Bestimmung beim Vergleich von SchS mit UV und mit csU. Die semiquantitative Caspase-1-Immunhistologie zeigt ein Maximum für SchS und UV, eine moderate Ausprägung für csU und eine fehlende Expression für die Kontrollen, mit einer Signifikanz für den Vergleich letzterer mit SchS, UV und csU. Trotz also graduellem Divergieren der hier vorgelegten Ergebnisse von ELISA und Immunhistologie (im ELISA-Proteinnachweis lag die mediane Caspase-1-Konzentration bei den gesunden Kontrollen geringfügig höher als bei UV und csU; in der Immunhistologie hingegen zeigten die gesunden Kontrollen im Vergleich zu den anderen Erkrankungsgruppen niedrigste Werte) scheint Caspase-1 eine Wertigkeit als zumindest möglicher Biomarker zuzukommen.

Wie in den eigenen Untersuchungen für n=3 CAPS Patienten, konnten von anderen Autoren Caspase-1-positive Zellen bei Patienten mit NOMID/CINCA mittels Immunfluoreszenzfärbung in läsionaler Haut identifiziert werden.⁸⁷ In

Doppelmarkierungen ließ sich Caspase-1-Reaktivität für dermale CD11c⁺ dendritische Zellen sowie dermale CD163⁺ Makrophagen feststellen.⁸⁷ Im Gegensatz dazu entsprach bei n=2 SchS Patienten die Caspase-1-Expression auf mRNA-Ebene in isolierten Monozyten derjenigen von gesunden Kontrollen, unbeeinflusst durch eine Anakinra-Therapie.⁶⁴

4.3 Weitere untersuchte Parameter

Mastzellen

Die vorliegende Arbeit quantifiziert erstmals exakt die Mastzellendichte (Zellen/mm²) in läsionaler Haut vergleichend bei AIH, UV und csU im Bezug auf gesunde Kontrollen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Zahlenmäßig lassen sich also zwischen den vorgenannten Erkrankungen und gesunden Kontrollen keine Unterschiede erkennen. Wobei die untersuchten Hautproben von verschiedenen Körperstellen stammten und unterschiedliche Mastzellendichten in der Haut bezüglich der Lokalisation bekannt sind.⁹⁹

Die eigenen Untersuchungen zeigen nun bei AIH und UV das vermehrte Auftreten einer Kolo-kalisation von Mastzellen mit sowohl IL-1 β als auch IL-6, nicht jedoch von IL-18, im Sinne einer Beteiligung an der Entzündungsreaktion durch Produktion dieser Zytokine.

Histologische Untersuchungen zu Mastzellzahlen bei AIH und UV sind in der Literatur rar: Bei n=2 MWS Patienten trat keine Veränderung der kutanen Mastzellzahl infolge Kälteprovokation auf.⁸⁶ Bei einem Fall von anstrengungsinduzierter UV konnte im Vorher-/Nachher-Vergleich bezüglich körperlicher Belastung eine Reduktion der kutanen Mastzellzahlen beobachtet werden.¹³³ Zu Mastzellzahlen in läsionaler Haut bei csU gibt es unterschiedliche Mitteilungen in der Literatur. So wurden höhere Zahlen Tryptase-positiver Mastzellen bei Gesunden im Vergleich zu csU Patienten beobachtet.^{107,108} In einer anderen Studie zu csU konnten keine signifikanten Unterschiede der Mastzellzahl zwischen läsionaler und nicht-läsionaler sowie gesunder Haut gefunden werden.⁸⁴ Diese teils divergierenden Ergebnisse erfordern zukünftige Studien an größeren Patientenzahlen mit Stratifizierung für insbesondere mögliche ätiologische Faktoren, die Läsionsdauer und therapeutische Einflüsse.

VEGF

Die vorliegende Arbeit ergibt semiquantitativ erhobene Immunreaktivitäten der läsionalen Dermis für VEGF mit einem maximalen medianen Score von 1,5 für SchS und UV im Vergleich zu einem medianen Score von 0,75 bei csU und von 0 bei den gesunden Probanden. Dies entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen der gesunden Kontrolle und jeweils SchS und UV.

In einer Studie zu n=13 SchS Patienten waren die VEGF-Serum-Konzentrationen deutlich höher als bei gesunden Kontrollen, mit signifikanter Reduktion infolge Therapie, weshalb die Autoren vorschlugen, VEGF als diagnostischen und Verlaufsparemeter in den Katalog der SchS Minor-Kriterien aufzunehmen.⁹⁷ Die eigenen Untersuchungen geben Hinweise, dass VEGF nicht nur bei SchS, sondern vor allem auch bei UV signifikant aufreguliert ist, so dass also im Bezug auf den zu relativierenden Vorschlag der zuvor zitierten Autoren insgesamt eher eine Surrogat-Marker-Funktion zu diskutieren ist. Bei n=8 csU Patienten zeigte sich in läsionaler Haut eine signifikant höhere Zahl VEGF-positiver Zellen als in nicht-läsionaler Haut und in gesunden Kontrollen.⁸⁸ Hingegen konnte in einer Untersuchung von n=56 csU Patienten kein signifikanter Unterschied bezüglich der VEGF-Serum-Konzentration im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden⁸⁹; in der hier vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen csU und Gesunden bezüglich der VEGF-Expression in läsionaler Haut gezeigt.

4.4 Limitationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind an einer relativ geringen Fallzahl ermittelt worden. Dies liegt zum einen an der Seltenheit einiger der untersuchten Erkrankungen, zum anderen auch an der schwierigen Verfügbarkeit von Biopsien läsionaler Haut dieser Patienten. Die hier gewonnenen Resultate müssen immer unter Vorbehalt der kleinen Fallzahl gesehen werden, letztlich repräsentative Aussagen können nur bedingt abgeleitet werden.

Die hier untersuchten CAPS Patienten waren sämtlich von MWS betroffen; andere Unterformen konnten nicht rekrutiert werden. Auch gab es lediglich einen Patienten mit AOSD. Somit konnten weder CAPS noch AOSD in eine statistische Signifikanzbetrachtung einbezogen werden.

Bei der UV erfolgte keine Unterscheidung zwischen normo- und hypokomplementämischer Form.

Die in der Arbeit untersuchten Biopsien differieren hinsichtlich der anatomischen Entnahme-Region (besonders relevant für die Mastzellanzahl in der Dermis, da diese in Abhängigkeit von der Körperregion variiert), dem Alter und Geschlecht der Patienten. Außerdem waren Angaben zu der Bestandsdauer der biopsierten urtikariellen Läsion bzw. Urtica nicht verfügbar. Ganz wesentlich müssen zudem mögliche therapeutische Einflüsse bei den histologischen Untersuchungen berücksichtigt werden, wobei die meisten hier untersuchten Patienten keine Therapie zum Zeitpunkt der Probeentnahme erhielten.

Die hier verwendeten Methoden waren zum einen die Histologie, Immunhistologie und Immunfluoreszenz sowie zum anderen Proteinkonzentrationsbestimmungen mittels ELISA. In der Immunhistologie wurden unspezifische Hintergrundfärbungen so weit wie möglich subtrahiert, was möglicherweise die Identifizierung positiv angefarbter Zellen und die Score-Erhebung beeinflussen kann. Es wurden zur Überprüfung der histologischen Ergebnisse bzw. quantitativen Proteinbestimmungen keine Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene durchgeführt.

Die in dieser Arbeit auf ihr Potential als Biomarker untersuchten Proteine wurden mithilfe der bereits bestehenden Literatur, also hypothesenbasiert, ausgewählt.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Daten aus der Literatur war nur begrenzt möglich, da es bis dato nur relativ wenige histologische Analysen der Haut bei AIH und UV gibt. Dabei handelte es sich oft nur um Einzelfallberichte. In die Diskussion wurden daher ergänzend Publikationen zu Markern

in extrakutanen Kompartimenten (Serum, Plasma oder PBMC) eingeschlossen. Die Literaturrecherche war auf die Datenbank PubMed eingegrenzt, wobei englischsprachige Publikationen bis zum 22. April 2015 erfasst wurden.

4.5 Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die läsionale dermale Haut von Patienten mit AIH (CAPS, SchS, AOSD) und UV auf potentielle diagnostische Biomarker speziell zur Frage der Differenzierung gegenüber csU als einer häufigen und in der alltäglichen dermatologischen Praxis bedeutsamen Erkrankung untersucht. Die vorgenannten Erkrankungen sind in ihrer Ätiopathogenese weitgehend ungeklärt. Nach statistischen Kriterien ließ sich csU von SchS (als Prototyp für AIH) mittels MPO, IL-1 β , IL-6, IL-18, Caspase-1 und ASC als Biomarker-Profil abgrenzen. Eine Teil der UV Patienten besitzt möglicherweise autoinflammatorische Komponenten und nimmt eine Zwischenstellung zwischen AIH und csU ein. Des Weiteren wurden erstmalig NET-ähnliche Strukturen im Rahmen der kutanen Entzündungsreaktion bei SchS und UV beschrieben.

Im Folgenden sollte die UV weiter auf den hier identifizierten autoinflammatorischen Aspekt und die damit verbundene mögliche Unterteilung der UV in Subpopulationen untersucht werden, sodass neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie der UV gewonnen werden.

Weiterhin gilt es die pathophysiologische Funktion und Bedeutung der neutrophilen Granulozyten, speziell die der NETs in der läsionalen Haut bei AIH weiter zu erforschen.

Um die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich potentieller Biomarker zu festigen, sollten größere Patientenzahlen untersucht werden, was mithilfe (internationaler) Multi-Center-Studien realisierbar wäre. Bei einer prospektiven Studie können insbesondere Alter und Geschlecht der Patienten/Probanden, Biopsie-Lokalisation, Läsionsdauer, Art der Therapie bzw. Nicht-Behandlung, als mögliche Einflussfaktoren in den Einschluss- und Ausschluss-Kriterien besonders definiert und berücksichtigt werden.

Ergänzende bzw. alternative Untersuchungsmethoden wie z.B. Genexpressionsanalysen bieten sich zur Überprüfung der vorliegenden Ergebnisse und zur Identifizierung neuer Marker an.

Im Rahmen einer fallstarken Folgestudie ließen sich „Cut-off-Werte“ zur Diagnose definierter Erkrankungen für die bereits identifizierten Biomarker ermitteln, ebenso könnte die Korrelation zwischen Biomarker-Profil und therapeutischem Ansprechen untersucht werden.

Zukünftiges Ziel ist die Etablierung eines histologischen Biomarkers bzw. Biomarker-Profiles mit hoher Spezifität und Sensitivität für die Routinediagnostik zur Identifizierung einer AIH.

5 Literaturverzeichnis

1. Maurer M, Magerl M, Metz M, Siebenhaar F, Weller K, Krause K. Practical algorithm for diagnosing patients with recurrent wheals or angioedema. *Allergy* 2013;68:816-9.
2. Maurer M, Weller K, Bindslev-Jensen C, et al. Unmet clinical needs in chronic spontaneous urticaria. A GA(2)LEN task force report. *Allergy* 2011;66:317-30.
3. Zuberbier T, Aberer W, Asero R, et al. The EAACI/GA(2) LEN/EDF/WAO Guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria: the 2013 revision and update. *Allergy* 2014;69:868-87.
4. Peroni A, Colato C, Schena D, Girolomoni G. Urticarial lesions: if not urticaria, what else? The differential diagnosis of urticaria: part I. Cutaneous diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2010;62:541-55; quiz 55-6.
5. Peroni A, Colato C, Zanoni G, Girolomoni G. Urticarial lesions: if not urticaria, what else? The differential diagnosis of urticaria: part II. Systemic diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2010;62:557-70; quiz 71-2.
6. Altman K, Chang C. Pathogenic intracellular and autoimmune mechanisms in urticaria and angioedema. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2013;45:47-62.
7. Maurer M, Bader M, Bas M, et al. New topics in bradykinin research. *Allergy* 2011;66:1397-406.
8. Zuberbier T, Maurer M. Urticaria: current opinions about etiology, diagnosis and therapy. *Acta dermato-venereologica* 2007;87:196-205.
9. Zuberbier T, Balke M, Worm M, Edenharter G, Maurer M. Epidemiology of urticaria: a representative cross-sectional population survey. *Clinical and experimental dermatology* 2010;35:869-73.
10. Shipley D, Ormerod AD. Drug-induced urticaria. Recognition and treatment. *American journal of clinical dermatology* 2001;2:151-8.
11. Zhong H, Song Z, Chen W, et al. Chronic urticaria in Chinese population: a hospital-based multicenter epidemiological study. *Allergy* 2014;69:359-64.
12. Wedi B, Raap U, Kapp A. Chronic urticaria and infections. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:387-96.
13. Kaplan AP. What the first 10,000 patients with chronic urticaria have taught me: a personal journey. *The Journal of allergy and clinical immunology*. United States 2009:713-7.
14. Kaplan AP, Greaves M. Pathogenesis of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy*. England 2009:777-87.
15. Ferrer M, Luquin E, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, Sanz ML, Kaplan AP. Secretion of cytokines, histamine and leukotrienes in chronic urticaria. *International archives of allergy and immunology*. Switzerland: 2002 S. Karger AG, Basel; 2002:254-60.
16. Metz M, Stander S. Chronic pruritus--pathogenesis, clinical aspects and treatment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 2010;24:1249-60.
17. Staevska M, Popov TA, Kralimarkova T, et al. The effectiveness of levocetirizine and desloratadine in up to 4 times conventional doses in difficult-to-treat urticaria. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010;125:676-82.
18. Humphreys F, Hunter JA. The characteristics of urticaria in 390 patients. *The British journal of dermatology* 1998;138:635-8.

19. Asero R. Chronic unremitting urticaria: is the use of antihistamines above the licensed dose effective? A preliminary study of cetirizine at licensed and above-licensed doses. *Clinical and experimental dermatology* 2007;32:34-8.
20. Maurer M, Altrichter S, Bieber T, et al. Efficacy and safety of omalizumab in patients with chronic urticaria who exhibit IgE against thyroperoxidase. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011;128:202-9.e5.
21. Venzor J, Lee WL, Huston DP. Urticarial vasculitis. *Clinical reviews in allergy & immunology. United States*2002:201-16.
22. Carlson JA, Chen KR. Cutaneous vasculitis update: small vessel neutrophilic vasculitis syndromes. *The American Journal of dermatopathology* 2006;28:486-506.
23. Davis MD, Daoud MS, Kirby B, Gibson LE, Rogers RS, 3rd. Clinicopathologic correlation of hypocomplementemic and normocomplementemic urticarial vasculitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1998;38:899-905.
24. Mehregan DR, Gibson LE. Pathophysiology of urticarial vasculitis. *Archives of dermatology* 1998;134:88-9.
25. Dincy CV, George R, Jacob M, Mathai E, Pulimood S, Eapen EP. Clinicopathologic profile of normocomplementemic and hypocomplementemic urticarial vasculitis: a study from South India. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. Netherlands*2008:789-94.
26. Lee JS, Loh TH, Seow SC, Tan SH. Prolonged urticaria with purpura: the spectrum of clinical and histopathologic features in a prospective series of 22 patients exhibiting the clinical features of urticarial vasculitis. *Journal of the American Academy of Dermatology. United States*2007:994-1005.
27. Zeiss CR, Burch FX, Marder RJ, Furey NL, Schmid FR, Gewurz H. A hypocomplementemic vasculitic urticarial syndrome. Report of four new cases and definition of the disease. *The American journal of medicine* 1980;68:867-75.
28. Krause K, Mahamed A, Weller K, Metz M, Zuberbier T, Maurer M. Efficacy and safety of canakinumab in urticarial vasculitis: an open-label study. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013;132:751-4.e5.
29. Kai AC, Flohr C, Grattan CE. Improvement in quality of life impairment followed by relapse with 6-monthly periodic administration of omalizumab for severe treatment-refractory chronic urticaria and urticarial vasculitis. *Clinical and experimental dermatology* 2014;39:651-2.
30. Botsios C, Sfriso P, Punzi L, Todesco S. Non-complementaemic urticarial vasculitis: successful treatment with the IL-1 receptor antagonist, anakinra. *Scand J Rheumatol. Norway*2007:236-7.
31. Braun-Falco M, Ruzicka T. Skin manifestations in autoinflammatory syndromes. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011;9:232-46.
32. Kastner DL, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R. Autoinflammatory disease reloaded: a clinical perspective. *Cell* 2010;140:784-90.
33. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell. United States*1999:133-44.
34. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). *Annual review of immunology* 2009;27:621-68.
35. Stojanov S, Lohse P. Autoinflammatorische Erkrankungen als wichtige Differenzialdiagnosen in der Rheumatologie - ein Update. *Akt Rheumatol* 2011;36:226-35.

36. Kuemmerle-Deschner JB. CAPS--pathogenesis, presentation and treatment of an autoinflammatory disease. *Seminars in immunopathology* 2015;37:377-85.
37. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nature genetics* 2001;29:301-5.
38. Feldmann J, Prieur AM, Quartier P, et al. Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *American journal of human genetics* 2002;71:198-203.
39. Kümmerle-Deschner, Jasmin. Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrome (CAPS). Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2011; 1.Auflage:38-42
40. Cantarini L, Rigante D, Brizi MG, et al. Clinical and biochemical landmarks in systemic autoinflammatory diseases. *Ann Med* 2012;44:664-73.
41. Federici S, Sormani MP, Ozen S, et al. Evidence-based provisional clinical classification criteria for autoinflammatory periodic fevers. *Annals of the rheumatic diseases* 2015; 74:799-805
42. Maksimovic L, Stirnemann J, Caux F, et al. New CIAS1 mutation and anakinra efficacy in overlapping of Muckle-Wells and familial cold autoinflammatory syndromes. *Rheumatology (Oxford, England)*. England 2008:309-10.
43. Ye Z, Ting JP. NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family *Curr Opin Immunol*. England 2008:3-9.
44. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. United States 2002:417-26.
45. Krause K, Metz M, Makris M, Zuberbier T, Maurer M. The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12:477-84.
46. Heymann MC, Rosen-Wolff A. Contribution of the inflammasomes to autoinflammatory diseases and recent mouse models as research tools. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2013;147:175-84.
47. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology* 2009;27:519-50.
48. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-147.
49. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, et al. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. United States 2003:2645-50.
50. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annual review of immunology*. United States 2001:423-74.
51. Hoffman HM, Rosengren S, Boyle DL, et al. Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinflammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. *Lancet* 2004;364:1779-85.
52. Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, et al. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N Engl J Med*. United States: 2006 Massachusetts Medical Society.; 2006:581-92.
53. Lachmann HJ, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner JB, et al. Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *N Engl J Med*. United States: 2009 Massachusetts Medical Society; 2009:2416-25.
54. Hoffman HM, Throne ML, Amar NJ, et al. Efficacy and safety of riloncept (interleukin-1 Trap) in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes: results

- from two sequential placebo-controlled studies. *Arthritis and rheumatism* 2008;58:2443-52.
55. Enriquez R, Sirvent AE, Padilla S, et al. Nephrotic syndrome and AA amyloidosis revealing adult-onset cryopyrin-associated periodic syndrome. *Ren Fail* 2013;35:738-41.
56. Klein AK, Horneff G. [Improvement of sensorineural hearing loss in a patient with Muckle-Wells syndrome treated with anakinra]. *Klin Padiatr* 2010;222:266-8.
57. Kuemmerle-Deschner JB, Koitschev A, Ummenhofer K, et al. Hearing loss in Muckle-Wells syndrome. *Arthritis Rheum* 2013;65:824-31.
58. van der Hilst JC, Simon A, Drenth JP. Hereditary periodic fever and reactive amyloidosis. *Clin Exp Med* 2005;5:87-98.
59. Simon A, Asli B, Braun-Falco M, et al. Schnitzler's syndrome: diagnosis, treatment, and follow-up. *Allergy* 2013;68:562-8.
60. de Koning HD, Bodar EJ, van der Meer JW, Simon A. Schnitzler syndrome: beyond the case reports: review and follow-up of 94 patients with an emphasis on prognosis and treatment. *Semin Arthritis Rheum. United States*2007:137-48.
61. Lipsker D, Veran Y, Grunenberger F, Cribier B, Heid E, Grosshans E. The Schnitzler syndrome. Four new cases and review of the literature. *Medicine* 2001;80:37-44.
62. Ryan JG, de Koning HD, Beck LA, Booty MG, Kastner DL, Simon A. IL-1 blockade in Schnitzler syndrome: ex vivo findings correlate with clinical remission. *J Allergy Clin Immunol. United States*2008:260-2.
63. Launay D, Dutoit-Lefevre V, Faure E, et al. Effect of in vitro and in vivo anakinra on cytokines production in Schnitzler syndrome. *PloS one* 2013;8:e59327.
64. Migliorini P, Del Corso I, Tommasi C, Boraschi D. Free circulating interleukin-18 is increased in Schnitzler syndrome: a new autoinflammatory disease? *Eur Cytokine Netw. France*2009:108-11.
65. Bhattacharyya J, Mihara K, Morimoto K, Takihara Y, Hide M. Elevated interleukin-18 secretion from monoclonal IgM+ B cells in a patient with Schnitzler syndrome. *Journal of the American Academy of Dermatology. United States*2012:e118-20.
66. Pizzirani C, Falzoni S, Govoni M, et al. Dysfunctional inflammasome in Schnitzler's syndrome. *Rheumatology (Oxford, England). England*2009:1304-8.
67. Loock J, Lamprecht P, Timmann C, Mrowietz U, Csernok E, Gross WL. Genetic predisposition (NLRP3 V198M mutation) for IL-1-mediated inflammation in a patient with Schnitzler syndrome. *J Allergy Clin Immunol. United States*2010:500-2.
68. de Koning HD, van Gijn ME, Stoffels M, et al. Myeloid lineage-restricted somatic mosaicism of NLRP3 mutations in patients with variant Schnitzler syndrome. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2015;135:561-4.
69. Rowczenio DM, Trojer H, Russell T, et al. Clinical characteristics in subjects with NLRP3 V198M diagnosed at a single UK center and a review of the literature. *Arthritis Res Ther. England*2013:R30.
70. Krause K, Weller K, Stefaniak R, et al. Efficacy and safety of the interleukin-1 antagonist riloncept in Schnitzler syndrome: an open-label study. *Allergy* 2012;67:943-50.
71. de Koning HD, Schalkwijk J, van der Ven-Jongekrijg J, Stoffels M, van der Meer JW, Simon A. Sustained efficacy of the monoclonal anti-interleukin-1 beta antibody canakinumab in a 9-month trial in Schnitzler's syndrome. *Annals of the rheumatic diseases. England*2013:1634-8.

72. Krause K, Feist E, Fiene M, Kallinich T, Maurer M. Complete remission in 3 of 3 anti-IL-6-treated patients with Schnitzler syndrome. *J Allergy Clin Immunol. United States*2012;848-50.
73. Kadavath S, Efthimiou P. Adult-onset Still's disease-pathogenesis, clinical manifestations, and new treatment options. *Ann Med* 2015;47:6-14.
74. Kong XD, Xu D, Zhang W, Zhao Y, Zeng X, Zhang F. Clinical features and prognosis in adult-onset Still's disease: a study of 104 cases. *Clin Rheumatol* 2010;29:1015-9.
75. Yamaguchi M, Ohta A, Tsunematsu T, et al. Preliminary criteria for classification of adult Still's disease. *J Rheumatol* 1992;19:424-30.
76. Gerfaud-Valentin M, Jamilloux Y, Iwaz J, Seve P. Adult-onset Still's disease. *Autoimmun Rev* 2014;13:708-22.
77. Krause K, Grattan CE, Bindslev-Jensen C, et al. How not to miss autoinflammatory diseases masquerading as urticaria. *Allergy* 2012;67:1465-74.
78. Gerbig AW, Dahinden CA, Mullis P, Hunziker T. Circadian elevation of IL-6 levels in Muckle-Wells syndrome: a disorder of the neuro-immune axis? *QJM* 1998;91:489-92.
79. Weller K, Viehmann K, Brautigam M, et al. Cost-intensive, time-consuming, problematical? How physicians in private practice experience the care of urticaria patients. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012;10:341-7.
80. Natbony SF, Phillips ME, Elias JM, Godfrey HP, Kaplan AP. Histologic studies of chronic idiopathic urticaria. *The Journal of allergy and clinical immunology. United States* 1983:177-83.
81. Haas N, Toppe E, Henz BM. Microscopic morphology of different types of urticaria. *Archives of dermatology* 1998;134:41-6.
82. Sabroe RA, Poon E, Orchard GE, et al. Cutaneous inflammatory cell infiltrate in chronic idiopathic urticaria: comparison of patients with and without anti-FcepsilonRI or anti-IgE autoantibodies. *The Journal of allergy and clinical immunology. United States*1999:484-93.
83. Kay AB, Clark P, Maurer M, Ying S. Elevations in T-helper-2-initiating cytokines (interleukin-33, interleukin-25 and thymic stromal lymphopoietin) in lesional skin from chronic spontaneous ('idiopathic') urticaria. *The British journal of dermatology* 2014:2015; 172(5):1294-302
84. Smith CH, Kepley C, Schwartz LB, Lee TH. Mast cell number and phenotype in chronic idiopathic urticaria. *J Allergy Clin Immunol. United States*1995:360-4.
85. Kieffer C, Cribier B, Lipsker D. Neutrophilic urticarial dermatosis: a variant of neutrophilic urticaria strongly associated with systemic disease. Report of 9 new cases and review of the literature. *Medicine* 2009;88:23-31.
86. Haas N, Kuster W, Zuberbier T, Henz BM. Muckle-Wells syndrome: clinical and histological skin findings compatible with cold air urticaria in a large kindred. *The British journal of dermatology. England* 2004:99-104.
87. Aubert P, Suarez-Farinas M, Mitsui H, et al. Homeostatic tissue responses in skin biopsies from NOMID patients with constitutive overproduction of IL-1beta. *PloS one* 2012;7:e49408.
88. Kay AB, Ying S, Ardelean E, et al. Calcitonin gene-related peptide and vascular endothelial growth factor are expressed in lesional but not uninvolved skin in chronic spontaneous urticaria. *Clin Exp Allergy* 2014;44:1053-60.
89. Metz M, Krull C, Maurer M. Histamine, TNF, C5a, IL-6, -9, -18, -31, -33, TSLP, neopterin, and VEGF are not elevated in chronic spontaneous urticaria. *Journal of dermatological science* 2013;70:222-5.

90. Dos Santos JC, Azor MH, Nojima VY, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and imbalanced regulatory T-cell cytokines production in chronic idiopathic urticaria. *Int Immunopharmacol*. Netherlands 2008;14:33-40.
91. Kasperska-Zajac A, Sztylc J, Machura E, Jop G. Plasma IL-6 concentration correlates with clinical disease activity and serum C-reactive protein concentration in chronic urticaria patients. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1386-91.
92. Puxeddu I, Italiani P, Giungato P, et al. Free IL-18 and IL-33 cytokines in chronic spontaneous urticaria. *Cytokine* 2013;61:741-3.
93. Nakamura Y, Kambe N, Saito M, et al. Mast cells mediate neutrophil recruitment and vascular leakage through the NLRP3 inflammasome in histamine-independent urticaria. *The Journal of experimental medicine* 2009;206:1037-46.
94. Yamauchi A, Iwata H, Ohnishi H, Teramoto T, Kondo N, Seishima M. Interleukin-17 expression in the urticarial rash of familial cold autoinflammatory syndrome: a case report. *The British journal of dermatology*. England 2010;135:1-3.
95. Volz T, Wolbing F, Fischer J, et al. Dermal interleukin-1 expression and effective and long-lasting therapy with interleukin-1 receptor antagonist anakinra in Schnitzler syndrome. *Acta dermato-venereologica* 2012;92:393-4.
96. de Koning HD, van Vlijmen-Willems IM, Rodijk-Olthuis D, et al. Mast cell interleukin-1 beta, neutrophil interleukin-17 and epidermal antimicrobial proteins in the neutrophilic urticarial dermatosis in Schnitzler's syndrome. *The British journal of dermatology* 2015;173(2):448-56.
97. Terpos E, Asli B, Christoulas D, et al. Increased angiogenesis and enhanced bone formation in patients with IgM monoclonal gammopathy and urticarial skin rash: new insight into the biology of Schnitzler syndrome. *Haematologica* 2012;97:1699-703.
98. Chen DY, Lan JL, Lin FJ, Hsieh TY. Proinflammatory cytokine profiles in sera and pathological tissues of patients with active untreated adult onset Still's disease. *J Rheumatol*. Canada 2004;21:89-98.
99. Weber A, Knop J, Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *The British journal of dermatology* 2003;148:224-8.
100. Kumar G. Education Guide Immunohistochemical Staining Methods. 5 ed. Carpinteria, California: Dako North America; 2009. 57-60.
101. Kumar G. Education Guide Immunohistochemical Staining Methods. Carpinteria, California: Dako North America; 2009. 61-65.
102. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. United States 2011;538-52.
103. Qin Y, Ekmekcioglu S, Liu P, et al. Constitutive aberrant endogenous interleukin-1 facilitates inflammation and growth in human melanoma. *Mol Cancer Res*. United States: *Mol Cancer Res*; 9(11); 1537-50. 2011 AACR.; 2011:1537-50.
104. R&D Systems. ELISA Reference Guide and Catalog. Minneapolis, USA: R&D Systems. 2015: 8-14.
105. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, NY)* 2004;303:1532-5.
106. Cozzi A, Papagrigraki A, Biasi D, Colato C, Girolomoni G. Cutaneous manifestations of adult-onset Still's disease: a case report and review of literature. *Clin Rheumatol* 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-014-2614-2> [Epub ahead of print]
107. Ying S, Kikuchi Y, Meng Q, Kay AB, Kaplan AP. TH1/TH2 cytokines and inflammatory cells in skin biopsy specimens from patients with chronic idiopathic

- urticaria: comparison with the allergen-induced late-phase cutaneous reaction. *The Journal of allergy and clinical immunology*. United States 2002;694-700.
108. Caproni M, Volpi W, Macchia D, et al. Infiltrating cells and related cytokines in lesional skin of patients with chronic idiopathic urticaria and positive autologous serum skin test. *Experimental dermatology* 2003;12:621-8.
109. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, et al. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1beta-mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Annals of the rheumatic diseases* 2014;0:1-9.
110. Lachmann HJ, Lowe P, Felix SD, et al. In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *The Journal of experimental medicine* 2009;206:1029-36.
111. Ohnishi H, Teramoto T, Iwata H, et al. Characterization of NLRP3 variants in Japanese cryopyrin-associated periodic syndrome patients. *Journal of clinical immunology* 2012;32:221-9.
112. Markotic A, Skerk V, Cvetko Krajinovic L, Beus A. Is the clinical picture of Schnitzler syndrome always Schnitzler syndrome? *Clinical and experimental rheumatology*. Italy 2009;507-9.
113. de Kleijn EM, Telgt D, Laan R. Schnitzler's syndrome presenting as fever of unknown origin (FUO). The role of cytokines in its systemic features. *Neth J Med. Netherlands* 1997;140-2.
114. Aouba A, Pressiat C, Pricopi M, et al. Complete remission of Schnitzler syndrome and Waldenstrom macroglobulinemia under rituximab-cyclophosphamide-dexamethasone. *Dermatology*. Switzerland: 2014 S. Karger AG, Basel.; 2015:18-22.
115. Chen DY, Chen YM, Lan JL, Lin CC, Chen HH, Hsieh CW. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of adult-onset Still's disease. *Rheumatology (Oxford, England)*. England 2010;2305-12.
116. Kotter I, Wacker A, Koch S, et al. Anakinra in patients with treatment-resistant adult-onset Still's disease: four case reports with serial cytokine measurements and a review of the literature. *Semin Arthritis Rheum*. United States 2007;189-97.
117. Asahina A, Sakurai N, Suzuki Y, Narushima K. Schnitzler's syndrome with prominent neutrophil infiltration misdiagnosed as Sweet's syndrome: a typical example of urticarial neutrophilic dermatosis. *Clinical and experimental dermatology*. England 2010:e123-6.
118. Chen DY, Chuang HC, Lan JL, et al. Germinal center kinase-like kinase (GLK/MAP4K3) expression is increased in adult-onset Still's disease and may act as an activity marker. *BMC Med*. England 2012;84.
119. Saiki O, Uda H, Nishimoto N, et al. Adult Still's disease reflects a Th2 rather than a Th1 cytokine profile. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. United States 2004;120-5.
120. Kone-Paut I, Lachmann HJ, Kuemmerle-Deschner JB, et al. Sustained remission of symptoms and improved health-related quality of life in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome treated with canakinumab: results of a double-blind placebo-controlled randomized withdrawal study. *Arthritis Res Ther*. England 2011;R202.
121. Lasiglie D, Traggiai E, Federici S, et al. Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLRP3 mutated patients. *PLoS one* 2011;6:e20014.
122. Makol A, Gibson LE, Michet CJ. Successful use of interleukin 6 antagonist tocilizumab in a patient with refractory cutaneous lupus and urticarial vasculitis. *J Clin Rheumatol* 2012;18:92-5.

123. Keidel SM, Hoyles RK, Wilkinson NM. Efficacy of tocilizumab for interstitial lung disease in an undifferentiated autoinflammatory disorder partially responsive to anakinra. *Rheumatology (Oxford, England)*. England2014;573-4.
124. Naniwa T, Ito R, Watanabe M, et al. Case report: successful use of short-term add-on tocilizumab for multirefractory systemic flare of adult-onset Still's disease. *Clin Rheumatol* 2013;32 Suppl 1:S103-6.
125. Yoshida Y, Sakamoto M, Yokota K, Sato K, Mimura T. Tocilizumab improved both clinical and laboratory manifestations except for interleukin-18 in a case of multiple drug-resistant adult-onset Still's disease. *Intern Med*. Japan2011;1757-60.
126. Jung KH, Kim JJ, Lee JS, et al. Interleukin-18 as an efficient marker for remission and follow-up in patients with inactive adult-onset Still's disease. *Scand J Rheumatol* 2014;43:162-9.
127. Nirmala N, Grom A, Gram H. Biomarkers in systemic juvenile idiopathic arthritis: a comparison with biomarkers in cryopyrin-associated periodic syndromes. *Curr Opin Rheumatol* 2014;26:543-52.
128. Rajappa M, Chandrashekar L, Sundar I, et al. Platelet oxidative stress and systemic inflammation in chronic spontaneous urticaria. *Clin Chem Lab Med* 2013;51:1789-94.
129. Papadopoulos J, Karpouzis A, Tentis J, Kouskoukis C. Assessment of Interleukins IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 in Acute Urticaria. *J Clin Med Res* 2014;6:133-7.
130. Kurt E, Aktas A, Aksu K, et al. Autologous serum skin test response in chronic spontaneous urticaria and respiratory diseases and its relationship with serum interleukin-18 level. *Archives of dermatological research* 2011;303:643-9.
131. Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Seminars in immunology* 2013;25:469-84.
132. Baroja-Mazo A, Martin-Sanchez F, Gomez AI, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat Immunol* 2014;15:738-48.
133. Kano Y, Orihara M, Shiohara T. Cellular and molecular dynamics in exercise-induced urticarial vasculitis lesions. *Archives of dermatology* 1998;134:62-7.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIH	Autoinflammatorische Erkrankungen der Haut
AISD	Autoinflammatory skin diseases
AK	Antikörper
AOSD	Adulter Morbus Still
ASC	Apoptosis Speck Protein
ASST	Autologer intrakutaner Serumtest
Aqua dest.	Aqua destillata
Avidin-FITC	Avidin-Fluorescein Isothiocyanat
BSA	bovines Serum-Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
ca.	circa
CAPS	Cryopyrin-assoziiertes periodisches Syndrom
CINCA	Chronisch-infantiles-neurologisch-kutanes-artikuläres Syndrom
CRP	C-reaktives Protein
csU	chronische spontane Urticaria
DAMPs	Danger-associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCAS	familiäre Kälteurtikaria
FCS	Fetales Kälberserum
FMF	Familiäres Mittelmeerfieber
GNS	Goat-Normalserum
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPF	High Power Fields
HRP	Horseradish-Peroxidase
HUVS	hypokomplementärisches UV-Syndrom
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Konz.	Konzentration
LSAB	Labeled Streptavidin Biotin
M	Mittelwert
Max	Maximum
Med	Median
Min	Minimum
min	Minuten
MNS	Maus-Normalserum
MPO	Myeloperoxidase
MTX	Methotrexat
MWS	Muckle-Wells-Syndrom
NaCl	Natriumchlorid
NETs	Neutrophil extracellular traps
NLR	NOD-like-Rezeptoren
NLRP3	Nucleotide binding Domain-like Receptor Protein 3
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
Pat.	Patient
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
RT	Raumtemperatur
SAA	Serum-Amyloid A
SchS	Schnitzler-Syndrom
R	Spannweite
SD	Standardabweichung
s.o.	siehe oben

sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Saline
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TSLP	Thymic stromal lymphopietin
UV	Urtikariavaskulitis
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vgl.	Vergleich

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hanna Thiathild Bonnekoh, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Eine immunhistologische Charakterisierung potentieller diagnostischer Biomarker bei Urtikariavaskulitis und autoinflammatorischen Erkrankungen der Haut“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Zum Zeitpunkt der Einreichung der hier vorliegenden Dissertation lagen bezüglich dieser keine publizierten Originalarbeiten vor.

Hanna Thiathild Bonnekoh hatte zu diesem Zeitpunkt deshalb keinen Anteil an diesbezüglichen Publikationen.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Publikationsliste

Bonnekoh H., Maurer M., Krause K.:

Interleukin-1 related cytokines as potential biomarkers in auto-inflammatory skin diseases. 8th International Congress of Familial Mediterranean Fever and Systemic Autoinflammatory Diseases. Pediatric rheumatology online journal 2015;13 Suppl 1:O1-p211.

Presented at the 8th International congress of familial mediterranean fever and systemic auto-inflammatory diseases, Dresden, Germany, September 30 - October 3, 2015. Poster 197.

Bonnekoh H., Krause K.:

How to Diagnose and Manage Systemic Autoinflammatory Diseases in Childhood. Current Treatment Options in Allergy 2015;2:235–245

Bonnekoh H., Maurer M., Krause K.:

Interleukin-1 related cytokines as potential biomarkers in auto-inflammatory skin diseases. Experimental Dermatology. 2015, 24:E1-E42

Presented at the 42th annual meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Ulm, Germany, March 5 - March 7, 2015. Poster 081.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Besonders großer Dank gilt meiner Doktormutter Privatdozentin Dr. med. Karoline Krause für die freundliche Überlassung dieses spannenden Themas, das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten in der dermatologischen Forschung, die permanente Begleitung und umfassende Unterstützung sowie für ihr unermüdliches Engagement.

Weiterhin gilt mein großer Dank Prof. Dr. med. Marcus Maurer für die Bereitstellung aller für die Durchführung dieser Arbeit notwendigen Mittel und Laborräume sowie für die große Unterstützung durch seine langjährige wissenschaftliche Erfahrung.

Ich danke Prof. Dr. med. Dr. h. c. Torsten Zuberbier für die freundliche Vermittlung dieses Dissertationsthemas.

Mein herzlicher Dank gilt der gesamten AG Maurer; vor allem möchte ich dem Labor-Team für die tatkräftige Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit danken. Besonders Evelin Hagen sei hier genannt, die mir mit viel Geduld bei dem Erlernen der für die Arbeit notwendigen Techniken zur Seite stand.

Meinen Eltern und Großeltern danke ich von Herzen für ihre liebevolle allumfassende und beständige Unterstützung.