

Untersuchungen zur nNOS an psoriatischer Haut

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Mirjam Letschert

2011

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referentin: Prof. Dr. Kolb-Bachofen

Korreferentin: Prof. Dr. Bruch-Geharz

*Die ganze Lebenstätigkeit verlangt eine Hülle, die gegen das äußere rohe
Element, es sei Wasser, Luft oder Licht, sie schütze, ihr zartes Wesen
bewahre, damit sie das, was ihrem Inneren spezifisch obliegt, bewahre.
[...] Die Rinden der Bäume, die Häute der Insekten, die Haare und Federn
der Tiere, selbst die Oberhaut des Menschen, sind ewig sich absondernde,
abgestoßene dem Unleben hingeebene Hüllen, hinter denen immer neue
Hüllen sich bilden, unter welchen sodann, oberflächlicher oder tiefer, das
Leben sein schaffendes Gewebe hervorbringt.*

(Johann Wolfgang von Goethe, Aus: „Schriften zur Morphologie“)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 1
1.1 Stickstoffmonoxid: Nitrosative Balance lokal und systemisch	S. 1
1.2 Psoriasis und die lokale nitrosative Balance	S. 6
1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen und die systemische nitrosative Balance	S. 14
1.4 Zielsetzung der Arbeit	S. 16
2. Material und Methoden	S. 18
2.1 Patientenkollektiv	S. 18
2.1.1 Votum der Ethikkommission	S. 18
2.1.2 Rekrutierung des Patientenkollektivs, Ein- und Ausschlusskriterien	S. 18
2.1.3 Voruntersuchungen	S. 19
2.1.3.1 Evaluierung der Psoriasis	S. 19
2.1.3.2 Evaluierung des kardiovaskulären Risikos	S. 21
2.1.4 Haut-Biopsien und Gewebe	S. 22
2.2 Material	S. 23
2.2.1 Gebrauchsmaterialien	S. 23
2.2.1.1 Geräte	S. 23
2.2.1.2 Glaswaren	S. 24
2.2.2 Verbrauchsmaterialien	S. 24
2.2.2.1 Chemikalien	S. 24
2.2.2.2 Plastikartikel	S. 24
2.2.3 Puffer	S. 25
2.2.4 Antikörper	S. 25
2.2.5 Kits	S. 25
2.2.6 Software	S. 26

2.3 Methoden	S. 26
2.3.1 Immunhistochemie nach der LAB-LSAB-Methode	S. 26
2.3.2 RT-PCR	S. 27
2.3.3 Real-Time-PCR	S. 27
2.3.4 Statistische Methoden	S. 32
 3. Ergebnisse	 S. 33
3.1 Statistische Analyse des Patientenkollektivs	S. 33
3.1.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs	S. 33
3.1.2 Vergleich der Psoriasis-Verlaufsformen vom Typ 1 <i>versus</i> Typ 2 bezüglich psoriasisspezifischer Parameter und dem Vorkommen kardiovaskulärer Risikofaktoren	S. 35
3.1.3 Vergleich zwischen dem Patientenkollektiv mit Psoriasis <i>versus</i> dem Patientenkollektiv mit Atopischer Dermatitis bezüglich kardiovaskulärer Risikofaktoren	S. 39
3.2 Charakterisierung des Arginase 1-Expressionsmusters in menschlicher Epidermis	S. 42
3.2.1 Voruntersuchungen an gesunder Haut: Arginase 1- Expression in gesunder Haut	S. 43
3.2.2 Arginase 1-Expression an psoriatisch veränderter Haut: Vergleich zwischen läsionalen und nicht läsionalen Abschnitten an Schnittbildern von Patient 12	S. 44
3.2.3 Arginase 1-Expression im Verlauf einer Lichttherapie: Vergleich zwischen einem Psoriasis-Plaque in unbehandeltem Zustand und drei Stunden nach der ersten UVB311 nm- Fototherapie an Schnittbildern von Patient 21	S. 46
3.2.4 Arginase 1-Expression im Verlauf einer Lichttherapie: Vergleich zwischen einem Psoriasis-Plaque vor Beginn einer Lichttherapie, drei Stunden nach der ersten Applikation und nach drei Wochen an Schnittbildern von Patient 3	S. 47

3.3 Charakterisierung des nNOS-Expressionsmusters in menschlicher Epidermis	S. 50
3.3.1 Spezifitätskontrolle für den nNOS-Antikörper	S. 50
3.3.2 Expressionsmuster der nNOS an gesunder Haut	S. 53
3.3.3 Expressionsmuster der nNOS an psoriatisch veränderter Haut: Vergleich zwischen läsionalen und unbefallenen Abschnitten an Schnittbildern von Patient 6	S. 54
3.3.4 Expressionsmuster der nNOS im Verlauf einer Lichttherapie: Vergleich zwischen einem unbehandelten Psoriasis-Plaque und drei Wochen nach einer Fototherapie mit UVB311nm-Strahlen am Beispiel von Patient 7	S. 55
3.4 Vergleich der relativen nNOS-Expression in läsionalen und nicht läsionalen Hautabschnitten	S. 58
3.4.1 RT-PCR	S. 58
3.4.2 Real-Time-PCR	S. 58
4. Diskussion	S. 60
5. Zusammenfassung	S. 69
6. Abbildungsverzeichnis	S. 73
7. Tabellenverzeichnis	S. 78
8. Literaturverzeichnis	S. 79
9. Danksagung	S. 87
10. Lebenslauf	S. 88
Anhang:	S. 90
a) Ergänzendes Bildmaterial	S. 90
b) Anamnese-Bogen	S. 95
c) Einverständniserklärung	S. 97
d) PASI-Dokumentations-Bogen	S. 98

Abkürzungsverzeichnis

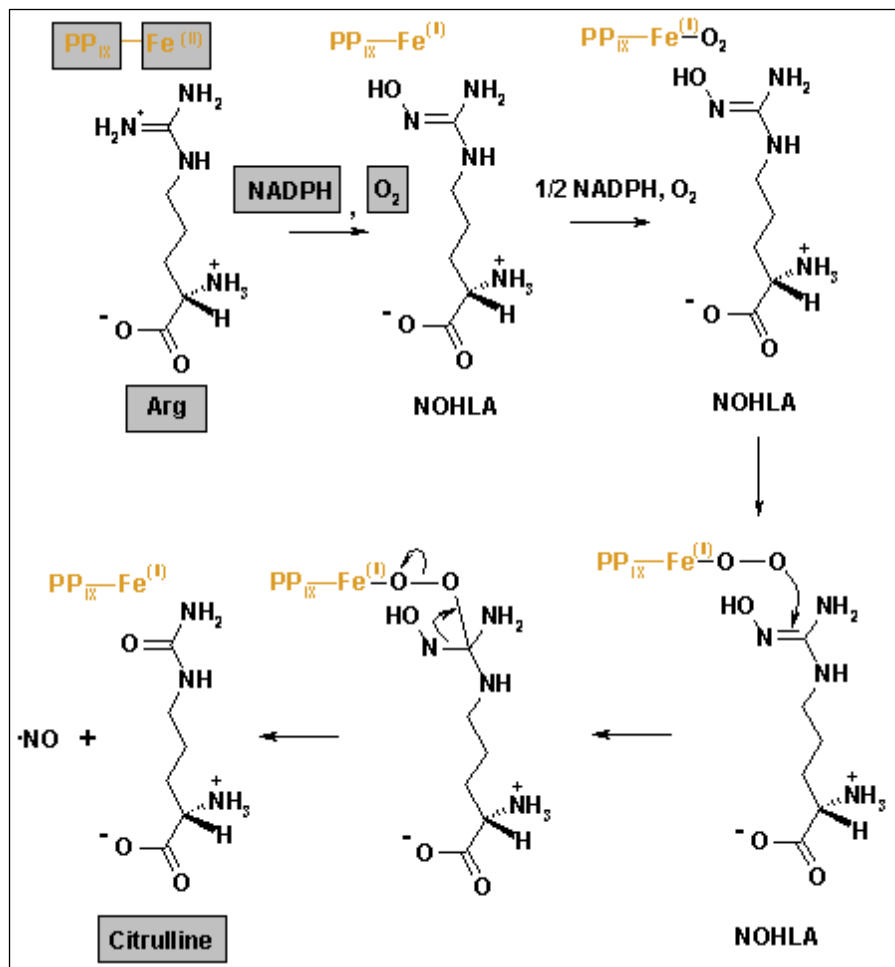
AD	Atopische Dermatitis
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body-Mass-Index
BSA	bovines Serum Albumin
CCD	charge-coupled device
cGMP	cyclischen Guanosinmonophosphat
CRP	C-reaktives Protein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Erythem
HDL	high density lipoprotein
IL-1 β	Interleukin-1 β
IFN- γ	Interferon- γ
Kb	Kilobasen
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein a
MED	minimale Erythemdosis
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PJ	Praktisches Jahr
PSO	Psoriasis

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein anorganisches Gas, das im Organismus vielfältige Aufgaben übernimmt und aufgrund seiner Fähigkeit zur Diffusion Signale von einer Zelle zur anderen übertragen kann. Durch seine geringe Größe und seine lipophilen Eigenschaften kann es durch Membranen hindurch diffundieren und so von seinem unmittelbaren Entstehungsort entfernt wirken. Gebildet wird NO von der Familie der NO-Synthasen. Es sind drei Isoformen bekannt, von denen zwei nach dem Zelltyp benannt sind, in dem sie erstmals nachgewiesen werden konnten: die neuronale NOS (nNOS) und die endotheliale NOS (eNOS). Die letzte Isoform, die induzierbare NOS (iNOS), ist im Gegensatz dazu nach der Form ihrer Aktivierung benannt (1). Sie sind auf unterschiedlichen Genen lokalisiert, die sich auf unterschiedlichen Chromosomen befinden. Alle drei verwenden als Substrat die semiessentielle Aminosäure L-Arginin, um in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und mehreren Kofaktoren die Reaktion zu äquimolaren Mengen an Stickstoffmonoxid und Citrullin zu katalysieren (2-5).



Quel

Abb.

1:

Abb.

Abb.

Abb.

Abb.

Abb.

Abb.

Abb.1: Reaktionsschema „Synthese von NO durch NO-Synthasen“

Die NO-Synthasen verwenden als Substrat die essentielle Aminosäure L-Arginin, um in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und mehreren Kofaktoren die Reaktion zu äquimolaren Mengen an Stickstoffmonoxid und Citrullin zu katalysieren.

Die nNOS und die eNOS werden konstitutiv exprimiert, d. h. sie sind kontinuierlich präsent und durch erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel zeitlich limitiert aktivierbar. Sie setzen NO pulsatil für kurze Zeiträume im Bereich von Sekunden bis Minuten frei. So medieren sie rasche Ereignisse wie z.B. die Vasorelaxation zur Regulation des kutanen Blutflusses auf Reize

wie Wärme, UV-Licht usw., allgemein Prozesse, die regulatorische Bedeutung haben.

Die iNOS dagegen wird nicht konstitutiv exprimiert, sondern kann durch bestimmte Reize wie proinflammatorische Zytokine, bakterielle Endotoxine und UV-Strahlung in fast allen Zelltypen induziert werden. Sie wurde erstmals in Makrophagen nachgewiesen. Die iNOS ist aufgrund der hohen Affinität zum Kalzium-Kalmodulin-Komplex weitgehend kalziumunabhängig. Anders als bei den konstitutiven Isoformen werden durch die Aktivität der iNOS lokal hohe NO-Konzentrationen - bis zur 1000-fachen Menge (6) - über längere Zeiträume (7,8) freigesetzt. Tendenziell induzieren Zytokine, die im Rahmen einer Th1-Reaktion abgegeben werden, wie z. B. IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , die iNOS-Transkription, während Zytokine, die während einer Th2-Reaktion produziert werden, zu einer verringerten Transkription von iNOS führen.

An der enzymatischen Synthese von NO sind als Kofaktoren NADPH, Kalzium und BH₄ beteiligt.

Ein weiterer Faktor, der die Aktivität der iNOS beeinflusst, ist die Verfügbarkeit des Substrates L-Arginin. Schon kleine Abweichungen der L-Arginin-Konzentration können die NO-Produktion stark beeinträchtigen (8, 15). Abhängig ist die Verfügbarkeit von L-Arginin von der *de novo*-L-Arginin-Synthese, von den exogenen Spiegeln, von dem zellulären L-Arginin-Transport und von der Anwesenheit konkurrierender Enzyme (9). Als konkurrierendes Enzym ist die Arginase zu nennen, die aus L-Arginin Harnstoff und Ornithin bildet (10, 11). Eine verringerte Verfügbarkeit von L-

Arginin hat eine verringerte NO-Synthese zur Folge. Darüberhinaus kann die iNOS durch endogene NOS-Inhibitoren reguliert werden (9,12).

Neben der enzymatischen Synthese kann NO auch nicht-enzymatisch aus Nitrit oder nitrosierten Thiolen generiert werden. Einen ersten Hinweis auf einen fotoinduzierten Zerfall von Nitrit gab es schon früh. So stellte Furchgott 1955 eine Relaxation der glatten Muskulatur in Anwesenheit von Tageslicht fest. Durch eine indirekte Erhöhung des cGMP-Spiegels induziert NO bekanntermaßen über die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur eine Vasodilatation und damit eine Blutdrucksenkung. Da auch die Fotorelaxation mit einer Erhöhung des cGMP-Spiegels assoziiert ist, aber nicht durch NOS-Inhibitoren beeinflusst wird, wurde die Freisetzung von NO aus einem lichtempfindlichen Speicher vermutet (13).

Gerade in der humanen Haut und im Schweiß können signifikante Mengen Nitrit und RS-NO gemessen werden, und es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung von humaner Haut in der Freisetzung von bioaktivem NO aus Nitrit und RS-NO resultiert (15, 16).

Die hohe Konzentration von NO nach inflammatorischer Stimulation kann FeS-Gruppen zerstören und die Aktivität von Enzymen durch Nitrosierung von Tyrosinresten oder Cysteinresten modifizieren (8, 17).

NO kann als Signalmolekül auf verschiedene Signalkaskaden wirken, indem es durch Nitrosierung die Aktivität verschiedener Phosphatasen beeinflusst. Es hat Einfluss auf die Wirkung von Transkriptionsfaktoren.

Durch indirektes Einwirken auf Signalwege und durch direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren beeinflusst NO die Genexpression

verschiedener Gene. Zytotoxische Effekte, die mit NO in Verbindung gebracht werden, sind oft Folge der Interaktion mit Enzymen des Energiemetabolismus, speziell in der respiratorischen Kette der Mitochondrien und durch die Aktivierung von Energie-verbrauchenden DNA-Reparatur-Signalwegen.

NO kann aber auch protektiv wirken. So kann es auf die Transkriptionsregulation von schützenden Proteinen einwirken, z. B. auf die Expression von Heat-Shock-Proteinen oder der Heme-Oxygenase-1. Durch die Inhibition der Lipidperoxidase können Zellen von dem durch UVA-induzierten Zelltod geschützt werden (8,17).

NO hat außerdem immunmodulatorische Effekte und beeinflusst vielfältig Prozesse des Immunsystems sowie autoimmune Vorgänge. So konnte gezeigt werden, dass psoriatische Plaques iNOS exprimieren, während in atopischer Dermatitis oder in gesunder Haut keine iNOS-Expression nachweisbar ist.

Die Psoriasis ist eine Th1-vermittelte Dermatose, während die atopische Dermatitis Th2-vermittelt ist (9, 11, 18). Die Abwehr von Viren, Bakterien, Protozoen und Pilzen ist eine weitere immunologische Aufgabe des NO, indem es sich antiproliferativ oder zytotoxisch auf verschiedene Erreger auswirkt (19 – 21).

1.2 Psoriasis und die lokale nitrosative Balance

Heute wird die Psoriasis als Autoimmundermatose gesehen, die durch eine aberrierende T-Zellfunktion gekennzeichnet ist.

Die charakteristische Leiteffloreszenz ist ein scharf begrenzter, rundlicher Herd mit einer locker haftenden, silbrig- großlamellösen Schuppung, der sich über einem hochroten Erythem zeigt.

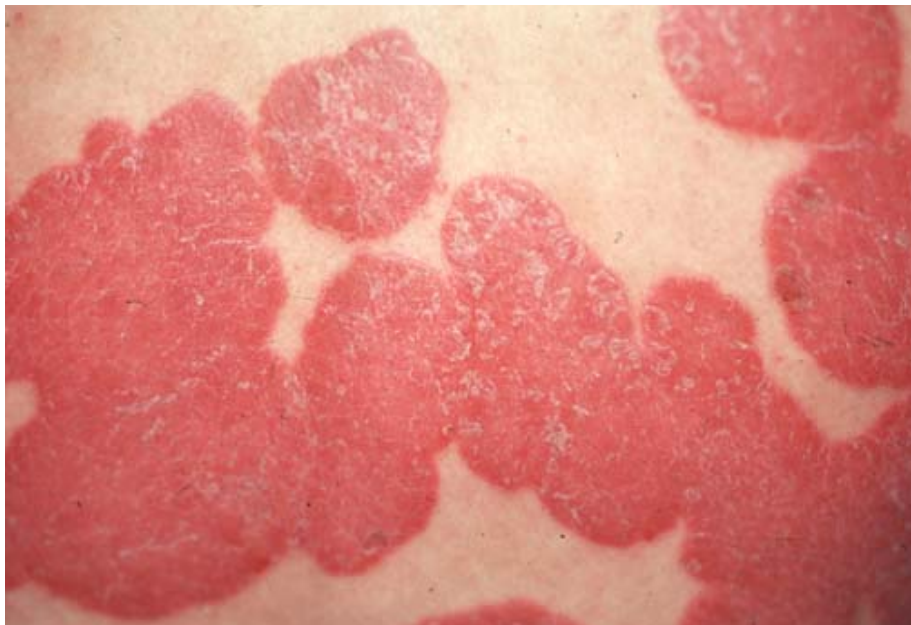


Abb. 2: Psoriatischer Plaque

Die charakteristische Leiteffloreszenz ist ein scharf begrenzter, rundlicher Herd mit einer locker haftenden, silbrig- großlamellösen Schuppung über einem hochroten Erythem. In diesem Bild konfluieren mehrere Herde miteinander.

Das klinische Erscheinungsbild kann sich in verschiedenen Variationen der Leiteffloreszenz ausdrücken, z. B. indem Morphe und Größe des einzelnen psoriatischen Plaques, die Verteilung der Plaques über die Körperfläche,

die zeitliche Dynamik ihres Auftretens und ihrer Persistenz unterschiedlich sind. Z. B. sind typisch für die sog. Psoriasis guttata viele kleine, münzgroße Plaques, die wie Regentropfen auf einer Wasseroberfläche angeordnet sind. Bei der chronischen Plaque-Psoriasis finden sich eher wenige, großflächige Plaques. Bei der generalisierten Ausdehnung über das gesamte Integument spricht man von einer Erythrodermie (22). Prinzipiell können sich die einzelnen Unterformen überlappen.

Eine Nagelbeteiligung in Form von Tüpfelnägeln bzw. dem psoriatischen „Ölfleck“ ist häufig. Eine Mitbeteiligung von Gelenken im Sinne einer psoriatischen Arthropathie findet sich bei 3 – 10% der Patienten (23).

Histopathologisch lässt sich die Psoriasisläsion in vier Kompartimente unterteilen, die untereinander durch mobile Zellen des Immunsystems sowie das Nervengeflecht, das sie durchzieht, kommunizieren (24).

1. Das epidermale Mikrokompartiment ist durch eine massive Verbreiterung der Epidermis um das drei- bis fünffache (Akanthose) gekennzeichnet, was zu einer Auffältelung der Haut führt (Papillomatose). Innerhalb der Epidermis ist die Hornschicht, in der sich teilweise Kernreste (Parakeratose) zeigen, verbreitert (Hyperkeratose).
2. In dem dermal-interstitiellen Kompartiment finden sich gleichmäßig verlängerte, teilweise birnenförmig aufgetriebene, von Ödemen umgebene Reteleisten.

3. Das vaskuläre Kompartiment enthält dilatierte, korkenzieherartig gewundene Kapillarschlingen.
4. Im Gegensatz zu gesunder Haut halten sich im sog. inflammatorischen Mikrokompartiment antigen-präsentierende Zellen, T-Zellen und Mastzellen auf. Außerdem finden sich neutrophile Granulozyten als perivaskuläres Infiltrat („Munroe'scher Mikroabszess“).

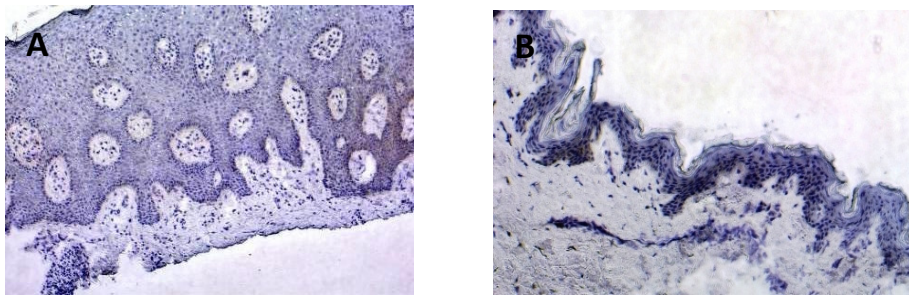


Abb. 3 A+B: Psoriatischer Plaque (A) im Gegensatz zu gesunder Haut (B), 200-fache Vergrößerung

Deutlich zu sehen ist die gegenüber gesunder Haut im psoriatischen Plaque massiv verbreiterte Epidermis (Akanthose), die zu einer Auffältelung der Haut führt (Papillomatose). Die Hornschicht ist verbreitert (Hyperkeratose) und aufgetriebene Reteleisten aus der Dermis ragen in die Epidermis hinein. Im Bild erscheinen sie durch den Anschnitt als kreisrunde Aussparungen.

Eine interessante Beobachtung ist, dass Proben aus einem nicht-befallenen Hautareal eines an Psoriasis Erkrankten in der histologischen Untersuchung nicht wie gesunde Haut erscheinen, sondern Merkmale eines psoriatischen Plaques in milderer Ausprägung aufweisen: Die Epidermis nicht-befallener

Haut ist verdickt und aufgefaltet, die Hornschicht wirkt dicker als in normaler Haut und aufgetriebene Reteleisten ragen in die Epidermis hinein. Als anschauliches Beispiel werden hier zwei Bilder eines Patienten gezeigt. Das Material für das erste Bild stammt aus einem typischen Plaque am Ellenbogen. Das Material für das zweite ist aus einem makroskopisch unauffälligen, nicht-befallenen Areal auf der kontralateralen Körperseite an der Außenseite des Knies entnommen.

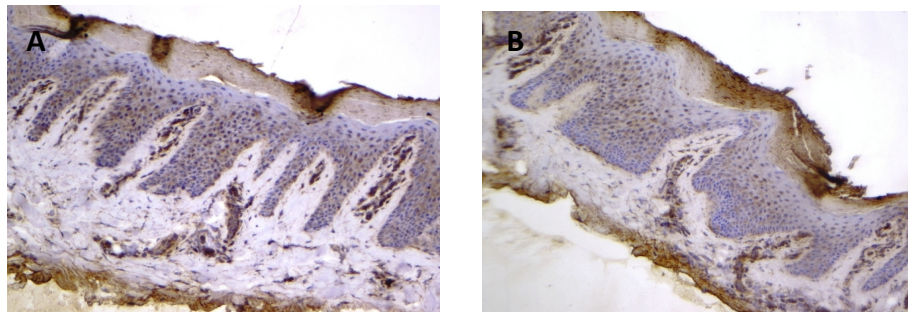


Abb. 4 A+B: Histologische Schnittbilder zum Vergleich aus einem psoriatischen Plaque (A) und aus einem makroskopisch unauffälligen, nicht läsionalen Hautareal eines Psoriasis-Patienten (B), 200-fach vergrößert

Hier zeigt sich, dass äußerlich unbefallene Haut eines Psoriatikers im histologischen Schnittbild Merkmale eines Plaques in gemilderter Ausprägung aufweist: Akanthose, Papillomatose, Hyperkeratose.

Für die intakte Funktion der Haut ist es wichtig, zwischen der ständigen Erneuerung und der Abschilferung von Hautzellen ein Gleichgewicht herzustellen, das die oben beschriebene Architektur der Epidermis erhält. Die Keratinozyten der Epidermis stellen eine sich kontinuierlich erneuernde Zellpopulation dar. 40 % der Basalzellreihe besteht aus einem Reservepool relativ undifferenzierter Stammzellen (23). Normalerweise befinden sich

ca. 95 % der Stammzellen in der Ruhe-Phase. Nach einem adäquaten Stimulus z.B. bei der Wundheilung oder der Entzündungsreaktion werden diese Zellen in den Zellzyklus rekrutiert. Es entstehen sich drei bis fünf Mal teilende Tochterzellen. Sie wandern einzeln über einer Dauer von ca. 14 Tagen bis ins Stratum granulosum und bereiten sich währenddessen durch Stoffwechselveränderungen auf die terminale Differenzierung zum ausgereiften Keratinozyten vor. Vom Stratum granulosum aus steigen sie synchron, die terminale Differenzierung durch Synthese und Vernetzung von Keratinfilamenten vollendend, im Verband weiter auf, um schließlich als Schuppen abgeschilfert zu werden (23).

Mitoseaktivität ist in gesunder Haut auf die Basalschicht beschränkt. In psoriatischer Haut findet eine überstürzte, gesteigerte Proliferation statt, die über eine vermehrte Rekrutierung der Ruhepopulation und eine Verkürzung der Zellzyklusphasen verwirklicht wird. Entsprechend ist die Wachstumsfraktion, d. h. der Anteil der sich aktiv teilenden Zellen, in der Basalzellreihe verdoppelt. Das proliferativeNKompartiment beschränkt sich nicht mehr auf die Basalzellschicht sondern weitete sich nach suprabasal aus. Mitosen können in basalen und suprabasalen Zellreihen nachgewiesen werden.

Anschaulich werden in gesunder Haut pro Zeiteinheit und pro Quadratmillimeter Haut 1250 Zellen produziert, in der psoriatischen Haut sind es 40-fach so viele: ca. 35000 Zellen pro Zeiteinheit. Während ein gesunder Mensch 1 g pro Tag abschilfert, verliert ein Patient mit Psoriasis bis zu 20 g pro Tag an Hautzellen (25).

NO hat einen „biphasischen, wachstumsregulierenden Effekt auf Keratinozyten“: niedrige NO-Konzentrationen fördern Proliferation und Reparatur, hohe NO-Konzentrationen fördern die Differenzierung der Zellen (26,27). In psoriatischen Keratinozyten wird durch Th1-Entzündungsstimuli die iNOS überexprimiert, was hohe lokale NO-Konzentrationen zur Folge hat. Sie ist jedoch durch eine Koexpression mit der Arginase, die kompetitiv um das gemeinsame Substrat L-Arginin konkurriert, in ihrer Effektivität limitiert. Es kommt daher paradoxerweise zu niedrigen NO-Konzentrationen, die als Proliferationsstimulus wirken, auf den hin die Keratinozyten zu der beschriebenen Hyperproliferation angetrieben werden.

Die Koexpression von Arginase 1 und iNOS in psoriatischer Haut deutet auf eine aberrante Regulation von Th1- bzw. Th2-Antworten hin, deren Regulation in gesunder Haut reziprok ist (28).

Die Psoriasis ist weltweit verbreitet und betrifft hellhäutige Ethnien mehr als andere. In Europa sind 2-3 % der Bevölkerung betroffen. Für die deutsche Bevölkerung ist von einer Prävalenz von 2,8 % auszugehen. Frauen und Männer sind gleich häufig betroffen, einige wenige Autoren finden eine geringfügig höhere Prävalenz bei Männern. Tatsächlich scheint das Geschlecht einen Einfluss auf das Alter bei Erstmanifestation zu haben, die Psoriasis manifestiert sich bei Kindern von erkrankten Vätern früher im Leben als bei Kindern von erkrankten Müttern (sog. „parental sex effect“).

Eine familiäre Häufung wurde schon 1801 von R. Willan beschrieben. 1972 erkannten T. J. Russel und Mitarbeiter erstmalig eine Assoziation zu bestimmten HLA-Antigenen. Im Folgenden fanden verschiedene Autoren unabhängig voneinander Assoziationen zu den HLA-Typen Cw6, B 13 und B57, das in 93 % der Fälle mit B17 identisch ist. Die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen liegt bei 60 % (31).

Die pathogenetische Bedeutung für die Psoriasis könnte zum einen darin liegen, dass die HLA-Moleküle selbst T-zellulär erkennbare Antigen-Strukturen darstellen. Zum anderen könnten sie kosegregieren zu genomisch-physisch eng benachbarten, psoriasisrelevanten Genen.

Von allen Haplotypen weist Cw6 die höchste Psoriasis-Assoziation auf und gilt als Suszeptibilitätsgen für die Psoriasis (29,30). 2/3 der Psoriasis-Patienten tragen dieses Allel im Vergleich zu 10-15 % in der gesunden Kontrollpopulation. Heterozygote Träger haben ein 10 % - iges, homozygote Träger ein 20-30 % - iges Risiko, im Laufe ihres Lebens eine Psoriasis entwickeln. HLA-Cw 6 kodiert für ein Protein, das an Immunreaktionen teilnehmen kann, indem es Peptid-Epitope CD8-positiven T-Zellen präsentiert. Es ist stark verbunden mit drei HLA-B Allelen: B57, das in 93 % mit B17 identisch ist, B37 und B13, die sämtlich mit einem erhöhten Risiko, Psoriasis zu entwickeln, verbunden sind.

Vermutlich hängen bestimmte klinische Subtypen von bestimmten genetischen Komponenten ab (29). Als Beispiel nennen Gudjonsson und Valdimarsson Cw6-positive Patienten, deren Krankheitsverlauf durch früheres Alter der Erstmanifestation und durch eine höhere Anfälligkeit für

durch Streptokokken-Superantigen getriggerte Schübe gekennzeichnet ist

(31). DR7 und B27 sind positiv mit der Psoriasis-Arthritis korreliert.

Henseler und Christophers erarbeiteten eine Subtypisierung der Psoriasis in die Typen 1 und 2, deren Hauptkriterium das Alter bei der Erstmanifestation ist (22).

Charakteristika	Typ 1	Typ2
Relativer Anteil	ca. 75 %	Ca. 25 %
Erstmanifestation	< 40. Lebensjahr	> 40. Lebensjahr
HLA Assoziation	A30, B13, B57/17, Cw6	B27, Cw2
Familiarität	stark	schwach

Tab. 1: Subtypen der Psoriasis nach Henseler und Christophers

Zusammengefasst wird die Typ 1-Psoriasis früher im Leben manifest, vor dem 40. Lebensjahr, kommt gehäuft familiär vor, ist stärker Cw6-assoziiert und insgesamt mit einem Anteil von ca. 75 % häufiger.

Dass UV-Licht heilend auf verschiedene Hauterkrankungen wirkt, ist seit der Antike bekannt. Heute macht man sich die nicht-enzymatische Freisetzung von NO gezielt zum Ausgleich des lokalen NO-Defizits bei der Fototherapie mit ultravioletten Strahlen der Wellenlänge 311 nm zu Nutze. Sie wird bei der mittelschweren bis schweren Psoriasis angewendet, dann, wenn mindestens 10 % der Körperoberfläche eines Patienten betroffen ist. Vor Beginn der Bestrahlung wird die individuelle minimale Erythemdosis (MED) an einem ca. 10 x 10 cm großen Hautareal bestimmt. Die MED ist die

UV-Dosis, die in einer bestimmten Zeiteinheit gerade noch eine Rötung der Haut auslöst. Die Startdosis für eine Ganzkörperbestrahlung liegt bei 70 – 80 % der MED. Bei täglicher Behandlung wird die Dosis um etwa 15 % der MED erhöht. Die UV-Dosis, die am Ende einer Fototherapie verabreicht wird, ist 15 – 20-fach höher als die ursprüngliche individuelle MED. Mit einer Abheilung ist nach etwa 20 – 30 Behandlungen zu rechnen (22, 32).

1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen und systemische nitrosative Balance

In den Blutgefäßen spielt die Freisetzung von NO aus dem Gefäßendothel eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung eines aktiven vasodilatierenden Tonus. Zum einen vermittelt NO den Mechanismus der Vasodilatation selbst: Von NOS produziertes NO kann frei diffundieren und an die Hämgruppe der löslichen cyclischen Guanylatzyklase (cGMP) in glatten Muskelzellen binden. Damit steigt der intrazelluläre Gehalt an cGMP an, was zum Einstrom von Kalzium-Ionen in die glatte Muskelzelle führt. Folglich kommt es zur Entspannung der glatten Muskeln der Gefäßwand und auf diese Weise zur Vasodilatation.

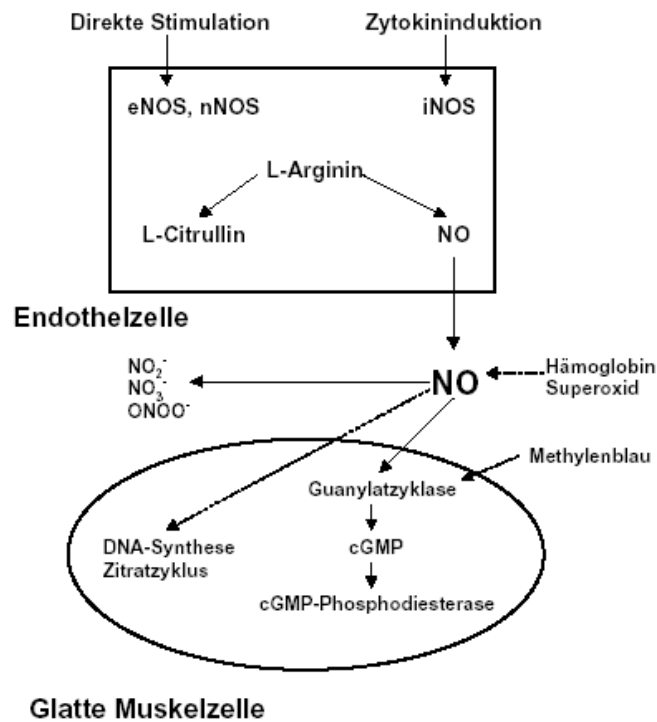


Abb.5: NO-vermittelte Vasodilatation

Von NOS produziertes NO diffundiert in die glatte Muskelzelle der Gefäßwand und bindet an die Hämgruppe der cGMP in glatten Muskelzellen. Damit steigt der intrazelluläre Gehalt an cGMP an, Kalziumionen strömen in die glatte Muskelzelle ein. Es kommt zur Entspannung der glatten Muskelzellen und auf diese Weise zur Vasodilatation.

Darüberhinaus vermittelt NO viele andere Vorgänge, die es als „endogenes anti-arteriosklerotisches Molekül“ in die Diskussion gebracht haben (34).

Als einige Beispiele seien stichwortartig die Hemmung der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an die Gefäßwand durch die Steigerung der intrazellulären cGMP-Konzentration genannt, die Wirkung als Inhibitor der Monozyten- und Leukozytenadhäsion, die Hemmung der zur Plaquebildung führenden Proliferation glatter Muskelzellen, u. v. m. Über die

endothelabhängige Regulation des Gefäßtonus durch NO hinaus weisen neuere Untersuchungen auf einen Effekt von nNOS produziertem NO im zentralen und im autonomen Nervensystem, der den systemischen und pulmonalen Blutdruck mitreguliert (35).

Bei der Arteriosklerose kommt es zu einer Änderung der Endothel-

Physiologie: Aus einer reduzierten Verfügbarkeit von biologisch aktivem NO resultiert eine Einschränkung der endothelvermittelten Vasodilatation.

Die Rate der NO-Produktion hängt kritisch von der Verfügbarkeit von L-Arginin im Plasma ab, einer semiessentiellen Aminosäure, die das Ausgangsprodukt der NO-Synthese ist. Systemische und/oder lokale L-Arginin-Mangelzustände steigern daher signifikant das Risiko für endotheliale Dysfunktion. (36) In der psoriatischen Haut ist ein solcher Argininmangelzustand gegeben. Da die Haut mit ihrer ausgedehnten Oberfläche als Ganzes eines der größten Organe des menschlichen Körpers ist, kann eine solche Fehlregulation systemische Auswirkungen haben.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Bei dem Thema „Untersuchungen zur nNOS an der psoriatischen Haut“ war eine zugrundeliegende theoretische Überlegung, ob die Psoriasis, die durch eine lokale Störung der nitrosativen Balance in der Haut gekennzeichnet ist, gleichzeitig anfällig macht für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko als Ausdruck einer systemischen nitrosativen Dysbalance. Methodisch wurde die Frage einmal durch eine klinische Studie sowie einen experimentellen Teil beleuchtet.

Ein Kollektiv aus Psoriasis-Patienten wurde zusammengestellt, das zum einen nach Psoriasis-relevanten Kriterien, z. B. Auslösefaktoren, Familiarität etc., charakterisiert wurde und zum anderen bezüglich ihres kardiovaskulären Risikoprofils analysiert wurde. Dieses Kollektiv wurde nach der klinischen Verlaufsform in eine die Gruppen Typ 1 und Typ 2 eingeteilt. Weiter wurden diese beiden Gruppen, Verlaufsform Typ 1 und Verlaufsform Typ 2, bezüglich ihres kardiovaskulären Risikoprofils verglichen. Als Vergleichsgruppe für das Gesamtkollektiv der Psoriasis-Patienten wurde ein kleines Kollektiv an Patienten mit Atopischer Dermatitis rekrutiert. Die Atopische Dermatitis folgt einem grundsätzlich anderen Pathomechanismus und eignet sich daher als Vergleichsgruppe: Während die Psoriasis Th1-vermittelt ist, wird die Atopische Dermatitis Th2-vermittelt.

Weiterhin sollte die Rolle des Enzyms nNOS als Proliferationsmarker in der psoriatischen Epidermis qualitativ und quantitativ geprüft werden.

Änderungen im Expressionsmuster von Arginase und nNOS im unbehandelten Stadium der Erkrankung und im Verlauf einer UV-Licht-Therapie wurden mittels Immunhistochemie untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

2.1.1 Votum der Ethikkommission

Die Studie zur „Analyse der differentiellen Genexpression und des nitroso-oxidativen Stresses bei entzündlichen und tumorösen Hauterkrankungen“ (2294) fand im Februar 2004 die Genehmigung der Ethikkommission.

2.1.2 Rekrutierung des Patientenkollektivs, Ein-/Ausschlusskriterien

Im Rahmen meines PJ-Tertials vom 26.04.2004 bis 13.08.2004 in der dermatologischen Abteilung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf habe ich allen stationär aufgenommenen Patienten mit der Diagnose Psoriasis bzw. Atopischer Dermatitis angeboten, an der Studie teilzunehmen. Die Studie beinhaltete neben der Anamnese und der körperlichen Untersuchung die Entnahme von Blut und die Entnahme von Hautbiopsien an unterschiedlichen Körperstellen. Die Patienten wurden ausführlich über den Verlauf und das Ziel der Studie aufgeklärt sowie über das Risiko einer Shave-Biopsie (Infektion, Perforation, Blutung, Gefäß- und Nervenverletzung, allergische Reaktion, Narbenbildung aufgeklärt (Formular siehe Anhang!).

Insgesamt stimmten 23 Patienten mit Psoriasis und 5 Patienten mit Atopischer Dermatitis zu, wobei nicht alle Patienten zur Abgabe von Biopsien bereit waren.

2.1.3 Voruntersuchungen

Es wurde eine ausführliche Eigen- und Familienanamnese, eine körperliche Untersuchung mit Erhebung der Vitalparameter und des dermatologischen Befundes, laborchemische Untersuchungen (Entzündungskonstellation, Hyperlipoproteinämie, HLA-Typisierung etc.) sowie die Entnahme von shave-Biopsien durchgeführt. Die Biopsien wurden aus läsionaler und nicht-läsionaler Haut entnommen, möglichst vor Beginn einer UV-Therapie, kurz nach Beginn der Therapie und im Langzeitverlauf nach Wochen. Als Vergleichsgruppe wurden Patienten mit Atopischer Dermatitis rekrutiert.

2.1.3.1 Evaluierung der Psoriasis

Zur Quantifizierung der Krankheitsaktivität wurde bei allen Patienten der PASI-Index erhoben.

Der Psoriasis Area and Severity (PASI)-Index wurde von Fredericksson und Petersson 1978 erstmals publiziert und hat sich als am häufigsten verwendeter, klinischer Graduierungsindex zur Einschätzung der Krankheits-Aktivität bei der Psoriasis bewährt. Die zu Grunde liegende Formel zur Berechnung lautet:

	Kopf (K)		Stamm (S)	
PASI=	0,1 (E + I + D) A	+	0,3 (E + I + D) A	+
	0,2 (E + I + D) A	+	0,4 (E + I + D) A	
	Obere Extremität (oE)		Untere Extremität (uE)	

Tab. 2: Formel zur Berechnung des PASI-Score

A= Flächenfaktor, E= Erythem, I= Infiltration, S= Schuppung;

oE= obere Extremität, uE= untere Extremität, K= Kopf, S= Stamm

Für die Beurteilung wird der Körper in vier Regionen – Kopf (K), obere Extremität (oE), Stamm (S), untere Extremität (uE) - eingeteilt, die 10, 20, 30 bzw. 40 % der Körperoberfläche entsprechen. Jedem der genannten Körperabschnitte wird ein Flächenfaktor (A) von 0 bis 6 zugeordnet, welcher den läsionalen Anteil des Körperabschnitts spiegelt:

- 1: steht für <1 %,
- 2: für 10-30 %,
- 3: für 30-50 %,
- 4: für 50-70 %,
- 5: für 70-90 %,
- 6: für 90 – 100 % .

Dann wird jedem dieser Körperabschnitte eine qualitative Graduierung für Erythem (E), Infiltration (I) und Schuppung (S) auf einer 5-Punkte-Skala zugeordnet:

- 0: keine,
- 1: leichte,
- 2: mäßige,
- 3: starke,
- 4: sehr starke Beteiligung.

Hieraus ergibt sich eine Graduierung im PASI-Score von minimal 0 bis maximal 72.

Allgemein gilt, dass eine Psoriasis mit einem Score von 10 als leichtgradig, ab einem Score von 30 als schwergradig einzuordnen ist.

Geschätzt wird diese Methode als praktikable Einstufung des Schweregrades der Erkrankung eines Patienten. Kritisch gesehen wird eine deutliche interindividuelle Variabilität zwischen den Untersuchern. Solange die Beurteilung der Patienten von einem einzigen Untersucher durchgeführt wird, gilt der PASI-Score als verlässlich (22, 37, 38).

Neben dem PASI-Score wurden individuelle Daten wie Körpergröße, -gewicht und Alter erhoben, eine Eigenanamnese bezüglich des Beginnes der Erkrankung, Gelenkbeteiligung und der bisherigen bzw. laufenden Therapieversuche, z. B. lokale/systemische Medikation, UV-Therapie etc.

Bekannte Risikofaktoren wie z. B. Nikotinkonsum wurden erfasst. (s. Anhang!) Weiterhin wurden die Patienten zu Psoriasis-spezifischen Parametern, die die Einteilung in eine Verlaufsform 1 und 2 erlauben, untersucht (Alter bei der Erstmanifestation, Familiarität der Erkrankung und HLA-Assoziation). Anhand von Blutentnahmen wurden laborchemisch die Entzündungsparameter (Leukozytenzahl und CRP) sowie der Lipidstatus im Serum erfasst. Weiterhin wurde zur Einordnung einer möglichen genetischen Komponente eine HLA- Typisierung durchgeführt.

2.1.3.2 Evaluierung des kardiovaskulären Risikoprofils

Von allen Studienteilnehmern wurde ein kardiovaskuläres Risikoprofil erstellt.

Das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren wird seit der Framingham-Studie 1948 benutzt, um Gruppen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für stenosierende Veränderungen des Herzkranzgefäßsystems auf dem Boden einer Arteriosklerose zu charakterisieren (39). Je mehr Risikofaktoren vorliegen, desto höher ist das Risiko, von einer koronaren Herzkrankheit betroffen zu sein. Dabei kann man Risikofaktoren unterscheiden, die durch Verhaltensmodifikation und Medikamente beeinflussbar sind und solche, die unbeeinflussbar sind. Zu den biochemischen bzw. physiologischen, beeinflussbaren Charakteristika gehören der Blutdruck, die Hyperlipoproteinämie, die Hyperglykämie neigung bzw. Diabetes mellitus, die Adipositas und der Nikotingebrauch. Zu den unbeeinflussbaren zählen: das Geschlecht, das Alter, die Familiengeschichte und eine bereits vorhandene Arteriosklerose.

Lebensstil	Biochemische Parameter	Persönliche Parameter
Ernährung	Blutdruck	Alter
Nikotingebrauch	Hyperglykämie/Diabetes mellitus	Geschlecht
Alkoholgenuss	Fettstoffwechselstörungen (↓ HDL, ↑LDL, ↓LpA)	Familienanamnese
Körperliche Inaktivität	Adipositas thrombogene Faktoren	bekannte KHK oder pAVK

Tab. 3 Risikofaktoren für eine KHK (LDL= low density lipoprotein, HDL= high density lipoprotein, LpA= Lipoprotein a)

Dementsprechend wurden die Patienten zu ihrer Familiengeschichte, Größe, Gewicht, Nikotinkonsum, Vorerkrankungen und aktueller Medikation befragt. Weiterhin wurde vor Ort der Blutdruck gemessen. Mittels der Blutentnahmen wurden der Lipid- und der Gerinnungsstatus erfasst.

Bis auf eine Erfassung des PASI-Score wurden die Patienten mit Atopischer Dermatitis analog zu 2.1.2.1 und 2.1.2.2 untersucht.

2.1.4 Haut-Biopsien und Gewebe

Die Hautproben wurden in Form von Shave-Biopsie entnommen. Angestrebt wird dabei das tangentielle Abtrennen der Epidermis scharf an der Grenze zur Subkutis. Nach der Desinfektion des ausgewählten Hautareals und einer Lokalanästhesie mit Xylocain 2 % (ca. 2-4 ml pro Areal) wurde die Biopsie aus einem läsionalen und einem nicht läsionalen

Areal mit einem Skalpell entnommen, sofort in Kryo-Gefäße gelegt, in flüssigem Stickstoff von -196°C schockgefroren transportiert und bei -80°C gelagert. Die entstandene Wunde wurde mit einem sterilen Druckverband versorgt.

Als gesunde Haut wurden Gewebstücke aus Mammareduktionen aus der Abteilung für Plastische Chirurgie des Florence-Nightingale-Krankenhaus in Düsseldorf Kaiserswerth verwendet.

Zerebrales Gewebe für die Positivkontrolle des nNOS-Antikörpers wurde freundlicherweise vom Institut für Neuropathologie, Prof. Reifenberger, zur Verfügung gestellt.

2.2 Material

2.2.1 Gebrauchsmaterialien

2.2.1.1 Geräte

Mikrotom: Mikrotom 2800 Frigocut-E (Reichert-Jung/ Leica-Instruments

GmbH Jung in Nußloch, Deutschland, Reichert in Wien, Österreich)

Mikroskop: Zeiss-Axioplan-Mikroskop (Carl Zeiss Ag, Jena, Deutschland)

Digitalkamera: Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland ABI Prism

HT 7900 Sequence Detection System (Fa. Applied Biosystems, Foster City (CA), U. S. A.)

2.2.1.2 Glaswaren

Objektträger, Deckgläschen (Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland)

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

2.2.2.1 Chemikalien

Aceton, Ethanol, Isopropanol, Hämotoxyllin, Natriumchlorid, Natriumdihydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Wasserstoffperoxid, Xylol (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

Agarose, Ethylendiamintetraacetat, BSA Albumin bovine serum (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)

Ethidiumbromid, Triton X-100 (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland)

Wasser/molekularbiologischer Grad (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Eindeckelungssubstanz Eukitt (Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe, Deutschland)

Einbettmedium Tissue Tek O. C. T. compound (Sakura Finetek Europe B.V, Zoeterwoude, Niederlande)

2.2.2.2 Plastikartikel

96-Well Optical Reaction Plate with barcode 128 ABI Prism, Optical adhesive Covers (Fa. Applied Biosystems, Foster City (CA), U. S. A.)

Absaugpipetten (Fa. BD Falcon, Heidelberg, Deutschland)

Pipettenspitzen DNase-, RNase-frei (Fa. Biozym Scientific GmbH,
Ahrensberg, Deutschland)

2.2.3 Puffer

TBS (pH 7,8): Tris 20 mM, NaCl 150 mM

2.2.4 Antikörper

Negative Control Mouse IgG1 (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

Arginase1-Antikörper (Auftragsarbeit des Labors Dr. O. Schnorr, Biochemie
und Molekularbiologie, Heinrich-Heine-Universität, an die Firma

Eurogentec, Seraing, Belgien, Peptidsequenz: H2N-SLG KTP EEV TRT VNT C

– CONH₂, Molekulargewicht 1734,93)

nNOS/NOS-Type1 (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ U.S.A.)

2.2.5 Kits

Omni Script RT Kit, QIAshredder, QuantiTect SYBR Green PCR Kit, RNA-

freeDNase Set, RNeasy Mini Kit, Taq PCR Core Kit (Fa. Qiagen, Hilden,
Deutschland)

Power SYBR Green Master Mix (Fa. Applied Biosystems, Foster City (CA), U.
S. A.)

Universal LSAB Kit, DAKO Liquid DAB Substrate-Chomogen System (Fa.
DAKO Cytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.2.6 Software

Fotodokumentation und Bildbearbeitung: Software SPOT Advanced

(Diagnostic Instruments, Sterling Heights; MI, U.S.A.)

Statistik: GraphPad Prism, (GraphPad, California, U. S. A.)

Real-Time-PCR: Primer Express 2.0 (Fa. Applied Biosystems, Foster City

(CA), U. S. A.), Q-Gene-Software (QGene, U.S.A.)

2.3 Methoden

2.3.1 Immunhistochemie nach der LAB-LSAB-Methode zur

Charakterisierung des Arginase 1- und des nNOS-

Expressionsmuster in Epidermiszellen

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Gewebestücke in O. C. T.

Compound eingebettet, mit dem Mikrotom in 6 µm dicke Scheiben

geschnitten, auf Objektträger aufgetragen und ein bis zwei Stunden

luftgetrocknet. Bis zu ihrer weiteren Verarbeitung lagerten die

fertiggestellten Objektträger bei -20 °C.

Unter der LAB-LSAB-Methode versteht man den indirekten Nachweis eines nukleären, membranständigen oder zytoplasmatischen Antigens, hier die Arginase 1 bzw. die nNOS, nach der sog. Labeled (Strept) Avidin-Biotin-Methode (41). Hierbei macht man sich die Affinität von dem aus Streptomyces-Bakterien gewonnenen Protein Streptavidin zu dem Vitamin Biotin zunutze, um dann indirekt über eine enzymatisch katalysierte Reaktion eine Farbmarkierung des entsprechenden Antigens zu erreichen: Im ersten Schritt bindet ein spezifischer Primär-Antikörper an das Antigen der Probe. Bei dem zweiten Schritt wird zu dem bereits gebundenen Primärantikörper ein sekundärer Brückenantikörper

hinzugegeben, der mit Biotin gekoppelt ist. In dem dritten Schritt folgt das Auftragen eines direkt mit einem Enzym, hier der Peroxidase, gebundenen Streptavidins. Streptavidin, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, und das Biotin des Brückenantikörpers verbinden sich. Mittels Diaminobenzidin als Chromogen findet eine enzymvermittelte Farbreaktion statt. Der durch die Peroxidase aus Wasserstoffperoxid freigesetzte Sauerstoff wird durch Diaminobenzidin zu einem braunen, unlöslichen Farbprodukt oxidiert und entspricht dann dem darzustellenden Antigen:

Peroxidase (gebunden an Antikörper) + $\text{H}_2\text{O}_2 = \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

$\text{O}_2 + \text{Diaminobenzidin} = \text{brauner Komplex}$

Als Gegenfärbung eignet sich Hämatoxylin.

Der Arginase1- und der IgG1-Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:200 verwendet, der nNOS-Antikörper in einer Verdünnung von 1:50.

Zur Sicherung der Spezifität der Immunreaktionen wurde für alle Hautproben eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der statt des spezifischen Primärantikörpers ein irrelevanter monoklonaler Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse (Maus-IgG1) verwendet wurde.

Um sicherzustellen, dass der Antikörper ausschließlich das Zielantigen färbt, dienten als Positivkontrolle Gewebe mit bereits nachgewiesener Immunreaktivität für das jeweilige Antigen. Für die Arginase1 lag der Arbeitsgruppe eine Positivkontrolle aus Haut- und Pankreasgewebe bereits vor. Für die nNOS wurde eine Positivkontrolle aus zerebralem Cortexgewebe angefertigt (s. u.). Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem Zeiss-Axioplan-Mikroskop. Für die Fotodokumentation und Bildbearbeitung kamen die Digitalkamera Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland und die Software SPOT Advanced zum Einsatz.

2.3.2 RT-PCR

Die RT-PCR wurde im Labor O. Schnorr durchgeführt und mir freundlicherweise zur weiteren Bearbeitung überlassen.

2.3.3 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR wurde in der Mitte der 90er Jahre entwickelt und basiert auf der Technik der PCR (43). Während mit der PCR der qualitative Nachweis von DNA als Endpunkt-Analyse gelang, steht mit der Real-Time PCR eine Methode zur Verfügung, die mittels fluoreszierender Farbstoffe PCR-Produkte in der Echtzeit ihrer Entstehung sichtbar machen und quantifizieren kann.

In der hier vorliegenden Arbeit kam die direkte SYBR Green Methode zum Einsatz.

SYBR Green ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der unspezifisch an Doppelstrang-DNA bindet. In Lösung zeigt der Farbstoff wenig Fluoreszenz, bindet er in der Elongationsphase an die Doppelstrang-DNA, ist ein entsprechender Fluoreszenzanstieg zu detektieren, der nach der Denaturierung der DNA wieder abfällt. Da das Bindungsverhalten unspezifisch ist und somit auch Nebenprodukte und Primer-Dimere markiert werden, wird die Spezifität bei dieser Methode durch eine Schmelzpunktanalyse gesichert: Die charakteristische Schmelztemperatur eines DNA-Fragments ist abhängig von der Größe und von der Nukleotidzusammensetzung. Das Amplikon wird kontinuierlich bis über seinen Schmelzpunkt hinaus erhitzt. Währenddessen wird seine Fluoreszenz erfasst. Ein charakteristischer Schmelzpunktanstieg unterscheidet das Zielprodukt von Artefakten, die einen früheren und breiteren Fluoreszenzanstieg verursachen.

Das Reaktionsgemisch wird in Mikrotiterplatten (96 Wells à 25 - 50 µl Reaktionsvolumen) aufgetragen.

Das ABI Prism 7700 Sequence Detection System von Applied Biosystems besteht

aus einem Thermozykler, der mit einem Laser und einem charge-coupled device (CCD) Optiksystem verbunden ist. Über jedem well ist über eine Linse eine optische Faser positioniert, über die Laserlicht geleitet wird, das die Fluorochrome in der PCR-Lösung anregt. Deren Emissionen werden in regelmäßigen Zeitabständen aufgenommen und durch dieselbe Faser zu der CCD-Kamera geschickt, wo sie durch entsprechende Software analysiert wird (45). Fluoreszenzwerte werden somit bei jedem Zyklus erstellt und repräsentieren die Produktmenge, die bis zu diesem Zeitpunkt amplifiziert wurde. Der Ct-Schwellenwert ist an dem Punkt erreicht, an dem das Fluoreszenzsignal statistisch signifikant über dem Hintergrundsignal zu erfassen ist. Dieser Punkt wird in der exponentiellen Phase der Reaktion erreicht, wenn die Amplifikation am effektivsten und am wenigsten betroffen von reaktions-limitierenden Bedingungen ist. Je mehr cDNA zu Beginn der Reaktion vorhanden war, desto weniger Amplifikationsschritte sind nötig, um den Punkt zu erreichen, der Ct-Wert ist also umgekehrt proportional zu der im Ausgangstemplate vorhandenen Anzahl der Kopien (46).

Neben dem Zielprodukt wird zeitgleich ein konstitutiv exprimiertes "housekeeping" Gen, z. B. 18S, mitgeführt. So wird die relative Quantifizierung spezifischer Transkriptmengen durch Bezug auf das interne Referenzgen ermöglicht.

In meiner Arbeit wurde die Real-Time-PCR mit dem Power SYBR Green PCR Master Mix im ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System durchgeführt. Um den Schwellenwert zu ermitteln, bei dem die PCR-Reaktion für alle untersuchten Gene im linearen Bereich verläuft, wurde für beide Gene die geeignete Templatmenge in Vorversuchen ermittelt. Als housekeeping gene wurde die 18S gewählt. Ein Leerwert (NTC), in welchem die cDNA durch RNase-DNasefreies Wasser ersetzt wurde, diente als Negativkontrolle.

Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen stammen aus Veröffentlichungen oder wurden mittels der Software Primer Express 2.0

(Fa. Applied Biosystems) generiert. Synthetisiert wurden die Primer von Sigm-Genosys, Steinheim, Deutschland. Die Spezifität wurde mit Hilfe des Homologievergleichs von BLAST (NCBI) und der Aufzeichnung der Dissoziationskurven überprüft.

Die übernommenen Patientenproben sowie die gesunden Kontrollen lagen in einer Ausgangskonzentration von 250 ng in 20 µl vor. Um das knappe Probenvolumen aus humaner Epidermis optimal zu nutzen, wurden 80 ng cDNA pro well als Dupletts anstatt der üblichen Tripletts eingesetzt. Zur Darstellung des gewählten house keeping genes 18S wurden 0,4 ng cDNA pro well ebenfalls in Dupletts eingesetzt. Die cDNA wurde dementsprechend auf Eis mit H₂O so verdünnt, dass sich die geforderte cDNA-Menge in jeweils 10 µl befand. Das Sybergreen-Reaktionsgemisch wurde so vorbereitet, dass die gewünschte Menge in insgesamt 15 µl enthalten war.

10 µl Probe und 15 µl Sybergreenmix ergaben so das vorgeschriebene Endvolumen von 25 µl.

	nNOS	18S
cDNA	80 ng	0,4 ng
SYBR GREEN mAster Mix	12,5	12,5
Primer sense	0,75	0,25
Primer antisense	0,75	0,25
H₂O	ad 15 µl	ad 15 µl

Tab. 4: Pipettierschema für die Reaktion der Real-Time-PCR

Gen	Sequenz	Größe des Fragments (in bp)
nNOS	sense: CTT CAA GAA GCT AGC AGA AGC TGT antisense: ACA AGG ACC AGA GTT TCA TGT TC	221
18S	sense: 5`-CAT GGT GAC CAC GGG TGA C-3` antisense: 5`-TTC CTT GGA TGT GGT AGC CG-3`	79

Tab. 5: Primersequenzen

Die gewählten PCR-Bedingungen im Real-Time-System sind der Tabelle zu entnehmen:

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Sek.)	Beschreibung
1	95	15	Aktivierung der TaqPolymerase
2 (40x)	94	15	Denaturierung
	60	30	Annealing
	72	30	Elongation
3	95	15	Erstellen einer
	60	15	Schmelzkurve
	95	15	

Tab. 6: Ablauf der Real-Time PCR unter der Verwendung von SYBR-Green

Die relative Expression der untersuchten Gene wurde mit Hilfe der Formel von Pfaffl bestimmt (47).

2.3.4 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurden als Signifikanztests der Mann-Whitney-Test und der Fisher`s-Test angewendet. Ist der p-Wert $< 0,05$, dann gilt das Ergebnis als signifikant, d. h. ein Fehler bei der Entscheidung, ein falsches Ereignis als „wahr“ einzustufen, tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 5% ein (48). Zur Berechnung wurde die Software PadGraph Prism genutzt.

3. Ergebnisse

3.1 Statistische Auswertung der klinischen Daten

3.1.1 Charakterisierung des Kollektives der Patienten mit Psoriasis

Zunächst wurde die Psoriasis-Patienten-Gruppe bezüglich Psoriasis-relevanter Parameter analysiert, um eine Zuteilung zur Verlaufsform der Psoriasis Typ 1 bzw. Typ 2 vorzunehmen. Die Tabelle beinhaltet die Geschlechtszugehörigkeit [Mann/Frau], das Alter zu Beginn der Erkrankung [Alter des Patienten in Jahren], die Familienanamnese [positiv, wenn mindestens ein Angehöriger, Großeltern, Eltern, Geschwister, eigene Kinder, ebenfalls erkrankt ist] sowie die laborchemisch nachgewiesene HLA-Assoziation zu B17/57, B13, B27,Cw6 und Cw2. Entsprechend wird eine Einteilung in die Verlaufsform Typ 1 bzw. Typ 2 vorgenommen. Aufgeführt sind Daten von 23 Patienten:

Patient	Geschlecht [M/F]	Beginn [Jahre]	Familien- anamnese [+/-]	HLA- Assoziation	Typ [1/2]
Pat. 1	F	15	+	B17/57, Cw6	1
Pat. 2	F	6	+	0	1
Pat. 3	M	57	-	0	2
Pat. 4	M	57	-	B27, Cw2	2
Pat. 5	M	17	+	0	1
Pat. 6	M	16	+	Cw6	1
Pat. 7	M	30	+	0	1
Pat. 8	M	18	-	0	1
Pat. 9	F	8	-	B17/57, Cw6	1
Pat. 10	F	34	-	0	1
Pat. 11	M	28	+	0	1
Pat. 12	W	26	+	0	1
Pat. 13	W	20	+	B17/57, Cw6	1
Pat. 14	M	48	+	0	2
Pat. 15	F	14	+	Cw6	1
Pat. 16	M	29	-	B17/57, Cw6	1
Pat. 17	M	41	-	B27, Cw6	2
Pat. 18	M	11	-	0	1
Pat. 19	M	45	-	Cw6	2
Pat. 20	M	16	-	B13	1
Pat. 21	F	39	+	0	1
Pat. 22	F	9	+	B13, Cw6	1
Pat. 23	M	22	+	0	1

Tab.7: Charakterisierung des Kollektivs der Patienten mit Psoriasis (M = Mann, F = Frau, Pat. = Patient)

Nach den genannten Charakteristika zur Einteilung der Patienten mit Psoriasis in Typ 1- bzw. Typ 2-Verlaufsformen zählen 78,26% der untersuchten Personen zum Typ 1 und 21,74 % zum Typ 2. Das entspricht in etwa der in der Literatur vorbeschriebenen Verteilung von 75% mit der Verlaufsform vom Typ 1 und 25% mit der Verlaufsform vom Typ 2 (22). Überhaupt HLA-assoziiert sind in der Gruppe Typ 1 zehn von 17 Fällen, insgesamt 58,82%, in der Gruppe Typ 2 drei von sechs Fällen, also 50 %. Somit liegt eine stärkere HLA-Assoziation in der Gruppe 1 vor. Innerhalb der Gruppe 1 kommt Cw6 neunmal und damit am häufigsten vor. B17/57 kommt viermal, B13 zweimal vor. Hier sind auch Kombinationen z. B. Cw6 und B17/57 möglich. 52,94 % der Fälle von Typ 1 Psoriasis sind demnach Cw6-assoziiert.

In der Gruppe Typ 2 kommt zweimal die Assoziation zu B27, einmal die Assoziation zu Cw2 und einmal die Assoziation zu Cw6 vor. 33% des Kollektivs Typ 2 sind also Cw2 assoziiert.

3.1.2 Vergleich der Psoriasis-Verlaufsformen vom Typ 1 bzw. Typ 2 bezüglich psoriasispezifischer Parameter und dem Vorkommen kardiovaskulärer Risikofaktoren

Danach wurde dieselbe Psoriasis-Patientengruppe in Bezug auf kardiovaskuläre Risikofaktoren untersucht sowie bezüglich bestimmter psoriasispezifischer Kategorien. Unter den individuellen Daten sind das Alter zum Untersuchungszeitpunkt, die Geschlechtszugehörigkeit und der Body-Mass-Index BMI [kg/m²] aufgeführt. Kardiovaskuläre Risikofaktoren

umfassen das CRP [mg/dl] als Entzündungsmarker, das Cholesterin als Stellvertreter für den Lipidstatus, die anamnestische Angabe, ob eine gestörte Glukosetoleranz oder ein manifester Diabetes mellitus vorliegen, die anamnestische Angabe über den Nikotingebrauch und Eigen- sowie Familienanamnese bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen , also Erkrankungen bei direkten Angehörigen und eigener Erkrankungen in der Vorgeschichte.

Parameter zur Beschreibung der Psoriasis schließen den PASI-Score als Marker für den aktuellen Aktivitätsgrad der Psoriasis, die laborchemisch nachgewiesene HLA-Assoziation, das Alter bei der Erstmanifestation der Erkrankung sowie die Familienanamnese bezüglich der Psoriasis ein. Einige Parameter sind für beide Fragen, sowohl für die Erfassung des kardiovaskulären Risikos als auch der Psoriasis, interessant: z. B. BMI, CRP. Die Daten für Patienten mit Psoriasis vom Typ 1 bzw. vom Typ 2 sind als Mittelwert plus/minus ihrer Standardabweichung [$\bar{x} \pm SD$] und als Median mit ihrer 25%- und 75%-Perzentile [$\bar{x}$ (25%/75%)] angegeben.

Variable	Typ1 (n=17)	Typ2 (n=6)	p-Wert
Individuelle Parameter:			
Alter [Jahre]	42,65 ± 12,82 41 (32,50/49,0)	58,67 ± 10,37 62,50 (46,0/67,5)	0,0157
Geschlecht [F/M, %]	0,47 ± 0,51 47,07F/52,93 M	0,17 ± 0,41 20,0F/80,0 M	0,3401
BMI [kg/m²]	27,34 ± 4,29 26,4 (23,35/31,05)	33,68 ± 10,17 28,65 (26,0/46,4)	0,2205
Parameter zur Beschreibung des kardiovaskulären Risikos:			
CRP [mg/dl]	0,62 ± 0,06 0,3 (0,3/0,7)	1,54 ± 1,47 0,7 (0,4/3,1)	0,1147
Cholesterin [mg/dl]	198,7 ± 43,50 189,5 (180,5/223,5)	217,8 ± 37,05 223,5(178,5/252,5)	0,3858
Diabetes mellitus [%]	0 0	0,83 ± 0,41 83,33	0,0593
Nikotingebrauch [%]	0,53 ± 0,51 52,94	0,67 ± 0,52 66,70	0,66
Pos. Eigenanamnese bzgl. kardiovaskulärer Erkrankungen [%]	0,29 ± 0,47 29,42	0,67 ± 0,52 66,70	0,1616
Pos. Familienanamnese bzgl. kardiovaskulärer Erkrankungen [%]	0,59 ± 0,51 58,82	0,83 ± 0,41 83,33	0,3690
Parameter zur Beschreibung der Psoriasis:			
Pos. Familienanamnese für Psoriasis [%]	0,65 ± 0,49 64,71	0,33 ± 0,52 33,33	0,3413
Beginn der Erkrankung [Jahre]	18,88 ± 3,563 17,0 (12,5/27)	47,83 ± 7,76 46,50 (40,0/57,0)	0,0004
PASI-Score	16,83 ± 9,28 13,6 (10,05/22,05)	18,25 ± 8,84 15,20 (11,0/32,8)	0,4412
HLA-Assoziation [%]	0,59 ± 0,51 58,8	0,50 ± 0,55 50,0	1,0

Tab. 8: Vergleich der Psoriasis-Verlaufsformen vom Typ 1 bzw. Typ bezüglich psoriasisspezifischer Parameter und dem Vorkommen kardiovaskulärer Risikofaktoren (x= Mittelwert, SD = Standardabweichung, pos. = positiv)

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergeben sich erwartungsgemäß in den Kategorien “ Alter bei der Erstmanifestation“ und – daraus resultierend- beim “ Alter zum Untersuchungszeitpunkt“. Da Typ1-Psoriatischer definitionsgemäß jünger bei der Erstmanifestation sind, weisen sie zum Untersuchungszeitpunkt, zu dem Zeitpunkt also, an dem sie sich wegen ihrer Erkrankung in stationäre Behandlung begeben, ein jüngeres Lebensalter auf.

Alle weiteren Parameter sind nicht statistisch signifikant unterschiedlich, allerdings lassen sich Trends ablesen: So erweist sich die Typ 1-Verlaufsform der Psoriasis als häufiger familiär vorkommend. Die Familiarität wurde hier durch zwei Parameter, „Familienanamnese bezüglich Psoriasis“ und „HLA-Assoziation“, belegt.

Patienten mit der Typ 2-Verlaufsform weisen tendenziell eine deutlich höhere Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf: Die Werte für den Body-Mass-Index, für das Cholesterin im Serum und das Lebensalter an sich fallen höher aus. Patienten aus dieser Gruppe sind häufiger Raucher, häufiger kardiovaskulär vorerkrankt und mit einer positiven Familienanamnese diesbezüglich belastet. Inwiefern dieser Effekt mit der Psoriasis zusammenhängt oder einem altersentsprechenden Zuwachs an Risikofaktoren zuzuschreiben ist, bleibt zu diskutieren.

CRP und PASI-Score zeigen in den Gruppen Typ 1 und Typ 2 keine signifikanten Unterschiede. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Patienten beider Gruppen trotz unterschiedlicher zeitlicher Verläufe, genetischer Verankerung und der Ausprägung der Parameter für

kardiovaskuläre Riskofaktoren bei der Ausprägung der Entzündungsreaktion und der Manifestation an der Haut von einem ähnlichen Ausmaß der Erkrankung betroffen sind.

3.1.3 Vergleich zwischen Patienten mit Psoriasis *versus* Patienten mit Atopischer Dermatitis bezüglich kardiovaskulärer Risikofaktoren

Im nächsten Schritt wurde das gesamte Kollektiv der Psoriasis-Patienten mit dem Kollektiv der Patienten mit Atopischer Dermatitis im Hinblick auf Unterschiede im kardiovaskulären Risikoprofil verglichen.

Die aufgelisteten Parameter sind wieder das Alter zum Untersuchungszeitpunkt, die Geschlechtszugehörigkeit, der Body-Mass-Index, das CRP im Serum, das Cholesterin im Serum, die anamnestischen Angaben über eine gestörte Glukosetoleranz oder einen manifesten Diabetes mellitus sowie über den Nikotingebrauch, weiterhin Familien- und Eigenanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Daten sind als Mittelwert plus/minus ihrer Standardabweichung und als Median mit ihrer 25%- und 75%-Perzentile angegeben.

Variable	Psoriasis (n=23) x ± SD Median	Atopische Dermatitis (n=6) x ± SD Median	p-Wert
Alter (Jahre)	46,83 ± 13,99 43,0 (35,0/60,0)	46,8 ± 20,43 36,0,0 (30,0/69,0)	0,9045
Geschlecht (F/M,%)	0,39 ± 0,5 39,13	0,60 ± 0,55 60,0	0,3333
BMI (kg/m²)	29,0 ± 6,71 27,2 (24,8/31,7)	22,94 ± 4,22 21,4 (19,95/26,7)	0,0227
CRP i. S. (mg/dl)	0,86 ± 0,99 0,3 (0,3/0,8)	1,46 ± 1,02 1,7 (0,4/2,4)	0,2628
Cholesterin i. S. (mg/dl)	201,7 ± 41,6 193,0 (180,5/230,5)	210 ± 36,88 202,0 (183,5/240,5)	0,4343
Diabetes mellitus (%)	0,087 ± 0,29 8,69	0 0	1,00
Nikotin (%)	0,57 ± 0,51 56,52	0,2 ± 0,45 20,0	0,3333
Eigenanamnese positiv für kardiovaskuläre Erkrankungen (%)	0,39 ± 0,5 39,13	0,2 ± 0,45 20,0	1,00
Familienanamnese positiv für kardiovaskuläre Erkrankungen (CVR) (%)	0,65 ± 0,49 65,22	0,2 ± 0,45 20,0	0,133

Tab. 9 Vergleich zwischen Patienten mit Psoriasis und Patienten mit Atopischer Dermatitis bezüglich kardiovaskulärer Risikofaktoren

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Psoriasis und Patienten mit Atopischer Dermatitis in der Kategorie „Körpergewicht“. So weisen Psoriatiker einen deutlich höheren Body-Mass-Index auf. Patienten mit Psoriasis sind

demnach übergewichtig bis knapp an der Grenze zur Adipositas I nach WHO, während Patienten mit Atopischer Dermatitis idealgewichtig sind. Alle anderen Parameter sind nicht signifikant unterschiedlich, allerdings zeichnen sich deutliche Trends dergestalt ab, dass Patienten mit Psoriasis eine größere Belastung an kardiovaskulären Risikofaktoren zeigen: In der Gruppe der Psoriatiker findet sich ein höheres Alter, ein größerer Anteil Männer, eine häufigeres Vorkommen von Diabetes mellitus, mehr Raucher, kardiovaskulär häufiger vorerkrankte Menschen sowie eine größere Belastung durch eine positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Ereignisse. Eine einzige Ausnahme bildet das Cholesterin im Serum, das in der Atopikergruppe mit durchschnittlich $210 \pm 36,88$ mg/dl mehr und deutlich über den Idealwert hinaus erhöht ist als in der Psoriatikergruppe. Zusammenfassend kann hier festgehalten werden:

Die Typ 1-Verlaufsform manifestiert sich früher im Leben der Patienten, vor dem 40. Lebensjahr, und hat eine stärkere familiäre Komponente als die Typ 2-Verlaufsform.

Bei Patienten mit der Verlaufsform vom Typ 2 zeichnet sich ein Trend zu einer höheren Belastung an kardiovaskulären Risikofaktoren ab.

Die Ausprägung von Entzündungsreaktion und Hautmanifestation scheint unabhängig von der Zugehörigkeit zur Typ 1- oder Typ 2-Gruppe.

Im Vergleich zu Patienten mit Atopischer Dermatitis weisen Patienten mit Psoriasis ein signifikant höheres Körpergewicht auf. Weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren kommen als Trend in der Gruppe der Patienten mit Psoriasis häufiger vor.

3.2 Expressionsmuster von Arginase 1 an psoriatischer Haut

Die Arginase 1 spielt in der Psoriasis als konkurrierendes Enzym für die durch Th1-Entzündungsstimuli hochregulierte iNOS um das Substrat L-Arginin eine wichtige Rolle. Sie ist dafür verantwortlich, dass es trotz der Überexpression der iNOS zu einem lokalen NO-Mangel kommt, der auf Keratinozyten als Proliferationsstimulus wirkt. Die gesteigerte Proliferation unreifer Keratinozyten entspricht auf makroskopischer Ebene dem psoriatischen Plaque.

Die Bestrahlung mit UVB311nm wird seit Jahren erfolgreich bei Psoriasis-Patienten angewendet. Möglicher Mechanismus ihres Erfolges ist die nicht-enzymatische Freisetzung von NO, die das lokale Defizit auszugleichen vermag.

Hier werden immunhistochemische Beispiele von insgesamt drei Patientenproben für das Expressionsmuster der Enzyme Arginase1 in unbehandelter psoriatischer Haut und im Verlauf einer Fototherapie mit UVB311-Strahlen dargestellt. Die Zeitpunkte der Probenentnahme unter der Fototherapie sind drei Stunden nach der ersten Applikation und nach drei Wochen unter laufender Fototherapie.

Die entsprechenden Positivkontrollen für Arginase 1 lagen der Arbeitsgruppe bereits vor.

Weitere Patientenbeispiele befinden sich im Anhang.

3.2.1 Voruntersuchungen an gesunder Haut: Arginase 1-Expression in gesunder Haut

Zuerst wurde die Arginase 1-Expression an gesunder Haut untersucht.

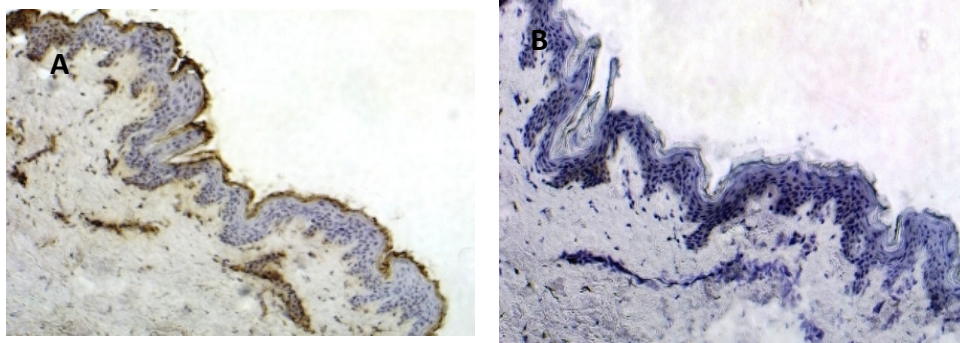


Abb. 6 A+B: Charakterisierung des Arginase 1-Expressionsmuters an gesunder Haut (A) und Negativkontrolle (B), Durchlicht-Mikroskopie, 200-fach vergrößert Die gesunde Haut verfügt über eine dünne Epidermis. Die Hornschicht färbt sich unspezifisch an. Die Arginase 1 ist im Endothel der Subkutis nachweisbar.

Am Bild der gesunden Haut zeigt sich eine dünne Epidermis mit einer abgrenzbaren Basalschicht und einer dünnen Hornschicht. Die Reteleisten sind zierlich und schlank. Die Hornschicht färbt sich unspezifisch an. In der Epidermis wird die Arginase nicht exprimiert. In der Dermis und Subkutis sieht man jedoch braun gefärbte Areale, die im Endothel liegender Arginase 1 entsprechen.

3.2.2 Arginase 1-Expression an psoriatischer Haut: Vergleich zwischen läsionalen und nicht läsionalen Abschnitten an Schnittbildern von Patient 1

Hier wird die Expression der Arginase 1 an unbehandelter, läsionaler Haut gezeigt:

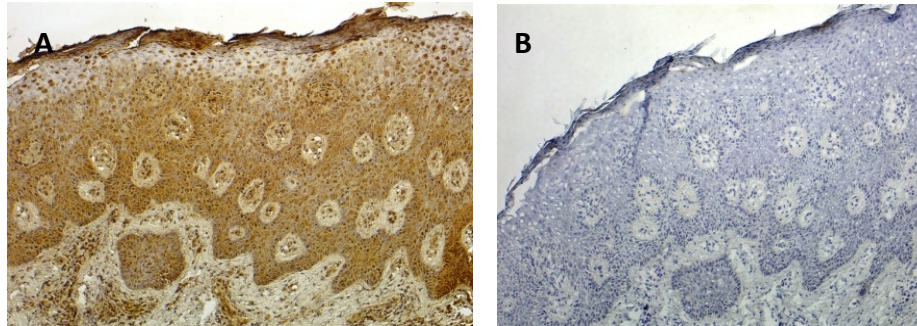


Abb. 7 A+B: Charakterisierung des Arginase1-Expressionsmusters an unbehandelter, läsionaler Haut (A) und Negativkontrolle für den Arginase 1-Antikörper, Durchlicht-Mikroskopie, 200-fach vergrößert Die Expression ist in den basalen Abschnitten am höchsten, dünnt sich nach distal hin aus und verflüchtigt sich bis zur Hornschicht ganz.

Im histologischen Bild zeigen sich die wesentlichen morphologischen Merkmale der Psoriasis: Die Epidermis weist im Vergleich zu gesunder Haut eine massive Verbreiterung der Epidermis (Akanthose) auf, die zu einer Fältelung der Haut führt, was hier im histologischen Bild als eine Aufwerfung der Papillen (Papillomatose) zu sehen ist. Die Reteleiste im dermalen Kompartiment wirken plump, verlängert und aufgetrieben. Die ausgespart wirkenden runden Areale entsprechen angeschnittenen, benachbart liegenden Rete-Zapfen. Die Hornschicht erscheint verbreitert (Hyperkeratose).

In unbehandelter, läsionaler Haut ist die Expression der Arginase 1 am deutlichsten ausgeprägt. Die Konzentration ist in den basalen Abschnitten

am höchsten, dünnt sich nach distal hin aus und verflüchtigt sich bis zur Hornschicht ganz.

Zum Vergleich wird die Arginase 1- Expression an unbehandelter Haut gezeigt:

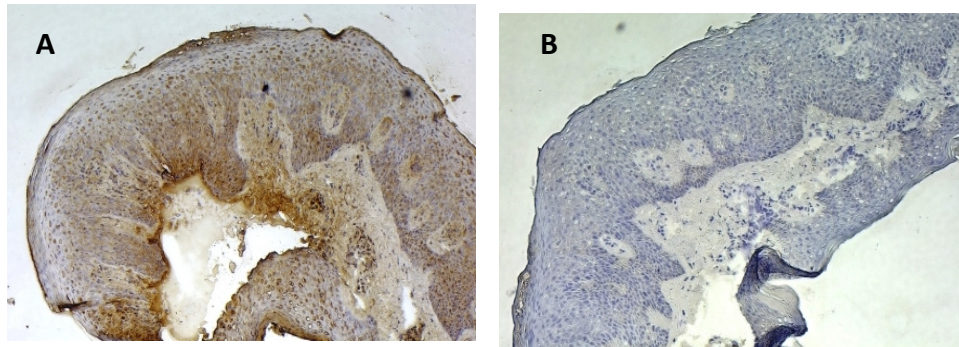


Abb. 8 A+B: Charakterisierung des Arginase 1-Expressionsmusters an unbehandelter, nicht lässionaler Haut (A) und Negativkontrolle für den Arginase 1-Antikörper (B), Durchlicht-Mikroskopie, 200-fach vergrößert
Makroskopisch unauffällige, unbefallene Haut eines Psoriasis-Patienten weist in geringerer Ausprägung die Merkmale eines Psoriasis-Plaques auf. Die Arginase 1-Expression ist deutlich stärker als in gesunder Haut.

Makroskopisch unauffällige, nicht lässionale Haut von Psoriasis-Patienten zeigt eine milde Ausprägung der psoriasispezifischen Merkmale. Die Epidermis ist mässig verbreitert, die Haut faltet sich etwas, die Reteleisten erscheinen etwas verplumpt. Die Hornschicht ist kaum verbreitert. In nicht lässionaler Haut von Psoriasis-Patienten ist die Expression der Arginase 1 schwächer ausgeprägt.

3.2.3 Arginase 1-Expression an psoriatisch veränderter Haut in unbehandeltem Zustand und drei Stunden nach der ersten UVB311 nm Fototherapie an Schnittbildern von Patient 21

Hier wird die Arginase-Expression im Verlauf einer UVB311nm-Therapie untersucht. Es werden histologische Schnittbilder in unbehandeltem Zustand und drei Stunden nach Beginn einer UVB311nm-Therapie verglichen.

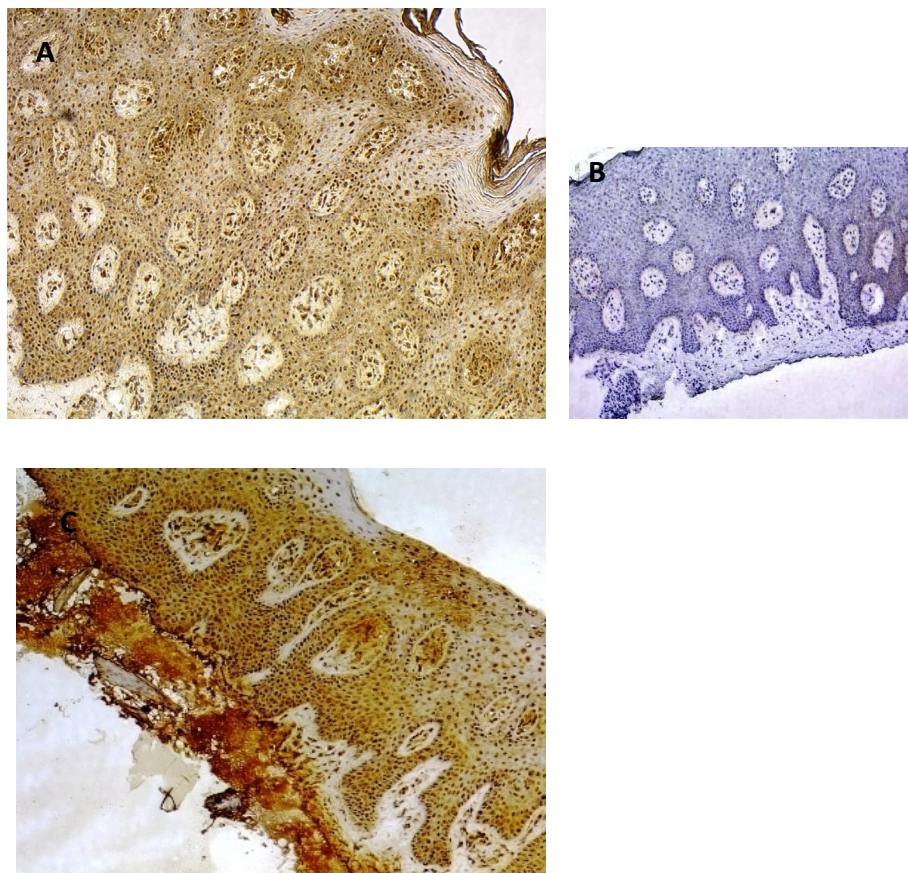


Abb. 9 A-C: Charakterisierung des Arginase 1-Expressionsmusters an unbehandelter, läsionaler Haut (A), Negativkontrolle (B) sowie 3 Stunden nach UVB311nm-Lichttherapie (C), Durchlichtmikroskopie, 250-fach vergrößert, Negativkontrolle 150-fach vergrößert

Die Arginase1-Expression ist im unbehandelten Zustand und 3 Stunden nach UV-Therapie unverändert.

Die histologischen Schnittbilder dieses Patientenbeispiels weisen in unbehandeltem Zustand und drei Stunden nach Beginn der ersten UVB311nm-Bestrahlung dieselben morphologischen Psoriasis-Merkmale auf, die oben beschrieben wurden. Die Arginase 1-Expression ist unverändert.

3.2.4 Arginase1-Expression an psoriatischer Haut vor Beginn einer Fototherapie mit UVB311nm-Strahlen, drei Stunden nach der ersten Applikation und nach drei Wochen Fototherapie am Beispiel von Patient 11

An diesem Beispiel lassen sich die Veränderungen psoriatischer Haut im Verlauf einer dreiwöchigen Fototherapie mit UVB311 nm-Licht verfolgen: Zu Beginn und nach Applikation der ersten Bestrahlung sind wie im vorherigen Beispiel 3.2.3 keine Veränderungen im Vergleich zum unbehandelten Ausgangszustand zu sehen. Nach dreiwöchiger Fototherapie ist jedoch deutlich zu bemerken, wie sich die Histoarchitektur des Plaques verändert. Insgesamt ist die Epidermis dünner und kaum noch aufgefältelt im Vergleich zum unbehandelten Zustand. Die Reteleisten wirken noch verplumpt, aber nicht mehr aufgetrieben und verlängert. Unverändert dick ist die Hornschicht geblieben. Die Arginase1-Expression ist stark zurückgegangen und hat sich nahezu der Expression in gesunder Haut angeglichen.

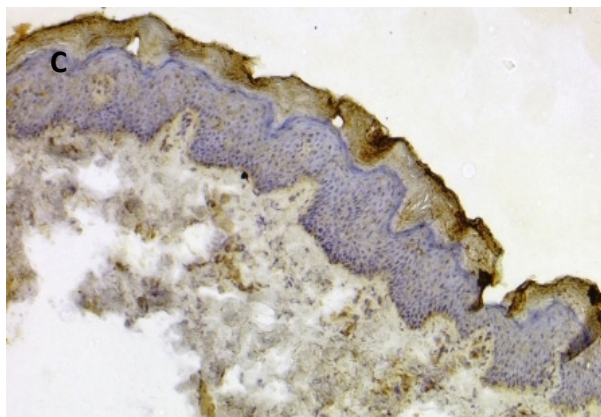
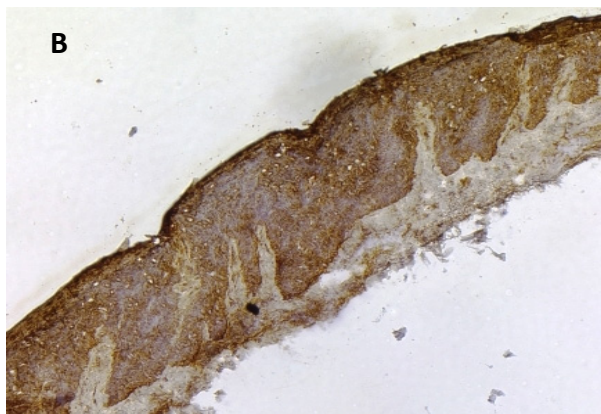
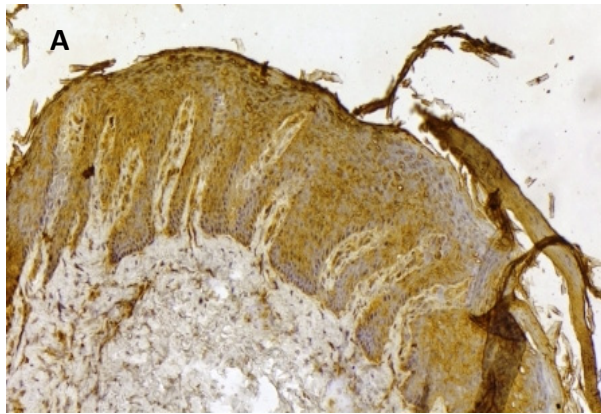


Abb. 10 A-C: Charakterisierung des Arginase1-Expressionsmusters an einem Psoriasis-Plaque im Verlauf einer Lichttherapie (A) in unbehandeltem Zustand, (B) drei Stunden nach der Applikation der ersten UV-Dosis, (C) nach dreiwöchiger Lichttherapie am Beispiel von Patient 11, Durchlicht-Mikroskopie 250-fache Vergrößerung Deutlich zu erkennen ist die unter UVB311nm-Therapie zurückgehende Arginase 1-Expression und die Normalisierung der Histoarchitektur der Haut.

An nicht läsionaler, makroskopisch unauffälliger Haut wurden ebenfalls Effekte der Lichttherapie untersucht. Die unten stehenden Abbildungen zeigen nicht läsionale Hautabschnitte in unbehandeltem Zustand und nicht läsionale Hautabschnitte drei Stunden nach der ersten UVB311nm-Applikation: An nicht läsionaler Haut zeigt sich kaum Arginase 1-Expression. Die Histoarchitektur entspricht nicht normaler Haut, die psoriasis-typischen Merkmale sind nur schwach ausgeprägt. Ein Unterschied in der Arginase1-Expression zwischen unbehandeltem Zustand und drei Stunden nach Applikation der ersten UVB311nm-Dosis zeigt sich nicht.

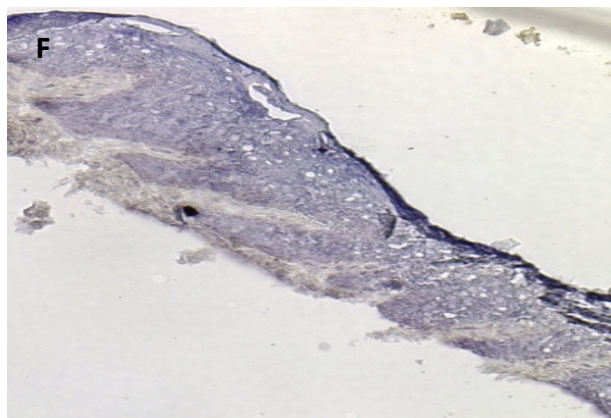
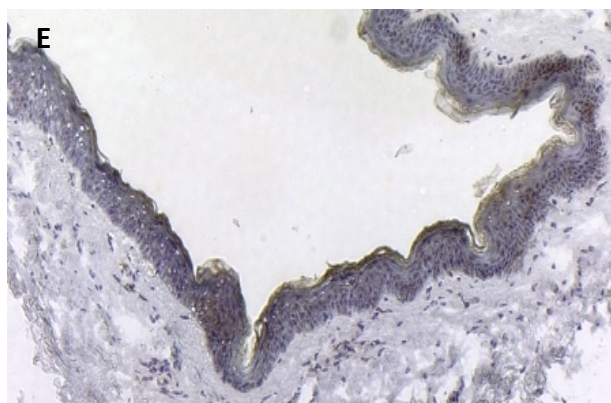
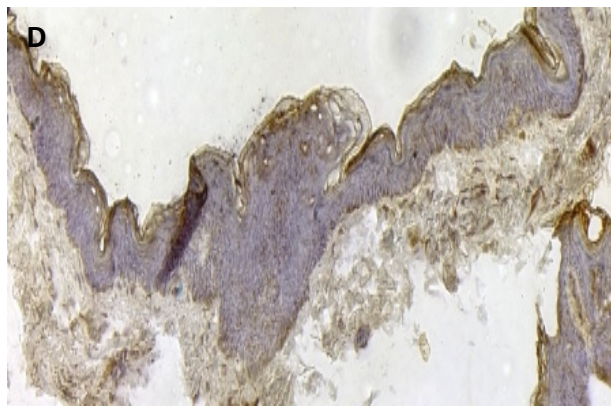


Abb. 10 D-F: Charakterisierung des Arginase 1-Expressionsmusters an nicht läSIONaler Haut unter einer Lichttherapie (D) in unbehandeltem Zustand, (E) drei Stunden nach der Applikation der ersten UV-Dosis am Beispiel von Patient 11, (F) Negativ-Kontrolle für den Arginase1-Antikörper an einem unbehandelten Psoriasis-Plaque, Durchlicht-Mikroskopie 250-fache Vergrößerung

3.3 Expressionsmuster der nNOS an psoriatischer Haut

3.3.1 Spezifitätskontrolle für den nNOS-Antikörper

Von der nNOS ist bekannt, dass sie bei der Wundheilung hochreguliert ist und im Gehirn eine wichtige Rolle spielt (49). Als Proliferationsmarker ist sie in jeder Phase des Zellzyklus exprimiert. Über die Expression der nNOS in psoriatischer Haut ist bislang nichts bekannt.

Die Spezifitätskontrolle für nNOS ist an Nervengewebe aus menschlichem Kortex durchgeführt sowie an schnell proliferierenden Zellen einer Tumorzelllinie (HaKat).

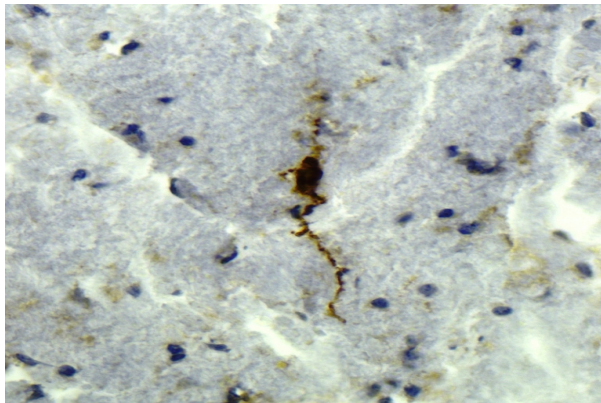


Abb. 11: Schnittbild der Spezifitätskontrolle für nNOS an einer Nervenzelle aus humanem, neuronalem Kortexgewebe, 250-fach vergrößert

Die nNOS ist in neuronalem Gewebe des Gehirns nachweisbar.

Die nNOS ist sehr gut in neuronalem Gewebe nachweisbar. An einer schnell proliferierenden Tumorzelllinie ist die nNOS in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus darstellbar.

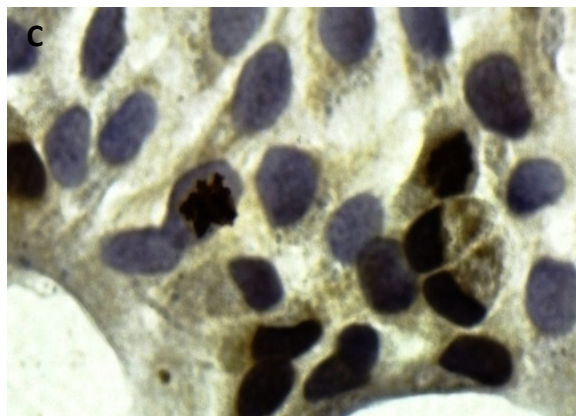
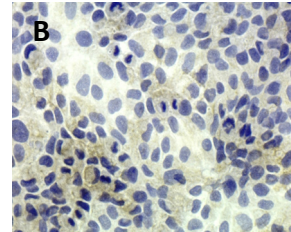
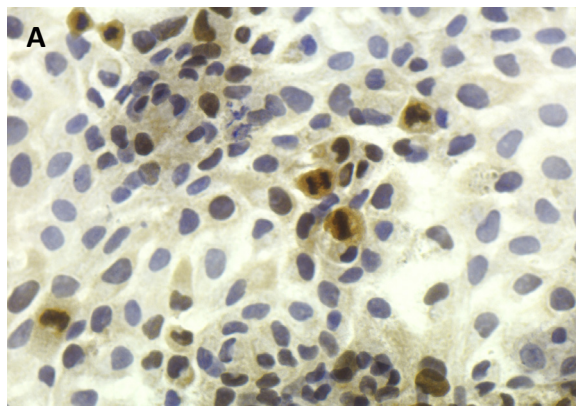


Abb. 12 A-C: Spezifitätskontrolle für nNOS an einer schnell-proliferierenden Tumorzelllinie (HaKat) (A), 250-fach vergrößert, und Negativ-Kontrolle für den Antikörper (B), 150-fach vergrößert, (C) Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, 450-fach vergrößert

Als Proliferationsmarker ist sie in jeder Phase des Zellzyklus exprimiert, hier gut sichtbar in Ana- und Telophase.

3.3.2 Expressionsmuster der nNOS an gesunder Haut

Hier wird das nNOS Expressionsmuster an gesunder Haut gezeigt:

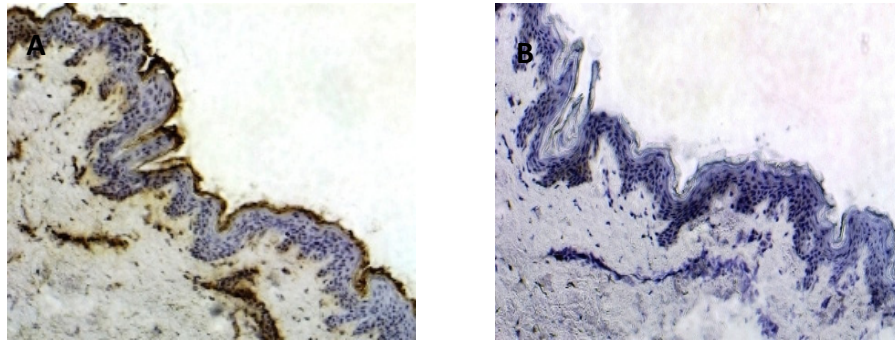


Abb. 13: A+B: Charakterisierung des nNOS-Expressionsmusters an gesunder Haut (A) und Negativkontrolle für den Antikörper (B), Durchlicht-Mikroskopie, 200-fach vergrößert

Die nNOS wird ganz vereinzelt in Zellen der Basalschicht exprimiert. Sie ist außerdem im Endothel der Gefäße in der Subkutis nachweisbar.

Histologisch stellt sich die gesunde Haut mit einer dünnen Epidermis mit einer abgrenzbaren Basalschicht und einer dünnen Hornschicht dar. Die Reteleisten sind zierlich und schlank.

Die nNOS wird ganz vereinzelt in Zellen der Basalschicht exprimiert.

Außerdem färbt sich das Endothel der Gefäße in der Subkutis an. Die Hornschicht färbt sich unspezifisch an.

3.3.3 nNOS-Expression an psoriatisch veränderter Haut: Vergleich zwischen läsionalen und nicht läsionalen Abschnitten an Schnittbildern von Patient 6

Hier wird die nNOS-Expression an läsionalen Hautabschnitten, den sog. Plaques, eines Psoriasis-Patienten und makroskopisch unauffälliger Haut desselben Patienten im Vergleich gezeigt.

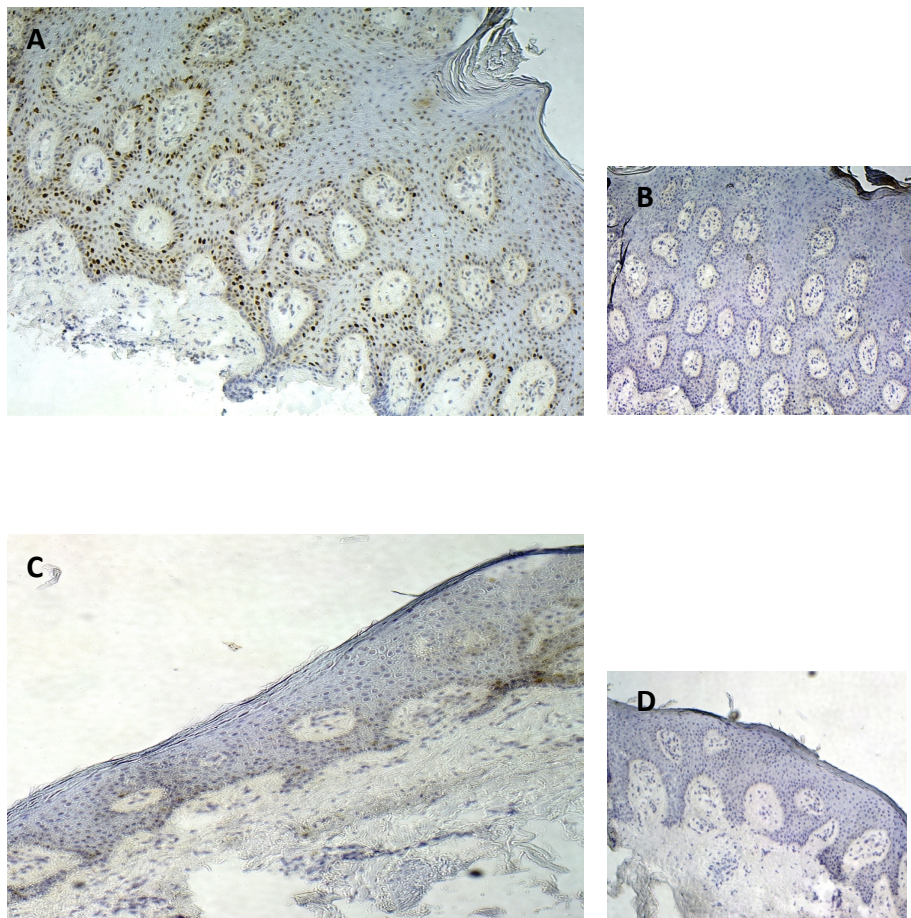


Abb. 14 A-D: Charakterisierung des nNOS-Expressionsusters (A) an einem Plaque des Psoriasis-Patienten 6 mit (B) entsprechender Negativkontrolle für den Antikörper und an nicht-läsionaler Hautabschnitten desselben Patienten, Durchlicht-Mikroskopie, Schnittbilder 250-fach vergrößert, deren Negativkontrollen 150-fach vergrößert.

In diesem Beispiel der Epidermis eines Psoriasis-Patienten zeigen sich wieder die typischen histologischen Merkmale eines psoriatischen Plaques: die massive Verbreiterung der Epidermis (Akanthose), die Aufwerfung der Papillen (Papillomatose), die verdickte Hornschicht (Hyperkeratose) und die plumpen, aufgetriebenen Reteleisten. Die nicht läsionäre Epidermis weist ebenfalls eine Akanthose und eine Verplumpung und Verlängerung der Reteleisten auf, allerdings in vergleichsweise geringem Ausmaß. Die Hornschicht ist dünn.

Bezüglich der Expression der nNOS zeichnet sich eine deutliche Mehranfärbung in den Basalschichten der läsionalen Haut ab, zum einen sichtbar an der Grenze zwischen Epidermis und Dermis und um die Aussparungen benachbarter Reteleisten herum. Teilweise weitet sich das proliferative Kompartiment nach suprabasal aus. In der äußerlich nicht sichtbar befallenen, nicht läsionalen Haut dieses Psoriasis-Patienten ist kaum nNOS-Expression nachweisbar.

3.3.4 nNOS-Expression an psoriatisch veränderter Haut in unbehandelten

Zustand und nach drei Wochen Fototherapie mit UVB311nm-

Strahlen am Beispiel von Patient 6

Hier lassen sich die Veränderungen der nNOS-Expression im Verlauf einer UVB311nm-Lichttherapie beobachten. Es werden histologische Schnittbilder von Plaques im unbehandelten Zustand und drei Wochen nach einer Lichttherapie verglichen.

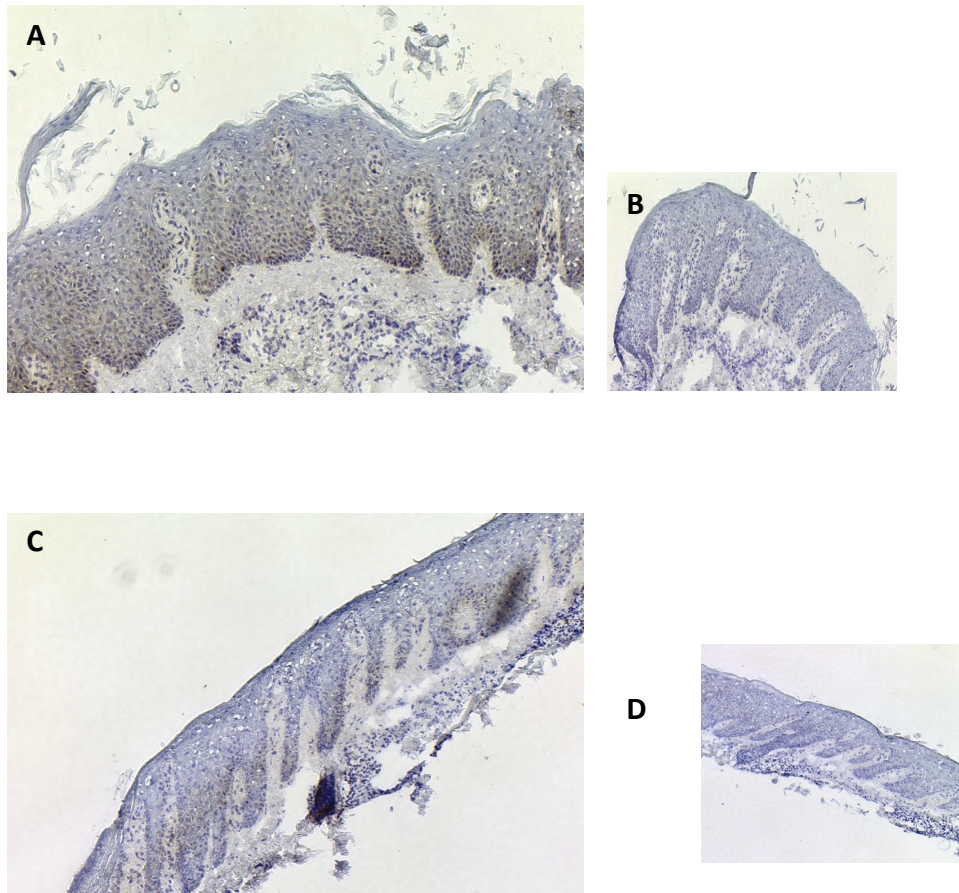


Abb. 15 A-D: Charakterisierung des nNOS-Expressionssmusters (A) am histologischen Schnittbild eines Plaques in unbehandeltem Zustand mit (B) Negativkontrolle für den Antikörper und (C) an einem Plaque nach dreiwöchiger UVB311nm-Therapie mit Negativkontrolle, Durchlichtmikroskopie, Schnittbilder 250-fach vergrößert, deren Negativkontrollen 150-fach vergrößert

Im Verlauf der Lichttherapie verringert sich die nNOS-Expression als Ausdruck einer zurückgehenden Proliferation in der Epidermis.

Hier werden die histologischen Veränderungen und die Änderung der nNOS-Expression im Verlauf einer dreiwöchigen UVB311nm-Fototherapie gezeigt. An der unbehandelten psoriatischen Epidermis zeigen sich die histologischen Merkmale eines Psoriasis-Plaques: Akanthose,

Hyperkeratose, aufgetriebene, verlängerte Reteleisten. Die nNOS-Expression ist besonders in der proliferativ aktiven Basalschicht nachweisbar und weitet sich etwas nach suprabasal aus.

Nach dreiwöchiger Fototherapie ist die Epidermis dünner, die Reteleisten sind schlank, das peripapilläre Ödem hat sich zurückgebildet. Die nNOS-Expression ist kaum noch detektierbar als Ausdruck einer zurückgehenden Proliferationsaktivität in der Epidermis.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der Enzym-Expression der nNOS und der Arginase festhalten:

Die nNOS-Expression ist dort darstellbar, wo Zellen proliferieren: in gesunder Haut in sehr geringer Ausprägung in der Basalzellschicht, in Haut aus unbehandelten Plaques dagegen in der Basalschicht und darüber hinaus. Im Verlauf einer UV-Therapie ist auch die nNOS-expression vermindert nachweisbar als Ausdruck zurückgehender proliferativer Aktivität.

Die Arginase1 ist in psoriatischen Plaques in allen Zellschichten der Epidermis stark exprimiert und nach einer dreiwöchigen Fototherapie mit UVB311-Bestrahlung kaum bis gar nicht mehr nachweisbar.

Die Arginase 1 wird mit der iNOS und der nNOS koexprimiert.

3.4 Relative nNOS-Expression in drei Patientenproben im Vergleich

läsionaler und nicht läsionaler Hautabschnitte

Nach dem qualitativen Nachweis von Arginase 1 und nNOS in den Patientenproben soll nun die Expression der Enzyme anhand von Proben aus derselben Patientengruppe quantifiziert werden.

3.4.1 RT-PCR

Die Patientenproben wurden freundlicherweise entsprechend im Labor. O. Schnorr bearbeitet und mir in der oben genannten Form zur Verfügung gestellt.

3.4.2 Real-Time-PCR

Anschließend wurde eine Real-Time-PCR durchgeführt.

Dargestellt wird die relative nNOS-Expression in drei Pärchen von Patientenproben aus jeweils einem läsionalen und nicht läsionalen Hautabschnitt.

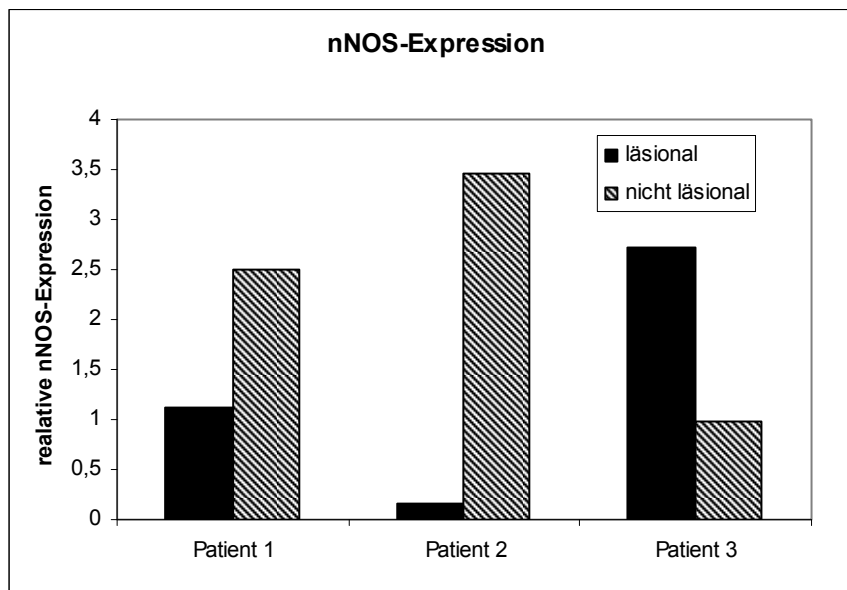


Abb. 16: Relative nNOS-Expression in drei Patientenproben im Vergleich läsionaler und nicht läsionaler Hautabschnitte

In zwei von drei Patientenproben ist die nNOS-Expression in nicht-läsionalen Abschnitten höher als Proben aus läsionalen Plaques.

Nach dieser Darstellung ist die nNOS-Proliferation in zwei von drei Patientenproben in nicht läsionalen Hautabschnitten höher als in Proben aus läsionalen Plaques.

4. Diskussion

Stickstoffmonoxid (NO) ist als eines der kleinsten und am einfachsten strukturierten Moleküle, die in der Natur vorkommen, mit komplexen chemischen Eigenschaften ausgestattet, die ihm die Fähigkeit verleihen als Botenstoff durch Diffusion Signale zwischen Zellen zu vermitteln und durch weitere Mechanismen an vielfältigen biologischen Prozessen teilzunehmen: Im Kreislaufsystem z. B. fungiert NO als Botenstoff, der durch die Aufrechterhaltung des basalen Gefäßtonus und die Hemmung der Thrombozytenaggregation (1, 4, 6, 33, 51, 52) sowie durch eine Mitbeteiligung an der neuronalen Steuerung (35) maßgeblich an der Kontrolle des Blutdruckes beteiligt ist. Im zentralen Nervensystem trägt NO ebenfalls in seiner Funktion als Botenstoff zur Plastizität von Nervenzellverbindungen und damit zur Gedächtnisbildung (1) bei. Außerdem vermittelt es vegetative Funktionen wie z. B. die Bronchodilatation (1, 4, 5, 52). Weiterhin übernimmt es im angeborenen Abwehrsystem eine Schlüsselrolle, indem es durch unspezifische zytotoxische Aktivität von Makrophagen Krankheitserreger und Tumorzellen zerstört. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Entzündungsreaktion, vermittelt vielseitige immunmodulatorische Stimuli (1, 5) u. v. m.

Die chemische Reaktion wird über eine kovalente Bindung mit dem Zielsubstrat umgesetzt, wobei die Stärke der Bindung durch das Redoxpotential von Ligand und Substrat bestimmt wird (1, 52). Ort und

molekularer Wirkungsmechanismus sowie die biologischen Konsequenzen hängen dabei entscheidend von der Kinetik und Menge der NO-Freisetzung ab.

NO wird von einer Enzymfamilie produziert, den NO-Synthasen (NOS), die aus zwei konstitutiv exprimierten Enzymen mit regulatorischen Aufgaben besteht und einem induzierbaren Enzym, das im Dienst immunregulatorischer Funktionen und Selbstschutzfunktionen wirkt (2, 7-9). Die NO-Synthasen verwenden als Substrat die semiessentielle Aminosäure L-Arginin, um in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und mehreren Kofaktoren die Reaktion zu äquimolaren Mengen an Stickstoffmonoxid und Citrullin zu katalysieren (1-5, 7-9, 27). Die nNOS und die eNOS werden konstitutiv exprimiert (1, 49), d. h. sie sind kontinuierlich präsent und durch erhöhte intrazelluläre Kalziumspiegel zeitlich limitiert aktivierbar. Sie setzen NO pulsatil für kurze Zeiträume im Bereich von Sekunden bis Minuten frei. So medieren sie rasche Ereignisse wie z.B. die Vasorelaxation zur Regulation des kutanen Blutflusses auf Reize wie Wärme, UV-Licht usw. Die iNOS dagegen wird nicht konstitutiv exprimiert, sondern kann durch bestimmte Reize wie proinflammatorische Zytokine, bakterielle Endotoxine und UV-Strahlung in fast allen Zelltypen induziert werden. Anders als bei den konstitutiven Isoformen werden durch die Aktivität der iNOS lokal hohe NO-Konzentrationen - bis zur 1000-fachen Menge (6) - über längere Zeiträume (7,8) freigesetzt.

Eine nitrosative Dysbalance spielt bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine pathogenetische Rolle. In meiner Arbeit habe ich mich auf die lokale

nitrosative Dysbalance in der psoriatischen Haut und die systemische nitrosative Dysbalance im Kreislaufsystem konzentriert.

In der menschlichen Epidermis wird das Wachstum und die Differenzierung epidermaler Keratinozyten biphasisch durch NO moduliert (1, 26, 27):

Während geringe oder intermediäre NO-Konzentrationen eine Steigerung der Proliferationsrate und eine Erniedrigung des Differenzierungsstatus von Keratinozyten bewirken, haben hohe NO-Konzentrationen eine Proliferationshemmung und eine verstärkte Differenzierung zur Folge.

Das typische Erscheinungsbild der Psoriasis ist der Plaque, der sich auf gerötetem Grund über das Hautniveau nicht läsionaler Haut erhebt und von schlecht haftenden Schuppen belegt ist, als Ausdruck des Vorliegens einer Entzündungsreaktion und der Hyperproliferation nicht ausreichend differenzierter Keratinozyten auf dem Boden geringer NO-Konzentrationen in der Epidermis. Trotz ihrer Überexpression sind iNOS und nNOS also nicht in der Lage, ausreichende NO-Mengen für ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten bereitzustellen (iNOS/Psoriasis-Paradox) (9, 18). Ursache dafür ist – wie aus der Literatur bekannt ist und anhand meiner Ergebnisse hier noch einmal bestätigt wird – die zeitgleiche Überexpression der Arginase 1 (10, 11, 50), wodurch mittels Konkurrenz um das Substrat Arginin (1, 28) eine ausreichende NO-Synthese verhindert wird. Es handelt sich hier um eine fehlregulierte Enzymexpression von Arginase 1 und NOS, die normalerweise reziprok gesteuert werden (1, 9): Bei Th1-vermittelten Prozessen wird die NOS-Expression vermehrt induziert und die Arginase-Expression gehemmt.

Umgekehrt verhält es sich in Th2-regulierten Prozessen, bei denen die Arginase-Expression vermehrt induziert und die NOS-Expression gehemmt wird.

Dass die iNOS in der psoriatischen Epidermis überexprimiert wird, ist hinlänglich bekannt (18). In meiner Arbeit wird erstmals gezeigt, dass als Ausdruck der aberranten Immunregulation die nNOS ebenso wie die iNOS in psoriatischer Haut mit der Arginase 1 ko- und überexprimiert wird. Im immunhistochemischen Teil wird veranschaulicht, dass die nNOS in psoriatischer Haut im Vergleich zu gesunder und nicht läsionaler Epidermis vermehrt exprimiert wird: In gesunder Haut ist sie ausschließlich in der Basalzellschicht nachweisbar. In psoriatischer Haut wird die nNOS in der Basalzellschicht vermehrt und deutlich über die Basalzellschicht hinaus exprimiert, da Keratinozyten in psoriatischer Haut das proliferative Kompartiment über die Basalzellschicht hinaus erweitern. Somit kann die nNOS als ein Proliferationsmarker gelten. Interessant ist, dass die nNOS sowohl in läsionalen als auch zum Teil in nicht läsionalen Abschnitten der Hautproben vermehrt im Vergleich zu gesunder Haut exprimiert wird. D. h. nicht läsionale, äußerlich unauffällige Haut von Psoriasispatienten ist nicht mit normaler, gesunder Haut gleichzusetzen. Histoarchitektur und Enzym-Expression nicht läsionaler Hautareale von Psoriasis-Patienten können mehr Ähnlichkeit mit einem Plaque aufweisen als mit gesunder Haut. Wenn es sich bei der Psoriasis um eine systemische Fehlregulation der Immunantwort handelt, dann sind die äußerlich sichtbaren Symptome nicht auf lokal begrenzte Prozesse wie einen Plaque beschränkt.

Möglicherweise gibt es neben den Plaques, vielleicht sogar am gesamten Integument Areale, die sich in erhöhter Bereitschaft befinden, Plaques zu entwickeln, auch wenn sie klinisch unauffällig erschienen.

Der darauf folgende quantitative Nachweis der nNOS durch die Real-Time-PCR zeigt allerdings ein kontroverses Ergebnis: Verglichen wurde die relative nNOS-Expression anhand von drei Pärchen von Patientenproben aus jeweils einem läsionalen und nicht läsionalen Hautabschnitt. In zwei von drei Patientenproben erweist sich die nNOS-Expression in nicht läsionalen Hautabschnitten höher als in läsionalen Abschnitten.

Möglicherweise handelt es sich hier um sog. „Ausreißerkandidaten“, die zufälligerweise Ausnahmen darstellen. Weiterhin ist vorstellbar, dass auf der RNA-Ebene grundsätzlich andere Regulationsmechanismen greifen als auf der Proteinebene oder dass andere Faktoren, die hier nicht untersucht wurden und bisher unbekannt sind, die Expression beeinflussen.

Außerdem haben die Ergebnisse der Immunhistochemie gezeigt, dass nicht läsionale, äußerlich unveränderte Haut von Psoriasispatienten nicht mit gesunder Haut gleichzusetzen ist, so dass die nNOS Expression nicht der gesunder Haut entspricht.

Ein Therapieansatz für die Psoriasis, der 1976 von Fischer entdeckt wurde, besteht in der Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (32, 53-55). So wird auf nicht-enzymatischem Weg NO freigesetzt (13-16, 55,56), um das endogene Defizit auszugleichen und den Proliferationsstimulus abzufangen. In meiner Arbeit habe ich den Effekt einer dreiwöchigen Fototherapie mit UVB311-Bestrahlung immunhistochemisch anhand des

Verlaufs der Arginase 1- und nNOS-Expression an einigen Patientenbeispielen untersucht. Nach einer dreiwöchigen Lichttherapie ist sowohl die nNOS als auch die Arginase 1 deutlich verringert nachweisbar. Außerdem hat sich die Histoarchitektur der initial als typischer Plaque imponierenden Hautveränderungen weitgehend normalisiert. Interessant wäre es, neue Therapiestrategien zu entwickeln, die die Hyperproliferation der Keratinozyten selektiver und spezifischer beeinflussen als bisher gebräuchliche Zytostatika und Immunsuppression. Praktisch wäre eine medikamentöse Applikation von NO wie es zur Therapie der Angina pectoris bereits angewandt wird: Durch die Verabreichung von Glyceroltrinitrat wird NO aus der Gefäßwand freigesetzt und das endogenen Defizit so ausgeglichen, so dass das verengte Gefäß seine dilatative Reserve nutzen kann. Ein simpler Ansatz wäre, NO topisch anzuwenden. Bekannt ist ein ähnliches Therapieprinzip beim M. Raynaud (57), der durch eine abnormale Vasokonstriktion in den Fingern gekennzeichnet ist. Durch die Applikation eines NO-freisetzenden Gels vom Unterarm bis zu den Fingerspitzen konnte der Blutfluss signifikant erhöht werden.

Eine systemische Dysbalance im Gefäßsystem führt zu einer gestörten Regulation des Gefäßtonus in kleinen sowie großen Gefäßen (33,34) und klinisch zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko, das seit der Framingham-Studie 1948 mittels bestimmter, oben genannter Parameter klassifiziert wird. Erkenntnisse aus der neueren Literatur lassen darauf schließen, dass nicht nur das vom Endothel produzierte NO für die

Blutdruckregulation entscheidend ist, sondern auch das NO, das von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystem freigesetzt wird (35). So wird mittels des von der nNOS im Gehirn produzierten NOs Kontrolle über die vasomotorischen Zentren ausgeübt. Außerdem beeinflussen autonome Nervenfasern über die Freisetzung von NO den peripheren Gefäßwiderstand in unterschiedlichen Organen. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich, bevor neue Therapieansätze entwickelt werden können.

Eine Fragestellung meiner Arbeit ist, ob die Psoriasis als lokale Fehlregulation der nitrosativen Balance in dem oberflächengroßen Organ Haut gleichzeitig anfällig macht für eine systemische nitrosative Dysbalance im Kreislaufsystem und vielleicht darüber hinaus auch auf neuronaler Ebene mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität. Dazu habe ich in meiner Arbeit Daten eines selbst rekrutierten Patientenkollektivs mit 25 Psoriasis-Patienten und 5 Patienten mit Atopischer Dermatitis erhoben: Die Patienten mit Psoriasis wurden nach der Verlaufsform in zwei Subgruppen, Typ 1 und Typ 2 (22), eingeteilt und nach psoriasispezifischen Merkmalen charakterisiert. Bei einer Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen von 60 % (31) ist eine starke immunpathogenetische Komponente der Psoriasis unbezweifelt. So sind Assoziationen zu den HLA-Typen besonders zu Cw6, aber auch zu B 13 und B57, das in 93 % der Fälle mit B17 identisch ist, erwiesen (29-31). Das untersuchte Kollektiv der Psoriasis-Patienten ist bezüglich der Einteilung

von Henseler und Christophers (22) ein typisches Kollektiv: Rund 78 % gehören der Subgruppe Typ 1 an, deren Alter bei der Erstmanifestation unter 40 Jahre liegt. In dieser Gruppe kommt die Psoriasis signifikant häufiger familiär vor und sie ist häufiger HLA-assoziiert als in der Subgruppe Typ 2. Besonders stark ist die Assoziation mit Cw6 und B17/57. In der Subgruppe 2, die 22% des gesamten Kollektivs umfasst und dadurch gekennzeichnet ist, dass sie sich später im Leben, ab dem 40. Lebensjahr, manifestiert, ist eine positive Familienanamnese sowie eine HLA-Gebundenheit seltener. Die häufigste HLA-Assoziation in dieser Gruppe ist die zu Cw2. Ein Unterschied in der Ausprägung von Entzündungsreaktion und der Hautmanifestation zwischen Gruppe 1 und 2 - ermittelt anhand des PASI-Score und anhand der laborchemischen Entzündungskonzellation - zeichnet sich nicht ab.

Weiterhin wurde das kardiovaskuläre Risikoprofil der Gruppe der Psoriasis-Patienten mit der Gruppe von Patienten mit Atopischer Dermatitis verglichen. Der Pathomechanismus der Atopischen Dermatitis ist Th2-vermittelt und damit grundlegend anders als der der Psoriasis, der Th1-vermittelt ist.

Innerhalb der Gruppe der Psoriasispatienten weisen die Patienten aus der Subgruppe 2 eine höhere Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf, wie z. B. eine höheres Alter, einen höheren Body-Mass-Index, höhere Cholesterinwerte im Serum, einen höheren Nikotinkonsum, eine eigene kardiovaskuläre Anamnese mit Vorerkrankungen sowie eine diesbezüglich positive Familienanamnese. An dieser Stelle ist kritisch zu betrachten,

inwiefern dieser Effekt mit der Psoriasis zusammenhängt oder vielmehr einem altersentsprechenden Zuwachs an Risikofaktoren zuzuschreiben ist. Zur näheren Differenzierung sind weitere Untersuchungen erforderlich. Des Weiteren wurde die gesamte Gruppe der Psoriasis-Patienten bezüglich ihres kardiovaskulären Risikoprofils mit Patienten verglichen, die an Atopischer Dermatitis erkrankt sind. Patienten mit Psoriasis weisen ein signifikant höheres Körpergewicht bzw. eine Präadipositas auf. Weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren kommen als Trend in der Gruppe der Patienten mit Psoriasis häufiger vor: so z. B. ein höheres Alter, ein größerer Anteil Männer, ein häufigeres Vorkommen von Diabetes mellitus, mehr Raucher, mehr kardiovaskuläre Vorerkrankungen sowie eine größere Belastung durch eine positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Ereignisse.

Demnach besteht für Psoriasis-Patienten, besonders für diejenigen mit der Verlaufsform Typ 2, ein erhöhtes Risiko, Herz- und Kreislauferkrankungen zu erleiden. Demzufolge sollten Patienten mit Psoriasis zur Früherkennung und Prävention kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität intensiv und interdisziplinär begleitet werden. Dies kann eine wichtige Schnittstelle zwischen behandelnden Dermatologen und Allgemeinmedizinerinnen bzw. Internisten sein.

5. Zusammenfassung

Eine nitrosative Dysbalance spielt bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine pathogenetische Rolle: Bei der Psoriasis besteht eine nitrosative Dysbalance in der Haut, die die Epidermis in eine Hyperproliferation nicht ausdifferenzierter Zellen treibt und klinisch zum Krankheitsbild der Psoriasis führt. Eine systemische Dysbalance im Gefäßsystem führt zu einer gestörten Regulation des Gefäßtonus in kleinen sowie großen Gefäßen. Somit ist eine der Arbeit zugrundeliegende Überlegung, ob die Psoriasis, die als lokale Störung der nitrosativen Balance des großen Organs Haut gesehen wird, gleichzeitig anfällig macht für eine systemische nitrosative Dysbalance, die sich klinisch in einem erhöhten kardiovaskulären Risiko ausdrückt.

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein einfach gebautes Molekül mit komplexen chemischen Eigenschaften, das vielfältig mit seiner chemischen Umgebung reagieren und unterschiedliche, weitreichende Prozesse im Organismus einleiten und bahnen kann. Es wird von einer Enzymfamilie produziert, die aus zwei konstitutiv exprimierten Enzymen, eNOS und nNOS, mit regulatorischen Aufgaben besteht und einem induzierbaren Enzym, iNOS, das im Dienst immunregulatorischer Funktionen steht. Die NO-Synthasen verwenden als Substrat die semiessentielle Aminosäure L-Arginin, um in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und mehreren Kofaktoren die Reaktion zu äquimolaren Mengen an Stickstoffmonoxid und Citrullin zu katalysieren. In der menschlichen Epidermis hat NO einen „biphasischen,

wachstumsregulierenden Effekt auf Keratinozyten“: In hohen Konzentrationen fördert es die Differenzierung der Zellen, in niedriger Konzentration fördert es die Proliferation. Die NOS und die Arginase, die normalerweise reziprok reguliert sind, werden in psoriatischer Haut überexprimiert, wodurch es durch Konkurrenz um das Substrat L-Arginin zu niedrigen NO-Konzentrationen kommt und folglich zu einer Hyperproliferation undifferenzierter Zellen.

Im immunhistochemischen Teil der Arbeit wird gezeigt, dass die nNOS in gesunder Haut in der Basalzellschicht nachweisbar ist und in psoriatischer Haut sowohl in läsionalen als auch zum Teil in nicht läsionalen Abschnitten vermehrt und deutlich über die Basalzellschicht hinaus exprimiert wird. Sie kann somit als Proliferationsmarker gelten. Bei dem quantitativen Nachweis durch die Real-Time-PCR ergibt sich ein inhomogenes Ergebnis: In zwei von drei Patientenproben erweist sich die nNOS-Expression in nicht läsionalen Hautabschnitten höher als in läsionalen Abschnitten. Aufgrund der Erfahrung, dass äußerlich unauffällige, nicht läsionale Haut eines Psoriasis-Patienten bezüglich Enzymexpressionsmuster und Histoarchitektur einem Plaque häufig mehr ähnelt als gesunder Haut, besteht der Verdacht, dass es sich bei der Psoriasis um eine Fehlregulation des gesamten Systems Haut handelt und nicht nur um lokal begrenzte Erscheinungen.

Darüberhinaus wurde immunhistochemisch der Verlauf der Arginase 1- und nNOS-Expression unter einer Fototherapie mit UVB311-Bestrahlung untersucht. Nach einer dreiwöchigen Lichttherapie ist sowohl die nNOS als

auch die Arginase 1 deutlich verringert nachweisbar, da die auf nicht-enzymatischem Weg freigesetzte NO-Menge den NO-Mangel in der Haut ausgleicht.

Weiterhin werden in meiner Arbeit Daten eines Patientenkollektivs mit 25 Psoriasis-Patienten und 5 Patienten mit Atopischer Dermatitis als Vergleichsgruppe erhoben, die die Erkrankung Psoriasis mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko in Zusammenhang bringen: Das untersuchte Kollektiv an Patienten mit Psoriasis wird nach der Verlaufsform in zwei Subgruppen, Typ 1 und Typ 2, eingeteilt. In der Gruppe Typ 1, die 78% des Gesamtkollektivs ausmacht, manifestiert sich die Hautkrankheit vor dem 40. Lebensjahr, kommt signifikant häufiger familiär vor und ist häufiger HLA-assoziiert, besonders stark mit Cw6 und B17/57. In der Subgruppe 2, die 22% des gesamten Kollektivs umfasst, manifestiert sich die Psoriasis nach dem 40. Lebensjahr, ist weniger familiär gebunden und a. e. assoziiert mit Cw2. Ein Unterschied in der Ausprägung von Entzündungsreaktion und der Ausprägung der Hautmanifestation zwischen Gruppe 1 und 2 zeichnet sich nicht ab. Bezüglich ihres kardiovaskulären Risikos weisen Patienten aus der Subgruppe 2 eine höhere Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf. Desweiteren wird die gesamte Gruppe der Psoriasis-Patienten bezüglich ihres kardiovaskulären Risikoprofils mit Patienten verglichen, die an Atopischer Dermatitis erkrankt sind. Psoriasis-Patienten weisen danach ein signifikant höheres Körpergewicht auf. Weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren kommen als Trend in der Gruppe der Patienten mit Psoriasis häufiger. Daher sollten Patienten mit Psoriasis

zur effektiven Prävention kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität
intensiv und interdisziplinär begleitet werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Reaktionsschema „Synthese von NO durch NO-Synthasen“, nach Boris TM, wikipedia	S. 2
Abb. 2: „Psoriatischer Plaque	S. 6
Abb. 3 A+B: „Psoriatischer Plaque im Vergleich zu gesunder Haut“	S. 8
Abb. 4 A+B: Histologische Schnittbilder zum Vergleich aus einem psoriatischen Plaque (A) und aus einem makroskopisch unauffälligen, nicht läsionalen Hautareal eines Psoriasis-Patienten (B)	S. 9
Abb. 5: NO-vermittelte Vasodilatation	S. 15
Abb. 6 A+B: Charakterisierung des Arginase 1-Expressionsusters an gesunder Haut (A) und Negativkontrolle (B)	S. 43
Abb. 7 A+B: Charakterisierung des Arginase1-Expressionsusters an unbehandelter, läsionaler Haut (A) und Negativkontrolle für den Arginase 1-Antikörper (B)	S. 44
Abb. 8 A+B: Charakterisierung des Arginase 1-Expressionsusters an einem Psoriasis-Plaque im Verlauf einer Lichttherapie mit UVB311 nm (A) in unbehandeltem Zustand, (B) drei Stunden nach der Applikation der ersten UV-Dosis, und (C) nach dreiwöchiger Lichttherapie am Beispiel von Patient 11	S. 45
Abb. 9 A-C: Charakterisierung des Arginase1-Expressions-	

musters an nicht läsionaler Haut im Verlauf einer
 Lichttherapie mit UVB311 nm (A) in unbehandeltem
 Zustand, (B) drei Stunden nach der Applikation der
 ersten UV-Dosis am Beispiel von Patient 11,
 (C) Negativ-Kontrolle für den Arginase 1-Antikörper
 an einem unbehandelten Psoriasis-Plaque am
 Beispiel von Patient 11

S. 46

Abb. 10 A-C: Schnittbild der Spezifitätskontrolle für nNOS
 an einer Nervenzelle aus humanem, neuronalem Kortex-
 gewebe

S. 48

Abb. 10 D-F: Charakterisierung des Arginase 1-Expressions-
 musters an nicht läsionaler Haut unter einer
 Lichttherapie (D) in unbehandeltem Zustand,
 (E) drei Stunden nach der Applikation der ersten
 UV-Dosis am Beispiel von Patient 11,
 (F) Negativ-Kontrolle für den Arginase 1-Antikörper
 an einem unbehandelten Psoriasis-Plaque

S. 50

Abb. 11: Spezifitätskontrolle für nNOS an einer schnell-proliferierenden
 Tumorzelllinie (HaKat) (A),
 250-fach vergrößert, und Negativ-Kontrolle für den
 Antikörper (B), 150-fach vergrößert, (C) Zellen in
 unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus, 450-fach
 vergrößert

S. 51

Abb. 12 A-C: Charakterisierung des nNOS-Expressionsmusters an

gesunder Haut (A) und Negativkontrolle für den Antikörper (B), Durchlicht-Mikroskopie	S. 52
Abb. 13 A+B: Charakterisierung des nNOS-Expressions- musters (A) an einem Plaque des Psoriasis- Patienten 6 mit (B) entsprechender Negativkontrolle für den Antikörper und an nicht-läsionaler Hautabschnitten desselben Patienten	S. 53
Abb. 14 A-D: Charakterisierung des nNOS-Expressions- musters (A) am histologischen Schnittbild eines Plaques in unbehandeltem Zustand mit (B) Negativ- kontrolle für den Antikörper und (C) an einem Plaque nach dreiwöchiger UVB311nm-Therapie mit Negativkontrolle	S. 54
Abb. 15 A-D: Relative nNOS-Expression in drei Patienten- proben im Vergleich läsionaler und nicht läsionaler Hautabschnitte	S. 56
Abb. 16: Charakterisierung des Arginase 1-Expressions- musters (A) am Beispiel eines unbehandelten Plaques und (B) am Beispiel unbehandelter nicht läsionaler Haut	S. 59
Abb. 17 A+B: Charakterisierung des Arginase1-Expressions- musters (A) am Beispiel eines unbehandelten Plaques und (B) am Beispiel unbehandelter nicht läsionaler Haut	S. 90

Abb. 18 A+B: Charakterisierung des Arginase1-Expressions-
musters (A) am Beispiel eines Plaques nach dreimaliger
Applikation von UVB311nm-Strahlen und (B) eine
dazugehörige Negativkontrolle für den Antikörper aus
unbehandelter Haut S. 90

Abb. 19 A+B: Charakterisierung des nNOS-Expressions-
musters (A) am Beispiel eines unbehandelten
Plaques und (B) nicht-läsionaler Haut eines
Psoriasis-Patienten im unbehandelten Zustand
sowie (C) eine Negativkontrolle für den Antikörper aus
unbehandelter nicht-läsionaler Haut S. 91

Abb. 20 A-C: Charakterisierung des nNOS-Expressions-
musters (A) am Beispiel eines unbehandelten
Plaques und (B) nicht-läsionaler Haut desselben
Psoriasis-Patienten im unbehandelten Zustand
sowie (C) eine Negativkontrolle für den Antikörper aus
läsionaler Haut S. 92

Abb. 21 A-C: Charakterisierung des nNOS-Expressions-
musters (A) am Beispiel eines unbehandelten Plaques
und (B) nicht-läsionaler Haut desselben Psoriasis-
Patienten im unbehandelten Zustand sowie (C) eine
Negativkontrolle für den Antikörper aus nicht
läsionaler Haut S. 93

Abb. 22 A-C: Charakterisierung des nNOS-Expressions-

musters (A) am Beispiel eines unbehandelten Plaques
und (B) nicht-läsionaler Haut desselben Psoriasis-
Patienten im unbehandelten Zustand sowie (C) eine
Negativkontrolle für den Antikörper aus nicht läsionaler
Haut

S. 94

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Subtypen der Psoriasis nach Henseler und Christophers	S. 13
Tab. 2: Formel zur Berechnung des PASI-Score	S. 19
Tab. 3: Risikofaktoren für eine KHK	S. 22
Tab. 4: Pipettierschema für die Reaktion der Real-Time-PCR	S. 30
Tab. 5: Primersequenzen	S. 31
Tab. 6: Ablauf der Real-Time PCR unter der Verwendung von SYBR-Green	S. 31
Tab. 7: Charakterisierung des Kollektivs der Patienten mit Psoriasis	S. 34
Tab. 8: Psoriasis-Verlaufsformen vom Typ 1 bzw. Typ bezüglich psoriasispezifischer Parameter und dem Vorkommen kardiovaskulärer Risikofaktoren	S. 37
Tab. 9: Vergleich zwischen Patienten mit Psoriasis und Patienten mit Atopischer Dermatitis bezüglich kardiovaskulärer Risikofaktoren	S. 40

8. Literaturverzeichnis

1. Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V „Stickstoffmonoxid in der Pathogenese entzündlicher Dermatosen“, JDDG 11 2003 (Band 1)
2. Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S., “Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline”, J Biol Chem. 1991 Dec 15; 266(35): 23790-5
3. Leone AM, Francis PL, Palmer RM, Ashton DS, Moncada S., “Thermospray tandem mass spectrometric analysis of oxygen incorporation into citrulline by nitric oxide synthase”, Biol Mass Spectrom. 1991 Dec.; 20(12): 759-62
4. Feldman PL, Griffith OW, Hong H, Stuehr DJ, “Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation”, Glaxo Inc. Research Institute, Research Triangle Park, North Carolina 27709
5. Bogdan C., “Nitric oxide and the immune response” Nat. Immunol. 2001 Oct;2(10):907-16
6. Anggård E., “Nitric oxide: mediator, murderer and medicine”, Lancet. 1994 May 14;343(8907):1199-206
7. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H, “Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterisation,

- purification, molecular cloning, and functions." *Hypertension*. 1994 Jun;23(6 Pt 2):1121-31
8. Kröncke KD, Suschek CV, Kolb-Bachofen V, "Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity" *Antioxid Redox Signal*. 2000 Fall; 2(3):585-605
 9. Suschek CV, Schnorr O, Kolb-Bachofen V., "The Role of iNOS in Chronic Inflammatory Processes *In Vivo*: Is it Damage-Promoting, Protective or Active at all?" *Curr Mol Med*. 2004 Nov;4:(7) 763-775
 10. Mori M, Gotoh T, "Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes", *Biochem Biophys res Commun*. 2000 Sep 7;275(3):715-9
 11. Bruch-Gerharz D, Schnorr O, Suschek CV, Beck KF, Pfeilschifter J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V, "Arginase 1 overexpression in psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation.", *Am J Pathol*. 2003 Dec;163(6):2642-3
 12. Böger RH, Vallance P, Cooke JP, "Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase", *Atheroscler Suppl*. 2003 Dec;4(4): 1-3
 13. Matsunaga K, Furchgott RF, "Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta", *J Pharmacol Exp Ther*. 1989 Feb;248(2):687-95

14. Weller R, Pattullo S, Smith L, Golden M, Ormerod A, Benjamin N, "Nitric oxide is generated on the skin by reduction of sweat nitrate", J Invest Dermatol. 1996 Sep;107(3):327-31
15. Suschek CV, Schroeder P, Aust O, Sies H, Mahotka C, Horstjann M, Ganser H, Mürtz M, Hering P, Schnorr O, Kröncke HD, Kolb-Bachofen V, "The presence of nitrite during UVA irradiation protects from apoptosis", FASEB J. 2003 Dec; 17(15):1937-46
16. Paunel AN, Dejam A, Thelen S, Kirsch M, Hosrtjann M, Gharini P, Mürtz M, Kelm M, de Groot H, Kolb-Bachofen V, Suschek CV, „Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular scources, and mechanisms.“, Free Radic Biol Med. 2005 Mar 1;38(5):606-15
17. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V, „Nitric oxide: cytotoxicity *versus* cytoprotection – how, why, when, and where?“, Nitric Oxide. 1997 Apr;1(2):107-20
18. Bruch-Gerharz D, Fehsel, Suschek CV, Michel G, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V, „A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes“, J Exp Med. 1996 Nov 1;184(5):2007-12
19. Blank C, Bogdan C, Bauer C, Erb K, Moll H, "Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthases", Eur J Immunol. 1996 Apr;26(4):792-6
20. Benjamin N, Pattullo S, Weller R, Smith L, Ormerod A, "Wound licking and nitric oxide", Lancet. 1997 Jun 14;349(9067):1776

21. Feelisch M, Kolb-Bachofen V, Liu D, Lundberg JO, Revelo LP, Suschek CV, Weller RB, „Is sunlight good for our heart?“, Eur Heart J. 2010 May;31(9):1041-5
22. H. Gollnik, Bonnekoh, „Psoriasis- Pathogenese, Klinik und Therapie“ 1. Auflage Bremen UNI-MED, 2001
23. Fritsch, „Basiswissen Dermatologie und Venerologie“, 1. Auflage, Springer-Verlag
24. Hengge, Ruzicka (Hrsg.) „Lehrbuch der Dermatologie und Venerologie“, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mBH
25. Braun-Falco, Wolff, Landthaler, Plewig „Dermatologie und Venerologie“, Springer-Verlag, 5. Auflage
26. Krischel V, Bruch-Gerharz D, Suschek CV, Kröncke KD, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V, “Biphasic Effect of Exogenous Nitric Oxide on Proliferation and Differentiation in Skin Derived Keratinocytes but Not Fibroblasts”, J Invest Dermatol. 1998 Aug;111(2):286-91
27. Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V, “Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease- a review.”, Arch Dermatol Res 1998 Dec;290:643- -651
28. Bruch-Gerharz D, Schnorr O, Suschek CV, Beck KF, Pfeilschifter J, Ruzicka T Kolb-Bachofen V, “Arginase 1 Overexpression in Psoriasis: limitation of inducible nitric oxide synthase activity as a molecular mechanism for keratinocyte hyperproliferation.”, Am J Path. 2003 Dec;163(6):2642

29. Guðjónsson JE, Kárason A, Antonsdóttir AA, Rúnarsdóttir EH, Gulcher J, Stefánsson K, "HLA-Cw6-Positive and HLA-Cw6-Negative Patients with Psoriasis Vulgaris have Distinct Clinical Features." J Invest Dermatol. 2002 Feb;118(2):362-5
30. Jenisch S, Henseler T, Nair RP, Guo SW, Westphal E, Stuart P, Krönke M, Voorhees JJ, Christophers E, Elder JT, "Linkage Analysis of Human Leukocyte Antigen (HLA) Markers in Familial Psoriasis: Strong Disequilibrium Effects Provide Evidence for a Major Determinant in the HLA-B/-C Region ", Am J Hum Genet. 1999 Mar;64(3): 895-6
31. Guðjónsson JE, Johnston A, Sigmundsdóttir H, Valdimarsson H, "Immunopathogenic mechanisms in psoriasis", Clin Exp Immunol 2004;135(1): 1-8
32. Krueger JG, Wolfe JT, Nabeya RT, Vallat VP, Gilleaudeau P, Heftler NS, Austin LM, Gottlieb AB, "Successful Ultraviolet B Treatment of Psoriasis is Accompanied by a Reversal of Keratinocyte Pathology and by Selective Depletion of Intraepidermal Cells", J Exp Med. 1995 Dec 1;182(6):2057-68
33. Böger RH, Bode-Böger SM, "Endotheliale Dysfunktion bei peripherer arterieller Verschlusskrankung: Von der Grundlagenforschung zur klinischen Anwendung", VASA 1997;26:180-84
34. Cooke JP, Tsao PS, "Is NO an endogenous antiatherosclerotic molecule?" Arterioscler Thromb. 1994; 14(5): 653-655

35. Toda N, Ayajiki K, Okamura T, "Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase.", J Hypertens 2009 Oct;27(10)1929-1940
36. Suschek CV, Schnorr O, Kolb-Bachofen V., "The Role of iNOS in Chronic Inflammatory Processes *In Vivo*: Is it Damage-Promoting, Protective or Active at all?" Curr Mol Med. 2004 Nov;4:(7) 763-775
37. Fredriksson T, Petterson U, "Severe Psoriasis- oral therapy with a new retinoid." Dermatologica 157: 238 – 244;
38. Ashcroft DM, Li Wan Po A, Williams HC, Griffiths CEM, "Quality of life measures in psoriasis: a critical appraisal of their quality." J Clin Pharm Ther 23: 391-8
39. Hense HW, "Risk factor scoring for coronary heart disease", BMJ. 2003 Nov 29;327:1238-9
40. "Prevention of coronary heart disease in clinical practice" Eur Heart J. 1998; 19: 1434-1503
41. Noll, Schaub-Kuhnen, „Praxis der Immunhistochemie“, Urban und Schwarzenberg, 1. Auflage Oktober 2000
42. Rapanelli M, Frick LR, Zanutto BS, "Modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthases during learning of an operant conditioning task", J Neurochem 2010 May;113(3):725-34.
43. Walker NJ, "A Technique whose time has come", Science. 2002 Apr 19;296(5567):557-9
44. "The usefulness of quantitative Real-Time-PCR in immunogenetic Scientific communications" ASHI Quarterly 3rd Quarter 2001

45. Deborah S, "Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Core Facility Using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector", ABRF Grove 28th February 1999
46. Bustin SA, "Review: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays", J Mol Endocrinol. 2000 Oct;25(2):169-193
47. Pfaffl MW, "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR Michael", Nucleic Acids Res, 2001 May 1;29(9):e45.
48. Bender R, Lange ST, "Median oder Mittelwert?" DMW 2001; 126: T 25 – T 26
49. Huang PL, „Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knock out mice“, Braz J Med and Biol Res 1999 Nov;32(11):1353-59
50. Morris SM Jr., "Regulation of arginine availability and its impact on NO synthesis", aus: Nitric oxide: biology and pathobiology, San Diego: Academic Press, 2000: 187-97
51. Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V, „Nitric Oxide in Human Skin: Current Status and Future Prospects“, J Invest Dermatol. 1998 Jan; 110(1):1-7
52. Mancardi D, Ridnour L, Thomas D, Katori T, Tocchetti C, Espey M, Mirande K, Paolocci N, Wink D, "The chemical Dynamics of NO and Reactive Nitrogen Oxides: A Practical Guide", Curr Mol Med. 2004 Nov;4(7):723-40
53. Bandow G, Koo J, "Narrow-band ultraviolet B radiation: a review of the current literature" Int J Dermatol. 2004 Aug; 43(8): 555-561

54. Ibbotson SH, Bilsland D, Cox NH, Dawe RS, Diffey B, Edwards C, Farr PM, Ferguson J, Hart G, Hawk J, Lloyd J, Martin C, Moseley H, McKenna K, Rhodes LE, Taylor DK, "An update and guidance on narrowband ultraviolet B phototherapy: a British Photodermatology Group Workshop Report" Br J Dermatol. 2004 Aug;151(2):283-97
55. Seo SJ, Choi HG, Chung HJ, Hong CK "Time course of expression of mRNA of inducible nitric oxide synthase and generation of nitric oxide by ultraviolet B in keratinocyte cell lines", Br J Dermatol. 2002 Oct;147(4):655-662
56. Suschek C, Paunel A, Kolb-bachofen V, "Nonenzymatic nitric Oxide Formation during UVA Irradiation of Human Skin: Experimental Setups and Ways to measure" aus "Cell Biology and Physiology", Vol. 396, copyright 2005
57. Tucker AT, Pearson RM, Cooke ED, Benjamin N, "Effect of nitric-oxide-generating system on microcirculatory blood flow in skin of patients with severe Raynaud`s syndrome: a randomised trial", Lancet 1999 Nov 13; 354(9191):1670-5

9. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Kolb-Bachofen herzlich für die Übernahme des Themas und die kontinuierliche Unterstützung meiner Arbeit. Ich habe hier einen neuen und begeisterten Blick auf die Naturwissenschaften kennen- und schätzen gelernt. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Ruzicka für die Ermöglichung der Patienten-Studie in der Hautklinik.

Für das Überlassen von Gewebeproben bin ich v. a. den Hautkranken verpflichtet, namentlich meiner Schwester Veronika, die ihre Daten und Gewebeproben zur Verfügung gestellt haben, um zu dem erhofften medizinischen Fortschritt beizutragen. Für die großzügige Bereitstellung von zerebralen Gewebeproben danke ich Herrn Prof. Dr. Reifenberger, Institut für Neuropathologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Außerdem danke ich dem Florence-Nightingale-Hospital in Kaiserswerth für die Spende gesunder Hautproben. Für Austausch und Zusammenarbeit danke ich außerdem Herrn Dr. Schnorr und seiner Arbeitsgruppe.

Ohne die Beratung durch Dr. Christian Herder wäre die Statistik für mich ein weißer Fleck auf der Landkarte meiner Kenntnisse geblieben. Für das Aufzeigen und Erklären von Möglichkeiten bleibe ich dankbar. Das gilt auch für Frau Gertrud Teuwssen, die mir die Möglichkeiten der Bildbearbeitung und Formatierung nahegebracht hat.

Unersetzlich und unvergesslich war die Unterstützung durch die Arbeitsgruppe der Immunbiologie. Hier möchte ich besonders Frau Dr. Fitzner und Frau Dr. Koch für alle freundschaftliche Beratung danken. Selbstverständlich danke ich meiner Familie, meinem Partner und meinen Freunden für all die ermutigende Unterstützung.

10. Lebenslauf

Julia Mirjam Letschert
Am Sonnenhang 3
40883 Ratingen

Persönliche Angaben

Geburtsdatum/-ort 13.09.1976 in Remscheid
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulische Ausbildung

1983-1996 Grundschule und Gymnasium in Ratingen
09/-12/1993 Fulbright-Auslandsaufenthalt in England

Universitäre Ausbildung

09/1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/1999 Physikum
08/2001 1. Staatsexamen
04/2002 2. Staatsexamen
06/2005 3. Staatsexamen
09/2002-06/2003 Erasmus-Auslandsstudium an der Universidad
de Granada, Spanien
12/2004- 03/2005 Auslandsstertial an National Institutes of Health,
Bethesda, Maryland, USA

Facharztausbildung

09/2006-10/2009 Innere Medizin am Elisabeth-Krankenhaus in Essen
Seit 11/2009 Nephrologie am Elisabeth-Krankenhaus in Essen

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 03.03.2011

Anhang

I. Zusätzliche Beispiele für Arginase 1-Expression

Patient 23

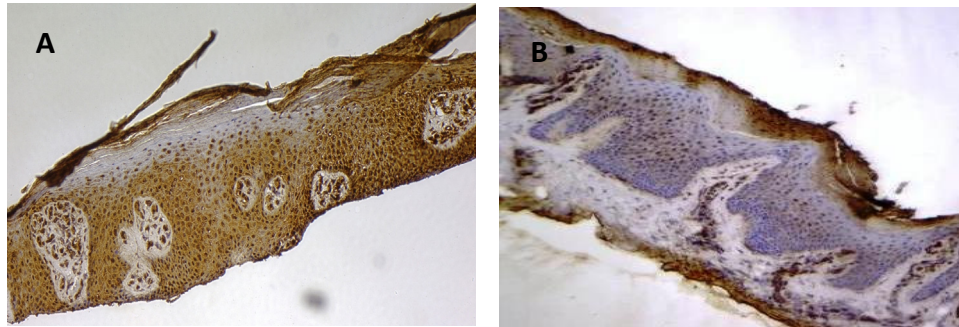


Abb. 17 A+B: Charakterisierung des Arginase1-Expressionsmusters (A) am Beispiel eines unbehandelten Plaques und (B) am Beispiel unbehandelter nicht läsionaler Haut, Durchlicht-Mikroskopie, 200-fach vergrößert

Es wird deutlich, wieviel stärker die Arginase1 im psoriatischen Plaque exprimiert wird als in nicht läsionaler Haut.

Patient 13

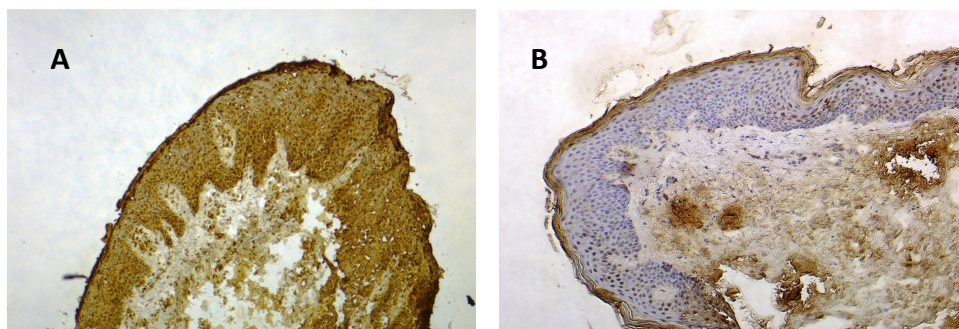


Abb. 18 A+B: Charakterisierung des Arginase1-Expressionsmusters (A) am Beispiel eines unbehandelten Plaques und (B) am Beispiel unbehandelter nicht läsionaler Haut, Durchlicht-Mikroskopie, 200-fach vergrößert

Es wird auch hier deutlich, wieviel stärker die Arginase 1 im psoriatischen Plaque exprimiert wird als in nicht läsionaler Haut.

Patient 4

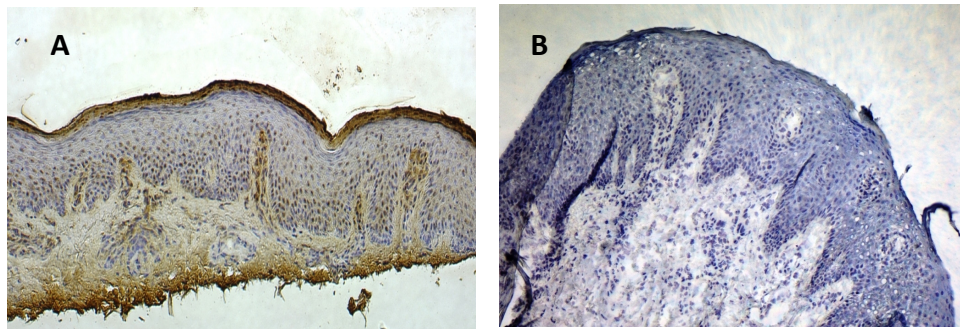


Abb. 19 A+B: Charakterisierung des Arginase1-Expressionsmusters (A) am Beispiel eines Plaques nach dreimaliger Applikation von UVB311nm-Strahlen und (B) eine dazugehörige Negativkontrolle für den Antikörper aus unbehandelter Haut, Durchlicht-Mikroskopie, 200-fach vergrößert
Hier sieht man eine eher schwache Arginase1-Expression nach Lichttherapie.

II. Zusätzliche Beispiele für nNOS-Expression

Patient 5

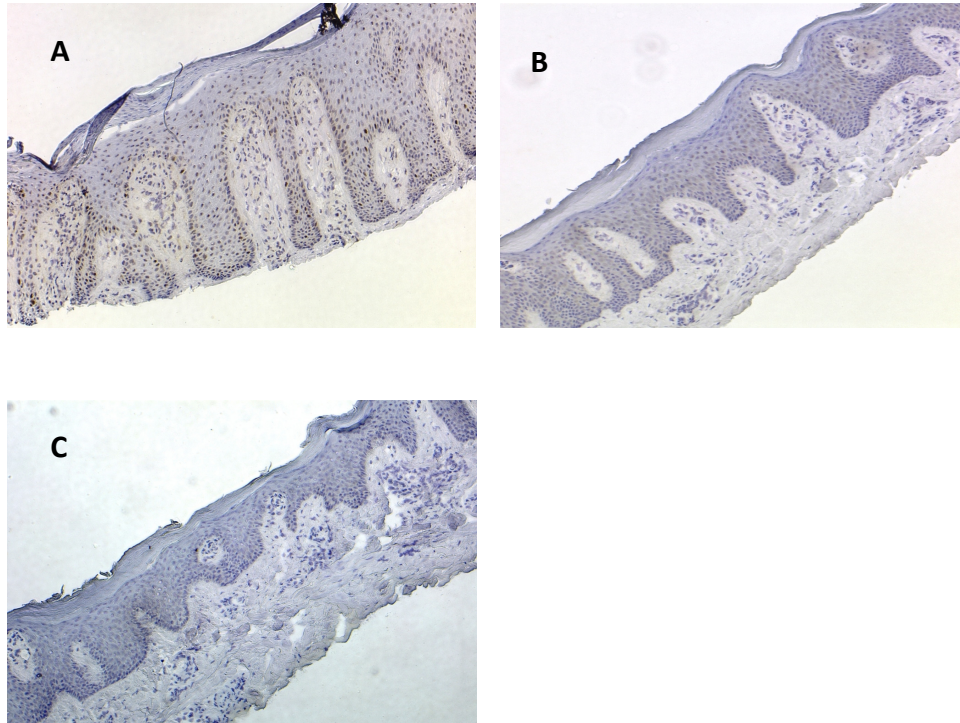


Abb. 20 A-C: Charakterisierung des nNOS-Expressionsmusters (A) am Beispiel eines unbehandelten Plaques und (B) nicht-läsionaler Haut desselben Psoriasis-Patienten im unbehandelten Zustand sowie (C) eine Negativkontrolle für den Antikörper aus unbehandelter nicht-läsionaler Haut, Durchlicht-Mikroskopie, 200-fach vergrößert

An läsionaler Haut sind die psoriasisspezifischen histoarchitektonischen Veränderungen stärker ausgeprägt als an nicht läsionaler, scheinbar unveränderter Haut eines Psoriasis-Patienten. Die nNOS lässt sich deutlich in den basalen Abschnitten des Psoriasis-Plaques nachweisen.

Patient 12

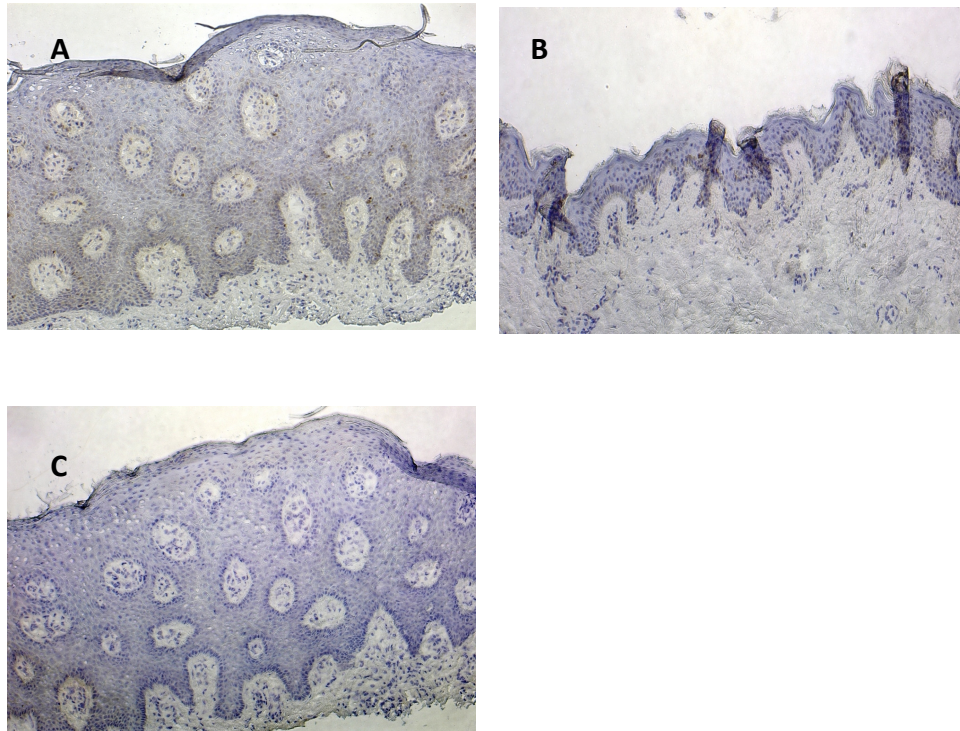


Abb. 21 A-C: Charakterisierung des nNOS-Expressionsmusters (A) am Beispiel eines unbehandelten Plaques und (B) nicht-läsionaler Haut desselben Psoriasis-Patienten im unbehandelten Zustand sowie (C) eine Negativkontrolle für den Antikörper aus läsionaler Haut, Durchlicht-Mikroskopie, 200-fach vergrößert

Hier ist deutlich die nNOS-Expression in den basalen Abschnitten des Plaques zu sehen. Die nicht-läsionale Haut desselben Patienten zeigt in diesem Beispiel so wenig psoriasispezifische, histologische Veränderungen wie nNOS-Expression.

Patient 13

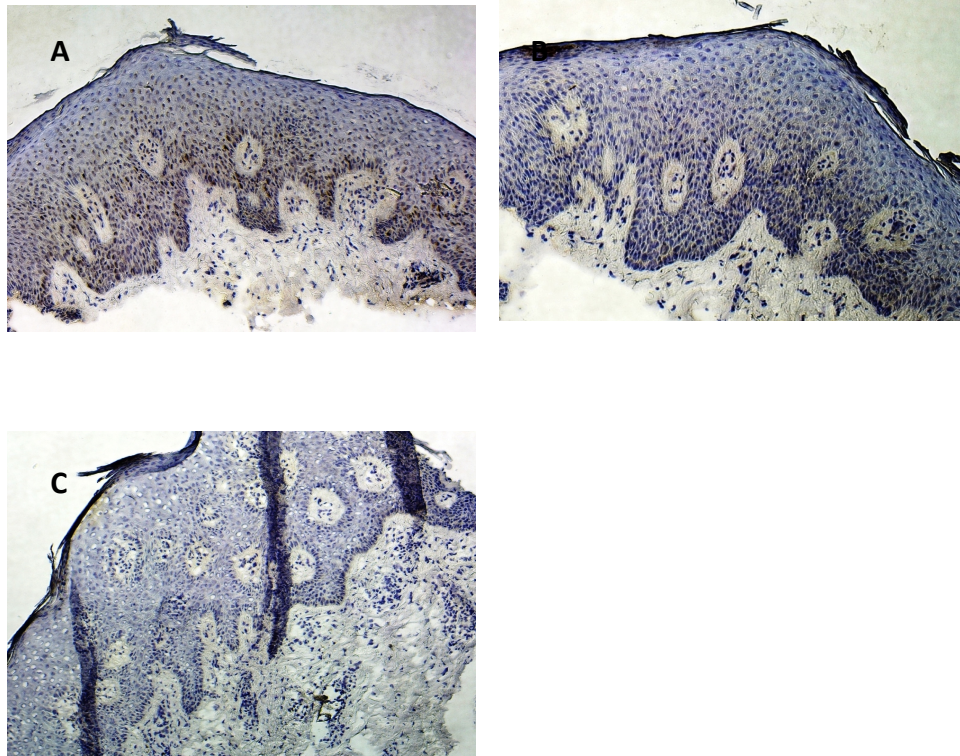


Abb. 22 A-C: Charakterisierung des nNOS-Expressionsmusters (A) am Beispiel eines unbehandelten Plaques und (B) nicht-läsionaler Haut desselben Psoriasis-Patienten im unbehandelten Zustand sowie (C) eine Negativkontrolle für den Antikörper aus nicht läsionaler Haut, Durchlicht-Mikroskopie, 200-fach vergrößert

Auch hier ist deutlich die nNOS-Expression in den basalen Abschnitten des Plaques zu sehen. Die nicht-läsionale Haut desselben Patienten zeigt in diesem Beispiel psoriasispezifische, histologische Veränderungen. Die nNOS-Expression ist in den proliferativ aktiven, basalen Abschnitten des Psoriasis-Plaques aktiv, jedoch nicht in nicht-läsionaler Haut.



MEDIZINISCHE EINRICHTUNGEN
Hautklinik
Direktor: Universitäts-Prof.Dr.Dr. h.c.T.Ruzicka

Patientenaufkleber:

Anamnese

Datum:

1 Familienanamnese:

<u>Hauterkrankungen</u>	<u>Nicht-Hauterkrankungen</u>
Psoriasis	KHK
Arthropathie	Herzinfarkt
Andere	andere

2 Eigenanamnese:

	seit	Bisherige Medikation	Wirksamkeit
Psoriasis			
Arthropathie			
KHK/ Herzinfarkt			
Rauchen (aktiv/ passiv)			
Art. Hypertension			
Diabetes mellitus			
Andere			

3 Aktuelle Anamnese:

	Aktuelle Medikation (KJ: Nitrate!)	Medikation seit
Psoriasis (Arthropathie)		
KHK/ Herzinfarkt		
Rauchen (aktiv/ passiv)		
Art. Hypertension		
Diabetes mellitus		
Andere		

bei aktueller UV-Therapie:

	seit	Häufigkeit/ Woche	aktuelle Einzeldosis/ kumulative Dosis [J/m²m)	
UVB311				



MEDIZINISCHE EINRICHTUNGEN
Hautklinik
Direktor: Universitäts-Prof. Dr. Dr. h.c.T.Ruzicka

Informationsblatt und Einverständniserklärung

Sehr geehrte(r) Patient(in),

das Verständnis, warum und wie Hauterkrankungen entstehen, ist von großer Bedeutung, um daraus Nutzen für zukünftige Behandlungen abzuleiten. In unseren wissenschaftlichen Untersuchungen soll die Frage beantwortet werden, welche Störungen bei Hauterkrankungen - im Vergleich zum Gesunden – vorliegen. Dazu wird Blut bzw. Hautgewebe auf das Vorhandensein bestimmter körpereigener Produkte untersucht, die unseren ersten Untersuchungen zufolge für die Entstehung von Hauterkrankungen bedeutend sein könnten. Das wollen wir weitergehend untersuchen und bitten daher um Ihre Unterstützung. Die von Ihnen gewonnenen Proben und die Erkenntnisse werden anonym und streng vertraulich behandelt.

Wir wären Ihnen sehr dankbar, wenn Sie sich mit Ihrer Unterschrift mit der wissenschaftlichen Auswertung der von Ihnen gewonnenen Proben einverstanden erklären und so an unseren Untersuchungen teilzunehmen. Für Rückfragen stehen wir Ihnen natürlich gerne zur Verfügung.

Vermerke zum Aufklärungsgespräch:

Düsseldorf, den

Patient

Arzt

Name, Vorname

.....*

PASI:

(Frederickson und Petterson. PASI: Psoriasis Area and Severity Index. Dermatologica 1978; 157: 238 – 244).

Für Erythem, Infiltration und Schuppung gilt:
nicht 0 1 2 3 4 sehr stark

Für Befall (Anteil der betroffenen Körperoberfläche der vier Körperregionen) gilt:
Befall < 10 % 0 1 2 3 4 5 6 Befall > 90 %

<u>Kopf</u>	Erythem	0	1	2	3	4		
	Infiltration	0	1	2	3	4		
	Schuppung	0	1	2	3	4		
	Befall	0	1	2	3	4	5	6
<u>Rumpf</u>	Erythem	0	1	2	3	4		
	Infiltration	0	1	2	3	4		
	Schuppung	0	1	2	3	4		
	Befall	0	1	2	3	4	5	6
<u>Arme</u>	Erythem	0	1	2	3	4		
	Infiltration	0	1	2	3	4		
	Schuppung	0	1	2	3	4		
	Befall	0	1	2	3	4	5	6
<u>Beine</u>	Erythem	0	1	2	3	4		
	Infiltration	0	1	2	3	4		
	Schuppung	0	1	2	3	4		
	Befall	0	1	2	3	4	5	6

Gelenkschmerzen

nicht 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
sehr stark