

# **Vergleich unterschiedlicher Biopsietechniken zur molekularen Diagnostik bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen**

**Anais Marie Theresa Doll**

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Lutz Renders  
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Kilian Eyerich, Ph.D.  
2. Priv.-Doz. Dr. Felix Lauffer, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 11.04.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät der Medizin am 13.06.2023 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Psoriasis und atopisches Ekzem . . . . .	6
1.1.1	Epidemiologie . . . . .	6
1.1.2	Belastung für die Patienten . . . . .	6
1.1.3	Kosten . . . . .	8
1.1.4	Klinik und Ätiopathogenese . . . . .	8
1.1.5	Diagnostik . . . . .	12
1.1.6	Therapie . . . . .	15
1.2	Molekulare Diagnostik . . . . .	21
1.2.1	Entwicklung der molekularen Diagnostik . . . . .	21
1.2.2	Molekulare Signatur von Psoriasis und atopisches Ekzem . . . . .	22
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Material, Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Material . . . . .	26
3.1.1	Probenentnahme . . . . .	26
3.1.2	RNA-Isolation . . . . .	27
3.1.3	Bioanalyzer . . . . .	28
3.1.4	cDNA-Synthese . . . . .	29
3.1.5	rt-PCR . . . . .	30
3.2	Methoden . . . . .	31
3.2.1	Patientenkohorte . . . . .	31
3.2.2	Methodik . . . . .	31
3.2.3	Datenauswertung . . . . .	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.1	Patienten Population . . . . .	36
4.2	Vergleich der Histologie von Macro- und Microbiopsie . . . . .	38

4.3	Schritte zur <i>Molecular Classifier</i> Entwicklung und Vergleich zwischen Macro- und Microbiopsie . . . . .	40
4.3.1	RNA Konzentration von Macro- und Microbiopsien . . . . .	40
4.3.2	Untersuchung der RNA-Qualität durch Bioanalyzer . . . . .	42
4.3.3	Sequenzierungsdaten von Macro- und Microbiopsien . . . . .	43
4.3.4	rt-PCR Daten von Macro- und Microbiopsien . . . . .	46
4.3.5	<i>Molecular Classifier</i> von Macro- und Microbiopsien . . . . .	49
4.4	Evaluation durch Patienten . . . . .	50
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
5.1	Vergleich von Macro- und Microbiopsien aus verschiedenen Blickpunkten	53
5.1.1	Vergleich der Biopsieverfahren . . . . .	53
5.1.2	Vergleich der Histologie . . . . .	54
5.1.3	Vergleich der <i>Molecular Classifier</i> Ergebnisse . . . . .	54
5.2	Schlussfolgerung und Ausblick . . . . .	56
5.2.1	Möglichkeiten im Bereich der minimal invasiven Diagnostik . . . . .	56
5.2.2	Minimal invasive und molekulare Diagnostik bei anderen chronisch entzündlichen Dermatosen . . . . .	58
<b>6</b>	<b>Fazit der Ergebnisse</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Synopsis</b>	<b>65</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>78</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>80</b>
	<b>Anhang</b>	<b>82</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>83</b>

# Abkürzungsverzeichnis

- A.E.** Atopisches Ekzem. 6
- AMP** Antimikrobielle Peptide. 9
- BSA** Body Surface Area. 12
- CCL27** Chemokine (C-C motif) Ligand 27. 22
- cDNA** Complementary DNA. 33
- CT** Cycle-Threshold. 47
- CXCL9** C-X-C Motif Chemokine Ligand 9. 60
- DEPC** Diethylpyrocarbonate. 33
- DLQI** Dermatology Life Quality Index. 6
- DNA** Deoxyribonucleic acid. 16
- EASI** Eczema Area and Severity Index. 13
- ELISA** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. 57
- IFN** Interferon. 16
- IgE** Immunglobulin E. 12
- IL** Interleukin. 10
- ILC2** Typ-2 innate Lymphozyten. 11
- JAK** Janus Kinase. 20



**MC** *Molecular Classifier*. 22

**NOS2** Inducible Nitric Oxidase Synthase 2. 22

**NRS** Numerische Rating Skala. 50

**PASI** Psoriasis Area Severity Index. 7

**PCA** Principal Component Analysis. 44

**PCR** Polymerase chain reaction. 21

**PDE** Phosphodiesterase. 17

**PGA** Physician Global Assessment. 13

**RIN** RNA Integrity Number. 32, 42

**RNA** Ribonucleic acid. 24

**rt-PCR** Real-time polymerase chain reaction. 24

**SCORAD** Scoring Atopic Dermatitis. 13

**TNF** Tumor Necrosis Faktor. 17

**TPMT** Thiopurinmethyltransferase. 20

**TSLP** Thymic stromal lymphopoietin. 11

# 1 Einleitung

## 1.1 Psoriasis und atopisches Ekzem

### 1.1.1 Epidemiologie

Psoriasis und atopisches Ekzem (A.E.) gehören zu den am häufigsten vorkommenden chronisch entzündlichen Hauterkrankungen. Weltweit sind in etwa 125 Millionen Personen an Psoriasis erkrankt (Armstrong & Read, 2020), in Europa liegt die Prävalenz bei 1,9% (Parisi et al., 2020). Es gibt starke regionale Abweichungen, so liegt zum Beispiel die Prävalenz im asiatischen Raum bei 0,5% und in Norwegen bei 8% (Armstrong & Read, 2020).

Vor allem in entwickelten Ländern tritt das A.E. sehr häufig auf. Die Prävalenz stieg in den letzten 30 Jahren stetig und scheint nun ein Plateau zwischen 10-20% erreicht zu haben (Deckers et al., 2012; Weidinger & Novak, 2016). Mit einer Prävalenz von 15-38% sind Kinder häufiger betroffen (Ballardini et al., 2013). Einige Autoren (Schmitt, Schmitt, Kirch, & Meurer, 2009) geben das A.E. als häufigste chronische Erkrankung im Kindesalter überhaupt an.

### 1.1.2 Belastung für die Patienten

Für Betroffene kommt es häufig zu zusätzlichen psychosozialen Beeinträchtigungen. Mehrere Studien zeigen, dass die Lebensqualität von Psoriasis und A.E. betroffene Personen deutlich reduziert ist (Eckert et al., 2018; Patel et al., 2017). Dies wirkt sich auf sämtliche Lebensbereiche wie Arbeit, Familie, sexuelle Beziehungen oder körperliches und emotionales Wohlbefinden aus (Weiss et al., 2002). Zudem zeigte eine Studie von Schuster und Kollegen (Schuster et al., 2021), dass Psoriasis-Patienten im Gegensatz zu gesunden Personen insgesamt weniger glücklich und unzufriedener mit ihrem Leben sind.

Der Dermatology Life Quality Index (DLQI) ist ein hilfreiches Tool, um die Auswirkungen chronischer Hauterkrankungen auf die Lebensqualität betroffener Personen zu bewerten. Der Fragebogen besteht aus 10 Fragen und die Gesamtpunktzahl reicht von

0-30. Eine Punktzahl von 0-1 bedeutet keine Beeinträchtigung, 2-5 Punkte eine kleine und 6-10 Punkte eine mäßige Beeinträchtigung. Ab einer Punktzahl von 10 wird von einem starken Einfluss und ab 20 von einem sehr starken Einfluss der Lebensqualität ausgegangen. (Basra, Fenech, Gatt, Salek, & Finlay, 2008).

Interessanterweise korreliert letzterer nicht immer mit dem Schweregrad der Hautveränderungen, bei Psoriasis meistens am PASI (Psoriasis Area Severity Index) gemessen, mit der erlebten psychischen Belastung (Kimball, Jacobson, Weiss, Vreeland, & Wu, 2005). Häufig werden die Symptome wie Juckreiz, Schuppung etc. belastender als die erhöhten Hautscores erlebt, die oftmals als Endpunkt vieler Studien definiert werden (Barrett, Hahn-Pedersen, Kragh, Evans, & Gnanasakthy, 2019).

Zudem kommt es durch die Sichtbarkeit der Läsionen zur Stigmatisierung von Patienten, was häufig zum sozialen Rückzug der Patienten führt und somit automatisch zur Verschlechterung der Lebensqualität (Misery, 2017; Schmid-Ott, Jaeger, Kuensebeck, Ott, & Lamprecht, 1996).

Nicht nur durch die Erkrankung selbst, sondern auch durch assoziierte Komorbiditäten kommt es zur Verschlechterung der Lebensqualität. Bekannt ist, dass Patienten mit A.E. ein erhöhtes Risiko für Asthma oder Rhinokonjunktivitis allergica aufweisen (Eckert et al., 2018). Weiter sind Assoziationen mit chronischer Rhinitis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und auch psychischen Erkrankungen wie Depression oder Angststörungen bekannt (Gandhi, Pirozzi, & Graham, 2017; Paller et al., 2018).

Psoriasis wird immer mehr als Systemerkrankung erkannt. Es gibt eine starke Assoziation mit dem metabolischen Syndrom (Gisoni, Fostini, Fossa, Girolomoni, & Targher, 2018; Nestle, Kaplan, & Barker, 2009). Im Rahmen der Psoriasis-Arthritis sind die Gelenke mitbetroffen. Auch die Rate an Alkoholabusus ist bei Psoriasis Patienten deutlich erhöht (Brenaut et al., 2013).

Zudem gibt es Hinweise, dass Psoriasis-Patienten ein leicht erhöhtes Risiko für maligne Tumorerkrankungen aufweisen, insbesondere für Lymphome oder Karzinome der Haut (Vaengebjerger, Skov, Egeberg, & Loft, 2020). Eines der Hauptsymptome über welche Patienten sowohl bei Psoriasis als auch bei A.E. klagen ist starker Juckreiz. Schon länger ist eine starke Korrelation zwischen dem Schweregrad des Juckreizes und Depression bekannt (Gupta, Gupta, Schork, & Ellis, 1994).

### 1.1.3 Kosten

Zusätzlich zu den psychosozialen Beeinträchtigungen, erleben die Betroffene auch eine zusätzliche finanzielle Belastung.

Nicht nur durch die hohe Prävalenz, sondern auch durch den chronischen Verlauf sowie hohe assoziierte Therapiekosten stellen die zwei Erkrankungen eine hohe wirtschaftliche Belastung für die Gesellschaft dar. Man unterscheidet zwischen direkten Kosten, verursacht durch Therapiekosten, zum Beispiel Arzneimittel oder Krankenhausaufenthalte, und indirekten Kosten, verursacht durch Produktivitätsverlust und damit verbundene Arbeitsausfälle oder Arbeitsreduzierung. Zudem verursachen die assoziierten Begleiterkrankungen ebenfalls hohe Kosten. Eine genaue Kostenberechnung gestaltet sich schwierig, jedoch wurden die jährlichen Therapiekosten in Deutschland pro Patient pro Jahr für das atopische Ekzem von 2017 bis 2019 auf 3616 € +/- 6452 € (Mohr et al., 2021) und für Psoriasis von 2013 bis 2014 auf 5543 € +/- 8044 € (Jungen et al., 2018) berechnet.

Zudem fallen patientenseitige Kosten an, zum Beispiel in Form von Zuzahlungen von ärztlichen Leistungen oder durch rezeptfreie Medikamente und Hilfsmittel. 2007 gaben Befragte an, die von Psoriasis betroffen sind, jährliche Zusatzkosten in Höhe von 988 € bis 2785 € zu haben. Im Gegensatz dazu gaben Nichtbetroffene an, jährlich 464 € bis 735 € für medizinische Zuzahlungen auszugeben (Augustin et al., 2011).

### 1.1.4 Klinik und Ätiopathogenese

#### Psoriasis

Die klassische Psoriasis Läsion ist eine scharf begrenzte, rundliche, erythematöse infiltrierte Plaque mit silbrig-groblamellärer Schuppung siehe Abbildung 1.1. Typische Lokalisationen für die Plaque-Psoriasis sind die Ellenbogen 1.1A), Knie 1.1B), Bauchnabel 1.1C), Rima ani und auch Kopfhaut 1.1D) (Schon & Boehncke, 2005). Im Gegensatz dazu ist die Psoriasis inversa 1.1E), wie der Name nahelegt an intertriginösen Arealen lokalisiert. Hier steht die Schuppung im Hintergrund, und es zeigen sich oft schmerzhafte erythematöse nässende scharf begrenzte Plaques. Eine weitere Verlaufsform ist die Psoriasis guttata 1.1F), die oft durch einen Streptokokken-Infekt getriggert wird und einen disseminierten punktförmigen meist einmaligen Verlauf aufweist. Die Nägel können in Form von Tüpfelnägel, Ölflecken oder subunguale Hyperkeratosen ebenfalls betroffen sein 1.1G). Eine besondere Verlaufsform ist die Psoriasis palmoplantaris, die ausschließlich Hand- und Fußflächen betrifft. Es zeigen sich stark hyperkeratotische,

oft schmerzhafte Plaques mit tiefen Rhagaden. Eine äußerst schwere Verlaufsform ist die erythrodermische Psoriasis, die das gesamte Integument betrifft und aufgrund ihres hohen Energieverbrauchs potenziell lebensbedrohlich ist (Fritsch & Schwarz, 2018). Bei circa 5-20% sind ebenfalls die Gelenke im Rahmen der Psoriasisarthritis betroffen (Schon & Boehncke, 2005). Am häufigsten sind die Gelenke der Hände und Füße betroffen mit klassischerweise asymmetrischer Lokalisation, morgendlichen Schwellungen sowie Bewegungseinschränkung. Der Verlauf kann destruktiv bis zur Arthritis mutilans sein. Bei dieser Form sind die Nägel häufiger mitbetroffen (Fritsch & Schwarz, 2018).



Abbildung 1.1: Psoriasis Abbildungen (Archiv Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Biederstein – TUM) A) Psoriasis Plaque am Ellenbogen B) Psoriasis Plaque am Knie C) Psoriasis Plaque am Bauchnabel D) Psoriasis capitis E) Psoriasis inversa F) Psoriasis guttata G) Nagelpsoriasis mit Ölflecken und Hyperkeratosen

Die Ätiopathogenese ist bis heute nicht vollständig geklärt, sie gilt jedoch als multifaktoriell. Man geht von einer genetischen Prädisposition aus, jedoch spielen auch Umwelt, Geschlecht sowie Alter eine große Rolle (Chandra, Ray, Senapati, & Chatterjee, 2015). Auch Trigger Faktoren wie mechanische Reize im Sinne von Köbnerisierung, Infekte oder Medikamente scheinen in der Initiierung von psoriasiformen Plaques relevant zu sein (Rendon & Schakel, 2019). Eine maßgebliche Rolle scheint jedoch eine Dysregulation des Immunsystems mit Erhöhung bestimmter Zytokine zu spielen. Sowohl das angeborene Immunsystem, unter anderem durch Aktivierung von dendritischen Zellen durch antimikrobielle Peptide (AMP) als auch das erworbene Immunsystem unter ande-

rem durch Umwandlung von naiven T-Zellen in Th-17 Zellen (Fritsch & Schwarz, 2018; Rendon & Schakel, 2019) führen letztendlich zu Hochregulierung verschiedener Zytokine wie IL-17 (Lauffer et al., 2020) und IL-23 (Hawkes, Yan, Chan, & Krueger, 2018). Dadurch kommt es unter anderem zur epidermalen Hyperproliferation sowie gestörte Differenzierung von Keratinozyten und somit zum klinischen Bild der Psoriasis.

### **Atopisches Ekzem**

Das klinische Bild des A.E. definiert sich durch eine Abfolge verschiedener Hautveränderungen oder auch „Stadien“ (siehe Abbildung 1.2A-F): zuerst bildet sich ein Erythem durch ein intraepidermales Ödem aus: „Stadium erythematodes“, folglich kommt es zur Ausbildung von spongiotischen Bläschen: „Stadium vesiculosum“, diese sind mit klarer Flüssigkeit gefüllt und jucken meist stark. Letztere platzen leicht und es kommt zum „Stadium madidans“ mit serösen nässenden Plaques, wobei das eiweißreiche Exsudat im „Stadium crustosum“ verkrustet. Die Läsionen heilen schuppig im „Stadium squamosum“ ab. Bei chronischem Verlauf bilden sich Lichenifikationen aus (Fritsch & Schwarz, 2018). Als prominenteste Form in der Ekzem-Gruppe wird hier vor allem das atopische Ekzem behandelt. Der Verlauf ist chronisch rezidivierend und beginnt meistens zwischen dem ersten und dritten Lebensjahr. Die Morphologie sowie die Lokalisationen wandeln mit dem Lebensalter, beim Säugling/Kleinkind sind typischerweise das Gesicht, Kopf sowie Streckseiten der Extremitäten betroffen, später sind vorzugsweise die Beugen befallen. Nicht selten sind Hals und Nacken im Rahmen der „Head and Neck Dermatitis“ betroffen (1.2G).

Gefürchtete Komplikationen sind Superinfektionen durch Bakterien (Impetiginisierung durch *Staphylococcus aureus*), Viren (Eczema herpeticatum durch Herpes simplex Virus oder Eczema molluscatum durch *Molluscum contagiosum*) oder seltener, Pilzen. Weiterhin zählen zur Gruppe der Ekzeme das nummuläre, seborrhoische, dyshidrosiforme, prurigoforme, Kontaktekzem und hyperkeratotisch-rhagadiforme Hand- und Fußekzem.

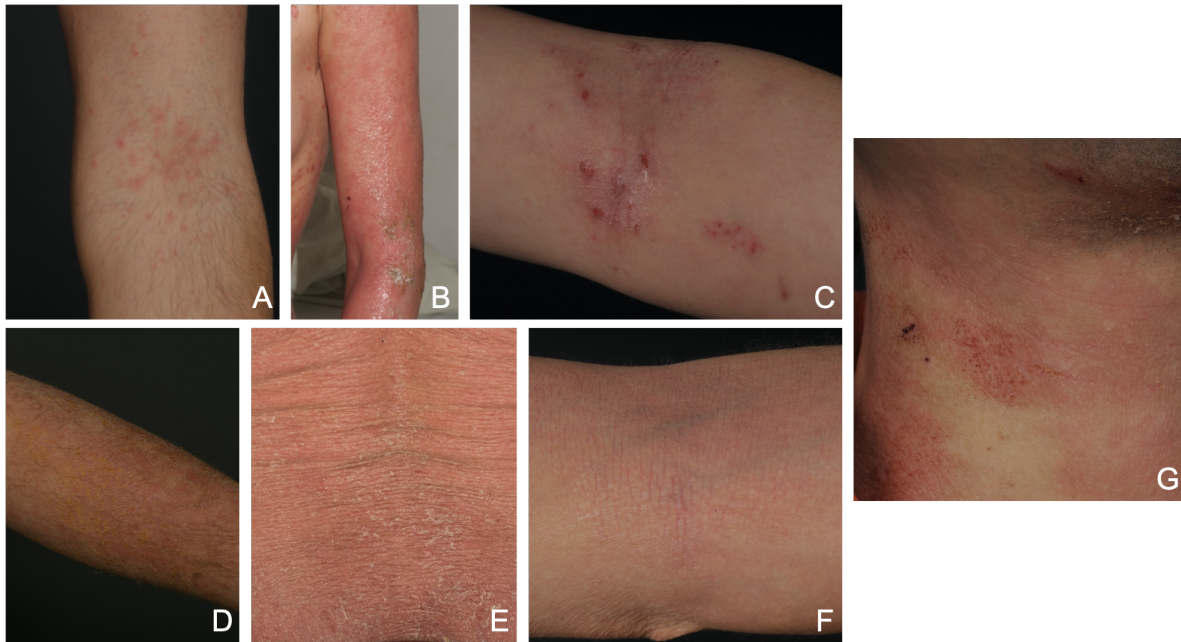


Abbildung 1.2: A.E. Abbildungen (Archiv Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Biederstein -TUM)  
 A) Stadium erythematodes B) Stadium vesiculosum/madidans C) Stadium madidans/crustosum D)  
 Stadium crustosum E) Stadium squamosum F) Lichenifikationen G) Head and Neck Dermatitis

Die Ätiopathogenese ist auch hier nicht vollständig geklärt, eine multifaktorielle Genese wird angenommen. Durch viele Zwillings- und Familien Studien konnte die genetische Prädisposition als einer der Entstehungsfaktoren des A.E. erkannt werden (Van Eerde- wegh et al., 2002). Zudem wurden zwei loss-of-function-Mutationen im Filaggrin Gen als Risikofaktor zur Entstehung des A.E. identifiziert (Palmer et al., 2006). Circa 10-30% der Patienten mit A.E. weisen die Mutation auf (Otsuka et al., 2017). Das Filaggrin Protein spielt eine Schlüsselrolle in der Bildung der Hautbarriere. Durch Filaggrin Mangel kommt es zur verminderten Hydratation des Stratum corneums. Durch geringeren Filaggrinabbau und daraus resultierenden verminderten Polycarboxylsäuren kommt es zum erhöhten Oberflächen-pH-Wert der Haut sowie zum gestörten Zytoskelett der Keratinozyten (Fritsch & Schwarz, 2018). Zu der gestörten Hautbarriere zeigt sich eine Dysbiose im Hautmikrobiom mit *Staphylococcus aureus* Kolonisation (Arikawa et al., 2002). Sowohl das innate als auch das adaptive Immunsystem spielen eine ganz maßgebliche Rolle in der Entstehung der Erkrankung. Durch die gestörte Hautbarriere werden zelleigene Molekülstrukturen wie Alarmine freigesetzt, die inflammatorische dendritische epidermale Zellen aktivieren, welche eine Th2 vermittelte Immunantwort auslösen. Keratinozyten werden ebenfalls zur Freisetzung von Chemokinen wie CCL17, CCL22 aber auch IL-1beta, IL-33 oder TSLP stimuliert. Dadurch werden hautresidente ILC2 akti-

viert und eine Th-2 vermittelte Immunantwort ausgelöst. Aktivierte Th2 Zellen setzen u.a. IL-4, IL-5 und IL-31 frei. IL-4 und IL-31 fördern auch den IgE Klassenwechsel in B-Zellen. ILC2 produzieren ebenfalls IL-5 und IL-31 welche die Typ-2 Immunreaktion und IgE Produktion verstärkt. Zudem können Typ-2 Zytokine wie IL-4, IL-13 oder IL-31 direkt sensorische Nerven aktivieren, was eine große Rolle bei der Juckreiz Entstehung und Aufrechterhaltung spielt. Diese unterschiedlichen Pathomechanismen verlaufen nicht parallel zueinander, sondern beeinflussen sich gegenseitig. Zum Beispiel beeinflussen Typ-2 Zytokine durch die Inhibition der Filaggrin Expression die Ausbildung einer epithelialen Barriere und fördern so die Mikrobiom Dysbiose (Koberle & Biedermann, 2018; Langan, Irvine, & Weidinger, 2020; Weidinger, Beck, Bieber, Kabashima, & Irvine, 2018). Zudem führen viele Umweltfaktoren zur Verschlechterung des Ekzems, wie Allergene, psychischer oder physischer Stress, Irritantien (Fritsch & Schwarz, 2018).

### **1.1.5 Diagnostik**

Bis heute gilt die klinische sowie histologische Untersuchung als Gold-Standard zur Diagnosestellung der Psoriasis und des A.E.

#### **Psoriasis**

Bei der klassischen Präsentation der Psoriasis mit, wie in Abschnitt 1.1.4 genannten pathognomonischen scharf abgrenzbaren erythematös-silbrig-groblamellär-schuppigen Plaques, ist die Diagnose mit geschultem Blick in manchen Fällen schon klinisch zu stellen. Jedoch stellt sich das klinische Bild nicht immer so typisch dar und weitere diagnostische Tools werden benötigt. Hilfreich kann zum Beispiel die Anamnese sein: Familienprädisposition, Gelenksbeschwerden, Nagelbeteiligung etc.

In den meisten Fällen wird zur richtigen Diagnosestellung eine Probebiopsie herangezogen. Histologische Merkmale in der Epidermis wie Akanthose (Verbreitung des Stratum spinosum), tief ausgezogene Reteleisten, Parakeratose (Verhornungsstörung mit Verbleib der Zellkerne im Stratum corneum) und Verlust des Stratum granulosum, aber auch Munro-Mikroabszesse (subkorneale neutrophile Granulozyten Ansammlung) sind typisch. In der Dermis findet sich ein Infiltrat aus Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen (U. Mrowietz & Prinz, 2018).

Der Schweregrad der Erkrankung kann durch verschiedene Scores erhoben werden, zum Beispiel: Body Surface Area (BSA), hier wird das Ausmaß der betroffenen Körperoberfläche ermittelt, hierbei gilt eine Handfläche als 1% der Körperoberfläche. Der Physician Glo-



bal Assessment (PGA) erfasst die Stärke des Erythems, Schuppung und Infiltration und reicht auf einer Skala von 0 bis 6. Der am weitesten verbreiteten Score: PASI erfasst pro Körperteil den prozentualen Anteil der betroffenen Haut. In jedem Areal wird die Stärke (von 0 bis 4) von Erythem, Schuppung sowie Infiltration gemessen. Insgesamt reicht die Punktzahl von 0-72 (Bozek & Reich, 2017).

Wenn der BSA  $\leq 10$  und PASI  $\leq 10$  und DLQI  $\leq 10$  sind, wird die Psoriasis als leicht bewertet. Bei PSA  $> 10$  oder PASI  $> 10$  und DLQI  $> 10$ , wird die Psoriasis als mittelschwer bis schwer bewertet (U. Mrowietz et al., 2011).

## **Atopisches Ekzem**

Bei typischem Krankheitsbild, Patienten- sowie Familienanamnese kann die Diagnose ebenfalls in manchen Fällen klinisch gestellt werden.

Zur besseren Objektivierung der Diagnosestellung haben sich die Diagnosekriterien nach Hanifin und Rajka bis heute durchgesetzt. 3 Hauptkriterien sowie 3 Nebenkriterien müssen erfüllt sein, siehe Tabelle 1.1 (Hanifin & Rajka, 1980).

Zur Abgrenzung anderer Hauterkrankungen wird häufig eine Probebiopsie entnommen. Das histologische Bild verändert sich je nach klinischem Stadium. In der akuten Phase sind meist Spongiose, Orthokeratose, seröse Krusten sowie ein perivaskuläres lymphozytäres Infiltrat in der Dermis zu sehen. Im chronischen Stadium zeigen sich histologisch eine Parakeratose, vermehrt Mastzellen und eosinophile Zellen im entzündlichen Infiltrat (Homey, Ruzicka, & Wollenberg, 2018).

Zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung wurden auch hier viele verschiedene Scores entwickelt. Vor allem zwei Scoringsysteme haben sich bewährt: Eczema Area and Severity Index (EASI) sowie Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD). Der EASI misst, angelehnt an den PASI zum einen, den Anteil (in %) der betroffenen Körperoberfläche pro Körperteil und zum anderen die Intensivität auf einer Skala von 0-3 von Erythem, Lichenifikation, Exkoration sowie Infiltration. Werte von 0 bis 72 können erreicht werden. Im SCORAD werden einerseits, das Ausmaß von betroffener Haut sowie Intensität von Erythem, Ödem, Krustenbildung, Exkoration, Lichenifikation sowie Trockenheit erfasst. Andererseits werden subjektive Symptome wie Juckreiz und Schlaflosigkeit mit einberechnet. Die maximale Punktzahl beträgt 103.

Tabelle 1.1: Diagnostische Kriterien des atopischen Ekzems nach Hanifin und Rajka

Major Kriterien	Minor Kriterien
Juckreiz	Ichthyosis, Hyperlinearität
Typische Morphologie	Soforttyp-Sensibilisierungen
Chronisch-rezidivierender Verlauf	Erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel
Positive Eigen- oder Familienanamnese	Früher Krankheitsbeginn
	Neigung zu kutanen Infektionen
	Neigung zu Hand- und Fußekzem
	Mamillenekzem
	Cheilitis
	Rezidivierende Konjunktivitis
	Dennie-Morgan-Falte
	Keratokonius
	Anteriorer subkapsulärer Katarakt
	Halonierung
	Gesichtsblässe oder Gesichtserythem
	Pityriasis alba
	Fältelung des Nackens
	Juckreiz bei Schwitzen
	Unverträglichkeit von Wolle oder Lösemitteln
	Perifollikuläre Akzentuierung
	Nahrungsmittelüberempfindlichkeit
	Abhängigkeit von Umwelt- und psychischen Faktoren
	Keratosis follicularis
	Weißer Dermographismus

Jedoch kann die Diagnosestellung in manchen Fällen zu einer wahren Herausforderung werden, wie zum Beispiel in Abbildung 1.3 zu sehen ist. Vor allem in Arealen wie Kopf oder Hände zeigen sich die zwei Erkrankungen sehr ähnlich und sind klinisch nicht voneinander zu unterscheiden. Selbst histologisch kann in diesen Fällen die Diagnose oft nicht klar zugeordnet werden. Es zeigen sich ähnliche Charakteristika wie Parakeratose, Akanthose, Spongiose oder dilatierte Kapillare in der Dermis (Aydin, Engin, Oguz, Ilvan, & Demirkesen, 2008).



Abbildung 1.3: Unklare Phänotypen (Archiv Klinik und Poliklinik für Dermatologie am Biederstein-TUM) A) Handekzem DD Psoriasis palmaris B) und C) A.E. DD Psoriasis Plaques-Typ

## 1.1.6 Therapie

### Psoriasis

Insgesamt sollte das Therapieziel die komplette Erscheinungsfreiheit sein. Jedoch scheint dies oft unrealistisch zu sein, weswegen das Ziel des PASI-75 eingeführt worden ist. Dies bedeutet, dass die Therapie erfolgreich ist, wenn eine Verbesserung um 75% des ursprünglichen PASI Werts erreicht ist. Zudem gehört die Verbesserung der Lebensqualität ebenfalls zu den Therapiezielen, hier soll eine DLQI Punktzahl von maximal zwei erreicht werden (Nast et al., 2021).

Bei immer spezifischeren und effektiveren Therapie-Entwicklungen wird zunehmend das Ziel PASI-90 oder  $\text{PASI} \leq 3$  geführt.

Das nach der aktuellen Leitlinie empfohlene Therapieregime ist nach Schweregrad der Erkrankung zu wählen, siehe Abbildung 1.4 (Nast et al., 2021):

Bei leichter Psoriasis ist in der Regel eine topische Therapie ausreichend. Zur Auswahl stehen die am weitesten verbreiteten topischen Kortikosteroide. Es existieren vier verschiedene Potenzklassen, die Topika können in der akuten Phase bis zu zweimal täglich

appliziert werden. Bei Besserung des Befundes wird eine proaktive Therapie empfohlen, mit ein bis zwei Applikationen pro Woche. Nebenwirkungen bei langfristiger Anwendung können unter anderem Hautatrophie, Teleangiektasien oder Striae sein (Armstrong & Read, 2020).

Alleine oder in Kombination mit letzteren, können Vitamin D3 Analoga verwendet werden. Durch Bindung an Vitamin D Rezeptoren von T-Lymphozyten sowie Keratinozyten wird die Keratinozyten Proliferation blockiert und die Differenzierung gefördert (Armstrong & Read, 2020). Irritationen sowie Juckreiz können auftreten, bei Niereninsuffizienz wird die Verwendung allerdings nicht empfohlen.

Off-label können auch topische Calcineurin-Inhibitoren verwendet werden. Durch Hemmung von IL-2 und IFN-gamma Bildung wird die T-Lymphozyten Aktivierung inhibiert (Armstrong & Read, 2020). Hautirritationen können als Nebenwirkung auftreten.

Dithranol wird seit langer Zeit bei Psoriasis eingesetzt, nach Irritation der Läsion kommt es zur Abheilung. Hier kann es zu starken Verfärbungen kommen.

Die anderen in der Leitlinie genannten topischen Therapien haben im heutigen klinischen Alltag kaum Verwendung.

Bei mittel- bis schwerer Psoriasis wird die Einleitung einer Systemtherapie empfohlen. Wenn von einer konventionellen Therapie kein Erfolg zu erwarten ist, also bei sehr starker Ausprägung oder Beteiligung sichtbarer Areale wie zum Beispiel Kopfhaut, Nägel aber auch Genitalregion, werden die konventionellen Systemtherapeutika schon als first line Therapie empfohlen.

Dazu zählen die Lichttherapie aber auch Acitretin. Als synthetisches Retinoid fördert es die Differenzierung von Keratinozyten, wirkt antiproliferativ, antiinflammatorisch und inhibiert neutrophile Chemotaxis (Lee & Li, 2009). Aufgrund des erhöhten Nebenwirkungsprofils (unter anderem Erhöhung der Blutfettwerte, Haut- und Schleimhauttrockenheit) findet es im klinischen Alltag kaum Verwendung.

Ciclosporin, als Calcineurin-Inhibitor wirkt immunsuppressiv durch Hemmung von T-Lymphozyten. Langzeitverwendungen werden aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen, vor allem arterielle Hypertonie und Nephrotoxizität aber auch Blutbild Veränderungen oder erhöhtes Lymphom Risiko, nicht empfohlen (Berth-Jones, 2005).

Methotrexat wurde schon 1958 bei Psoriasis eingesetzt. Durch irreversible Hemmung der Dihydrofolsäure-Reduktase können keine Purine und Pyrimidine synthetisiert werden, somit wird die DNA-Synthese gehemmt. Nebenwirkungen wie gastrointestinale Beschwerden, Leukopenie und Lebertoxizität können auftreten.

Zur Gruppe der *small molecules* zählt man Apremilast als PDE4-Hemmer. Die Wirkung ist der, der Biologika deutlich unterlegen. Das Sicherheitsprofil ist bei diesem Präparat besonders gut (Fritsch & Schwarz, 2018).

Als sehr spezifische, sehr wirksame und nebenwirkungsarme Arzneimittel, haben Biologika die Therapie der Psoriasis revolutioniert. Zusammengefasst kann man die Biologika in 4 Gruppen aufteilen:

Die als erste verwendeten Präparate sind aus der TNF-alpha Inhibitoren Gruppe. Infliximab, welches intravenös alle 8 Wochen verabreicht wird und Adalimumab, welches als subkutane Injektion alle 2 Wochen verwendet wird, sind die zwei am häufigsten angewandten Vertreter dieser Gruppe.

Zur Gruppe der Anti-IL-17 Antikörper zählen Secukinumab und Ixekizumab, diese binden am Subtyp IL-17A, Bimekizumab an den Subtypen IL-17A und IL-17F, Brodalumab ist gegen den IL-17-Rezeptor gerichtet.

Zur Gruppe der Anti-IL-12/23 Antikörper zählt Ustekinumab. Die Applikation erfolgt subkutan alle 3 Monate.

Zur Gruppe der IL-23 Inhibitoren zählen Guselkumab, Tildrakizumab sowie Risankizumab. Durch IL-23 Blockierung wird der TH17 Pathway inhibiert, die Anwendungsfrequenz dieser Gruppe ist seltener als bei anderen (Armstrong & Read, 2020).

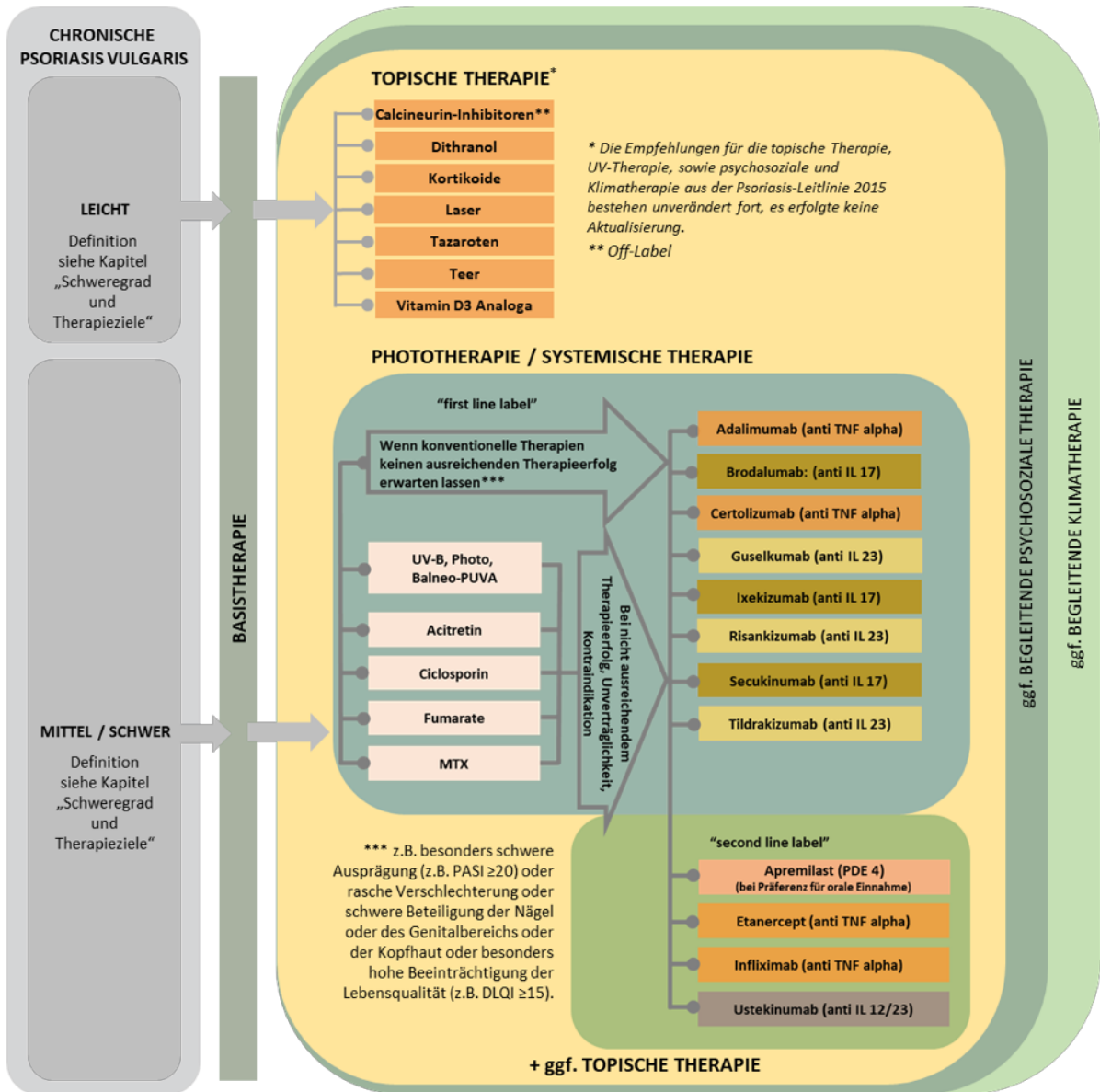


Abbildung 1.4: Therapieoptionen bei Psoriasis (Nast et al., 2021)

## Atopisches Ekzem

Nach aktuellen internationalen Empfehlungen, soll die Neurodermitis Therapie angepasst an den klinischen Befund in verschiedenen Stufen erfolgen (Akdis et al., 2006). Das Stufentherapie-Prinzip wurde in der aktuellen deutschen Leitlinie für das atopische Ekzem übernommen (Werfel et al., 2016) (Abbildung 1.5):

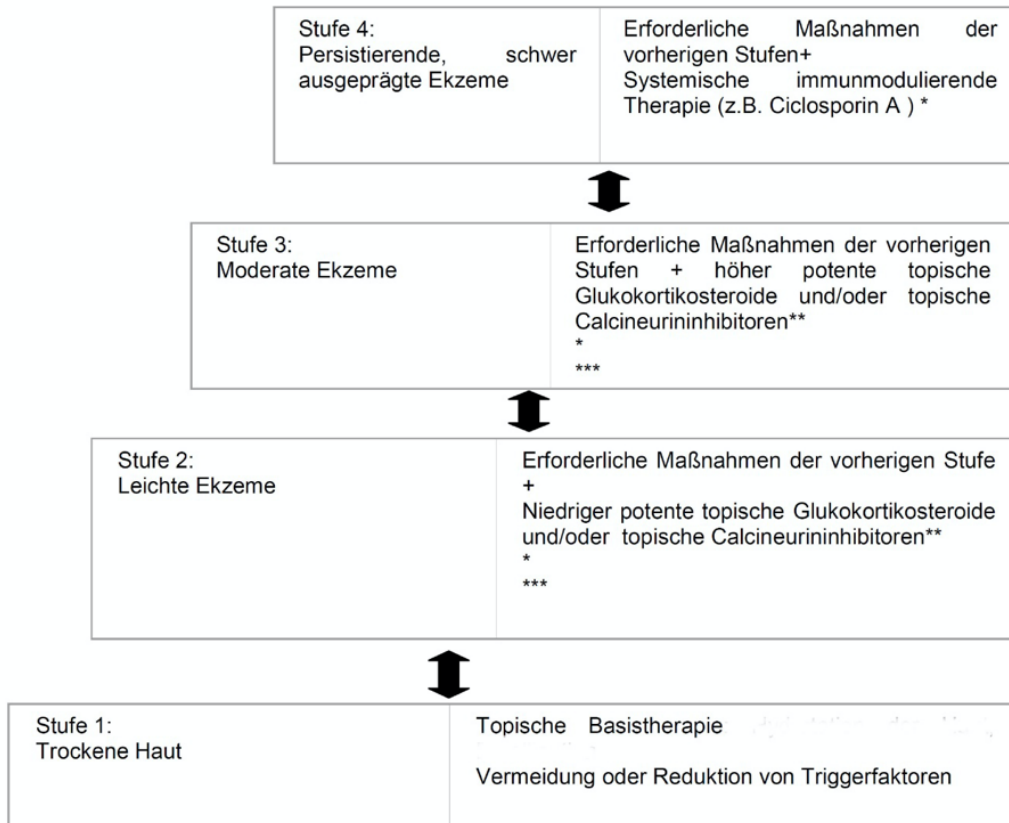


Abbildung 1.5: Stufentherapie des Atopischen Ekzems (Werfel et al., 2016) \*Eine UV- Therapie ist häufig ab Stufe 2 unter Berücksichtigung der Altersbeschränkung (nicht im Kindesalter) indiziert. Cave: keine Kombination mit Ciclosporin A und topischen Calcineurininhibitoren \*\*First-line Therapie: In der Regel topische Glukokortikosteroide, bei Unverträglichkeit/Nichtwirksamkeit und an besonderen Lokalisationen (z.B. Gesicht, intertriginöse Hautareale, Genitalbereich, Capillitium bei Säuglingen) topische Calcineurininhibitoren \*\*\*Die zusätzliche Anwendung von antipruriginösen und antiseptischen Wirkstoffen können erwogen werden.

Bei jeder Form des A.E. sollte eine konsequente Basispflege mit rückfettenden Topika erfolgen. Ziel ist es, die Hautbarriere zu stärken. Zur Basistherapie gehört ebenfalls die Vermeidung von Provokationsfaktoren wie Irritantien, bestimmte Allergene etc.

Auf Stufe 2 und 3 wird die Applikation von topischen Glukokortikosteroiden sowie Cal-

cineurinhibitoren in unterschiedlicher Stärke empfohlen (siehe Abbildung 1.5). Durch Okklusiv-Verwendung kann die Wirksamkeit der Topika deutlich erhöht werden. Nach Abheilung können weitere Schübe durch eine „proaktive Therapie“ vorgebeugt werden (Peserico et al., 2008). Die entzündungshemmenden Präparate sollen hierfür weiterhin 1 bis 2 Mal pro Woche verwendet werden.

Ab Stufe 2 kann auch zusätzlich eine Phototherapie vor allem mit UV-B und UV-A erfolgen. Aufgrund der vorzeitigen Hautalterung sowie des erhöhten kanzerogenen Risikos ist diese Form der Therapie nicht als Langzeittherapie vorgesehen.

Ab Stufe 4 wird eine Systemtherapie empfohlen. Zur Auswahl stehen verschiedene Präparate. Orale Glukokortikoide können bei akuter Exazerbation des Ekzems durchaus wirksam sein. Aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen wie Hyperglykämie, Fettumverteilung, Cushing-Syndrom, Osteoporose, etc. aber auch des Risikos eines erneuten Ausbruchs (*relapse*) nach Absetzen, soll keine Langzeittherapie erfolgen (Biedermann & Werfel, 2015).

Von den „klassischen“ Systemtherapeutika ist als einziges Ciclosporin zugelassen. Aufgrund der potenziell schweren Nebenwirkungen, siehe Absatz 1.1.6, wird auch dieses kaum mehr zur Langzeittherapie verwendet (siehe Abbildung 1.5). *Off-label* wird häufig Methotrexat verwendet. Alternativ werden Azathioprin sowie Mycophenolatmofetil in der Leitlinie genannt. Als gefürchtete Nebenwirkung von Azathioprin gilt eine erhöhte Myelotoxizität, vor allem bei veränderter TPMT Aktivität.

Die Zulassung des spezifischen monoklonalen Antiköpers Dupilumab gilt als wahre Revolution in der Therapie des mittel- bis schweren atopischen Ekzems. Der Antikörper richtet sich gegen den IL-4 Rezeptor alpha und hemmt somit die Wirkung von zwei wichtigen Typ-2 Zytokinen: IL-4 und IL-13. Zwei parallel durchgeführte Phase III Studien konnten die gute Wirksamkeit von Dupilumab belegen, die Hautscores sowie der Juckreiz zeigten sich signifikant reduziert unter der Therapie. Als unerwünschte Nebenwirkung wird bei einem geringen Prozentsatz der Patienten Konjunktivitis genannt (Simpson et al., 2016). Als selektiver IL-13 Inhibitor wurde erst kürzlich Tralokinumab für die Therapie des atopischen Ekzems zugelassen. Es konnte ebenfalls eine sehr gute Wirksamkeit sowie Sicherheitsprofil des Präparates gezeigt werden (Wollenberg et al., 2021).

Als sehr wirksam zeigten sich auch die erst kürzlich zugelassenen JAK-Inhibitoren wie zum Beispiel Baricitinib oder Upadacitinib (Guttman-Yassky et al., 2021; Simpson et al., 2020). Die orale Verabreichung stellt einen großen Vorteil dar. Zu den häufigen Nebenwirkung zählen Infektion der oberen Atemwege, Kopfschmerzen und Akne. Vor-



angegangene Thrombosen, erhöhte Blutfettwerte, Nieren- oder Leberinsuffizienz sowie Blutbildanomalien sollten vor der Therapie ausgeschlossen werden.

Trotz der steigenden Entwicklung von zielgerichteten Therapeutika, bleibt in vielen Fällen die Therapie der Psoriasis sowie des A.E. eine Herausforderung im klinischen Alltag.

Zum einen kann der Therapieerfolg an der falschen Diagnosestellung scheitern. Wie bereits erörtert kann sich die richtige Diagnosestellung in manchen Fällen sehr schwierig gestalten. Zum Beispiel zeigen TNF alpha Inhibitoren, die erfolgreich bei Psoriasis eingesetzt werden, bei Ekzem Patienten keine signifikante Wirksamkeit, zum Teil kommt es sogar zu einer Verschlechterung des klinischen Bildes (Jacobi, Antoni, Manger, Schuler, & Hertl, 2005).

Zum anderen, basieren die meisten Erfolge der Therapien auf empirische Daten, jedoch fehlt es noch an Verständnis der genauen Ätiopathogenese der chronisch entzündlichen Hauterkrankungen. Daher spielt die molekulare Diagnostik und für den Weg zur personalisierten Medizin eine immer größere Rolle.

## **1.2 Molekulare Diagnostik**

### **1.2.1 Entwicklung der molekularen Diagnostik**

Watson und Crick legten letztendlich den Grundbaustein für die molekulare Diagnostik fest. Als 1953 die DNA entschlüsselt wurde (Watson & Crick, 1953), konnten weitere Techniken wie zum Beispiel DNA-Sequenzierung oder PCR zur Vervielfältigung von Genen entwickelt werden, ohne die die Molekularbiologie heute nicht existieren würde.

Nicht nur im medizinischen Bereich haben molekulare Verfahren an Wichtigkeit gewonnen, sie spielen beispielsweise auch im Bereich der Kriminalistik eine ganz wesentliche Rolle. In der Medizin, insbesondere in der Onkologie, wurde die molekulare Diagnostik weiterentwickelt. So werden viele Marker zur Diagnostik oder zur Prognosebestimmung verwendet. Zudem konnten dadurch viele zielgerichtete Therapien entwickelt werden. Zum Beispiel werden zur Therapie des fortgeschrittenen malignen Melanoms bei nachgewiesener BRAF V600 Mutation erfolgreich BRAF-Inhibitoren (zum Beispiel Dabrafenib oder Trametinib) eingesetzt. Bei Vorliegen des BRAF Wildtyps können diese nicht verwendet werden.

Jedoch gibt es aktuell noch außer im Bereich der Dermatoonkologie kaum Anwendungs-

bereiche der molekularbasierten personalisierten Medizin in der Dermatologie (Garzorz-Stark & Eyerich, 2019).

Bei chronisch entzündlichen Hauterkrankungen wurden für Psoriasis oder A.E., wie in Absatz 1.1.6 erwähnt, in den letzten Jahren viele Biologika zugelassen. Auch bei insgesamt sehr gutem Ansprechen auf diese Arzneistoffe, gibt es bis zu 10-15% Therapieversager. Bei Therapiekosten von bis zu 20.000€ pro Jahr könnten spezifische diagnostische und prognostische Marker unter anderem helfen diese Therapieversagerquote zu senken (Garzorz-Stark & Eyerich, 2019).

## 1.2.2 Molekulare Signatur von Psoriasis und atopisches Ekzem

### *NOS2/CCL27*

Durch spezifische genetische Untersuchungen konnten Unterschiede in der molekularen Signatur zwischen Psoriasis und Ekzem erforscht werden. Zum Beispiel konnten Guttman-Yassky und Kollegen zeigen, dass manche Gene in der Keratinozyten Differenzierung entgegengesetzt exprimiert sind (Guttman-Yassky et al., 2009). Jedoch können diese Ergebnisse durch hohe interindividuelle Variabilität (Alter, Geschlecht, Umwelteinflüsse) beeinflusst werden. 2014 konnten durch intraindividuale Genom Expressionsanalyse krankheitsspezifische Gene identifiziert werden (Quaranta et al., 2014). Die molekulare Signatur von Psoriasis und Ekzem wurde bei Patienten, die von beiden Erkrankungen betroffen waren, anhand von ‚whole genome‘ Genexpressionsarrays verglichen. Insgesamt konnten 15 Gene ermittelt werden, die signifikant unterschiedlich zwischen beiden Erkrankungen exprimiert waren. Die zwei am signifikantesten unterschiedlich regulierten Gene waren *NOS2* und *CCL27*. Diese eignen sich als perfektes Paar zur Differenzierung von Psoriasis und Ekzem (Garzorz & Eyerich, 2015; Quaranta et al., 2014).

*NOS2* steht für Inducible Nitric Oxidase Synthase 2 und ist für die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) zuständig, welches eine große Rolle in inflammatorischen aber auch metabolischen Prozessen spielt (Kanwar, Kanwar, Burrow, & Baratchi, 2009).

*CCL27* steht für Chemokine (C-C motif) Ligand 27, bindet an Chemokine Rezeptor 10 und spielt eine Rolle in der Chemotaxis von hautassoziierten T-Lymphozyten (Mildner et al., 2014).

Basierend auf der entgegengesetzten Expression dieser zwei Gene konnte durch logarithmische Transformation der relativen Quantifizierungswerte von *NOS2* und *CCL27* ein *Molecular Classifier* (MC) entwickelt werden, welcher die Wahrscheinlichkeit (in %)

der vorliegenden Erkrankungen vorhersagen kann. Die Sensitivität und Spezifität liegen bei über 95% (Garzorz-Stark et al., 2016). In manchen Fällen konnte sogar eine Überlegenheit gegenüber den standardmäßig verwendeten diagnostischen Tools gezeigt werden (Garzorz-Stark et al., 2016).

### ***IL36G***

Auch andere Biomarker konnten zur Differenzierung der beiden Erkrankungen hervorgehoben werden.

(D’Erme et al., 2015) führten in über 150 von chronisch entzündlichen Erkrankungen betroffene Hautproben Cluster Analysen von Genexpressionsprofile durch. IL-17/TNF-alpha assoziierte Gene zeigten sich in Psoriasis Proben signifikant überexprimiert im Gegensatz zu anderen chronisch entzündlichen Hauterkrankungen. *IL36G* ragte besonders heraus und zeigte sich als signifikantestes und unterschiedlichstes exprimiertes Gen in Psoriasis.

IL-36G gehört zur Familie der IL-1 Zytokine. Es scheint eine besondere Rolle in Hautentzündungsreaktionen zu spielen, indem es die dendritischen Zellen und Keratinozyten Entwicklung und Proliferation beeinflusst (D’Erme et al., 2015).

Von besonderem Interesse ist IL-36G auch, da in nicht invasiven Tape-stripping Proben aus Psoriasis Läsionen signifikant erhöhte IL-36G Levels gegenüber Ekzem Läsionen durch ELISA quantifiziert werden konnten (Berekmeri et al., 2018).

*IL36G* scheint sich als Marker für Psoriasis behaupten zu können.

## 2 Zielsetzung

Die Notwendigkeit neue diagnostische Methoden zu entwickeln, um chronisch entzündliche Hauterkrankungen besser voneinander abgrenzen zu können; insbesondere Psoriasis von A.E., wird immer wesentlicher.

Bisher wurden für molekulare Diagnostik, Hautbiopsien mit einer Größe von 4-6 mm verwendet. Diese werden unter Lokalanästhesie entnommen, sind mit einem großen Zeitaufwand verbunden und können mit Komplikationen wie Schmerzen, Blutungen, Superinfektionen, Wundheilungsstörungen oder kosmetisch störenden Narben einhergehen. Jedoch ist das Ziel der modernen und patientenorientierten Medizin, qualitative aber auch immer weniger invasive Untersuchungsmethoden im klinischen Alltag einzusetzen. Ein Ansatz hierfür ist, die konventionell verwendeten „Macrobiopsien“ mit einem Durchmesser von 4-6 mm durch „Microbiopsien“ mit einem Durchmesser von 1 mm zu ersetzen. Letztere benötigen weder Lokalanästhesie noch Naht.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues minimal invasives Biopsieverfahren im Vergleich zu bisher standardmäßig verwendeten größeren Biopsien zur Erprobung molekularer Diagnostik zur Unterscheidung von Psoriasis und A.E. untersucht.

Als konkrete Aufgaben beziehungsweise Fragestellungen wurden festgelegt:

- Sind Microbiopsien zur histologischen Diagnosestellung geeignet?
- Welche Menge an mRNA kann von einer Microbiopsie extrahiert werden? Ist die mRNA-Konzentration in Microbiopsien suffizient für rt-PCR Messungen?
- Wie ist die mRNA Qualität in Microbiopsien im Gegensatz zu Macrobiopsien?
- Zeigt sich ein Informationsverlust in der molekularen Signatur zwischen Macro- und Microbiopsien?
- Vergleich der Genexpressionsanalyse von *NOS2*, *CCL27* und *IL36G* zwischen Macro- und Microbiopsien mittels rt-PCR.
- *Molecular Classifier* Berechnung und Vergleich der Ergebnisse zwischen Macro- und Microbiopsien.
- Welche Vorteile/Nachteile bringen Microbiopsien im Vergleich zu Macrobiopsien für

Patienten aber auch für Kliniker? Erklären sich Patienten eher für eine Macro- oder Microbiopsie Entnahme bereit?

# 3 Material,Methoden

## 3.1 Material

### 3.1.1 Probenentnahme

Tabelle 3.1: Probenentnahme Material

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
Octeniderm farblos Lösung	Schülke & Mayr GmbH
Xylocain 1% Injektionslösung	Aspen Pharma Trading Limited
Octenisept Lösung	Schülke & Mayr GmbH
<b>Ustensilien</b>	<b>Firma</b>
Einweghandschuhe Nitril 3000	Meditrade GmbH
Einmalspritze Injekt Luer Solo 5ml	B. Braun Melsungen AG
Injektionskanüle Sterican Grösse 18	B. Braun Melsungen AG
Sterile Handschuhe sempermed supreme	Semperit Technische Produkte GmbH
Lochtuch Raucodrape Pro 50x60cm	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG
Tupfer Gazin Grösse 3	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG
Steriles Biopsie-Set inklusive Scheere und Nadelhalter	standard chirurgische Ustensilien, unterschiedliche Firmen
Einmal Biopsiestanze 1mm	Kai Europe GmbH
Biopsy Punch 6mm	Stiefel GmbH & Co. KG
Feather disposable scalpel Nr 10	Feather Safety Razor Co., Ltd.
Nahtmaterial Daiflon 4/0	B. Braun Melsungen AG

### 3.1.2 RNA-Isolation

Tabelle 3.2: RNA-Isolation Material

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
RNAlater RNA Stbilization Reagent	Qiagen
RNase ZAP	Sigma-Aldrich
miRNeasy Mini KIT	Qiagen
QIAzol Lysis	Qiagen
Chloroform 99,8%	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Merck KGaA
RNase-free DNase Set	Qiagen
UltraPure DEPC-treated water	Thermo Scientific
<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
Tissuelyser II	Qiagen
Heraeus Fresco 21 Mikrozentrifuge	Thermo Scientific
NanoPhotometer N60/N50	Implen GmbH
<b>Ustensilien</b>	<b>Firma</b>
Latex Micro-touch Einweg Handschuhe	Ansell
Sterile Handschuhe sempermed supreme	Semperit Technische Produkte GmbH
Eppendorf research plus Pipetten 10, 100, 200 und 1000	Eppendorf AG
Safe Seal SurPhob Spitzen, steril	Biozym Scientific GmbH
Reagiergefässe SafeSeal 1,5ml 2ml	Sarstedt AG & Co. KG
Standard sterile chirurgische Schere	Unterschiedliche Firmen
Standard sterile chirurgische Pinzette	Unterschiedliche Firmen
Stahlkugeln stainless steel Beads 5mm	Qiagen

### 3.1.3 Bioanalyzer

Tabelle 3.3: Bioanalyzer Material

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
RNA 6000 Nano Kit	Agilent
RNase ZAP	Sigma-Aldrich
RNase-free DNase Set	Qiagen
<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
Bioanalyzer 2100	Agilent
Mikrozentrifuge	Thermo Scientific
<b>Ustensilien</b>	<b>Firma</b>
Chip Priming Station	Agilent
Eppendorf research plus Pipetten 10, 100, 1000	Eppendorf AG
Latex Micro-touch Einweg Handschuhe	Ansell



### 3.1.4 cDNA-Synthese

Tabelle 3.4: cDNA-Synthese Material

<b>Reagenzien</b>	<b>Firma</b>
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
UltraPure DEPC-treated water	Thermo Scientific
RNAse ZAP	Sigma-Aldrich
<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>
Techne TC-412 Thermal Cycler	Keison Products
<b>Ustensilien</b>	<b>Firma</b>
Quali-PCR-Tube-Streifen à 8 x 0,2ml	Kisker Biotech GmbH & Co. KG
Eppendorf research plus Pipetten 10, 100, 200 and 1000	Eppendorf AG
Safe Seal SurPhob Spitzen, steril	Biozym Scientific GmbH
Latex Micro-touch Einweg Handschuhe	Ansell

### 3.1.5 rt-PCR

Tabelle 3.5: rt-PCR Material

Reagenzien	Firma
Primer 18S_short forward GTAACCCGTTGAACCC-CATTC	Metabion international AG
Primer 18S_short reverse CGCACTTACTGGGAATT-CCTC	Metabion international AG
Primer GAPDH_short forward CTCCTCCTGTTCTGA-CAGTCA	Metabion international AG
Primer GAPDH_short reverse GATGTGGCTCGGCTGG	Metabion international AG
Primer NOS2_short1 forward ATCTGCAGACACGTG-CGTTA	Metabion international AG
Primer NOS2_short1 reverse TGATGGCCGACCT-GATGTTG	Metabion international AG
Primer CCL27_short1 forward CCCTACAGCAGCATT-CCTAC	Metabion international AG
Primer CCL27_short1 reverse GTAGAGCTGAGTA-CAGCAGGC	Metabion international AG
Primer IL36G forward AGGAAGGGCCGTCTAT-CAATC	Metabion international AG
Primer IL36G reverse CACTGTCACTTCGTGGAACTG	Metabion international AG
Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)	Roche Life Science
UltraPure DEPC-treated water	Thermo Scientific
Geräte	Firma
ViiA TM 7 Real-Time PCR System and Software	Applied Biosystems
Ustensilien	Firma
FrameStar 384 Well PCR Platte	4titude Ltd.
qPCR Seal adhesive Film	4titude Ltd.
Eppendorf research plus Pipetten	Eppendorf AG
Safe Seal SurPhob Spitzen, steril	Biozym Scientific GmbH
Latex Micro-touch Einweg Handschuhe	Ansell

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Patientenkohorte

Insgesamt wurden 51 Patienten in die Studie eingeschlossen: 27 mit A.E., 19 mit Psoriasis und 5 mit unklarer Diagnose. Nur Patienten mit einer jeweilig vorhandenen Macro- und Microbiopsie konnten mit eingeschlossen werden. Die Diagnosen wurden anhand klinischer sowie histologischen Merkmalen gestellt. Außerdem wurden bei 10 gesunden Teilnehmern Microbiopsien entnommen. Alle Patienten stammten aus der dermatologischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar – Technische Universität München. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde vor Einschluss in die Biobank sowie vor der Probenentnahme unterschrieben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät des Klinikums Rechts der Isar – Technische Universität München (44/16S) genehmigt.

### 3.2.2 Methodik

#### Probenentnahme

Nach gründlicher Desinfektion des zu entnehmenden Areals erfolgte eine lokale Anästhesie mit Xylocain 1% (zwischen 1 ml und 5 ml). Nach erneuter Desinfektion und Abdeckung mithilfe eines Lochtuchs, erfolgte die Hautprobeentnahme mit einer 6 mm Biopsie Stanze. Anschließend wurde die Wunde mit 1-2 Einzelknopfnähten verschlossen, erneut desinfiziert und mit einem sterilen Verband versorgt. Die Gewebprobe wurde mit einem Skalpell in drei gleiche Teile geteilt. Ein Drittel konnte für die Routinediagnostik (z.B. Histologie) verwendet werden, ein Drittel wurde kryo-konserviert und das restliche Drittel war für die RNA-Isolation bestimmt. Zur Stabilisierung der RNA, konservierte man die Hautprobe in einer *RNAprotect Tissue* Lösung. Zunächst für 24-48H bei 4°C, anschließend bei -80°C.

Analog dazu erfolgte im gleichen Areal die 1 mm Probebiopsie Entnahme und Konservierung in *RNAprotect Tissue* Lösung. Eine Lokalanästhesie sowie Hautnaht waren hier allerdings nicht erforderlich.

#### RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe des miRNeasy Mini Kits (Qiagen), die Vorgehensweise war dem dazugehörigen Protokoll zu entnehmen.

Zusammenfassend wurden die Gewebproben, nachdem sie aufgetaut waren, mit einer

Schere in 700  $\mu\text{l}$  *Qiazol Lysis* (Qiagen) zerkleinert. Zur kompletten Homogenisierung der Lösung kam der *TissueLyser* (Qiagen) zum Einsatz. 140  $\mu\text{l}$  Chloroform (Sigma-Aldrich) wurden hinzugefügt. Nachdem die Proben für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurden, konnte die wässrige Phase (mit der darin enthaltenen RNA) abpipettiert werden und 525  $\mu\text{l}$  Ethanol (Merck KGa) wurden hinzugefügt. Nach mehreren Waschetappen (350  $\mu\text{l}$  Buffer RWT, 500  $\mu\text{l}$  Buffer RPE) und DNase (Qiagen) Verwendung erfolgte die DNA-Verdauung. Letztendlich konnte die RNA in 28  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser (Qiagen) eluiert werden.

Über Photometrie konnte mit NanoPhotometer N60/N50 (Implen GmbH) die RNA Konzentration gemessen werden. Bei einer Konzentration von über 500  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , wurde die Lösung weiter mit RNase-freiem Wasser diluiert.

## Bioanalyser

Probeweise wurden bei jeweils 14 Macro- und Microbiopsien die RNA-Qualität im Bioanalyser (Agilent) auf einem RNA Chip mittels des Agilent RNA 6000 Nano Kits protokollgerecht überprüft. Zusammengefasst wurde als erstes die *RNA Ladder* vorbereitet, diese wurde bei 70°C für 2 Minuten denaturiert. Als nächstes wurde das Gel angefertigt indem 550  $\mu\text{l}$  Gel Matrix pipettiert und zentrifugiert wurden. Dazu wurde 1  $\mu\text{l}$  *RNA Dye concentrate* hinzugefügt, nachdem letzteres bei Raumtemperatur für 30 Minuten geruht hatte und das Gemisch wurde zentrifugiert. Das *Gel-Dye Mix* wurde in das vorgesehene Well auf den Chip mithilfe der Chip Prime Station angebracht. In weitere Wells wurden jeweils 5  $\mu\text{l}$  RNA-Marker platziert. Als letztes wurde 1  $\mu\text{l}$  *RNA Ladder* in das vorgesehene Well angebracht. Schließlich konnte der Mikrochip im 2100 Bioanalyser analysiert werden und die und die *RNA Integrity Number* (RIN) errechnet werden. Die Qualität von Proben mit einem RIN größer 8 kann als gut bewertet werden.

## RNA-Sequencing

Die Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Menden – *Computational Biomedicine – Menden Lab* – Helmholtz Zentrum München.

Insgesamt erfolgten bei  $n = 24$  Proben eine RNA Sequenzierung: bei 5 diagnostizierten Psoriasis mit jeweils einer Macro- und dazugehöriger Microbiopsie ( $n = 10$ ), 5 A.E. mit ebenfalls jeweils einer Macro- und Microbiopsie ( $n = 10$ ) sowie jeweils eine Macro- und Microbiopsie von zwei unklaren Phänotypen ( $n = 4$ ).

Zur Erstellung der Sequenzierungsbibliothek wurde das *TruSeq Stranded Total RNA*

*Kit* (Illumina) mit dem zugehörigen Protokoll verwendet. Die Sequenzierung erfolgte mittels des Illumina HiSeq4000. Anhand des *DESeq2 package* von Bioconductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) konnten die unterschiedlich exprimierte Gene untersucht werden. Ab  $\text{padj} < 0,05$ ,  $\log_2 \text{fold change} \geq 1$  galten die Gene als signifikant unterschiedlich exprimiert.

### **cDNA-Synthese**

Zur cDNA-Synthese wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies) mit dem dazugehörigen Protokoll genutzt.

Insgesamt wurden maximal 500 ng in 14,2  $\mu\text{l}$  RNA transkribiert (bei Bedarf wurde die Lösung mit DEPC behandeltem Wasser (Life Technologies) verdünnt). Zur RNA wurde der cDNA synthese Mix dazugemischt. Dieser bestand aus jeweils pro Probe 2  $\mu\text{l}$  *Buffer*, 2  $\mu\text{l}$  *Random Primers*, 0,8  $\mu\text{l}$  dNTP Mix und 1  $\mu\text{l}$  *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*. Anschließend wurden die Proben mit dem *Techne TC-412 Thermal Cycler* (Keison Products) im cDNA Programm für 10 Minuten bei 25°C, im nächsten Schritt für 120 Minuten bei 37°C und im letzten Schritt für 5 Minuten bei 85°C erhitzt. Folglich wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt und anschließend erneut bei -80°C konserviert bis die rt-PCR erfolgte.

### **rt-PCR**

Unter Verwendung des *Fast Start Universal SYBR® Green Masters* (Rox) (Roche Life Science) konnten die PCR-Reaktionen in 384-Well *Reaction Plates* stattfinden.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut.

In 10  $\mu\text{l}$  pro Well fanden sich jeweils 3,4  $\mu\text{l}$  cDNA-Mastermix (mit einer maximalen DNA Konzentration von 25 ng/ $\mu\text{l}$ ) und 6,6  $\mu\text{l}$  SYBR® Green-Mastermix. Der SYBR® Green Mastermix enthielt jeweils 1,6  $\mu\text{l}$  SYBR® Green mit dem darin enthaltenen DNA-Fluoreszenz Farbstoff und 5  $\mu\text{l}$  Primer Mastermix für die jeweiligen Primer (3.5).

Die Fluoreszenz Detektion erfolgte über das *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems).

Im ersten Abschnitt wurden die Proben initial für 2 Minuten auf 50°C, dann für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend begann der PCR-Abschnitt. Dieser bestand aus 40 Zyklen mit jeweils 2 Etappen: erstens wurden die Proben auf 95°C für 15 Sekunden erhitzt, hier fand die DNA-Denaturierung statt. Zweitens wurden sie auf 60°C erwärmt, hier fand die DNA-Amplifikation statt. Am Ende dieser Etappe konnte das Fluoreszenz Signal registriert werden.

## **Molecular Classifier**

Die Vorgehensweise zur Berechnung des *Classifiers* wurde der Publikation (Garzorz-Stark et al., 2016) entnommen.

Relativ zu gesunden Hautproben konnten die relativen Genexpressionen von *NOS2* und *CCL27* errechnet werden. Dafür wurde der jeweilige DeltaCT Mittelwert von über 100 gesunden Hautproben errechnet. Die Werte wurden transformiert mittels des Logarithmus mit Basis 10. Anhand der linearen Model Funktion in R (R Program, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) konnte der *Classifier* gebildet werden und die Wahrscheinlichkeit (%) der Diagnose von Ekzem oder Psoriasis abgeschätzt werden (Garzorz-Stark et al., 2016).

## **Fragebogen**

Um die Auswirkungen der verschiedenen Biopsie Techniken zu erfassen, wurde ein Fragebogen erstellt. Die Patienten erhielten den identischen Fragebogen für, die bei ihnen durchgeführten Macro- und Microbiopsie. Die Lokalisation der Biopsiestelle wurde erfasst. Mit einer numerischen Skala von 0-10 sollten die Patienten 5 unterschiedliche Kriterien bewerten: Schmerzen am Tag der Biopsie sowie während der 30 Folgetage nach der Biopsie, Zufriedenheit des kosmetischen Ergebnis nach 7 Tagen sowie nach 30 Tagen und wie hoch der zeitliche Aufwand durch die Biopsie war. Außerdem wurden potenzielle Komplikationen wie Blutung, Infektion, allergische Reaktion auf das Betäubungsmittel, nötige ärztliche Behandlung sowie die Dauer bis zur kompletten Wundheilung erfasst. Zuletzt wurde erfasst, ob die Teilnehmer eine erneute Probeentnahme zugelassen hätten.

## **Histologie**

Nachdem die Proben entnommen waren, wurden sie in Formaldehydlösung fixiert. Daraufhin erfolgte die Einbettung in Paraffin. Im folgenden Schritt konnten die Blöcke geschnitten werden und die feinen Schnitte auf Objektträger aufgebracht werden. Nach der Entparaffinierung konnten sie schließlich mit Hämotoxylin-Eosin gefärbt werden. Unter dem Mikroskop konnten die Schnitte in verschiedenen Vergrößerungen analysiert und fotografiert werden. Mit der Software Adobe-Photoshop wurde ein Weiß Abgleich der Bilder durchgeführt.

### **3.2.3 Datenauswertung**

Die Daten wurden pseudonymisiert ausgewertet. Die Auswertung der Daten und Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel Version 16.16.27 (201012). Um statistisch signifikante Unterschiede zu prüfen, wurde der t-Test verwendet, das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=0,05$  gesetzt. Grafiken wurden mittels Python Bibliothek Seaborn Version 0.10.1 (Python Version 3.8.3) erzeugt. Für die Niederschrift der Dissertation wurde LaTeX verwendet.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Patienten Population

Insgesamt wurden 61 Patienten für die Studie eingeschlossen, 19 mit Psoriasis, 27 mit Ekzem, 5 mit unklarem Phänotyp und 10 mit gesunder Haut. In Tabelle 4.1 sind die klinischen Charakteristika der Teilnehmer zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Patienten Charakteristika

	<b>Psoriasis</b> <i>M=52,4 SD=15,7</i>	<b>Ekzem</b> <i>M=57,2 SD=18,9</i>	<b>Unklar</b> <i>M=61,6 SD=18,2</i>	<b>Gesund</b> <i>M=30,9 SD=8,5</i>
<b>Alter</b>				
<b>Geschlecht</b>				
Männlich	13 (68,4%)	16 (59,3%)	2 (40%)	6 (60%)
Weiblich	6 (31,6%)	11 (40,7%)	3 (60%)	4 (40%)
<b>Entnahmestelle</b>				
Rücken	8 (42,1%)	5 (18,5%)	0	0
Abdomen	2 (10,5%)	3 (11,1%)	1 (20%)	0
Oberschenkel	2 (10,5%)	3 (11,1%)	0	0
Unterschenkel	3 (15,8%)	2 (7,4%)	0	0
Oberarm	0	4 (14,8%)	2 (40%)	5 (50%)
Unterarm	2 (10,5%)	1 (3,7%)	1 (20%)	5 (50%)
Gesäß	0	2 (7,4%)	1 (20%)	0
Ellenbogen	1 (5,3%)	1 (3,7%)	0	0
Ellenbeuge	0	2 (7,4%)	0	0
Handfläche	0	2 (7,4%)	0	0
Fußsohle	1 (5,3%)	0	0	0
Kopf	0	1 (3,7%)	0	0
Schulter	0	1 (3,7%)	0	0
<b>PGA</b>	<i>M=4,16 SD=1,21</i>	<i>M=4,19 SD=1,47</i>	<i>M=3 SD=1,87</i>	<i>M=0 SD=0</i>

Das Alter der Probanden lag zwischen 19 und 81 Jahren. In der Psoriasis Kohorte waren die Patienten im Schnitt 52,4 Jahre alt ( $SD=15,7$ ), in der Ekzem Kohorte 57,2 Jahre alt ( $SD=18,9$ ), in der unklaren Gruppe 61,6 Jahre alt ( $SD=18,2$ ) und in der gesunden Gruppe 30,9 Jahre alt ( $SD=8,5$ ). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der



Psoriasis-, Ekzem- und unklaren Kohorte ( $p > 0,05$ ) erkannt werden. Die gesunden Teilnehmer waren im Schnitt ca 25 Jahre jünger ( $p = 2,6E-5$ ).

Sowohl männliche als auch weibliche Patienten wurden eingeschlossen, mit leichter Prädominanz für Männer in der Psoriasis, Ekzem und gesunden Gruppe (zwischen 59-68%).

Die Macro- und Microbiopsien wurden stets aus der gleichen oder aus direkt nebeneinanderstehenden Läsionen entnommen, sodass die Lokalisation zwischen Macro- und Microbiopsie nicht abwich. Bei den gesunden Patienten wurde ausschließlich eine Microbiopsie entnommen. Es wurden aus jeder Körperpartie bis auf das Genital, Gesicht und Schleimhäute Proben entnommen: Rumpf ( $n=19$ ), obere Extremität ( $n=27$ ), untere Extremität ( $n=14$ ), Kopf ( $n=1$ ). Am häufigsten stammten die Proben vom Rücken ( $n=13$ ) gefolgt von Oberarm ( $n=11$ ), Unterarm ( $n=9$ ), Abdomen ( $n=6$ ), Oberschenkel ( $n=5$ ), Unterschenkel ( $n=5$ ), Gesäß ( $n=3$ ), Ellenbogen ( $n=2$ ), Ellenbeuge ( $n=2$ ), Handfläche ( $n=2$ ), Fußsohle ( $n=1$ ), Kopf ( $n=1$ ) und Schulter ( $n=1$ ).

Die Verteilung der Probenentnahmestellen war demnach sehr heterogen. Zwischen der Psoriasis und Ekzem Kohorte waren die Biopsie Lokalisationen ähnlich verteilt, am häufigsten wurden Biopsien aus dem Rücken gefolgt von den Beinen entnommen.

Zur Beurteilung des Schweregrads der Erkrankung wurde zum besseren Vergleich zwischen Psoriasis und Ekzem der PGA Score herangezogen. Der Score reicht von 0 bis 6, wobei 0 für Hauterscheinungsfreiheit und 6 für schwer betroffene Haut steht. Insgesamt lagen die PGA Scores zwischen 1 und 6, der PGA Mittelwert bei Psoriasis Patienten lag bei 4,16 mit einer Standardabweichung von 1,21, in der Ekzem Kohorte lag der mittlere PGA Wert bei 4,19 ( $SD=1,47$ ).

Die Patienten der beiden Gruppen waren in etwa gleich moderat betroffen, es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,47$ ). Es zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu den Patienten mit unklarer Diagnose ( $p > 0,05$ ).

Insgesamt zeigte sich eine relativ homogene Verteilung der eben genannten Kriterien zwischen den unterschiedlichen Gruppen.

## 4.2 Vergleich der Histologie von Macro- und Microbiopsie

Zur Diagnosesicherung von Psoriasis und Ekzem werden im klinischen Alltag histologische Untersuchungen herangezogen. Zur Überprüfung ob Microbiopsien hierfür ebenfalls geeignet sind, untersuchten wir jeweils eine Macro- und Microbiopsie einer Ekzem- sowie Psoriasis-Plaue.

### Übersicht

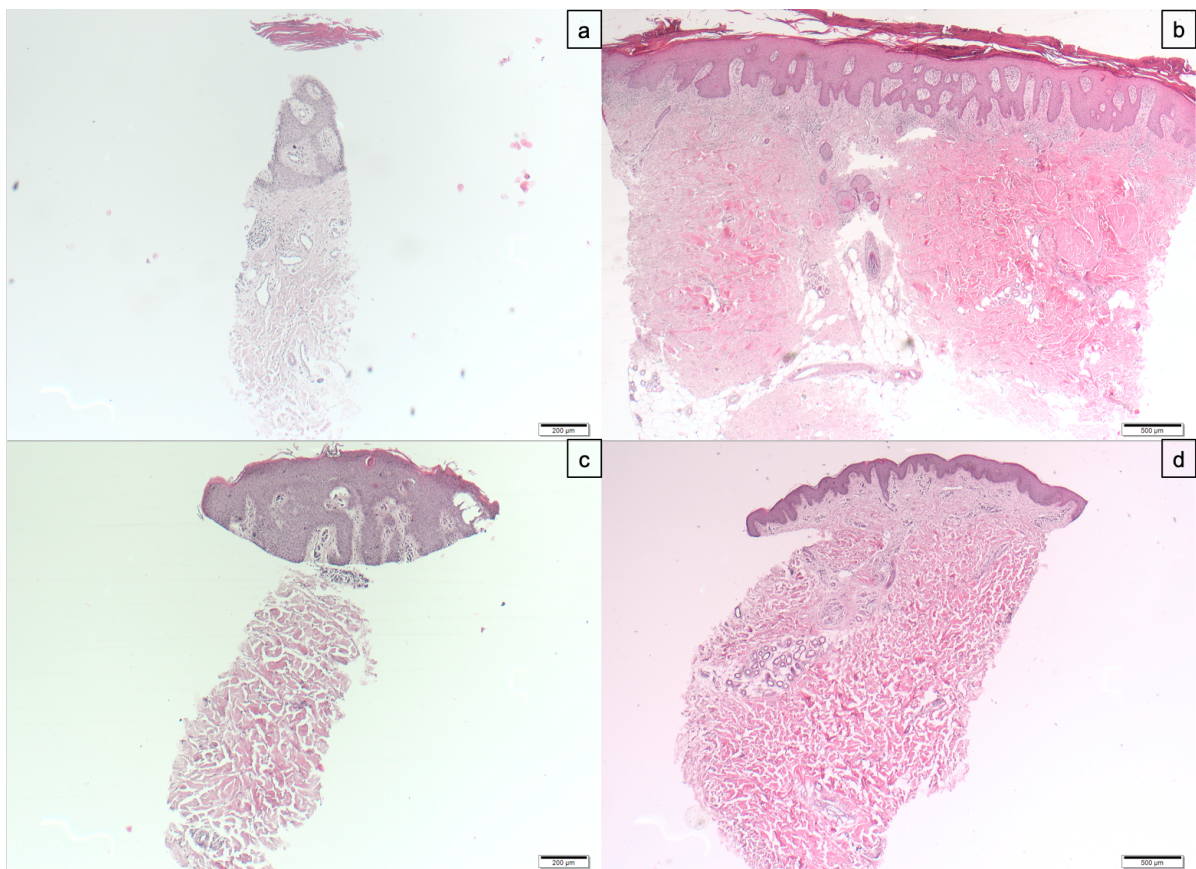


Abbildung 4.1: HE-Färbung von Micro- und Macrobiopsien – Übersichtsaufnahmen a] Psoriasis Microbiopsie b] Psoriasis Macrobiopsie c] Ekzem Microbiopsie d] Ekzem Macrobiopsie

In der Übersicht ist durch den unterschiedlichen Maßstab der Größenunterschied zwischen Micro- (Abbildung 4.1a] und 4.1c]) und Macrobiopsien (Abbildung 4.1b und 4.1d) deutlich zu sehen. Zudem ist zusehen, dass sowohl die Macro- als auch die Microbiopsie bis tiefermal reichen, in Abbildung 4.1a] beziehungsweise Abbildung 4.2d] sind subkutane Fettzellen vorzufinden. So waren die Epidermis und Dermis gut beurteilbar, hier

finden sich wesentliche diagnostische histologische Kriterien um Psoriasis von Ekzem zu unterscheiden.

### Histologisches Bild der Psoriasis Microbiopsie

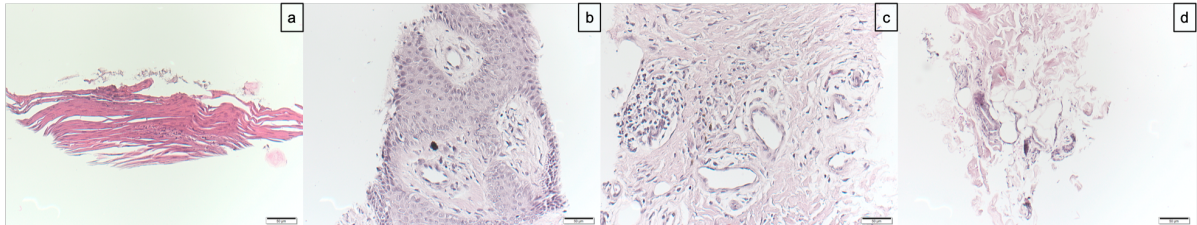


Abbildung 4.2: HE-Färbung Psoriasis Microbiopsie (Vergrößerung 40- bzw. 100-fach) a] Stratum corneum mit Hyperparakeratose und Munro-Mikroabszess b] Epidermis mit Akanthose c] Dermis mit lymphozytärem Infiltrat d] Subkutane Fettzellen

Auf Abbildung 4.2 (40- beziehungsweise 100-fach Vergrößerung) sind im Bereich der Microbiopsie typische diagnostische Merkmale für die Psoriasis vorzufinden. Wie in Abb.4.2 a] zu sehen ist, zeigt sich im Stratum corneum eine Hyperparakeratose, im Sinne einer Verbreitung des Stratum corneum unter Erhalt der Zellkerne aufgrund einer fehlerhaften Reifung der Keratinozyten. Zudem ist eine abszessartige Ansammlung von neutrophilen Leukozyten im Sinne eines Munro-Mikroabszess zu erkennen. Weitere Merkmale, wie Akanthose mit Verbreitung der Epidermis, s. Abb4.2 b] oder diffuses lymphozytäre Infiltrat in der Dermis, siehe Abbildung 4.2 c] sind ebenfalls vorhanden.

### Histologisches Bild der Ekzem Microbiopsie

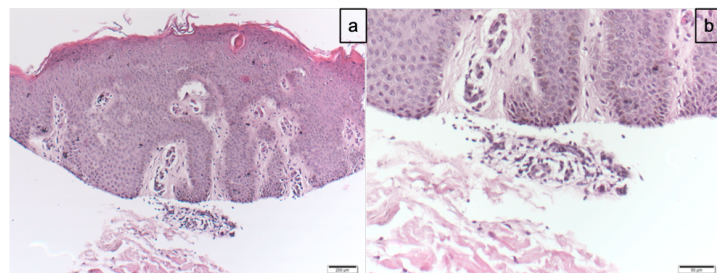


Abbildung 4.3: HE-Färbung Ekzem Microbiopsie (Vergrößerung 40- bzw. 100-fach) a] Epidermis mit serösen Krusten b] lymphozytäres Infiltrat

An der Epidermis Oberfläche der Microbiopsie sind seröse Krusten als Folge von durch Juckreiz herbeigeführten Exkoriationen, siehe Abbildung 4.3 a]. Die Epidermis ist insgesamt gut darstellbar, in dem Bereich ist angedeutet eine Spongiose mit Ödem zwischen

den Zellen zu sehen. Diese Merkmale finden sich meistens bei Ekzempläsionen, können jedoch bei vielen anderen dermatologischen Krankheitsbildern vorkommen. Als unspezifisches Zeichen ist in Abbildung 4.3 b] zusätzlich ein lymphozytäres Infiltrat zu sehen. Durch die Untersuchung der eben beschriebenen histologischen Bilder zeigte sich, dass histologische pathognomonische Merkmale die normalerweise in den Macrobiopsien zur Diagnosesicherung herangezogen werden, ebenfalls im Bereich der Microbiopsien identifiziert werden konnten.

## **4.3 Schritte zur Molecular Classifier Entwicklung und Vergleich zwischen Macro- und Microbiopsie**

### **4.3.1 RNA Konzentration von Macro- und Microbiopsien**

Als erster Schritt zur MC Durchführung erfolgte die RNA Messung von Macro- und Microbiopsien.

Im Bereich der Microbiopsien reichten die Werte von  $6,12\text{ng}/\mu\text{l}$  bis zu  $201,60\text{ ng}/\mu\text{l}$  pro Biopsie. Die RNA-Konzentrationen befanden sich bei 18 Proben unter  $20\text{ ng}/\mu\text{l}$ , davon 2 unter  $7,80\text{ ng}/\mu\text{l}$ . 18 Proben hatten eine Konzentration zwischen  $20\text{-}30\text{ ng}/\mu\text{l}$  und 33 über  $30\text{ ng}/\mu\text{l}$ . Der Mittelwert der RNA-Konzentration von Microbiopsien lag bei  $35,17\text{ ng}/\mu\text{l}$  mit einer Standardabweichung von  $27,75\text{ ng}/\mu\text{l}$ , der Median lag bei  $28,72\text{ ng}/\mu\text{l}$ .

Im Bereich der Macrobiopsien reichten die RNA Konzentrationswerte von  $14,96\text{ ng}/\mu\text{l}$  bis zu  $1940,80\text{ ng}/\mu\text{l}$ . Der Mittelwert betrug  $374,90\text{ ng}/\mu\text{l}$  mit einer Standardabweichung von  $341,88\text{ ng}/\mu\text{l}$ , der Median lag bei  $287,32\text{ ng}/\mu\text{l}$ . Somit überstieg die RNA-Konzentration der Macrobiopsien das 10-fache die, der Microbiopsien.

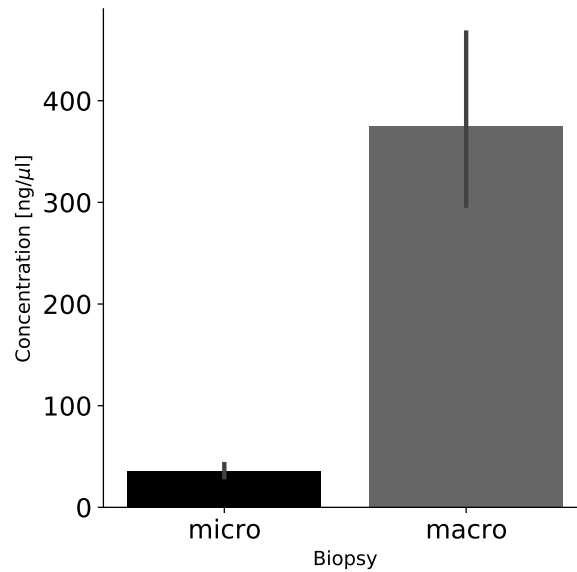


Abbildung 4.4: RNA-Konzentrationen läSIONaler Biopsien

Außerdem wurde bei 10 gesunden Teilnehmern je eine Microbiopsie entnommen und davon die RNA-Konzentration gemessen. Die Werte reichten jeweils von  $5,20 \text{ ng}/\mu\text{l}$  bis zu  $12,56 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , der Mittelwert lag bei  $7,74 \text{ ng}/\mu\text{l}$  und der Median bei  $7,60 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Zum Vergleich wurden die RNA-Konzentration von gesunden Macrobiopsien gemessen. Hier reichten die Konzentrationswerte von  $66,30 \text{ ng}/\mu\text{l}$  bis zu  $204,00 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Der Mittelwert lag bei  $127,30 \text{ ng}/\mu\text{l}$  und somit ca. 16-mal höher als bei Microbiopsien. Der Medianwert lag bei  $116,88 \text{ ng}/\mu\text{l}$ .

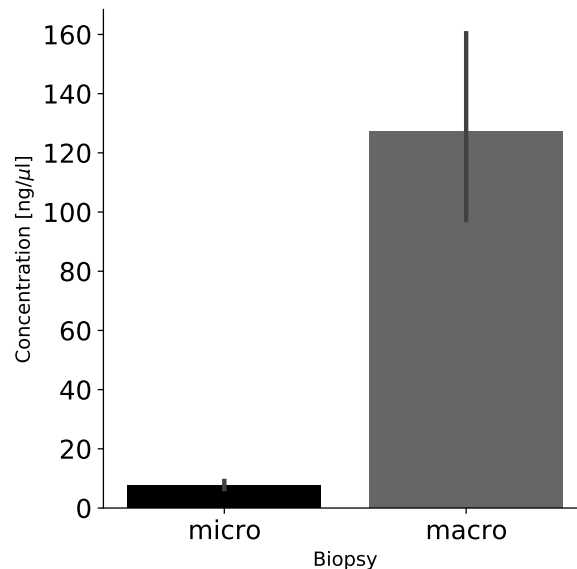


Abbildung 4.5: RNA-Konzentrationen nicht-läsionaler Biopsien

Wie zu erwarten waren die RNA-Konzentrationen im Bereich der Microbiopsien deutlich geringer, jedoch ausreichend um weitere Untersuchungen zur Erstellung des MC durchzuführen.

### 4.3.2 Untersuchung der RNA-Qualität durch Bioanalyzer

Zur Überprüfung ob die RNA-Qualität zwischen Macro- und Microbiopsien abweichend ist, wurde probeweise von 14 Proben die RNA-Qualität mittels Bioanalyzer untersucht.

Intakte RNA ist das Qualitätsmerkmal und ein wesentlicher Bestandteil für weitere Untersuchungen wie rt-PCR oder RNA-Sequenzierung. Durch elektrophoretische Auflösung werden durch den Bioanalyzer RNA Stränge detektiert und ein Immunfluoreszenz Signal ausgelöst, die Intaktheit der RNA kann dadurch kalkuliert werden.

Während der RNA Degradation nehmen die 18S und 28S ribosomalen Banden ab und das Baseline Signal zwischen den zwei Spitzen nimmt zu, wie beispielsweise auf folgender Abbildung zu sehen ist:

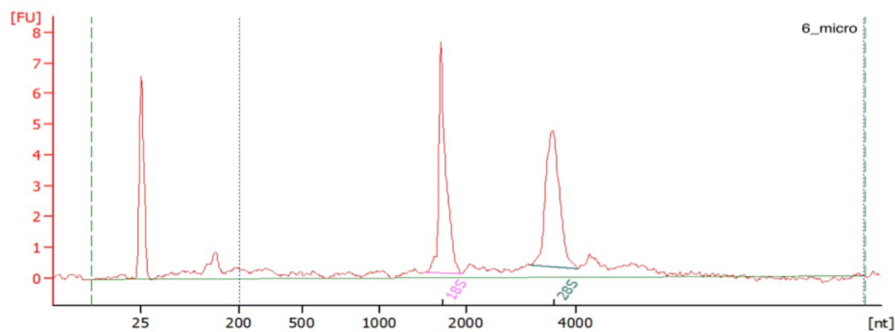


Abbildung 4.6: Bioanalyzer Analyse Beispiel

Zur Standardisierung der RNA Qualitätsbestimmung wurde der RIN Wert entwickelt. Der Wert kann zwischen 1 und 10 liegen, 10 steht für völlig intakte RNA. Ein RIN Wert von 5 bedeutet, dass die RNA teilweise degradiert ist und bei  $<3$  spricht es für stark degradierte RNA. Die RNA kann somit klassifiziert werden.

Insgesamt konnte bei 14 Macro- und deren zugehörigen Microbiopsien die RNA Qualität durch Bioanalyzer untersucht werden. Die RIN Werte erstreckten sich von 2,7 bis 9,2, der Mittelwert lag bei 7,3 und der Median bei 7,5. Insgesamt war also die RNA nur gering degradiert. Der RIN Wert im Bereich der Macrobiopsien erstreckte sich von 2,7 bis 9,1, der Mittelwert lag bei 6,8 mit einer Standardabweichung von 1,7 und der Median bei 7,5. Im Bereich der Microbiopsien lag der RIN Wert zwischen 5,6 und 9,2, der Mittelwert



bei 7,7 mit einer Standardabweichung von 1,1 und der Median bei 7,9. Auffällig war, dass eine einzige Probe einen sehr schlechten RIN Wert hatte (2,7), Auffälligkeiten im Sinne von unterschiedlicher Lagerung, Entnahmetechnik, Phänotyp etc. wurden nicht aufgefasst. Ansonsten war die RNA Qualität insgesamt gut (stets  $>5$ ). Proben mit guter RNA Qualität konnten zum Beispiel zur Sequenzierung weiterverwendet werden (s. Abschnitt 4.3.3).

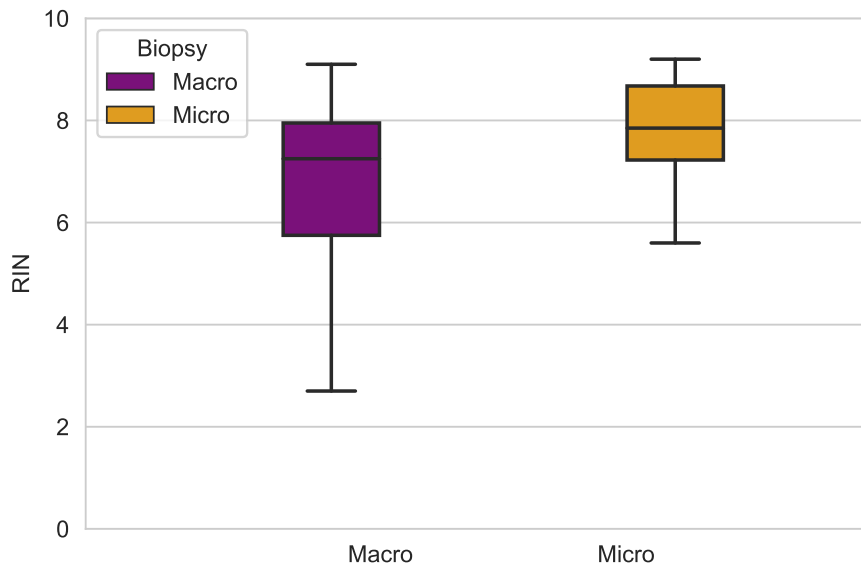


Abbildung 4.7: RIN Werte von Macro- und Microbiopsien

In den untersuchten Proben konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den RIN-Werten und somit der RNA Qualität zwischen den Macro- und Microbiopsien gezeigt werden ( $p > 0,05$ ).

### 4.3.3 Sequenzierungsdaten von Macro- und Microbiopsien

Zur Überprüfung ob ein Verlust an molekularer Signatur zwischen Macro- und Microbiopsie besteht wurde die mRNA von 5 Psoriasis und 5 A.E. Probenpaare, jeweils bestehend aus einer Macro- und Microbiopsie sowie einem unklarem Phänotyp Probenpaar verglichen. Vorab wurde die RNA Qualität der Proben untersucht (s. Abschnitt 4.3.2), ausschließlich Proben mit guter RNA Qualität ( $RIN > 5$ ) wurden verwendet.

Teile dieses Kapitels wurden bereits in (Fischer, Doll et al., 2023) veröffentlicht.

## Vergleich der Genexpressionen zwischen Macro- und Microbiopsien

Es wurden über 19000 proteinkodierende exprimierte Gene in Psoriasis, A.E. sowie unklare Phänotypen Proben direkt zwischen Macro- und Microbiopsien verglichen.

Wie in Grafik 4.8 zu sehen ist, konnten nur 5 signifikant unterschiedliche Gene zwischen Macro- und Microbiopsien identifiziert werden: *CCN1* und *FOS* in der Psoriasis-Gruppe, *KRTAP9-3* in der A.E. Gruppe sowie *GPD1* und *MEDAG* in der unklare Phänotyp-Gruppe.

Insgesamt zeigte sich also kein signifikanter Unterschied der exprimierten Gene zwischen Macro- und Microbiopsien (Fischer, Doll et al., 2023).

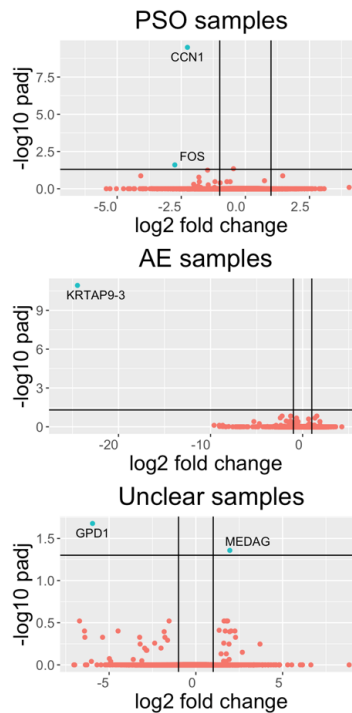


Abbildung 4.8: Vergleich der Genexpressionen zwischen Macro- und Microbiopsien in Psoriasis, A.E. sowie unklarer Phänotyp Proben

## Vergleich der Genexpressionen zwischen Psoriasis und A.E.

Nun sollte untersucht werden ob sich unterschiedliche Genexpressionsmuster zwischen Psoriasis und A.E. im Bereich der Macro- und Microbiopsien zeigen.

In den *PCA Plots* (Grafik 4.9) teilten sich, wie zu erwarten, sowohl im Bereich der Macro- als auch der Microbiopsien die Proben in 2 Gruppen auf, die mit den Diagnosen Psoriasis und A.E. korrelierten.



So konnten sowohl die Macro- als auch die Microbiopsien anhand ihres Genexpressionsprofils der Psoriasis oder A.E. zugeteilt werden (Fischer, Doll et al., 2023).

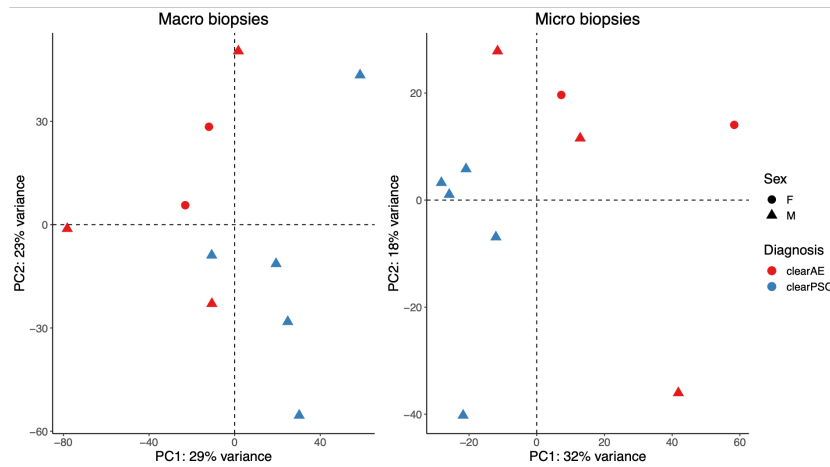


Abbildung 4.9: PCA Plots von Macro- und Microbiopsien (Fischer, Doll et al., 2023)

Insgesamt zeigten sich im Bereich der Macrobiopsien über 389 Gene signifikant hochreguliert, über 540 im Bereich der Microbiopsien. Besonders stach *NOS2* heraus, wie in den *Volcano Plots* (Grafik 4.10) zu sehen ist, zeigte sich dieser sowohl in den Macro- als auch in den Microbiopsien äußerst signifikant hochreguliert bei Psoriasis (Macro:  $\log_2FC = 8,10$ ;  $p_{adj} = 2,31 \cdot 10^{-6}$ , Micro:  $\log_2FC = 8,66$ ;  $p_{adj} = 1,39 \cdot 10^{-13}$ ).



Abbildung 4.10: Volcano Plots von signifikant regulierten Genen bei Macro- und Microbiopsien (Fischer, Doll et al., 2023)

Weiterhin konnten krankheitsspezifische exprimierte Gene sowohl im Bereich der Macro- als auch der Microbiopsien identifiziert werden, wie in Grafik 4.11 zu sehen ist. *IL17A*, *NOS2* und *DEFB4* zeigten sich im Bereich der Macro- und Microbiopsien bei Psoriasis

höher exprimiert als bei A.E., umgekehrt zeigten sich *IL13*, *CCL27* sowie *NELL2* bei A.E. höher reguliert (Fischer, Doll et al., 2023).

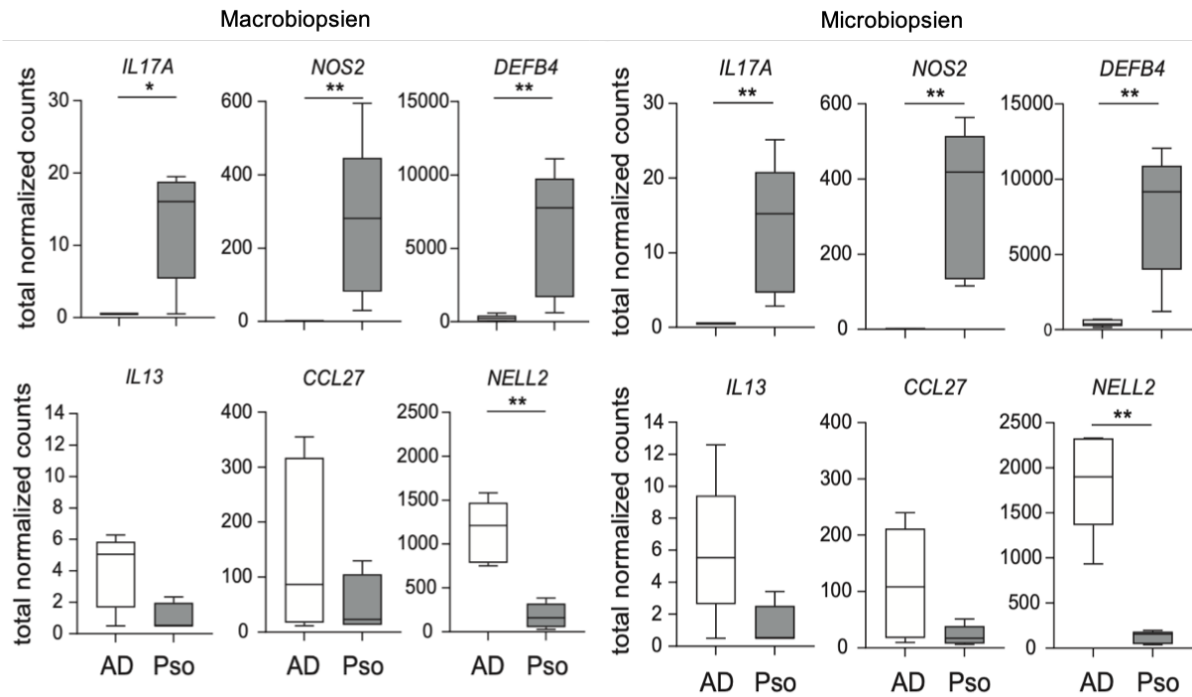


Abbildung 4.11: Krankheitsspezifische Gene für Psoriasis und A.E. in Macro- und Microbiopsien (Fischer, Doll et al., 2023)

Insgesamt konnte durch RNA-Sequenzierung gezeigt werden, dass die Genexpressionsmuster ähnlich zwischen Macro- und Microbiopsien sind und dass auch in den Microbiopsien hochregulierte krankheitsspezifische Gene identifiziert werden können.

#### 4.3.4 rt-PCR Daten von Macro- und Microbiopsien

Um die Kernfrage beantworten zu können, ob der MC für Microbiopsien ebenfalls geeignet ist, musste durch PCR ein Referenzgen bestimmt werden, die relativen Expressionswerte der in Frage kommende Zielgene bestimmt werden und basierend darauf die MC erstellt werden.

Teile dieses Kapitels wurden bereits in (Fischer, Doll et al., 2023) veröffentlicht.

#### Kohorte

Für den Vergleich der Genexpression zwischen Macro- und Microbiopsie wurden insgesamt Hautproben von 51 Patienten untersucht, 27 mit A.E., 19 mit Psoriasis sowie 5

unklar definierte Phänotypen. Es wurde jeweils eine Macro- und eine Microbiopsien aus derselben oder direkt nebeneinander liegenden Hautläsion des Patienten entnommen. Teilnehmer mit fehlender dazugehöriger Macro- bzw. Microbiopsie wurden für diese Untersuchung ausgeschlossen. Die Diagnose wurde histologisch, klinisch sowie das durch Therapieansprechen gestellt.

## Referenz Gen

Als Referenz Gene werden Gene definiert, die im Gegensatz zu regulierten Genen konstitutiv exprimiert werden. Zur Berechnung der DeltaCT Werte der Zielgene *NOS2*, *CCL27*, *IL36G* wurden mittels PCR die CT Werte von 2 Referenz Genen bestimmt: *18S* und *GAPDH*. Die CT Werte von *GAPDH* zeigten eine deutlich höhere Varianz als *18S* sowohl für Macro- als auch für Microbiopsien:  $\text{Varianz}(18S\text{-macro}) = 0,20$ ;  $\text{Varianz}(GAPDH\text{-macro}) = 1,57$ ;  $\text{Varianz}(18S\text{-micro}) = 0,74$ ;  $\text{Varianz}(GAPDH\text{-micro}) = 4,20$ . Im Bereich der Macrobiopsien lag der CT Mittelwert von *18S* bei 4,75 mit einer Standardabweichung von 0,45 und bei 18,59 für *GAPDH* mit einer Standardabweichung von 1,25. Der CT Mittelwert von *18S* bei den Microbiopsien lag bei 5,06 mit einer Standardabweichung von 0,86 im Gegensatz zu 18,74 mit einer Standardabweichung von 2,05 für *GAPDH*. Somit erfolgten die weiteren Berechnungen mit dem Referenz Gen *18S*.

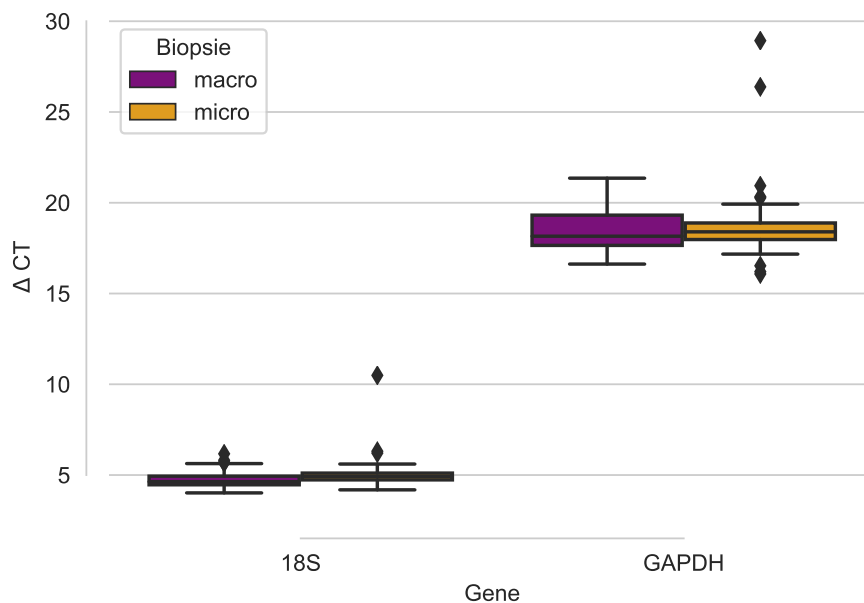


Abbildung 4.12: DeltaCT Werte von Referenz Gene 18S und GAPPDH

## Zielgene: NOS2, CCL27, IL36G

Erhoben wurden die relativen Genexpressionswerte von *NOS2*, *CCL27* sowie *IL36G*. Zur Kalibrierung wurden als Referenzwerte die Mittelwerte der Expressionswerte von den eben genannten Genen aus über 80 gesunden Hautproben verwendet. Die Berechnung dieser Werte erfolgte bereits zur Validierung des MC (Garzorz-Stark et al., 2016).

Zu erkennen war, dass die relativen Expressionswerte trotz teilweise hoher Varianz zwischen Macro- und Microbiopsien sehr ähnlich waren, es zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Fischer, Doll et al., 2023).

Für *NOS2* lag der Mittelwert der relativen Expressionen in der Psoriasis Kohorte für Macrobiopsien bei 36,72, für Microbiopsien bei 36,40 ( $p > 0,05$ ). In der Ekzem Kohorte bei 0,70 für Macrobiopsien und 1,45 für Microbiopsien ( $p > 0,05$ ).

Der Mittelwert der relativen Expressionen von *CCL27* lag in der Psoriasis Kohorte für Macrobiopsien bei 0,27 und bei 0,20 für Microbiopsien ( $p > 0,05$ ). In der Ekzem Kohorte lag der Wert für Macrobiopsien bei 1,06 und bei 1,19 für Microbiopsien ( $p > 0,05$ ).

Für *IL36G* wurde der Mittelwert in der Psoriasis Kohorte für Macrobiopsien bei 75,86 und für Microbiopsien bei 84,23 ( $p > 0,05$ ) errechnet. In der Ekzem Kohorte lag der Wert bei 18,86 für Macrobiopsien und 18,94 für Microbiopsien ( $p > 0,05$ ).

Zudem zeigte sich, dass sowohl in den Macro- als auch in den Microbiopsien, *NOS2* in den Psoriasis Proben signifikant hochreguliert und in den Ekzem Proben runterreguliert war ( $p(\text{macro}) < 0,001$ ;  $p(\text{micro}) < 0,05$ ). *CCL27* war hingegen in den Ekzem Proben höher reguliert als in den Psoriasis Proben ( $p(\text{macro}) < 0,0001$ ;  $p(\text{micro}) < 0,0001$ ). *IL36G* war wiederum in den Psoriasis Proben höher reguliert als in den Ekzem Proben ( $p(\text{macro}) < 0,001$ ;  $p(\text{micro}) < 0,001$ ).

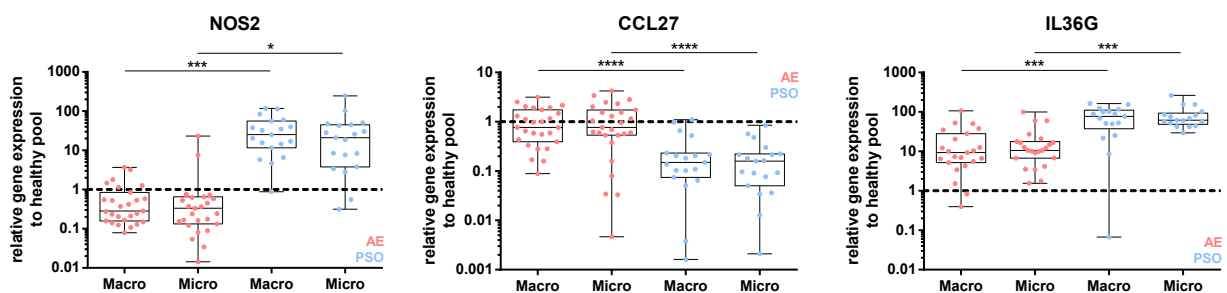


Abbildung 4.13: Relative Genexpressionen von *NOS2*, *CCL27* und *IL36G* von Macro- und Microbiopsien in Ekzem und Psoriasis Proben, in Anlehnung an (Fischer, Doll et al., 2023)

Zusammengefasst konnte hier gezeigt werden, dass die relativen Genexpressionswerte zwischen Macro- und Microbiopsien sehr ähnlich waren und sowohl in Macro- als auch Microbiopsien *NOS2* und *IL36G* in der Psoriasis Kohorte höher reguliert waren, während *CCL27* in der Ekzem Kohorte höher reguliert war.

### 4.3.5 Molecular Classifier von Macro- und Microbiopsien

Durch den *Classifier* kann die Wahrscheinlichkeit (in %) der vorliegenden Erkrankung prognostiziert werden.

Teile dieses Kapitels wurden bereits in (Fischer, Doll et al., 2023) veröffentlicht.

Die Graphik 4.14 zeigt die Ergebnisse des MC im Bereich der Macrobiopsien. Alle Ekzem Proben, in rot markiert, wurden als Ekzem erkannt. Eine einzige Psoriasis Probe, in blau, wurde fälschlicherweise als Ekzem erkannt (<50% Wahrscheinlichkeit für Psoriasis) (Fischer, Doll et al., 2023). Die Sensitivität des MC wurde für Macrobiopsien bei 89% für Psoriasis und 100% für Ekzem berechnet. Die unklaren Phänotypen wurden als Ekzem erkannt.

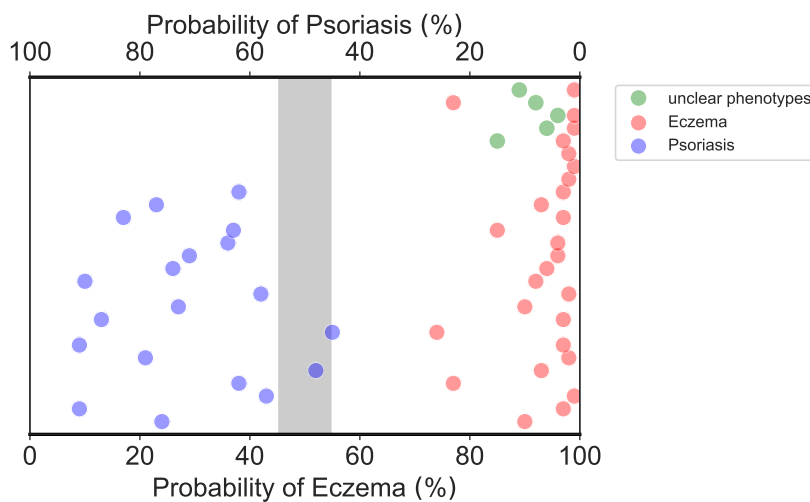


Abbildung 4.14: *Molecular Classifier* - Macrobiopsien, in Anlehnung an (Fischer, Doll et al., 2023)

Die Graphik 4.15 zeigt die MC Ergebnisse im Bereich der Microbiopsien. Hier wurde eine Ekzem Probe (in Rot, Wahrscheinlichkeit für Ekzem <50%) fälschlicherweise als Psoriasis erkannt und 6 Psoriasis Proben (in Blau, Wahrscheinlichkeit für Psoriasis unter 50%) wurden als Ekzem diagnostiziert (Fischer, Doll et al., 2023). Somit wurde die

Sensitivität des MC im Bereich der Microbiopsien bei 96% für Ekzem und 68% für Psoriasis berechnet. Erneut wurden alle unklaren Phänotypen als Ekzem identifiziert.

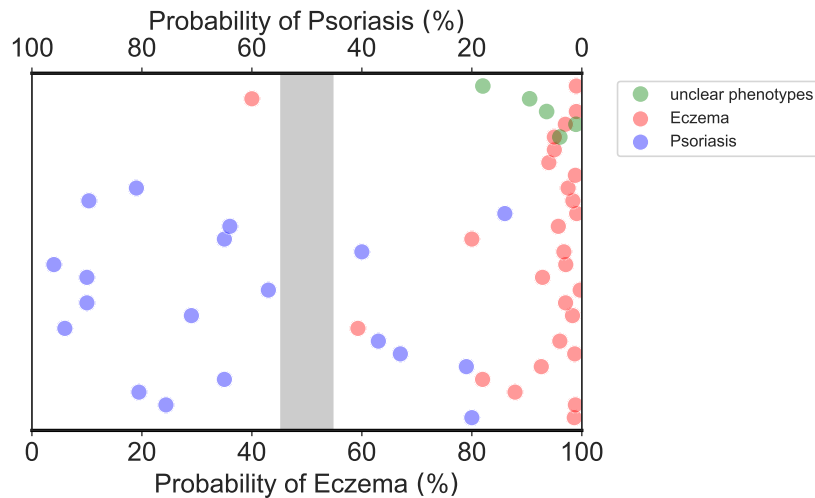


Abbildung 4.15: *Molecular Classifier* - Microbiopsien, in Anlehnung an (Fischer, Doll et al., 2023)

Insgesamt konnten durch den MC sowohl bei den Macro- als auch bei den Microbiopsien die meisten Proben der PSO oder A.E. richtig zugeordnet werden, allerdings zeigte sich die Sensitivität im Bereich der Microbiopsien etwas geringer.

## 4.4 Evaluation durch Patienten

Mittels des ausgeteilten Fragebogens sollte ermittelt werden, welche Vorteile bzw. Nachteile Microbiopsien im Gegensatz zur Macrobiopsien erbringen können. Insgesamt nahmen 17 Patienten an unserer schriftlichen Befragung teil.

Am Tag der Biopsie Entnahme gaben die Patienten einen mittleren Schmerz von 4,2 (NRS 0-10) für Micro- und 4,7 für Macrobiopsien an. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Biopsien ( $p=0,26$ ). Allerdings ist hier in Betracht zu ziehen, dass die Macrobiopsien in Lokalanästhesie während die Microbiopsien ohne durchgeführt worden sind.

In den folgenden 30 Tagen nach der Biopsie zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied bei den angegebenen Schmerzen ( $p=0,21$ ). Im Mittel wurden die Schmerzen für die Macrobiopsien bei 1,8 und für die Microbiopsien bei 2,5 angegeben.

Da für Microbiopsien weder Lokalanästhesie, Naht oder Dritteln der Probe nötig waren, zeigte sich der zeitliche Aufwand deutlich geringer ( $p < 0,0005$ ). Im Mittel wurden zwischen 1-5 Minuten für die Microbiopsien und zwischen 25-30 Minuten für die Macrobiopsien benötigt.

In Bezug auf das kosmetische Ergebnis, zeigten sich die Patienten in der ersten Woche mit den Microbiopsien mit 8,5/10 zufriedener als mit den Macrobiopsien mit 5,8/10 ( $p = < 0,005$ ). Allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Folgemonat der Biopsie ( $p = 0,1$ ), die mittlere Zufriedenheit für Microbiopsien wurde bei 8,2/10 und 7,2/10 für Macrobiopsien angegeben.

Nur bei zwei Macrobiopsien wurden Komplikationen, im Sinne von leichter Nachblutung und Superinfektion angegeben. Keine bei den Microbiopsien.

Auch in Bezug auf die Heilungsdauer der hinterlassenen Wunden nach der Biopsieentnahme zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Micro- und Macrobiopsien ( $p < 0,005$ ). Im Mittel benötigte es 8,1 Tage bis es zur kompletten Abheilung der Microbiopsien und 19,7 der Macrobiopsien kam.

Zuletzt wurden die Patienten gefragt, ob sie eine erneute Biopsie zulassen würden. 8 von 9 würden eine Microbiopsie, 1 von 9 würde eine Micro- oder Macrobiopsie erneut zulassen.

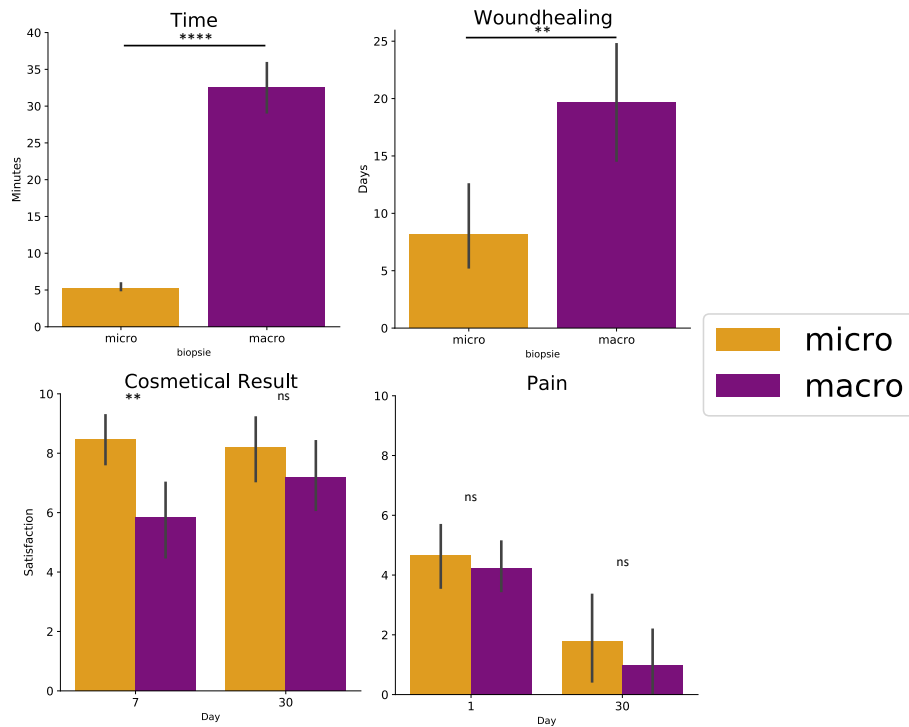


Abbildung 4.16: Evaluation von Zeitaufwand, Wundheilung, kosmetisches Ergebnis sowie Schmerzen von Micro- und Macrobiopsien

Insgesamt konnten durch den MC sowohl bei den Macro- als auch bei den Microbiopsien die meisten Proben der PSO oder A.E. richtig zugeordnet werden, allerdings zeigte sich die Sensitivität im Bereich der Microbiopsien etwas geringer.



# 5 Diskussion

Mit dem Ziel ein neues minimal invasives diagnostisches Tool zur Differenzierung von Psoriasis und A.E. einsetzen zu können, wurden in dieser Arbeit Macro- und Microbiopsien verglichen. Sowohl histologische Bilder als auch Genexpressionsprofile, Molecular Classifier sowie Biopsieverfahren wurden untersucht.

## 5.1 Vergleich von Macro- und Microbiopsien aus verschiedenen Blickpunkten

### 5.1.1 Vergleich der Biopsieverfahren

Insgesamt gaben Patienten an, dass sie die Microbiopsie der Macrobiopsie für eine Hautprobenentnahme vorziehen würden. Am deutlichsten zeigten sich die Vorteile der Microbiopsie im Zeitgewinn, Wundheilungstendenz sowie kosmetisches Ergebnis. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Bereich der erlebten Schmerzen durch die Probeentnahme. Jedoch ist hier anzumerken, dass Macrobiopsien in Lokalanästhesie entnommen wurden und Microbiopsien ohne Anästhesie. Daraus kann konkludiert werden, dass die zugeführten Schmerzen durch die Spritze der Lokalanästhesie in etwa der Schmerzen der Microbiopsie Entnahme ohne Anästhesie entsprachen. Dies kann für Patienten weiterhin sehr vorteilhaft sein, da auch wenn echte Lokalanästhetika-Allergien sehr selten sind, viele Patienten eine Unverträglichkeit angeben (Fathi, Serota, & Brown, 2016) und eine aufwendige allergologische Abklärung vor Probeentnahme notwendig machen. Das Risiko einer Anaphylaxie sowie Kosten und Zeit für eine aufwendige allergologische Abklärung können durch die minimal invasive Probenentnahme reduziert werden.

Aus der Sicht des Klinikers, zeigt sich die minimal invasive Entnahmetechnik ebenfalls in vielen Punkten vorteilhaft. Der Zeitgewinn im klinischen Alltag ist zweifellos der bestimmende Faktor. Zusätzlich werden durch fehlende Betäubung und Naht, Kosten und Material gespart. Auf eine laufende Koagulation des Patienten muss ebenfalls nicht geachtet werden.

Nachteilig kann bei der kleinen Größe der Probe sein, dass sie rasch in Flüssigkeit eingelegt werden muss, da sie schnell austrocknen kann. Außerdem ist die Hautprobe in manchen Fällen schwieriger aus der Biopsie Stanze zu entnehmen und benötigt etwas Übung in der Handhabung. Durch das geringe Ausmaß kann die Probe bei Unaufmerksamkeit schneller verloren gehen.

Insgesamt überwiegen die Vorteile der Microbiopsie Entnahme sowohl von Seiten des Patienten als auch des Klinikers, allerdings ist bei der kleinen Größe der Probe eine akkuratere Bearbeitung notwendig.

### **5.1.2 Vergleich der Histologie**

Trotz der minimalen Größe war es möglich pathognomonische histologische Merkmale zu erkennen und somit die Proben klar der Psoriasis beziehungsweise A.E. zuzuordnen. Der Prozess um histologische Schnitte aus den Microbiopsien zu erhalten ist aufwendiger und ist somit anfälliger für Artefakte. Durch die geringe Größe spielt die Auswahl einer repräsentativen Stelle für die Probenentnahme eine sehr große Rolle.

Bei Nichtvorhandensein histologischer Merkmale in der Microbiopsie, trotz optimal ausgewählter Probeentnahmestelle, kann die Diagnose nicht sicher gestellt werden. Zum Beispiel können in einer Psoriasis Plaque viele Munro'sche Mikroabszesse vorhanden sein, jedoch von einer Microbiopsie nicht erfasst werden. Neutrophile Granulozyten haben einen Durchmesser von etwa 10  $\mu\text{m}$  bis 15  $\mu\text{m}$ , durch Ansammlung dieser Zellen bilden sich die Munro'sche Mikroabszesse und können 100  $\mu\text{m}$  groß werden. Da letztere nicht kontinuierlich im Stratum corneum vorhanden sind, ist es annehmbar, dass nicht jede 1000  $\mu\text{m}$  breite Microbiopsie Munro'sche Mikroabszesse präsentiert. In unserem Patientenkollektiv konnte im Bereich der Microbiopsie Probe ein Munro'scher Mikroabszess nachgewiesen werden (Siehe Abbildung 4.2), bei  $n=1$  ist dies jedoch nicht repräsentativ.

### **5.1.3 Vergleich der Molecular Classifier Ergebnisse**

#### **Molecular Classifier Ergebnisse bei Psoriasis und Atopisches Ekzem**

Mehrheitlich konnte der MC die Diagnosen der Proben richtig zuordnen, jedoch zeigte sich eine Diskrepanz der Sensitivität des MC zwischen Macro- und Microbiopsien. Vor allem Psoriasis Proben wurden unter den Microbiopsien fälschlicherweise als Ekzem erkannt. Unter den Microbiopsien wurden 6 Psoriasis Proben fälschlicherweise als Ekzem und eine Ekzem Probe fälschlicherweise als Psoriasis erkannt.

Ein Zusammenhang mit der Lokalisation der entnommenen Proben oder RNA Konzentration, der vom MC falsch zugeordneten Biopsien, konnte ausgeschlossen werden siehe Tabelle 4.1.

Als weitere Ursache der Diskrepanz der MC Ergebnisse könnte ein Verlust von molekularer Signatur der Microbiopsien sein. In Anbetracht der Ergebnisse der relativen Expressionswerte von *NOS2*, *CCL27* sowie *IL36G* (Siehe Abbildung 4.13), die kein signifikanten Unterschied zwischen Macro- und Microbiopsie zeigten erscheint dies unwahrscheinlich. Ausgeschlossen konnte dies letztendlich durch RNA-Sequenzierung. Hier wurde kein signifikanter Unterschied der Genexpressionswerte zwischen Macro- und Microbiopsien erkannt. Durch eine erhöhte Probenanzahl könnte die Aussagekraft dieser Ergebnisse nochmal verstärkt werden.

Ebenso zeigte sich die Probenzahl der verwendeten mRNA zur Qualitätsuntersuchung durch Bioanalyzer mit  $n = 14$  relativ gering, daher sind die Ergebnisse als Stichprobe zu sehen. Allerdings ist bei ähnlichen Genexpressionswerten über die gesamte Kohorte anzunehmen, dass die RNA-Qualität in den weiteren Proben ebenfalls nur gering degradiert war. Durch den limitierenden Faktor der geringen RNA Konzentration in den Microbiopsien konnte keine RNA Qualitätsuntersuchung aller Proben durchgeführt werden.

*NOS2* und *CCL27* eignen sich als perfektes Paar zur Differenzierung der zwei Erkrankungen, da sie entgegengesetzt reguliert sind (Quaranta et al., 2014). Es ist jedoch zu bedenken, dass *CCL27* vorwiegend von Keratinozyten exprimiert wird (Davila et al., 2022; Homey et al., 2000). *NOS2* wird hingegen hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und weniger von Keratinozyten exprimiert (Uhlen et al., 2015). Keratinozyten sind kontinuierlich in Macro- sowie Microbiopsien vorhanden. Neutrophile Granulozyten sind durch ihre diskontinuierliche Verteilung, nur zufällig in den Microbiopsien und somit wahrscheinlich nicht in jeder Probe vorhanden. In den Macrobiopsien ist es sehr wahrscheinlich, dass Neutrophile vermehrt vorhanden sind. So wären die unterschiedlichen MC Ergebnisse zwischen Macro- und Microbiopsien durch die unterschiedlichen Verhältnisse von *NOS2* zu *CCL27* in den Biopsien durch die zufällige Verteilung von neutrophilen Granulozyten erklärbar. Durch weitere histologische Untersuchungen könnte untersucht werden ob das Verhältnis von Keratinozyten zu neutrophilen Granulozyten tatsächlich zwischen Macro- und Microbiopsien abweichend ist.

Um diesen Schwankungen entgegenzusetzen könnte es sinnvoll sein ein MC ausschließlich mit Keratinozyten Marker zu entwickeln, wie zum Beispiel *CCL27* und *IL36G*.

## **Molecular Classifier Ergebnisse bei unklaren Phänotypen**

Unklare Phänotypen zeigten sich klinisch und histologisch als Mischtyp zwischen Psoriasis und Ekzem. Eine klare Zuordnung wäre zur spezifischen Therapie Einleitung jedoch sehr hilfreich.

Durch den MC wurden alle Proben sowohl in den Macro- als auch in den Microbiopsien als Ekzem erkannt, sodass die Proben insgesamt eher als psoriasiforme Ekzeme und weniger als ekzematisierte Psoriasis einzuordnen wären. Durch die geringe Patientenzahl,  $n=5$  ist die Untersuchung dieser Kohorte jedoch nicht repräsentativ. Aktuell kann nicht abschließend geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß bei unklaren Phänotypen beziehungsweise Mischtypen der MC zwischen Macro- und Microbiopsien abweichend ist. Allerdings konnte bei  $n=2$  kein signifikanter Unterschied der exprimierten Gene zwischen Macro- und Microbiopsien erkannt werden.

Zur Erforschung welche krankheitsspezifischen Gene in Macro- und Microbiopsien überexprimiert sind, um diese unklaren Phänotypen besser zuzuordnen zu können sind weitere Untersuchungen und eine größere Kohorte erforderlich.

## **5.2 Schlussfolgerung und Ausblick**

### **5.2.1 Möglichkeiten im Bereich der minimal invasiven Diagnostik**

Zur Verbesserung der Diagnostik und seiner Akzeptanz bei Patienten aber auch der Durchführung im klinischen Alltag durch medizinisches Personal führt kein Weg daran vorbei, die Medizin und damit auch die diagnostischen Verfahren immer minimal invasiver zu gestalten. Den MC anhand von Microbiopsien durchzuführen ist ein wichtiger Schritt in diese Richtung.

Es gibt jedoch Ansätze diagnostische Verfahren mit noch minimaleren invasiven Tools durchführen zu können. In der Literatur werden seit 2013 andere als in dieser Studie verwendete Microbiopsien beschrieben (Lin et al., 2013). Diese „Microbiopsien“ sind 0,5 mm breit und 0,2 mm dick, Lokalanästhesie oder eine Naht sind ebenfalls nicht vonnöten. Im Gegensatz zu den 1 mm Microbiopsien, die wir für den MC verwendet haben, konnte bei den eben genannten „Microbiopsien“ keine Narbe an der Probenentnahmestelle nachgewiesen werden (Kislevitz et al., 2021).

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten, die eine konventionelle Biopsie (4-6 mm) verweigerten, sich für eine „Microbiopsie“ ( $\leq 1$  mm) bereit erklärt hatten, was

für die Akzeptanz dieser Methodik spricht (Yamada, Melville, Cowin, Prow, & Kopecki, 2021). Wenn die richtige Diagnosestellung und somit die richtige Therapie Einleitung daran scheitert, dass Patienten einen Eingriff zu Probengewinnung verweigern, ist dies eine gute Möglichkeit Patienten eine radikale Diagnostik zu ersparen.

Außerdem konnten trotz der minimalen Größe, von zwei Genen die relative Expressionswerte mittels rt-PCR gemessen werden (Yamada et al., 2021). Fraglich ist wie viel weitere Geneexpressionsanalysen die Menge an RNA erlauben würde. Im Gegensatz zu den 1 mm Microbiopsien konnte aus den hier beschriebenen „Microbiopsien“ keine histologische Untersuchung erfolgen (Lin et al., 2013).

Als noch weniger invasiver beziehungsweise nicht-invasive Vorgehensweise wird vor allem im Bereich von Psoriasis-, Ekzem- aber auch Melanom Forschung die Tape-Stripping Technik erprobt. Tatsächlich wurde diese Methode schon 1952 von Hermann Pinkus zur Erforschung von epithelialen Regenerationsmuster verwendet (Barber & Boiko, 2022). Durch Anbringen und Abziehen eines Klebestreifens an der Haut werden oberflächliche Schichten vom Stratum corneum entfernt und können weiter untersucht werden. In Psoriasis Plaques konnten bereits erhöhte *IL36G* mRNA und Protein Level (Sandwich-ELISA) gemessen werden.

*CCL27* zeigte sich jedoch, anders als erwartet, in Ekzem Plaques nicht erhöht. *CCL17* wurde stattdessen erhöht nachgewiesen, jedoch nicht in allen Ekzem Proben (Berekmeri et al., 2018). Im Gegensatz zu den 1 mm Microbiopsien konnte durch Tape-Stripping kein klarer Ekzem Biomarker erkannt werden.

Erst kürzlich wurden mittels Tape-Stripping bei Psoriasis und Ekzem Proben Transkriptom Analysen durchgeführt. Es zeigten sich unterschiedlich regulierte Gene. Besonders stach *NOS2* heraus, anhand dessen in allen untersuchten Proben (n=20) Psoriasis von Ekzem unterschieden werden konnte (He et al., 2021).

Molekulare Marker scheinen für minimal bis nicht invasive Diagnostik geeignet zu sein. Ob basierend auf deren Expressionswerte ebenfalls ein MC gebildet werden kann, bleibt zum aktuellen Zeitpunkt noch unklar, jedoch denkbar.

Da Patienten häufig eine Reihe von Untersuchungen wie zum Beispiel Blutentnahmen standardmäßig bei Arztbesuche durchführen lassen, wäre es wünschenswert durch diese, weitere Diagnosen stellen zu können und somit den Patienten zusätzliche Untersuchungen und Termine ersparen zu können. So wäre es vorstellbar, dass durch eine simple Blutentnahme die Diagnose Ekzem oder Psoriasis, auch durch nicht Dermatologen ge-

stellt wird, und die weitere Therapie Einleitung und Verlaufskontrollen beim Dermatologen erfolgen. Nur wenige Patienten verweigern eine solch risikoarme und nahezu komplikationslose Untersuchung.

Es wurden bereits einige Biomarker von Psoriasis und Ekzem im Serum untersucht. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass IL-36 Level (ELISA) im Blut von Psoriasis Patienten im Gegensatz zu Hautgesunden Patienten mit der Krankheitsaktivität korreliert (Sehat, Talaei, Dadgostar, Nikoueinejad, & Akbari, 2018).

Bei Ekzem betroffene Kinder wurde CCL27 im Serum untersucht, die Serumlevel korrelierten mit der Krankheitsaktivität (Nakazato et al., 2008).

Eine Studie in Indien konnte erhöhte Stickstoffmonoxid (NO) Serumlevel in Psoriasis Patienten im Gegensatz zu gesunden Patienten detektieren (Gokhale, Belgaumkar, Pandit, Deshpande, & Damle, 2005).

Da aktuell keine Vergleichsstudie zu den Biomarker im Serum zwischen Psoriasis und Ekzem Patienten vorliegt, ist unklar ob die oben genannten Biomarker im Serum sich zur Unterscheidung der zwei Erkrankungen eignen würden. Zudem wurden die Biomarker durch unterschiedliche Methoden, aber nicht mit rt-PCR gemessen.

Daher ist eine aktuelle Verwendung von Serum Proben zur Unterscheidung von Psoriasis und A.E. mithilfe des MC nicht möglich, weitere Untersuchungen sind notwendig. Das Potenzial von serologischen Biomarker zur Unterscheidung von Psoriasis und A.E. wird hier jedoch unterstrichen.

## **5.2.2 Minimal invasive und molekulare Diagnostik bei anderen chronisch entzündlichen Dermatosen**

Unsere Arbeit konzentrierte sich auf die Möglichkeiten von minimal invasiver molekularer Diagnostik im Bereich von Psoriasis und A.E., dies könnte auf andere chronisch entzündliche Dermatosen erweitert werden. Eine Großzahl weiterer Dermatosen wie zum Beispiel Lichen ruber, Hidradenitis suppurativa, Pityriasis rubra pilaris etc. zählen zu dieser großen Gruppe. Die Lebensqualität der betroffenen Personen ist häufig stark beeinträchtigt. In manchen Fällen stellen diese Erkrankungen ebenfalls eine therapeutische aber auch eine diagnostische Herausforderung dar. Wie bei Psoriasis und A.E. gelten im gesamten Bereich der chronisch entzündlichen Dermatosen bis heute als diagnostischer Goldstandard, klinische und histologische Merkmale, die sich häufig als subjektive Methoden erweisen.

Zur Entnahme von Hautproben werden auch hier in der Regel 4-6 mm Biopsie Stanzen

verwendet. Minimal invasive Diagnostik ist bisher noch kein Standard im Bereich der Dermatologie, jedoch zeigen sich immer mehr Fälle, wo sie zur Anwendung kommen. Wie in Absatz 5.2.1 bereits erwähnt, konnte demonstriert werden, dass Microbiopsien besser als Macrobiopsien akzeptiert werden (Yamada et al., 2021).

Minimal invasive Diagnostik kann ebenfalls das Infektionsrisiko im Gegensatz zu invasiveren Verfahren bei bestimmten Hauterkrankungen minimieren. Zum Beispiel konnten bei Warzen durch Microbiopsien HPV-DNA nachgewiesen und somit die Diagnose bestätigt werden (Tom et al., 2016) ohne das Risiko für Autoinokulation einzugehen.

Durch eine andere Art minimal invasiver Diagnostik konnten Unterschiede zwischen zwei sehr ähnlichen entzündlichen Dermatosen identifiziert werden. Durch die nicht schmerzhaft kaum invasive Dermal Biomarker Patch Anwendung, bestehend aus 100 Pyramidenförmige Micronadeln (750  $\mu\text{m}$  lang und an der Spitze 200 x 200  $\mu\text{m}$  breit) konnten durch Transkriptom Analyse unterschiedlich regulierte Gene zwischen Lichen planus pigmentosus inversus und Lichen planus pigmentosus sowie Lichen planus festgestellt werden (Dickman et al., 2022).

Durch weitere Transkriptom Analysen könnten durch unterschiedlichste minimal invasive Diagnostik weitere Biomarker identifiziert werden um den bestehenden MC ausweiten und weitere Erkrankungen voneinander unterscheiden zu können um weiter eine optimale Therapie anbieten zu können.

Im Bereich der Dermato-onkologie konnten bereits viele objektiv messbare molekulare Marker mit hoher diagnostischer und prognostischer Relevanz ausfindig gemacht werden (Levine & Fisher, 2014). Im Bereich der chronisch entzündlichen Hauterkrankungen liegt die molekulare Medizin erst in ihrer Anfangsphase (Garzorz-Stark & Eyerich, 2019).

Die zur Differenzierung von Psoriasis und A.E. verwendeten Biomarker konnten bereits in anderen Dermatosen erhöht exprimiert gefunden werden. Zum Beispiel zeigte sich NOS2 in Pityriasis lichenoides Läsionen immunhistochemisch erhöht (Di Giunta, da Silva, & Sotto, 2009). Ebenfalls konnte NOS2 in Rosazea Hautproben erhöht exprimiert gemessen werden (Moura, Guedes, Rivitti-Machado, & Sotto, 2018). Allerdings wurden die Hautproben nur im Vergleich mit hautgesunden Kontrollen untersucht, es kann also daraus nicht geschlossen werden, dass der Marker diese Erkrankungen von anderen Dermatosen unterscheidet. Zudem wurde NOS2 in den zwei eben erwähnten Arbeiten immunhistochemisch nachgewiesen, daher bleibt ein Vergleich mit dem durch PCR gemessene Biomarker schwierig.

CCL27 wurde beispielsweise in Alopecia areata Hautläsionen erniedrigt im Gegensatz

zu gesunder Haut nachgewiesen. Nach Diphencyprone Therapie zeigten sich die CCL27 Werte erhöht. Auch hier kann kein Fazit zur Bedeutung von CCL27 zur Unterscheidung von Alopecia areata im Gegensatz zu anderen Hauterkrankungen gezogen werden.

IL36G zeigte sich in Generalisierter Psoriasis Pustulosa, welche immer mehr als eigene Entität und nicht mehr als Variante der Psoriasis gesehen wird, erhöht exprimiert (Shao et al., 2019). So auch neben viele andere Marker in Pyoderma gangränosum Läsionen (Wang et al., 2017). Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig um herauszufinden ob diese Marker zur Unterscheidung von anderen Dermatosen geeignet wären.

Nicht nur Psoriasis und A.E. sind in manchen Fällen schwer voneinander zu unterscheiden, auch Lichen ruber ist in vielen Fällen eine valide Differentialdiagnose. CXCL9 konnte sich als signifikanter Marker für Lichen ruber herauskristallisieren (Wenzel et al., 2008). Die Expression des Zytokins war signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen aber auch im Vergleich zu Psoriasis und Ekzem Proben. Eine Erweiterung des *Classifiers* mit Integration zusätzlicher Biomarker zur weiteren Differenzierung von Lichen ruber, Psoriasis und Ekzem erscheint möglich, bedarf jedoch noch weiteren Analysen.

Weitere Proteine konnten identifiziert werden, welche als Krankheitsaktivitätsmarker fungieren könnten, so beispielsweise Lipocalin-2 bei Hidradenitis suppurativa (Wolk et al., 2017). Jedoch ist unklar inwiefern dieser Marker die Erkrankung von anderen unterscheiden kann.

In dieser Arbeit ist es uns gelungen die molekulare Signatur von Psoriasis und Ekzem anhand der Microbiopsien zu bestätigen (siehe Abbildung 4.13). Bei Psoriasis zeigte sich *NOS2* und *IL36G* hochreguliert und *CCL27* bei A.E. Dies zeigt nochmal, dass die Erkrankungen zu zwei unterschiedlichen Gruppen gehören. Immer mehr werden die chronisch entzündlichen Erkrankungen anhand ihres immunologischen Profils anstatt ihrer klinischen Präsentation klassifiziert. Die Identifizierung der molekularen Signatur ermöglicht unter anderem die Erkennung von Therapietargets und somit die Entwicklung neuer spezifischer Therapien sowie erfolgreiche Verwendung von spezifischen Therapien bei mehreren Erkrankungen, die der gleichen Gruppe zugehörig sind. Es konnten bereits 6 unterschiedliche Immunreaktionsmuster identifiziert werden. So wird das A.E. dem „Pattern2“, dem TH-2 Zell gesteuertem Muster unterteilt, während Psoriasis zu „Pattern 3“ (Th-17, Th-22) zählt (Eyerich & Eyerich, 2018).

NOS2 und IL-36 werden zum Beispiel als valide Marker für Pattern 3 (Eyerich & Eyerich, 2018) gesehen, durch weitere Untersuchungen könnten weitere Marker für andere



Pattern bestimmt werden und somit die Diagnose und gegebenenfalls Therapieoptionen für weitere Erkrankungen erleichtern.

## 6 Fazit der Ergebnisse

Auch in der untersuchten Microbiopsie konnte die Diagnose Psoriasis und Ekzem durch erkannte pathognomonische Merkmale histologisch gestellt werden.

Wie zu erwarten waren die RNA Konzentrationen in den Microbiopsien deutlich geringer, allerdings zeigte sich die RNA Qualität, in den probeweise untersuchten Biopsien, vergleichbar zwischen Macro- und Microbiopsien.

Ein Verlust an molekularer Signatur in Micro- im Gegensatz zu Macrobiopsien konnte durch RNA-Sequencing weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die durch rt-PCR gemessenen Genexpressionwerte von *NOS2*, *CCL27*, *IL36G* zeigten sich ebenfalls nicht differierend zwischen Macro- und Microbiopsien.

Basierend auf den Expressionswerten von *NOS2* und *CCL27* konnte sowohl für Macro- als auch Microbiopsien durch den MC in den meisten Fällen die richtige Diagnose Psoriasis oder Ekzem gestellt werden. Allerdings zeigte sich die Sensitivität im Bereich der Microbiopsien etwas geringer als bei Macrobiopsien, vor allem bei Psoriasis.

## 7 Zusammenfassung

Psoriasis und A.E. gehören zu den am häufigsten vorkommenden chronisch entzündlichen Hauterkrankungen und stellen eine große sozioökonomische Last für das Gesundheitswesen dar. Für eine erfolgreiche Therapie ist die richtige Diagnosestellung primordial, jedoch kann sich genau dies in manchen Fällen mit den aktuell zur Verfügung stehenden diagnostischen Mitteln schwierig darstellen. Daher gewinnt die molekulare Diagnostik immer mehr an Bedeutung. Zur Differenzierung von Psoriasis und A.E. konnte bereits ein MC, basierend auf die Genexpressionswerte von *NOS2* und *CCL27*, erstellt werden (Garzorz-Stark et al., 2016). Die Untersuchungen erfolgten bisher mit Hautproben mit einem Durchmesser von 4-6 mm, genannt Macrobiopsien.

In Zeiten von minimal invasiver Medizin war es Ziel dieser Arbeit im Bereich der Diagnostik von chronisch entzündlichen Dermatosen Microbiopsien, mit einem Durchmesser von 1 mm mit den aktuell noch meistens verwendeten Macrobiopsien unter verschiedenen Blickpunkten zu vergleichen. Die Histologie von Macro- und Microbiopsie, die RNA-Konzentration und -Qualität, RNA-Sequenzierung, Genexpressionswerte von *NOS2*, *CCL27* und *IL36G* sowie die MC Ergebnisse wurden zwischen den zwei Biopsie Arten verglichen. Abschließend wurden Patienten zur Evaluation der zwei Probenentnahmen befragt.

Trotz der geringeren Größe wurden in der Histologie alle Hautschichten bis tief dermal der Microbiopsie repräsentiert. Auch pathognomische Merkmale wie Parahyperkeratose, Munro'sche Abszesse oder seröse Krusten konnten in der Microbiopsie identifiziert werden. Microbiopsien können also zur histologischen Diagnosestellung verwendet werden. Die RNA Konzentration im Bereich der Microbiopsien zeigte sich im Schnitt 10-fach geringer als in den Macrobiopsien. Es konnte kein signifikanter Unterschied der RNA Qualität zwischen den probeweise untersuchten Macro- und Microbiopsien gezeigt werden. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Sequenzierungsdaten zwischen Macro- und Microbiopsien festgestellt werden. Die Genexpressionswerte von

*NOS2*, *CCL27* und *IL36G* zeigten sich ebenfalls ähnlich zwischen Macro- und Microbiopsien. Wie zu erwarten, waren in beiden Probenarten *NOS2* und *IL36G* bei Psoriasis höher und *CCL27* bei A.E. höher exprimiert. Der MC konnte wohl mit den Macro- und Microbiopsien erstellt werden. Die Sensitivität für Psoriasis im Bereich der Microbiopsien zeigte sich mit 68% geringer als bei den Macrobiopsien mit 89%. Für A.E. wurde die Sensitivität bei 100% im Bereich der Macro- und 96% im Bereich der Microbiopsien errechnet.

Durch Fragebogenauswertung zeigte sich, dass die Mehrheit der Patienten die Micro- der Macrobiopsie Entnahme bevorzugen würden. Die erlebten Schmerzen durch die Lokalanästhesie vor der Macrobiopsie Entnahme entsprach in etwa der Schmerzen der Microbiopsie Entnahme ohne Lokalanästhesie.

Microbiopsien stellten sich als wertvolles und vielversprechendes Tool zur histologischen und molekularen Diagnostik von Psoriasis und A.E. heraus, auch wenn die Sensitivität des MC für Psoriasis im Bereich der Microbiopsien etwas geringer als die von Macrobiopsien war. Weitere Untersuchungen sind notwendig um zu überprüfen ob weitere Marker identifiziert werden müssen oder bestehende ausschließlich Keratinozyten Marker wie zum Beispiel *CCL27* und *IL36G* für ein MC geeignet wären um eine höhere Sensitivität in diesem Bereich zu erreichen.

Microbiopsien sind ein wichtiger Schritt im Bereich der minimal invasiven Diagnostik. Erstrebenswert wäre es im klinischen Alltag noch weniger invasive Techniken, wie zum Beispiel Tape-Stripping zur Erfassung von molekularen Markern zur Diagnosestellung von chronisch entzündlichen Erkrankungen verwenden zu können. Weitere Studien sind notwendig um dies möglich zu machen.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass Microbiopsien ein vielversprechendes Tool sind mit welchen histologisch sowie mit Hilfe des MC Psoriasis von Ekzem unterschieden werden können. Jedoch könnte mit weiteren Untersuchungen der MC für Microbiopsien optimiert werden oder weitere Marker für noch minimalere Diagnostik oder andere chronisch entzündliche Dermatosen identifiziert werden.

## 8 Synopsis

Psoriasis and A.E. are two of the most common chronic inflammatory skin diseases and represent a major socio-economic burden for the healthcare system. For a successful therapy the correct diagnosis is primordial, however, with currently available diagnostic tools this can be very challenging in some cases. Therefore, molecular diagnostics is becoming more and more important. For the differentiation between psoriasis and A.E., a MC based on the gene expression of *NOS2* and *CCL27* has already been developed (Garzorz-Stark et al., 2016). Therefore, skin samples with a diameter of 4-6 mm: macrobiopsies have been used so far.

In times of minimally invasive medicine, the aim of this work was to compare microbiopsies with a diameter of 1 mm with the currently used macrobiopsies for the diagnosis of chronic inflammatory skin diseases. Histologies of macro- and microbiopsies, RNA concentrations and -quality, RNA sequencing, gene expression levels of *NOS2*, *CCL27* and *IL-36G* as well as MC results were compared between the two biopsy types. Finally, patients were interviewed to evaluate the biopsy procedure itself.

Despite the smaller size, all skin layers down to the dermis were represented histologically in the microbiopsy. Pathognomic features such as parahyperkeratosis, Munro's abscesses or scale crusts could also be identified. Hence, microbiopsies can be used for histological diagnosis.

The RNA concentration in the microbiopsies was on average 10-fold lower than in the macrobiopsies. No significant difference in RNA quality could be detected between the examined macro- and microbiopsies. Sequencing data showed also no significant difference between macro- and microbiopsies. Gene expression levels of *NOS2*, *CCL27* and *IL36G* were similar between macro- and microbiopsies, too. As expected, both in macro- and microbiopsies, *NOS2* and *IL36G* expression were higher in psoriasis samples whereas *CCL27* expression was higher in A.E. samples. The MC was established for both biopsy types. The sensitivity for psoriasis in microbiopsies was found to be lower at

68% than in macrobiopsies at 89%. For A.E., the sensitivity was calculated at 100% for macrobiopsies and 96% for microbiopsies.

The questionnaire assessment showed that the majority of patients would prefer micro- to macrobiopsy sampling. The pain experienced from local anesthesia for the macrobiopsy was similar to the pain experienced from microbiopsy sampling without local anesthesia.

Microbiopsies turned out to be a valuable and promising diagnostic tool for psoriasis and A.E., although the sensitivity of the MC for psoriasis in microbiopsies was somewhat lower than the MC of macrobiopsies. Further studies are needed to assess the necessity of other molecular markers or if keratinocyte specific markers, like CCL27 and IL-36G, would be suitable to achieve a higher sensitivity for the MC in microbiopsies.

Microbiopsies are an important step in the field of minimally invasive diagnostics. In clinical practice, it would be welcomed to use even less invasive techniques, such as tape stripping for the detection of useful molecular markers for the right diagnosis of chronic inflammatory skin diseases. This requires further investigations.

In conclusion, this study shows that microbiopsies are a promising tool to differentiate psoriasis from eczema histologically and with the MC. However, further studies could be helpful to optimise the MC in the field of microbiopsies. And also, to identify molecular markers for even more minimal diagnostic tools or for the diagnose of other chronic inflammatory skin diseases.

# Literaturverzeichnis

Augustin, M., Chapnik, J., Gupta, S., Buesch, K., Radtke, M. (2011). Psoriasis verursacht hohe Kosten, mindert die Produktivität am Arbeitsplatz und verringert die Lebensqualität. *Akt Dermatol*, 37: 353-359. Doi:10.1055/s-0030-1256636

Akdis, C. A., Akdis, M., Bieber, T., Bindslev-Jensen, C., Boguniewicz, M., Eigenmann, P., Hamid, Q., Kapp, A., Leung, D. Y. M., Lipozencic, J., Luger, T. A., Muraro, A., Novak, N., Platts-Mills, T. A. E., Rosenwasser, L., Scheynius, A., Simons, F.E., Spengel, J., Turjanmaa, K., Wahn, U., Weidinger, S., Werfel, T., Zuberbier, T. (2006). Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *J Allergy Clin Immunol*, 118(1), 152-169. doi:10.1016/j.jaci.2006.03.045

Arikawa, J., Ishibashi, M., Kawashima, M., Takagi, Y., Ichikawa, Y., & Imokawa, G. (2002). Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Invest Dermatol*, 119(2), 433-439. doi:10.1046/j.1523-1747.2002.01846.x

Armstrong, A. W., & Read, C. (2020). Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA*, 323(19), 1945-1960. doi:10.1001/jama.2020.4006

Aydin, O., Engin, B., Oguz, O., Ilvan, S., & Demirkesen, C. (2008). Non-pustular palmo-plantar psoriasis: is histologic differentiation from eczematous dermatitis possible? *J Cutan Pathol*, 35(2), 169-173. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18300385>

Ballardini, N., Kull, I., Soderhall, C., Lilja, G., Wickman, M., & Wahlgren, C. F. (2013). Eczema severity in preadolescent children and its relation to sex, filaggrin mutations,

asthma, rhinitis, aggravating factors and topical treatment: a report from the BAMSE birth cohort. *Br J Dermatol*, 168(3), 588-594. doi:10.1111/bjd.12196

Barber, C., & Boiko, S. (2022). Tape stripping: investigational, diagnostic and therapeutic uses in dermatology. *Clin Dermatol*. doi:10.1016/j.clindermatol.2022.02.008

Barrett, A., Hahn-Pedersen, J., Kragh, N., Evans, E., & Gnanasakthy, A. (2019). Patient-Reported Outcome Measures in Atopic Dermatitis and Chronic Hand Eczema in Adults. *Patient*, 12(5), 445-459. doi:10.1007/s40271-019-00373-y

Basra, M. K., Fenech, R., Gatt, R. M., Salek, M. S., & Finlay, A. Y. (2008). The Dermatology Life Quality Index 1994-2007: a comprehensive review of validation data and clinical results. *Br J Dermatol*, 159(5), 997-1035. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08832.x

Berekmeri, A., Latzko, A., Alase, A., Macleod, T., Ainscough, J. S., Laws, P., Goodfield, M. Wright, A., Helliwell, P., Edward, S., Brown, G. D., Reid, D. M., Wenzel, J., Stacey, M., Wittmann, M. (2018). Detection of IL-36gamma through noninvasive tape stripping reliably discriminates psoriasis from atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol*, 142(3), 988-991 e984. doi:10.1016/j.jaci.2018.04.031

Berth-Jones, J. (2005). The use of ciclosporin in psoriasis. *J Dermatolog Treat*, 16(5-6), 258-277. doi:10.1080/09546630500423914

Biedermann, T., & Werfel, T. (2015). Status quo and prospects for systemic therapy of atopic dermatitis. *Biologics ante portas. Hautarzt*, 66(2), 108-113. doi:10.1007/s00105-014-3575-8

Bozek, A., & Reich, A. (2017). The reliability of three psoriasis assessment tools: Psoriasis area and severity index, body surface area and physician global assessment. *Adv Clin Exp Med*, 26(5), 851-856. doi:10.17219/acem/69804

Brenaut, E., Horreau, C., Pouplard, C., Barnetche, T., Paul, C., Richard, M. A., Joly, P., Le Maitre, M., Aractingi, S., Aubin, F., Cribier, B., Jullien, D., Ortonne, J. P., Misery, L. (2013). Alcohol consumption and psoriasis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 27 Suppl 3, 30-35. doi:10.1111/jdv.12164



Chandra, A., Ray, A., Senapati, S., & Chatterjee, R. (2015). Genetic and epigenetic basis of psoriasis pathogenesis. *Mol Immunol*, 64(2), 313-323. doi:10.1016/j.molimm.2014.12.014

D'Erme, A. M., Wilsmann-Theis, D., Wagenpfeil, J., Holzel, M., Ferring-Schmitt, S., Sternberg, S., Wittmann, M., Peters, B., Bosio, A., Bieber, T., Wenzel, J. (2015). IL-36gamma (IL-1F9) is a biomarker for psoriasis skin lesions. *J Invest Dermatol*, 135(4), 1025-1032. doi:10.1038/jid.2014.532

Davila, M. L., Xu, M., Huang, C., Gaddes, E. R., Winter, L., Cantorna, M. T., Wang, Y., Xiong, N. (2022). CCL27 is a crucial regulator of immune homeostasis of the skin and mucosal tissues. *iScience*, 25(6), 104426. doi:10.1016/j.isci.2022.104426

Deckers, I. A., McLean, S., Linssen, S., Mommers, M., van Schayck, C. P., & Sheikh, A. (2012). Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: a systematic review of epidemiological studies. *PLoS One*, 7(7), e39803. doi:10.1371/journal.pone.0039803

Di Giunta, G., da Silva, A. M., & Sotto, M. N. (2009). Inducible nitric oxide synthase in pityriasis lichenoides lesions. *J Cutan Pathol*, 36(3), 325-330. doi:10.1111/j.1600-0560.2008.01028.x

Dickman, J., Howell, M., Hoopes, R., Wang, Y., Dickerson, T. J., Bottomley, M., Shamma, H. N., Rapp, C. M., Turner, M. J., Travers, J. B. (2022). Insights into Lichen Planus Pigmentosus Inversus using Minimally Invasive Dermal Patch and Whole Transcriptome Analysis. *J Clin Invest Dermatol*, 10(1). doi:10.13188/2373-1044.1000077

Eckert, L., Gupta, S., Amand, C., Gadkari, A., Mahajan, P., & Gelfand, J. M. (2018). The burden of atopic dermatitis in US adults: Health care resource utilization data from the 2013 National Health and Wellness Survey. *J Am Acad Dermatol*, 78(1), 54-61 e51. doi:10.1016/j.jaad.2017.08.002

Eyerich, K., & Eyerich, S. (2018). Immune response patterns in non-communicable inflammatory skin diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 32(5), 692-703. doi:10.1111/jdv.14673

Fathi, R., Serota, M., & Brown, M. (2016). Identifying and Managing Local Anesthetic Allergy in Dermatologic Surgery. *Dermatol Surg*, 42(2), 147-156. doi:10.1097/DSS.0000000000000596

Fischer, F., Doll, A., Uereyener, D., Roenneberg, S., Hillig, C., Weber, L., Hackert, V., Meinel, M., Farnoud, A., Seiringer, P., Thomas, J., Anand, P., Graner, L., Schlenker, F., Zengerle, R., Jonsson, P., Jargosch, M., Theis, F. J., Schmidt-Weber, C. B., Biedermann, T., Howell, M., Reich, K., Eyerich, K., Menden, M., Garzorz-Stark, N., Lauffer, F., Eyerich, S. (2023). Gene expression based molecular test as diagnostic aid for the differential diagnosis of psoriasis and eczema in formalin fixed and paraffin embedded tissue, microbiopsies and tape strips. *J Invest Dermatol*. doi:10.1016/j.jid.2023.02.015

Fritsch, P., & Schwarz, T. (2018). *Dermatologie Venerologie* (Vol. 3. Auflage): Springer.

Garzorz-Stark, N., & Eyerich, K. (2019). [Personalized medicine in the field of inflammatory skin diseases]. *Hautarzt*, 70(1), 15-20. doi:10.1007/s00105-018-4310-7

Garzorz, N., & Eyerich, K. (2015). NOS2 and CCL27: clinical implications for psoriasis and eczema diagnosis and management. *Expert Rev Clin Immunol*, 11(2), 167-169. doi:10.1586/1744666X.2015.996549

Garzorz-Stark, N., Krause, L., Lauffer, F., Atenhan, A., Thomas, J., Stark, S. P., Franz, R., Weidinger, S., Balato, A., Mueller, N. S., Theis, F. J., Ring, J., Schmidt-Weber, C. B., Biedermann, T., Eyerich, S., Eyerich, K. (2016). A novel molecular disease classifier for psoriasis and eczema. *Exp Dermatol*, 25(10), 767-774. doi:10.1111/exd.13077

Gisoni, P., Fostini, A. C., Fossa, I., Girolomoni, G., & Targher, G. (2018). Psoriasis and the metabolic syndrome. *Clin Dermatol*, 36(1), 21-28. doi:10.1016/j.clindermatol.2017.09.005

Gokhale, N. R., Belgaumkar, V. A., Pandit, D. P., Deshpande, S., & Damle, D. K. (2005). A study of serum nitric oxide levels in psoriasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 71(3), 175-178. doi:10.4103/0378-6323.16232

Gupta, M. A., Gupta, A. K., Schork, N. J., & Ellis, C. N. (1994). Depression modulates pruritus perception: a study of pruritus in psoriasis, atopic dermatitis, and chronic idio-

pathic urticaria. *Psychosom Med*, 56(1), 36-40. doi:10.1097/00006842-199401000-00005

Guttman-Yassky, E., Suarez-Farinas, M., Chiricozzi, A., Nograles, K. E., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Lin, P., Bergman, R., Bowcock, A. M., Krueger, J. G. (2009). Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis. *J Allergy Clin Immunol*, 124(6), 1235-1244 e1258. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.031

Guttman-Yassky, E., Teixeira, H. D., Simpson, E. L., Papp, K. A., Pangan, A. L., Blauvelt, A., Thaci, D., Chu, C. Y., Hong, H. C., Katoh, N., Paller, A. S., Calimlim, B., Gu, Y., Hu, X., Liu, M., Yang, Y., Liu, J., Tenorio, A. R., Chu, A. D., Irvine, A. D. (2021). Once-daily upadacitinib versus placebo in adolescents and adults with moderate-to-severe atopic dermatitis (Measure Up 1 and Measure Up 2): results from two replicate double-blind, randomised controlled phase 3 trials. *Lancet*, 397(10290), 2151-2168. doi:10.1016/S0140-6736(21)00588-2

Hanifin, J. M., & Rajka, G. (1980). Diagnostic Features of Atopic Dermatitis. *Acta Derm-Venerol.*, 44-47. doi:10.2340/00015555924447

Hawkes, J. E., Yan, B. Y., Chan, T. C., & Krueger, J. G. (2018). Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis. *J Immunol*, 201(6), 1605-1613. doi:10.4049/jimmunol.1800013 Homey, B., Ruzicka, T., & Wollenberg, A. (2018). Atopisches Ekzem. In: Plewig G., Ruzicka T., Kaufmann R., Hertl M. (eds) *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. (Vol. 7.): Springer, Berlin, Heidelberg.

He, H., Bissonnette, R., Wu, J., Diaz, A., Saint-Cyr Proulx, E., Maari, C., Jack, C., Louis, M., Estrada, Y., Krueger, J. G., Zhang, N., Pavel, A. B., Guttman-Yassky, E. (2021). Tape strips detect distinct immune and barrier profiles in atopic dermatitis and psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*, 147(1), 199-212. doi:10.1016/j.jaci.2020.05.048

Homey, B., Wang, W., Soto, H., Buchanan, M. E., Wiesenborn, A., Catron, D., Muller, A., McClanahan, T. K., Dieu-Nosjean, M. C., Orozco, R., Ruzicka, T., Lehmann, P., Oldham, E., Zlotnik, A. (2000). Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *J Immunol*, 164(7), 3465-3470. doi:10.4049/jimmunol.164.7.3465

- Jacobi, A., Antoni, C., Manger, B., Schuler, G., & Hertl, M. (2005). Infliximab in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*, 52(3 Pt 1), 522-526. doi:10.1016/j.jaad.2004.11.022
- Jungen, D., Augustin, M., Langenbruch, A., Zander, N., Reich, K., Stromer, K., Thaci, D., Purwins, S., Radtke, M., Gutknecht, M. (2018). Cost-of-illness of psoriasis - results of a German cross-sectional study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 32(1), 174-180. doi:10.1111/jdv.14543
- Kanwar, J. R., Kanwar, R. K., Burrow, H., & Baratchi, S. (2009). Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr Med Chem*, 16(19), 2373-2394. doi:10.2174/092986709788682155
- Kimball, A. B., Jacobson, C., Weiss, S., Vreeland, M. G., & Wu, Y. (2005). The psychosocial burden of psoriasis. *Am J Clin Dermatol*, 6(6), 383-392. doi:10.2165/00128071-200506060-00005
- Kislevitz, M., Wamsley, C., Bartels, M., Lu, K. B., Li, X., Pinch, S., Hoopman, J., Barton, F., Kenkel, J., Akgul, Y. (2021). Clinical Translation of Scarless 0.33-mm Core Microbiopsy for Molecular Evaluation of Human Skin. *Aesthet Surg J*, 41(11), NP1710-NP1720. doi:10.1093/asj/sjaa332
- Koberle, M., & Biedermann, T. (2018). [Microbiome, atopic eczema and blockade of type 2 immunity]. *Hautarzt*, 69(3), 197-203. doi:10.1007/s00105-018-4129-2
- Langan, S. M., Irvine, A. D., & Weidinger, S. (2020). Atopic dermatitis. *Lancet*, 396(10247), 345-360. doi:10.1016/S0140-6736(20)31286-1
- Lauffer, F., Eyerich, K., Boehncke, W. H., Asadullah, K., Beissert, S., Ghoreschi, K., & Schon, M. P. (2020). Cytokines of the IL-17 family in psoriasis. *J Dtsch Dermatol Ges*, 18(7), 675-681. doi:10.1111/ddg.14124
- Lee, C. S., & Li, K. (2009). A review of acitretin for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Drug Saf*, 8(6), 769-779. doi:10.1517/14740330903393732

Levine, D., & Fisher, D. E. (2014). Current status of diagnostic and prognostic markers in melanoma. *Methods Mol Biol*, 1102, 177-197. doi:10.1007/978-1-62703-727-3\_11

Lin, L. L., Prow, T. W., Raphael, A. P., Harrold Iii, R. L., Primiero, C. A., Ansaldo, A. B., & Soyer, H. P. (2013). Microbiopsy engineered for minimally invasive and suture-free sub-millimetre skin sampling. *F1000Res*, 2, 120. doi:10.12688/f1000research.2-120.v2

Mildner, M., Prior, M., Gschwandtner, M., Schuster, C., Tschachler, E., & Elbe-Burger, A. (2014). Epidermal CCL27 expression is regulated during skin development and keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol*, 134(3), 855-858. doi:10.1038/jid.2013.394

Misery, L. (2017). Burden of atopic dermatitis in adults. *Ann Dermatol Venereol*, 144 Suppl 5, VS23-VS28. doi:10.1016/S0151-9638(18)30088-7

Mohr, N., Naatz, M., Zeervi, L., Langenbruch, A., Bieber, T., Werfel, T., Wollenberg, A., Augustin, M. (2021). Cost-of-illness of atopic dermatitis in Germany: data from dermatology routine care. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 35(6), 1346-1356. doi:10.1111/jdv.17203

Moura, A. K. A., Guedes, F., Rivitti-Machado, M. C., & Sotto, M. N. (2018). Inate immunity in rosacea. Langerhans cells, plasmacytoid dendritic cells, Toll-like receptors and inducible oxide nitric synthase (iNOS) expression in skin specimens: case-control study. *Arch Dermatol Res*, 310(2), 139-146. doi:10.1007/s00403-018-1806-z

Mrowietz, U., Kragballe, K., Reich, K., Spuls, P., Griffiths, C. E., Nast, A., Franke, J., Antoniou, C., Arenberger, P., Balieva, F., Bylaite, M., Correia, O., Dauden, E., Gisoni, P., Iversen, L., Kemeny, L., Lahfa, M., Nijsten, T., Rantanen, T., Reich, A., Rosenbach, T., Segaert, S., Smith, C., Talme, T., Volc-Platzer, B., Yawalkar, N. (2011). Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus. *Arch Dermatol Res*, 303(1), 1-10. doi:10.1007/s00403-010-1080-1

Mrowietz, U., & Prinz, J. C. (2018). Psoriasis. In: Plewig G., Ruzicka T., Kaufmann R., Hertl M. (eds) *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. (G. Plewig, T. Ruzicka, R. Kaufmann, & M. Hertl Eds. 7 ed.): Springer, Berlin, Heidelberg.

Nakazato, J., Kishida, M., Kuroiwa, R., Fujiwara, J., Shimoda, M., & Shinomiya, N. (2008). Serum levels of Th2 chemokines, CCL17, CCL22, and CCL27, were the important markers of severity in infantile atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*, 19(7), 605-613. doi:10.1111/j.1399-3038.2007.00692.x

Nast, A., Altenburg, A., Augustin, M., Boehncke, W. H., Harle, P., Klaus, J., Koza, J., Mrowietz, U., Ockenfels, H. M., Philipp, S., Reich, K., Rosenbach, T., Schlaeger, M., Schmid-Ott, G., Sebastian, M., von Kiedrowski, R., Weberschock, T., Dressler, C. (2021). Deutsche S3-Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris, adaptiert von EuroGuiDerm - Teil 2: Therapiemonitoring, besondere klinische Situationen und Komorbiditat. *J Dtsch Dermatol Ges*, 19(7), 1092-1117. doi:10.1111/ddg.14507\_g

Nestle, F. O., Kaplan, D. H., & Barker, J. (2009). Psoriasis. *N Engl J Med*, 361(5), 496-509. doi:10.1056/NEJMra0804595

Otsuka, A., Nomura, T., Rerknimitr, P., Seidel, J. A., Honda, T., & Kabashima, K. (2017). The interplay between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Rev*, 278(1), 246-262. doi:10.1111/imr.12545

Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J., O'Regan, G. M., Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C. S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L. B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W. H. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*, 38(4), 441-446. doi:10.1038/ng1767

Parisi, R., Iskandar, I. Y. K., Kontopantelis, E., Augustin, M., Griffiths, C. E. M., Ashcroft, D. M., & Global Psoriasis, A. (2020). National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *BMJ*, 369, m1590. doi:10.1136/bmj.m1590

Patel, N., Nadkarni, A., Cardwell, L. A., Vera, N., Frey, C., Patel, N., & Feldman, S. R. (2017). Psoriasis, Depression, and Inflammatory Overlap: A Review. *Am J Clin*

Dermatol, 18(5), 613-620. doi:10.1007/s40257-017-0279-8

Peserico, A., Stadtler, G., Sebastian, M., Fernandez, R. S., Vick, K., & Bieber, T. (2008). Reduction of relapses of atopic dermatitis with methylprednisolone aceponate cream twice weekly in addition to maintenance treatment with emollient: a multicentre, randomized, double-blind, controlled study. *Br J Dermatol*, 158(4), 801-807. doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08436.x

Quaranta, M., Knapp, B., Garzorz, N., Mattii, M., Pullabhatla, V., Pennino, D., Andres, C., Traidl-Hoffmann, C., Cavani, A., Theis, F. J., Ring, J., Schmidt-Weber, C. B., Eyerich, S., Eyerich, K. (2014). Intraindividual genome expression analysis reveals a specific molecular signature of psoriasis and eczema. *Sci Transl Med*, 6(244), 244ra290. doi:10.1126/scitranslmed.3008946

Rendon, A., & Schakel, K. (2019). Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci*, 20(6). doi:10.3390/ijms20061475

Schmid-Ott, G., Jaeger, B., Kuensebeck, H. W., Ott, R., & Lamprecht, F. (1996). Dimensions of stigmatization in patients with psoriasis in a "Questionnaire on Experience with Skin Complaints". *Dermatology*, 193(4), 304-310. doi:10.1159/000246275

Schmitt, J., Schmitt, N. M., Kirch, W., & Meurer, M. (2009). Outpatient care and medical treatment of children and adults with atopic eczema. *J Dtsch Dermatol Ges*, 7(4), 345-351. doi:10.1111/j.1610-0387.2008.06967.x

Schon, M. P., & Boehncke, W. H. (2005). Psoriasis. *N Engl J Med*, 352(18), 1899-1912. doi:10.1056/NEJMra041320

Schuster, B., Peifer, C., Ziehfrend, S., Tizek, L., Biedermann, T., Zink, A., & Schielein, M. C. (2021). Happiness and depression in psoriasis: a cross-sectional study in Germany. *Qual Life Res*. doi:10.1007/s11136-021-02991-2

Sehat, M., Talaei, R., Dadgostar, E., Nikoueinejad, H., & Akbari, H. (2018). Evaluating Serum Levels of IL-33, IL-36, IL-37 and Gene Expression of IL-37 in Patients with Psoriasis Vulgaris. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 17(2), 179-187. Retrieved from <http://www.ijah.ir>

ps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29757591

Shao, S., Fang, H., Zhang, J., Jiang, M., Xue, K., Ma, J., Zhang, J., Lei, J., Zhang, Y., Li, B., Yuan, X., Dang, E., Wang, G. (2019). Neutrophil exosomes enhance the skin autoinflammation in generalized pustular psoriasis via activating keratinocytes. *FASEB J*, 33(6), 6813-6828. doi:10.1096/fj.201802090RR

Simpson, E. L., Bieber, T., Guttman-Yassky, E., Beck, L. A., Blauvelt, A., Cork, M. J., Silverberg, J. I., Deleuran, M., Kataoka, Y., Lacour, J. P., Kingo, K., Worm, M., Poulin, Y., Wollenberg, A., Soo, Y., Graham, N. M., Pirozzi, G., Akinlade, B., Staudinger, H., Mastey, V., Eckert, L., Gadkari, A., Stahl, N., Yancopoulos, G. D., Ardeleanu, M. Solo, SOLO 1 and SOLO 2 Investigators (2016). Two Phase 3 Trials of Dupilumab versus Placebo in Atopic Dermatitis. *N Engl J Med*, 375(24), 2335-2348. doi:10.1056/NEJMoa1610020

Simpson, E. L., Lacour, J. P., Spelman, L., Galimberti, R., Eichenfield, L. F., Bissonnette, R., King, B. A., Thyssen, J. P., Silverberg, J. I., Bieber, T., Kabashima, K., Tsunemi, Y., Costanzo, A., Guttman-Yassky, E., Beck, L. A., Janes, J. M., DeLozier, A. M., Gamalo, M., Brinker, D. R., Cardillo, T., Nunes, F. P., Paller, A. S., Wollenberg, A., Reich, K. (2020). Baricitinib in patients with moderate-to-severe atopic dermatitis and inadequate response to topical corticosteroids: results from two randomized monotherapy phase III trials. *Br J Dermatol*, 183(2), 242-255. doi:10.1111/bjd.18898

Tom, L. N., Dix, C. F., Hoang, V. L., Lin, L. L., Nufer, K. L., Tomihara, S., Prow, N. A., Soyer, H. P., Prow, T., W., Ardigo, M. (2016). Skin microbiopsy for HPV DNA detection in cutaneous warts. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 30(12), e216-e217. doi:10.1111/jdv.13548

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P. H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J., Ponten, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220), 1260419. doi:10.1126/science.1260419



Vaengebjerg, S., Skov, L., Egeberg, A., & Loft, N. D. (2020). Prevalence, Incidence, and Risk of Cancer in Patients With Psoriasis and Psoriatic Arthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol*, 156(4), 421-429. doi:10.1001/jamadermatol.2020.0024

Van Eerdewegh, P., Little, R. D., Dupuis, J., Del Mastro, R. G., Falls, K., Simon, J., Torrey, D., Pandit, S., McKenny, J., Braunschweiger, K., Walsh, A., Liu, Z., Hayward, B., Folz, C., Manning, S. P., Bawa, A., Saracino, L., Thackston, M., Benchekroun, Y., Capparell, N., Wang, M., Adair, R., Feng, Y., Dubois, J., FitzGerald, M. G., Huang, H., Gibson, R., Allen, K. M., Pedan, A., Danzig, M. R., Umland, S. P., Egan, R. W., Cuss, F. M., Rorke, S., Clough, J. B., Holloway, J. W., Holgate, S., Keith, T. P. (2002). Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*, 418(6896), 426-430. doi:10.1038/nature00878

Wang, E. A., Steel, A., Luxardi, G., Mitra, A., Patel, F., Cheng, M. Y., Wilken, R., Kao, J., de Ga, K., Sultani, H., Merleev, A. A., Marusina, A. I., Brassard, A., Fung, M. A., Konia, T., Shimoda, M., Maverakis, E. (2017). Classic Ulcerative Pyoderma Gangrenosum Is a T Cell-Mediated Disease Targeting Follicular Adnexal Structures: A Hypothesis Based on Molecular and Clinicopathologic Studies. *Front Immunol*, 8, 1980. doi:10.3389/fimmu.2017.01980

Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-738. doi:10.1038/171737a0

Weidinger, S., Beck, L. A., Bieber, T., Kabashima, K., & Irvine, A. D. (2018). Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*, 4(1), 1. doi:10.1038/s41572-018-0001-z

Weidinger, S., & Novak, N. (2016). Atopic dermatitis. *Lancet*, 387(10023), 1109-1122. doi:10.1016/S0140-6736(15)00149-X

Weiss, S. C., Kimball, A. B., Liewehr, D. J., Blauvelt, A., Turner, M. L., & Emanuel, E. J. (2002). Quantifying the harmful effect of psoriasis on health-related quality of life. *J Am Acad Dermatol*, 47(4), 512-518. doi:10.1067/mjd.2002.122755

Wenzel, J., Peters, B., Zahn, S., Birth, M., Hofmann, K., Kusters, D., Tomiuk, S., Baron,

J. M., Merk, H. F., Mauch, C., Krieg, T., Bieber, T., Tuting, T., Bosio, A. (2008). Gene expression profiling of lichen planus reflects CXCL9+-mediated inflammation and distinguishes this disease from atopic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol*, 128(1), 67-78. doi:10.1038/sj.jid.5700945

Werfel, T., Aberer, W., Ahrens, F., Augustin, M., Biedermann, T., Diepgen, T., Folster-Holst, R., Gieler, U., Heratizadeh, A., Kahle, J., Kapp, A., Nast, A., Nemat, K., Ott, H., Przybilla, B., Roecken, M., Schlaeger, M., Schmid-Grendelmeier, P., Schmitt, J., Schwennesen, T., Staab, Worm, M. (2016). Leitlinie Neurodermitis [atopisches Ekzem; atopische Dermatitis]. *J Dtsch Dermatol Ges.*, e1:75. doi:10.1111/ddg.12884

Wolk, K., Wenzel, J., Tsaousi, A., Witte-Handel, E., Babel, N., Zelenak, C., Volk, H. D., Sterry, W., Schneider-Burrus, S., Sabat, R. (2017). Lipocalin-2 is expressed by activated granulocytes and keratinocytes in affected skin and reflects disease activity in acne inversa/hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol*, 177(5), 1385-1393. doi:10.1111/bjd.15424

Wollenberg, A., Blauvelt, A., Guttman-Yassky, E., Worm, M., Lynde, C., Lacour, J. P., Spelman, L., Katoh, N., Saeki, H., Poulin, Y., Lesiak, A., Kircik, L., Cho, S. H., Herranz, P., Cork, M. J., Peris, K., Steffensen, L. A., Bang, B., Kuznetsova, A., Jensen, T. N., Osterdal, M. L., Simpson, E. L., ECZTRA 1 and ECZTRA 2 study investigators (2021). Tralokinumab for moderate-to-severe atopic dermatitis: results from two 52-week, randomized, double-blind, multicentre, placebo-controlled phase III trials (ECZTRA 1 and ECZTRA 2). *Br J Dermatol*, 184(3), 437-449. doi:10.1111/bjd.19574

Yamada, M., Melville, E., Cowin, A. J., Prow, T. W., & Kopecki, Z. (2021). Microbiopsy-based minimally invasive skin sampling for molecular analysis is acceptable to Epidermolysis Bullosa Simplex patients where conventional diagnostic biopsy was refused. *Skin Res Technol*, 27(3), 461-463. doi:10.1111/srt.12971

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Psoriasis Abbildungen . . . . .	9
1.2	A.E. Abbildungen . . . . .	11
1.3	Unklare Phänotypen . . . . .	15
1.4	Therapieoptionen bei Psoriasis . . . . .	18
1.5	Stufentherapie des Atopischen Ekzems . . . . .	19
4.1	HE-Färbung von Micro- und Macrobiopsien . . . . .	38
4.2	Psoriasis Microbiopsie Histologie . . . . .	39
4.3	Ekzem Microbiopsie Histologie . . . . .	39
4.4	RNA-Konzentrationen läsionaler Biopsien . . . . .	41
4.5	RNA-Konzentrationen nicht-läsionaler Biopsien . . . . .	41
4.6	Bioanalyser Analyse Beispiel . . . . .	42
4.7	RIN Werte von Macro- und Microbiopsien . . . . .	43
4.8	Vergleich der Genexpressionen zwischen Macro- und Microbiopsien in Psoriasis, A.E. sowie unklarer Phänotyp Proben . . . . .	44
4.9	PCA Plots von Macro- und Microbiopsien (Fischer, Doll et al., 2023) . .	45
4.10	Volcano Plots von signifikant regulierten Genen bei Macro- und Microbi- opsien (Fischer, Doll et al., 2023) . . . . .	45
4.11	Krankheitsspezifische Gene für Psoriasis und A.E. in Macro- und Micro- biopsien (Fischer, Doll et al., 2023) . . . . .	46
4.12	DeltaCT Werte von Referenz Gene 18S und GAPPDH . . . . .	47
4.13	Relative Genexpressionen von <i>NOS2</i> , <i>CCL27</i> und <i>IL36G</i> von Macro- und Microbiopsien in Ekzem und Psoriasis Proben, in Anlehnung an (Fischer, Doll et al., 2023) . . . . .	48
4.14	<i>Molecular Classifier</i> - Macrobiopsien, in Anlehnung an (Fischer, Doll et al., 2023) . . . . .	49
4.15	<i>Molecular Classifier</i> - Microbiopsien, in Anlehnung an (Fischer, Doll et al., 2023) . . . . .	50

4.16	Evaluation von Zeitaufwand, Wundheilung, kosmetisches Ergebnis sowie Schmerzen von Micro- und Macrobiopsien . . . . .	52
8.1	Fragebogen für Macro- und Microbiopsien . . . . .	82

# Tabellenverzeichnis

1.1	Diagnostische Kriterien des atopischen Ekzems nach Hanifin und Rajka .	14
3.1	Probenentnahme Material . . . . .	26
3.2	RNA-Isolation Material . . . . .	27
3.3	Bioanalyser Material . . . . .	28
3.4	cDNA-Synthese Material . . . . .	29
3.5	rt-PCR Material . . . . .	30
4.1	Patienten Charakteristika . . . . .	36

# Anhang

## Fragebogen



Klinik und Poliklinik  
für Dermatologie und Allergologie am Biederstein  
des Klinikums rechts der Isar  
der Technischen Universität München  
Biedersteiner Straße 29, 80802 München



Liebe Teilnehmer\*innen,

Im Rahmen der Studie wurden bei Ihnen Hautproben entnommen. Um die Auswirkung der Probebiopsien besser erfassen zu können, bitten wir Sie folgende Tabelle auszufüllen:

Lokalisation der Biopsie:

SCHMERZEN am Tag der Biopsie											KOMMENTAR
0 = keine Schmerzen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
SCHMERZEN während der 30 Folgetage nach der Biopsie											
0 = keine Schmerzen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
ZEITLICHER AUFWAND durch die Biopsie											
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
KOSMETISCHES ERGEBNIS - nach 7 Tagen											
0 = sehr schlechtes Ergebnis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
KOSMETISCHES ERGEBNIS - nach 30 Tagen											
0 = sehr schlechtes Ergebnis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
KOMPLIKATIONEN während der 30 Folgetage nach der Biopsie											
Blutung im Bereich der Biopsie <input type="radio"/>											
Infektion im Bereich der Biopsie <input type="radio"/>											
Allergische Reaktion auf das Betäubungsmittel <input type="radio"/>											
Nötige ärztliche Behandlung aufgrund der Biopsie <input type="radio"/>											
Wie viele Tage hat es gedauert bis die Biopsiestelle komplett abgeheilt war?											
Würden Sie eine erneute Probeentnahme zulassen?											
ja <input type="radio"/> nein <input type="radio"/>											

Abbildung 8.1: Fragebogen für Macro- und Microbiopsien

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Kilian Eyerich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie die Möglichkeit der Realisierung des Projekts.

Mein größter und besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefanie Eyerich und meinem Betreuer PD Dr. Felix Lauffer für die hervorragende Betreuung. Sie haben mich stets unterstützt, bestärkt, bei der Datenauswertung beraten, immer ein offenes Ohr für mich gehabt sowie zahlreiche Hinweise für die Konzeption der Dissertation gegeben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Manja Jargosch bedanken, die mich in die Methoden eingeführt hat und mich bei den Experimenten und Auswertung mit großem Engagement unterstützt hat. Auch Kerstin Weber möchte ich danken, die mich mit größter Geduld durch das Labor geführt hat und wertvolle Tipps gegeben hat.

Zudem bin ich Dr. Michael Menden und seiner Arbeitsgruppe am Helmholtz Zentrum München sehr dankbar, die großartige Arbeit zu den Sequenzierungsdaten geleistet haben. Vor allem sei hier Deniz Onur Üreyener genannt, aber auch Dr. Ali Farnoud und Christina Hillig möchte ich für die tolle Zusammenarbeit danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Tilo Biedermann für die Ermöglichung der Patientenrekrutierung an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein.

Bei all den Studienteilnehmern möchte ich mich ganz herzlich bedanken, dass sie sich die Zeit für die Fragebögen genommen haben und bereit waren Hautproben abzugeben.

Ein ganz großes Merci geht an meine Eltern! Liebe Mama, lieber Papa danke, dass ihr mich immer unterstützt und bestärkt habt. Meinen lieben Geschwistern, Sophia, Flo-

rian und Elisa kann ich nicht genug für deren Support und immerwährenden Rückhalt danken.

Zuletzt möchte ich mich noch ganz besonders bei meinem Freund, Marco für seine Geduld, zahlreichen Anregungen sowie liebevolle und uneingeschränkte Unterstützung bedanken.