

PROTEOMICS-BASIERTE BIOMARKERSUCHE BEI PSORIASIS

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Johanna Reindl
geboren am 20.04.1990 in Cham

Gutachter

1. PD Dr. Heidrun Rhode, Jena
2. Prof. Dr. Ferdinand von Eggeling, Jena
3. Prof. Dr. Uwe Wollina, Dresden

Tag der Promotion: 10.05.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1 Zusammenfassung.....	6
2 Einleitung	7
2.1 Krankheitsbild der Psoriasis	7
2.1.1 Epidemiologie	7
2.1.2 Komorbiditäten.....	8
2.1.3 Klassifikation nach Verlauf und Manifestationsalter	8
2.1.4 Klinisches Erscheinungsbild	8
2.1.5 Psoriasis-Arthropathie.....	9
2.1.5.1 Epidemiologie, Komorbidität, Abgrenzung zu anderen Arthritiden	9
2.1.5.2 Symptomatik.....	10
2.1.5.3 Diagnostik.....	10
2.1.6 Ätiologie: Genetik und Umweltfaktoren.....	11
2.1.7 Immunpathogenese.....	11
2.2 Biomarker	15
2.2.1 Begriffsklärung, Abgrenzung unterschiedlicher Markerarten	15
2.2.2 Biomarker in der Psoriasis-Forschung	16
2.2.3 Prozess der Biomarkersuche	18
2.3 Ziel der Arbeit	19
2.4 Aufgabenstellung.....	20
3 Material und Methode	21
3.1 Materialien	21
3.1.1 Blutentnahme.....	21
3.1.2 Fraktionierung	21
3.1.3 Tryptischer Verdau	22
3.1.4 LC-HESI-MS/MS.....	22

3.1.5	ELISA-Kits.....	22
3.1.6	Software.....	24
3.1.7	Charakterisierung der massenspektrometrisch analysierten Probanden.....	24
3.1.8	Proben für die Evaluierung mit Immuntests.....	28
3.2	Methode: Workflow zur Proteomuntersuchung	29
3.2.1	Probengewinnung, -aufarbeitung und -lagerung	29
3.2.2	Fraktionierung	30
3.2.3	LC-HESI-MS/MS.....	34
3.2.4	Auswertung der MS-Daten.....	36
3.2.5	ELISA-Immuntestdurchführung.....	42
3.2.6	Statistische Auswertung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen	42
4	Ergebnisse	44
4.1	Ergebnisse <i>SIEVE</i> TM -Auswertung	44
4.2	Ergebnisse <i>MetaboAnalyst</i> -Auswertung.....	45
4.3	Ergebnisse <i>Proteome Discoverer</i> TM -Auswertung.....	47
4.4	Gesamttabelle aller auffälliger Proteine der Proteomdaten	50
4.5	Ergebnistabelle selektierter Biomarkerkandidaten	59
4.6	Ergebnisse ELISA.....	60
4.6.1	Multivariate Analyse: Unterschiede zwischen den drei Gruppen	61
4.6.2	Korrelation der Kandidatenproteine mit Probandendaten	62
4.6.3	Korrelationen der Biomarkerkandidaten untereinander	63
4.6.4	Ergebnisse Kombinatorik	65
5	Diskussion.....	67
5.1	Immunglobuline.....	67
5.2	Apolipoproteine	67
5.3	Charakterisierung der Biomarkerkandidaten	68
5.3.1	Strukturproteine: Desmoplakin, Plakoglobin, Cytokeratin 17	68

5.3.2	Regulatoren von Zytoskelett und ECM: Profilin 1, FAM83H, COMP.....	72
5.3.3	Binde- und Transportproteine: RBP4, Vit.D-bindendes Protein, Haptoglobin, Ceruleplasmin.....	73
5.3.4	Gerinnung: Antithrombin III, Prothrombin, Faktor XII.....	76
5.3.5	Komplement: C3, C5.....	77
5.3.6	Proteaseinhibitoren: Inter- α -Trypsin-Inhibitor, α -1-Antichymotrypsin.....	80
5.3.7	Immunabwehr: NAAA, S100A7, PIGR.....	81
5.3.8	Kallikreine: Plasma-Kallikrein, Kallikrein 8.....	85
5.3.9	Nicht funktionell gruppierte Proteine.....	87
5.4	Ergebnisse der Kombinatorik: Biomarkermuster.....	90
5.5	Methodenkritik.....	91
5.5.1	Auswertung der MS-Daten.....	91
5.5.2	Design der gematchten Patient-Kontrolle-Paare.....	93
5.5.3	Anmerkungen zu der Interpretation der MS-Ergebnisse.....	94
5.5.4	Methode ELISA-Kits.....	96
6	Ausblick: Verifizierung der Biomarkerkandidaten.....	97
7	Literaturverzeichnis.....	99
8	Anhang.....	120

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	HDL	<i>high density lipoprotein</i>
µl	Mikroliter	HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
1D/2D/3D	erste/zweite/dritte Dimension der chromatographischen Proteinseparation	HMW	<i>high molecular weight</i>
Abb.	Abbildung	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
AEC	<i>anion exchange chromatography</i>	IDP	<i>inner dense plaque</i>
AG	Arbeitsgruppe	IFN	Interferon
AMP	antimikrobielles Peptid	Ig	Immunglobulin
AUC	<i>area under the curve</i>	IL	Interleukin
BMI	<i>body mass index</i>	IαI	Inter-α-Trypsin-Inhibitor
CASPAR	<i>CLASSification criteria of Psoriatic ARthritis</i>	ITIH	Inter-α-Trypsin-Inhibitor
COMP	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>		<i>heavy chain</i> (schwere Kette)
DC	dendritische Zelle(n)	J	Jahre
DLQI	<i>Dermatology Life Quality Index</i>	KKS	Kallikrein-Kinin-System
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LAC	Lektin-Affinitätschromatographie
EARP	<i>Early Arthritis for Psoriatic Patients</i> (Fragebogen)	LC-HESI-MS/MS	<i>liquid chromatography heat electro spray ionisation tandem mass spectrometry</i> bzw. Flüssigchromatographie-Hitze-Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie
ECM	Extrazellulärmatrix	LDL	<i>low density lipoprotein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	LJ	Lebensjahr
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	m	männlich
FOI	<i>fluorescence optical imaging</i>	M	mol
g	Gravitationskonstante	m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
GWAS	<i>genome wide association studies</i>	MAC	<i>membrane attacking complex</i>

mDC	myeloide dendritische Zelle(n)	PIGR	<i>polymeric immunoglobulin receptor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	PLS-DA	<i>Partial Least Squares – Discriminant Analysis</i>
ml	Milliliter	PON	Paraoxonase
mg	Milligramm	Ps	Psoriasis
mM	Millimol	PsA	Psoriasis-Arthritis
MMP	Matrix-Metalloproteinase	PSORS	<i>psoriasis susceptibility (Genort)</i>
MPa	Megapascal	RBP4	Retinol-bindendes Protein
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
MudPIT	<i>Multidimensional Protein Identification Technology</i>	rpm	<i>revolutions per minute</i>
n.s.	nicht signifikant	SD	Standardabweichung
NAAA	N-Acetylmuramoyl-l-Alanin-Amidase	SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
ng	Nanogramm	SERPIN	Serinprotease-Inhibitor
nm	Nanometer	siRNA	<i>small interfering-Ribonukleinsäure</i>
ODP	<i>outer dense plaque</i>	SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
PASE	<i>Psoriatic Arthritis Screening and Evaluation (Fragebogen)</i>	sog.	sogenannt
PASI	<i>Psoriasis Area and Severity Index</i>	Tab.	Tabelle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle(n)	UV	Ultraviolett
PGLYRP2	<i>peptidoglycan-recognition protein 2</i>	VIP	<i>variable importance in projection</i>
		w	weiblich
		Zn- α -GP	Zink- α -Glykoprotein

1 Zusammenfassung

Die Psoriasis ist eine verhältnismäßig häufige, chronisch entzündliche Systemerkrankung, die sich bevorzugt mit typischen Hauteffloreszenzen manifestiert und mit teils schwerwiegenden Komorbiditäten besonders aus dem Symptomkomplex des Metabolischen Syndroms einhergeht. Bei einem Teil der Patienten kommt es zu einer charakteristischen Beteiligung der Gelenke, der Psoriasis-Arthritis, in deren Verlauf es zu mutilierenden Gelenkarosionen kommen kann. Die wahrscheinlich auch autoimmunologisch unterhaltene Pathogenese und Ätiologie der Erkrankung ist bislang immer noch nicht in Gänze aufgeklärt und erschwert ein Verständnis adäquater Diagnosestellung und Therapie. Besonders die in ihren Anfangsstadien oder bei fehlender oder atypischer Hautbeteiligung oft unerkannte Psoriasis-Arthritis bedarf einer rechtzeitigen Diagnostik, die heute im klinischen Alltag nur unzureichend systematisch durchgeführt wird. Die vorliegende Arbeit dient der Suche eines diagnostischen Werkzeugs, das das Management der Psoriasis erleichtert, und wählt dazu einen hypothesenfreien Ansatz, die Plasmaproteom-basierte Biomarkersuche mittels Massenspektrometrie. Dies stellt die Grundlage der Entwicklung klinisch nutzbarer Biomarker dar, an die sich verifizierende Untersuchungen anschließen, um einen möglichst sensitiven und spezifischen Test für den medizinischen Alltag zu etablieren.

Blutplasmen von sechs Psoriasis- und Psoriasis-Arthritis-Patienten sowie von sechs gesunden Kontrollpersonen werden anhand bestimmter Probandendaten einander zugeordnet („gematcht“), anschließend in einem von unserer Arbeitsgruppe entwickelten Fraktionierungsprozess über Größenausschluss- und Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennt und in einer vergleichenden massenspektrometrischen Analyse identifiziert sowie semiquantitativ, d. h. über das Verhältnis der Proteinmengen in korrespondierenden Fraktionen der Patienten zu denen der Kontrollen, ausgemessen. Für die Auswertung der Daten werden drei unterschiedliche Methoden, basierend auf den drei Programmen *SIEVE*TM, *Proteome Discoverer*TM sowie *MetaboAnalyst*, herangezogen. Eine zusammenfassende Betrachtung der einzelnen Ergebnisse daraus führt zu einer Liste möglicher Biomarkerkandidaten, die für weitere Untersuchungen und nach ihrer Eignung als spezifischer Marker nochmals eingegrenzt wurden. Die hier vorgestellte Liste an Biomarkerkandidaten der Psoriasis umfasst 25 Proteine, von denen 15 im Anschluss einer zielgerichteten Evaluierung an weiteren Plasmaproben von Erkrankten sowie Gesunden durch Immuntests unterzogen wurden. Hierbei konnten wir auffällige Konzentrationen der Proteine Zink- α -Glykoprotein, Komplement C3, *polymeric immunoglobulin receptor* und Plasma-Kallikrein im Plasma der Psoriasis- bzw. Psoriasis-Arthritis-Patienten

gegenüber den Kontrollpersonen nachweisen. Korrelationen der Biomarkerkandidaten untereinander und mit Patientendaten, wie dem PASI-Wert als Indikator der Schwere der Erkrankung, deuten auf ein pathologisches Muster der von uns identifizierten Biomarkerproteine hin, die wir grob orientierend mit einer mathematischen Kombination mehrerer Biomarkerkandidaten festmachen konnten: 15 kombinierte Biomarkermuster wurden identifiziert, die die Spezifität der Kandidatenproteine alleine übersteigen und die wir für die weitere zielgerichtete Verifizierung an größeren Probandenkollektiven vorschlagen.

2 Einleitung

Psoriasis ist eine immunvermittelte, chronisch-entzündliche Erkrankung der Haut. Sie wird häufig als Volkskrankheit tituliert, die mit einer verkürzten Lebenserwartung und bedeutsamen Komorbiditäten einhergeht. Eine meist um Jahre verzögerte weitere Manifestation der Erkrankung ist die Psoriasis-Arthritis, die über langdauerndes Entzündungsgeschehen im gelenknahen Weichteilgewebe zu einer erosiven Gelenkdestruktion führen kann. Die Diagnose der Psoriasis wird heute beinahe ausschließlich anhand der klinischen Symptomatik, die Diagnose der PsA anhand der „*classification of psoriatic arthritis*“-Kriterien gestellt; insbesondere letztere führt v. a. in Frühstadien der Erkrankung bisweilen zu Fehldiagnosen. Daraus und aus der zunehmenden Entwicklung hochspezifischer Therapiemöglichkeiten (z. B. mit *biologicals*) resultiert ein Bedarf an objektiven und messbaren Biomarkern für die Psoriasis, wie sie für andere Erkrankungen bereits etabliert sind.

2.1 Krankheitsbild der Psoriasis

2.1.1 Epidemiologie

Bei einer weltweiten Prävalenz von 2-3 % findet sich ein Gewicht auf der nordamerikanischen und europäischen Population. So steht einer Prävalenz in Kanada von 4,6-4,7 % eine Erkrankungsrate von 0,4-0,7 % in afrikanischen, afroamerikanischen und asiatischen Populationen gegenüber (Perera *et al.* 2012). In Deutschland schätzt man die Prävalenz im Jahre 2010 auf 2,5 % (Augustin *et al.* 2010), vergleichbar der des Vorhofflimmerns in Deutschland (Schnabel *et al.* 2012).

2.1.2 Komorbiditäten

Assoziationen mit zahlreichen anderen Krankheitsbildern, teils aus dem Formenkreis der chronisch-entzündlichen, immunregulatorischen Erkrankungen, teils Stoffwechsel- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, verschärfen die Schwere der heute als Systemkrankheit erachteten Psoriasis: Symptome des „Metabolischen Syndroms“, d. h. Fettleibigkeit, Dyslipidämie, Hypertonie und Diabetes mellitus bzw. Insulinresistenz lassen sich bei Psoriasis-kranken signifikant häufiger diagnostizieren als bei gesunden, vergleichbaren Kontrollpersonen (Gottlieb *et al.* 2008), ebenso Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Augustin *et al.* 2010). So überrascht es auch wenig, dass das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (wie etwa ein Myokardinfarkt) bei Betroffenen vielfach als erhöht dargelegt wurde (González-Gay *et al.* 2012, Horreau *et al.* 2013). Zudem lässt sich auch eine im Vergleich zur gesunden Kontrolle signifikant höhere Prävalenz von Depression, Angststörungen und Suizidalität bei Psoriasis-Patienten festmachen (Kurd *et al.* 2010). Insgesamt geht die Psoriasis mit einer Lebensverkürzung und einer bei schwerem Verlauf bis zu 50 % erhöhter Mortalität gegenüber Gesunden einher (Gelfand *et al.* 2007).

2.1.3 Klassifikation nach Verlauf und Manifestationsalter

Seit Mitte der 80er Jahre klassifiziert man die Psoriasis anhand ihrer klinischen Symptomatik und vor allem des Manifestationsalters in zwei Typen: einen weitaus häufigeren, hereditären Typ mit frühem Manifestationsalter (< 30 Jahre) und schwererem Verlauf sowie einen selteneren mit späterem Altersgipfel (Henseler und Christophers 1985); diese Beobachtungen konnten in den letzten Jahren auch auf molekularbiologischer Ebene nachvollzogen werden, indem den Typen unterschiedliche HLA-Cw*0602-Status (Typ I: positiv, Typ II: negativ) zugeordnet werden konnten; allerdings erwies sich diese vereinfachte Zuordnung nicht konsistent, vielmehr erlaubt die HLA-C-Typisierung eine genauere Einteilung der Krankheitsverläufe als die rein klinische Einteilung (Gudjonsson *et al.* 2006).

2.1.4 Klinisches Erscheinungsbild

Die typischen Effloreszenzen der *Psoriasis vulgaris* sind erythemosquamöse Plaques, Läsionen mit silbrig-weißer, trockener Hautschuppung und hyperämischer Rötung unter der Schuppung und über deren Begrenzung hinaus; ein Phänomen, das auch als „Zeichen des zu kleinen Deckels [der Schuppung über der Rötung]“ bekannt ist. Prädilektionsstellen dieser Hauteffloreszenzen sind die Streckseiten der Extremitäten und Gelenke, die behaarte Kopfhaut – insbesondere der Haaransatz an der Stirn und hinter den Ohren – sowie die Sakralregi-

on. Histologisch sind die erythematosquamösen Plaques charakterisiert durch eine verdickte Hornschicht mit superfiziellen, unausgereiften Keratinozyten (Hyperparakeratose), tief ausgezogene Reteleisten und Vermehrung der Zellreihen der Epidermis (Akanthose). In der Dermis finden sich dagegen Leukozyteninfiltrate und zahlreiche, teils ektatische Kapillaren. Charakteristisch sind Infiltrate von neutrophilen Granulozyten in den oberen Schichten der Epidermis, die sog. Munro-Mikroabszesse (Perera *et al.* 2012).

Der psoriatische Nagelbefall imponiert klinisch als „Ölflecknägel“, nicht-tastbare, Ölfleckartige Farbveränderungen, pathogenetisch am ehesten einem psoriatischen Herd unter dem Nagel zuzuschreiben, oder als „Tüpfelnägel“, bei denen durch die Erkrankung die Nagelbildung gestört ist und sich im instabilen Nagelmaterial tastbare Grübchen bilden.

Anhand der Morphe ihrer Hautläsionen lässt sich die Psoriasis auch klinisch klassifizieren; so schlagen Griffiths *et al.* eine Einteilung primär nach lokal begrenztem vs. das gesamte Integument betreffendem Befall vor (Griffiths *et al.* 2007). Zu letzterem zählen beispielsweise die *Psoriasis guttata* und die generalisierte pustulöse Psoriasis. Die *Psoriasis vulgaris*, die häufigste Variante, findet sich unter den lokal begrenzten Formen, wobei sich diese auch in Abhängigkeit von den betroffenen Hautarealen differenzieren lässt. Neben den typischen Prädiaktionsstellen findet sich etwa ein Befall im Bereich von Hautfalten bei der intertriginösen Psoriasis. Dazu kann auch unterschieden werden hinsichtlich Nagelbeteiligung, stabilem oder instabilem Verlauf, Größe der psoriatischen Hautregionen usw.

Die charakteristische Morphe der Haut- und Nagelmanifestation der Psoriasis stellt heutzutage in der klinischen Praxis die Grundlage für ihre Diagnosestellung. Nur äußerst selten ist eine biopsische Gewebsuntersuchung einer psoriatischen Plaque nötig (siehe dazu S3-Leitlinie bei Nast *et al.* (2011)).

2.1.5 Psoriasis-Arthropathie

2.1.5.1 Epidemiologie, Komorbidität, Abgrenzung zu anderen Arthritiden

Die Psoriasis-Arthritis (PsA) ist eine heterogene Arthropathie, deren Häufigkeit nur schwer exakt einzuschätzen ist, da sich in der klinischen Praxis noch keine einheitlichen Diagnosekriterien etabliert haben und das Krankheitsbild durch seine Variabilität und seine Überschneidung zu anderen Gelenkerkrankungen wie Spondyloarthritiden oder der Rheumatoiden Arthritis in der Praxis häufig zunächst fehldiagnostiziert wird. So finden sich Prävalenzangaben von 5-42 % unter den Psoriasis-Patienten. Gewöhnlich tritt die PsA ca. zwei Jahrzehnte nach der Psoriasis-Hautmanifestation auf mit einem Altersgipfel bei 40-50 Jahren, allerdings geht die PsA in etwa 15 % der Fälle der Psoriasis-Hautmanifestation voraus, was die Diagnose der

Erkrankung erheblich erschwert. Eine Geschlechterbevorzugung besteht nicht (Goldenstein-Schainberg *et al.* 2012). Auch bei der PsA findet sich ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen (Jamnitski *et al.* 2013) und eine Assoziation mit Adipositas (Russolillo *et al.* 2013). Es handelt sich um eine seronegative Arthritis, d. h., im Serum der PsA-Patienten findet sich in der Regel kein Rheumafaktor, wie er für die Rheumatoide Arthritis beschrieben ist. Allerdings findet sich eine Assoziation mit dem HLA-B27-Allel, ein Charakteristikum der Gruppe der Spondyloarthritiden aus dem Formenkreis rheumatischer Erkrankungen.

2.1.5.2 Symptomatik

Die PsA ist charakterisiert durch Schwellung, Schmerzen und Steifigkeit befallener Gelenke, Synovitiden, Enthesitiden und Beteiligung des umgebenden Weichteilgewebes. Meist verläuft sie schubförmig mit akuten Entzündungsgeschehen und Remissionen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann es im Zuge eines gleichzeitigen Knochenauf- und -abbaus zu Gelenkdestruktionen, osteophytärem Anbau und Arthrodesen kommen. Bevorzugt befallene Gelenke sind Hand-, Finger- Fuß- und Zehengelenke (Metakarpophalangealgelenke, proximale und distale Interphalangealgelenke), Wirbelgelenke, das Sakroiliakgelenk und analog das benachbarte Weichteilgewebe: Achillessehne, sakroiliakaler und vertebraler Bandapparat, palmar- und plantare Faszien. Klassisch ist das Bild der sog. „Wurstfinger“: infolge des Befalls nacheinandergeschalteter Fingergelenke („im Strahl“) kommt es zur Auftreibung des gesamten Fingers in Form einer Daktylitis; auch die Schwellung einzelner Zehen ist möglich. Je nach Lokalisation der PsA werden klinisch fünf verschiedene Typen unterschieden: Asymmetrische Oligoarthritis, symmetrische Polyarthritis, distale Arthritis, *Arthritis mutilans*, Spondyloarthropathie. Allerdings überlappen sich diese Formen in der Praxis oft und sind auch innerhalb eines Krankheitsfalls über den Verlauf hinweg nicht konsistent (Goldenstein-Schainberg *et al.* 2012).

2.1.5.3 Diagnostik

Die Diagnose der PsA fußt heutzutage weitgehend auf den im Jahre 2006 formulierten **CLASSIFICATION of Psoriatic ARthritis** (CASPAR)-Kriterien, die neben klinischen Punkten (aktuelle oder anamnestisch gesicherte Psoriasis des Patienten oder seiner Familie, aktueller oder anamnestischer psoriatischer Befall der Nägel, aktuelle oder anamnestisch gesicherte Daktylitis) auch radiologische (in Bildgebung sichtbarer Knochenanbau) und Laborbefunde (Serum Rheumafaktor-negativ) abdecken (Taylor *et al.* 2006). Zudem wird auch versucht, standardisierte Fragebögen für eine hinreichend genaue Diagnose im Frühstadium der Erkrankung zu

etablieren, beispielsweise der *Psoriatic Arthritis Screening and Evaluation* (PASE)- (Dominguez *et al.* 2009) oder der *Early ARthritis for Psoriatic patients* (EARP)-Fragebogen (Tinazzi *et al.* 2012), die ein kostengünstiges und schnelles Screening ermöglichen sollen.

2.1.6 Ätiologie: Genetik und Umweltfaktoren

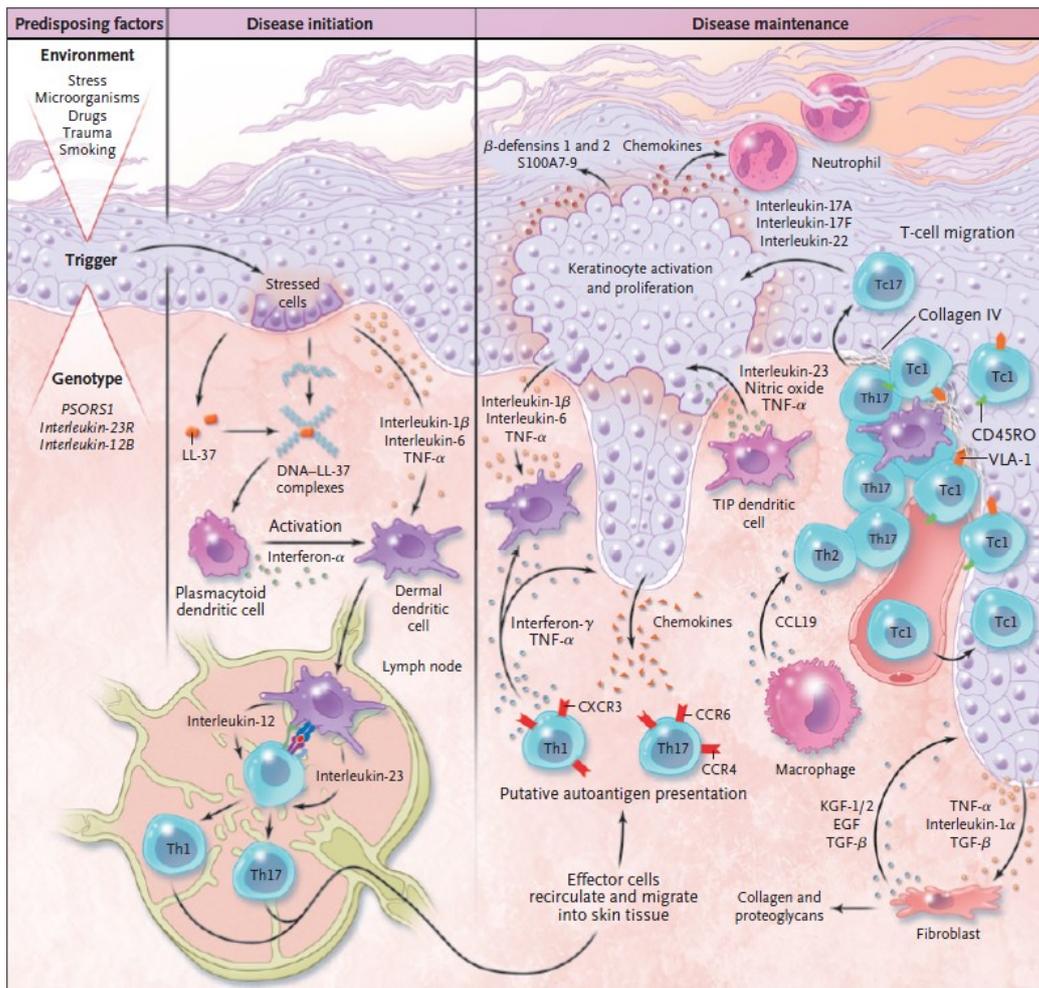
Wie das unterschiedliche Verteilungsmuster der Psoriasis in verschiedenen Populationen vermuten lässt, wird eine Prädisposition zur Erkrankung polygen vererbt. So konnten schon mehrere Suszeptibilitätsloci auf unterschiedlichen Chromosomen ausgemacht werden, insbesondere die *psoriasis susceptibility* (PSORS)-Regionen 1-10, deren Genprodukte bislang aber nur unzulänglich identifiziert werden konnten; darunter finden sich beispielsweise das HLA-Cw6-Allel in PSORS1 und weitere *major histocompatibility complex* (MHC)-Gene, ferner Gene, die in Zusammenhang mit der Differenzierung der Keratinozyten gebracht werden (wie etwa der Transkriptionsfaktor RUNX1), Gene für Zytokine oder antimikrobielle Peptide (AMP), bei denen sich als genetische Variante meist bestimmte Allele, aber auch etwa *single nucleotide polymorphisms* (SNP) als prädisponierend herausstellten (Bowcock und Cookson 2004, Perera *et al.* 2012).

Neben der genetischen Komponente spielen auch Umweltfaktoren eine Rolle beim Zustandekommen der Krankheit; sie fungieren wahrscheinlich als Trigger für die Manifestation der Psoriasis. Genannt werden Streptokokkeninfekte (Valdimarsson *et al.* 2009), physikalische Traumata oder mechanische Alterationen, was klinisch auch als „Köbner-Phänomen“ bekannt ist (Raychaudhuri *et al.* 2008), bestimmte Medikamente wie etwa β -Blocker oder Lithium (Basavaraj *et al.* 2010) sowie Nikotinabusus (Armstrong *et al.* 2011).

2.1.7 Immunpathogenese

Die Psoriasis wird als systemische, multifaktorielle Erkrankung aufgefasst, die mit einer gestörten Immunantwort einhergeht. Die pathophysiologischen Prozesse sind nach wie vor noch nicht in Gänze verstanden, daher bedient man sich Modellen, basierend auf empirisch gewonnenen Erkenntnissen. Sabat *et al.* erarbeiteten eine Variante, die den zeitlichen Ablauf der Pathogenese stärker gewichtet (Sabat *et al.* 2007) und in Abbildung 1 nachvollzogen werden kann.

Abb. 1: Schema zur Immunpathogenese der Psoriasis (aus Nestle *et al.* (2009))



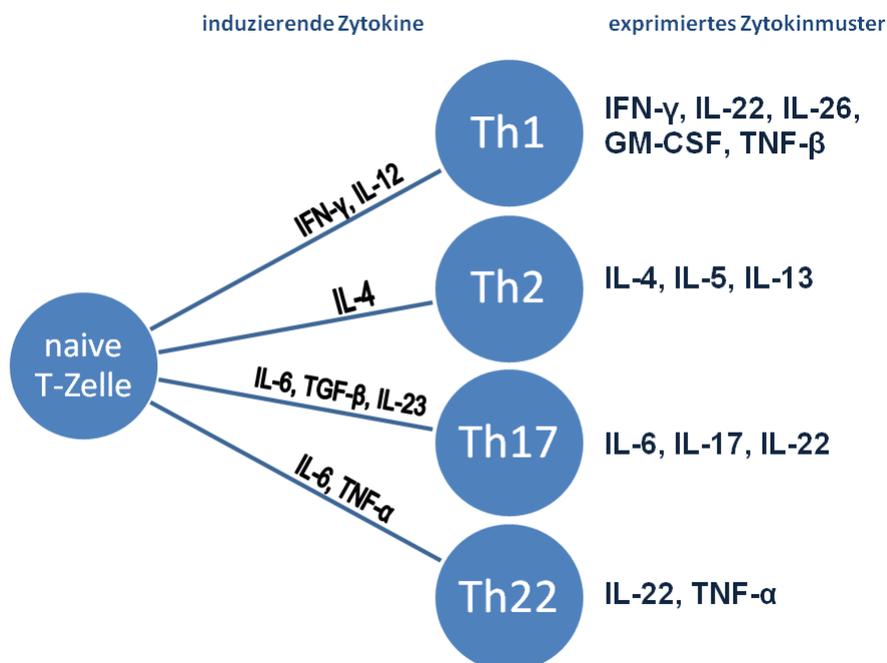
Der Entzündungsprozess beginnt durch Trigger („Predisposing factors“), die zu einer Schädigung der Epidermiszellen führen. Lokale dendritische Zellen werden aktiviert und begünstigen die Ausreifung von Th1- und Th17-Zellen im Lymphknoten („Disease initiation“). Diese Effektorzellen wandern zum Ort der Schädigung und unterhalten die Immunantwort durch Zytokine wie Interferon-γ (IFN-γ), TNF-α, Interleukin (IL)-17A, -17F, -22. Chemokine locken Makrophagen und neutrophile Granulozyten an. Im entzündlichen Milieu exprimieren die Keratinozyten vermehrt antimikrobielle Peptide (β-Defensine, S100A7-9) und proinflammatorische Zytokine (IL-1α und β, IL-6, TGF-β, TNF-α)

Zu Beginn der Erkrankung (Teil „Disease initiation“ der Abb. 1) kommt es zu einer Sensibilisierung des Organismus gegenüber einem Antigen, wobei bisher kein pathognomonisches Antigen der Psoriasis identifiziert wurde. Mögliche Kandidaten, die *in vitro* eine Autoreaktivität bei T-Zellen aus psoriatischen Läsionen hervorrufen, sind Streptokokken-M-Antigene, die allerdings in der Psoriasis-Plaques selbst nicht nachgewiesen werden können. Vermutet wird daher eine Kreuzreaktivität aufgrund einer molekularen Mimikry zwischen dem Streptokokken-Protein und körpereigenem Typ-I-Kollagen, da insbesondere das Cytokeratin 17 strukturelle Ähnlichkeit zum M-Protein aufweist. Cytokeratin 17 findet sich in psoriatischen Läsionen, aber nicht in unbetreffener Haut. Unter dieser Annahme verwundert auch der Trig-

gereffekt eines Streptokokkeninfekts bei der Psoriasis nicht. Weitere mögliche Antigene umfassen beispielsweise freigewordene, teils gebundene Zellbestandteile aus Keratinozyten wie etwa DNA oder DNA im Komplex mit AMP, die von lokalen dendritischen Zellen (DC) aufgenommen und prozessiert werden. Speziell die sog. myeloiden DC (mDC) und die plasmazytoiden DC (pDC), die in der Lage sind, große Mengen an IFN- α zu produzieren, scheinen bei der Psoriasis eine entscheidende Rolle einzunehmen.

Nach Aufnahme und Prozessierung der Antigene findet ein Reifungsprozess statt: die DC exprimieren eine große Zahl an MHC-II-Molekülen und Chemokinrezeptoren, die Aufnahme weiterer Antigenmoleküle wird inhibiert. Via Chemotaxis gelangen die DC in die regionären Lymphknoten, in deren T-Zell-Region sie MHC-II-/Peptid-Komplexe an naive T-Zellen präsentieren. Deren Aktivierung erfordert neben der Bindung des MHC-II-/Peptid-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor und Bindung entsprechender Corezeptoren auch ein bestimmtes Zytokinmuster seitens der DC, die die funktionelle Ausreifung der T-Zelle bestimmt. Eine Übersicht der T-Zell-Differenzierung und der typischen exprimierten Zytokinmuster zeigt Abb. 2. Die erst 2009 identifizierten Th22-Zellen, induziert in Gegenwart von IL-6 und TNF- α , sezernieren große Mengen an IL-22 und spielen vermutlich eine wichtige Rolle beim Zustandekommen des klinischen Erscheinungsbildes der Erkrankung (Eyerich *et al.* 2009).

Abb. 2: Schema zur T-Helferzell-Differenzierung



In Anwesenheit unterschiedlicher Zytokine und bei Koaktivierung des T-Zellrezeptors differenziert sich die naive T-Zelle in unterschiedliche aktive T-Helferzell-Populationen, die sich durch jeweils charakteristische Zytokinmuster definieren

Aktiviert T-Lymphozyten exprimieren Membran-Rezeptormoleküle durch Induktion der präsentierenden DC und gelangen über die Blutbahn schließlich an den Ort der Entzündung, für sie erkenntlich an induzierten Membranproteinen der Endothelien. Dort angekommen, werden die T-Zellen von residenten immunkompetenten Zellen stimuliert, was letztlich zu einer prolongierten Abwehrreaktion führt (s. Abb. 1, Teil „*Disease maintenance*“). Diese Stimulation erfolgt vornehmlich durch pDC via IFN- γ oder Monozyten/Makrophagen via IL-23. Bei der Psoriasis findet sich eine vermehrte Expression von IL-23 in betroffenen Hautarealen (Lee *et al.* 2004) sowie eine stärkere Antwort der T-Zellen auf Stimulation mit IFN- γ (Eriksen *et al.* 2005). Auch Keratinozyten selbst sind nach Aktivierung durch IFN- γ in der Lage, T-Zellen zu stimulieren, wenn sie bestimmte (Super-)Antigene auf induzierbaren Präsentationsmolekülen gebunden haben (Nickoloff *et al.* 1993). Nach Stimulation sezernieren Th1-, Th17- und Th22-Zellen jeweils spezifische Zytokinmuster (s. Abb. 2). Quantitativ dominierend sind hierbei IL-22 und IL-17. Weitere Immunzellen, etwa Monozyten und Makrophagen, werden ebenfalls aktiviert (hauptsächlich über IFN- γ) und sezernieren ihrerseits Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-18, IL-19, IL-20, IL-23). Auch die Zahl an natürlichen Killerzellen in psoriatischen Plaques ist erhöht (Dunphy und Gardiner 2011); die Ansammlung von neutrophilen Granulozyten in der Hornschicht führt zur Bildung der typischen Munro-Mikroabszesse. Dagegen scheinen die physiologischen Mechanismen der Limitierung der Entzündungsaktivität der T-Zell-Population über regulatorische T-Zellen bei der Psoriasis defekt (Sugiyama *et al.* 2005) – es entwickelt sich eine sich selbst unterhaltende, chronifizierende Immunantwort.

Physiologischerweise bilden die Keratinozyten die Epithelbarriere der Haut und durch Verhornung, Lipide und den Säureschutzmantel einen Schutz vor physikalischen und chemischen Einflüssen; die Differenzierung der epidermalen Basalzellen zu den superfiziellen, kernlosen Korneozyten entspricht einer Keratinozyten-*turnover*-Zeit von ca. vier Wochen. Die Keratinozyten sind darüber hinaus in der Lage, Antigene zu prozessieren und zu präsentieren, zudem produzieren sie eine breite Vielzahl von AMP, sodass sie eine eminente Rolle bei adaptiver und auch angeborener Immunantwort spielen (Perera *et al.* 2012).

Durch die freigesetzten Entzündungsmediatoren kommt es zu den typischen Veränderungen in der psoriatischen Haut: Hyperproliferation und Differenzierungsstörung der Keratinozyten sowie aberrante Synthese unterschiedlicher Mediatoren (Zytokine IL-1 α und β , IL-6, TGF- β und TNF- α in Abb. 1) und AMP (β -Defensine 1 und 2, S100A7-9 in Abb. 1), zudem eine Hypervaskularisierung mit Kapillarerweiterungen. Der stark beschleunigte Keratinozyten-*turnover* resultiert unter anderem aus der Wirkung von TNF- α , welches Proliferation und Wundheilung fördert (Schultz *et al.* 1987). Die Reifungsstörung der Keratinozyten geht einher

mit einer gestörten Expression von Molekülen, die für die Aufrechterhaltung der Polarisierung und Bildung einer robusten Hornschicht unerlässlich sind; dazu zählen beispielsweise Filaggrin, Keratine, Kallikrein. Eine *down*-Regulation dieser Genprodukte erfolgt etwa über IL-22, welches auch AMP wie β -Defensine und S100-Proteine sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) induziert (Wolk *et al.* 2004, Wolk *et al.* 2006). Sabat *et al.* vermuten eine dem IL-22 ähnliche Wirkung von IL-20 (Sabat *et al.* 2007).

Mediatoren für die Gefäßneubildung, die sich in erhöhter Konzentration in psoriatischen Hautläsionen finden, sind VEGF (aus Keratinozyten), Angiopoietin 1 (aus dermalen Stromazellen) und 2 (aus Endothelzellen).

2.2 Biomarker

2.2.1 Begriffsklärung, Abgrenzung unterschiedlicher Markerarten

Die *Biomarkers Definitions Working Group* der *US National Health Institutes* definiert einen Biomarker als „*a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention*“ und sieht seinen Nutzen in Diagnose- und Prognosestellung, Abschätzung des Krankheitsverlaufs und der -schwere sowie der Kontrolle des eventuellen Ansprechens auf eine Therapie (*Biomarkers Definitions Working Group* 2001). In ihrer diagnostischen Wertigkeit lassen sich prognostische (therapieunabhängig, populationsabhängig), prädiktive (therapieabhängig), pharmakodynamische (reflektieren die Effekte medikamentöser Therapie) und Surrogatmarker (korrelieren mit dem eigentlichen Endpunkt) differenzieren. In der klinischen Praxis haben sich bereits einige Biomarker für bestimmte Erkrankungen, charakteristische pathologische Prozesse oder zur Therapie(erfolgs)kontrolle etabliert und können meist mit verfügbaren Tests ausreichend genau gemessen werden, wie beispielsweise der Surrogat-Parameter glykiertes Hämoglobin A (HbA1c) bei der Kontrolle des Glukosestoffwechsels oder C-reaktives Protein als Entzündungsmarker (Gosho *et al.* 2012).

Es können diverse Arten von biologischen Markern unterschieden werden: *in-vivo*-Marker umfassen beispielsweise radiologische oder klinische Zeichen, *in-vitro*-Untersuchungen bedienen sich unterschiedlichen Probenmaterials und identifizieren hier Nukleinsäuren, Proteine, Lipide, aber auch Zellen als Biomarker, die prognostische Aussagekraft besitzen. Die Gewinnung des zu untersuchenden Probenmaterials bestimmt dabei die Invasivität des Verfahrens: Testung von Markern in Urin oder abgeschilferten Hautgewebe gilt als nicht-invasiv. Dieser Ansatz ist allerdings, bis auf vereinzelte Arbeiten (z. B. die Untersuchung von Material

aus bestimmten Hautwaschungen (Portugal-Cohen *et al.* 2012) oder erhöhte Neopterinkonzentrationen im Urin bei Erkrankten (Harland *et al.* 1992)) bei der Psoriasis-Markersuche bislang zweitrangig. Wenig invasive Testung von Blut/Plasma/Serum und invasive Testung von (Haut-)Biopsien und mittels Gelenkpunktion gewonnener Synovialflüssigkeit dominieren dagegen und stellen den Standard in der aktuellen Literatur dar.

2.2.2 Biomarker in der Psoriasis-Forschung

Anhand des Krankheitsbildes der Psoriasis sollen einige, in der Fachliteratur berichtete Biomarker exemplarisch vorgestellt werden (Villanova *et al.* 2013).

Genetische Marker sind bei der Psoriasis unter dem Gesichtspunkt zu bewerten, dass es sich um eine multifaktorielle und polygene Erkrankung handelt, d. h., einzelne Auffälligkeiten im Erbgut erlauben wahrscheinlich kaum exakte Vorhersagen oder Diagnosen. Dennoch konnten mithilfe von *genome-wide association studies* (GWAS) Genorte als Suszeptibilitätsloci ausgemacht werden, deren Alteration mit der Psoriasis assoziiert ist (Tsoi *et al.* 2012). Teilweise konnten bereits einzelne Gene auf diesen Genorten identifiziert werden: die bereits erwähnte Genregion PSORS1 beherbergt das HLA-Cw6-Allel aus der Familie der MHC-Klasse-I-Moleküle, das als am stärksten mit der Erkrankung assoziiert erachtet wird. Weitere Gene betreffen beispielsweise Epithelbarriere-Funktion der Haut, T-Zell-Aktivierung und Signaltransduktionswege zur Regulation des Zellzyklus. Die meisten dieser Gene prädisponieren auch für die PsA, allerdings wurden auch isoliert mit der PsA assoziierte DNA-Variationen berichtet, dies betrifft z. B. die Assoziation von HLA-B27 mit dem Befall der Wirbelgelenke, HLA-B38 und -B39 mit einer peripheren Polyarthritits. HLA-B22 konnte eine protektive Wirkung nachgewiesen werden (Duffin *et al.* 2008). Bestimmte SNPs und Polymorphismen wirken sich auch auf das Ansprechen des erkrankten Organismus auf Therapiekonzepte, wie Immunsuppression oder Zytokinblockade, aus. Klinische Relevanz erlangen die immer noch relativ kostenintensiven Gentests aufgrund ihrer geringen prädiktiven Aussagekraft allerdings aktuell noch nicht.

Die Messung **zirkulierender Zellpopulationen** im peripheren Blut erscheint demgegenüber in einer Durchflusszytometrie unkomplizierter durchführbar und könnte stärkere diagnostische Bedeutung erlangen: die Zahl der Th17-, Th22- und Th1-Zellen zeigte sich erhöht im Blut von Psoriasis-Patienten (Kagami *et al.* 2010), die Zahl der Osteoklasten-Vorläuferzellen erhöht bei PsA-Patienten (Fitzgerald und Chandran 2012).

Die Bestimmung der ortsständig exprimierten Gene ist das Prinzip der Erstellung von **Transkriptomen**, wozu sämtliche mRNA einer Zelle isoliert und – meist mittels sog. *Micro-arrays*

– in ihre Genprodukte „übersetzt“ wird, soweit die DNA-Sequenz (zur Synthese von Sonden) bekannt ist. Eine Metaanalyse aus dem Jahre 2012 listet mehr als 1000 *up*- oder *down*-regulierte Gene (Tian *et al.* 2012).

Der Nachweis bestimmter Moleküle direkt im Gewebe der psoriatischen Läsion, d. h. **histologischer Biomarker**, könnte unter Umständen in Zukunft auch pathognomonische Bedeutung erlangen. Zum Einsatz kommen hier probengebundene Methoden wie *In-situ*-Hybridisierungen und Immunhistologie oder Ansätze nach Prozessierung des Probenmaterials wie Immunoassays oder Kombinationen aus Chromatographieverfahren und Massenspektrometrie. Die veränderte lokale Biosynthese proapoptotischer Proteine und AMP im Gewebe psoriatischer Plaques lässt sich so nachweisen (Koçak *et al.* 2003, de Jongh *et al.* 2005).

Potenzielle **lösliche Biomarkermoleküle** im Blut stellen bei einer Systemerkrankung ein zwar invasives, aber dennoch verhältnismäßig praktikableres und aussagekräftiges Diagnostikinstrument dar; Aberrationen in Abhängigkeit von der Krankheitsschwere erlauben beispielsweise auch intraindividuelle Verlaufskontrollen anstatt einer statischen Erhebung mittels Genanalyse. Bisher berichtete lösliche Marker bei der Schuppenflechte lassen sich verschiedenen funktionellen Gruppen zuordnen. Eine orientierende Listung von Biomolekülen, deren Konzentration in Blutproben im Zusammenhang mit der Psoriasis/PsA bereits als auffällig berichtet wurde, zeigt nachfolgende Tabelle 1.

Tab. 1: Biomoleküle mit berichteten Aberrationen in Blut-, Plasma- oder Serumproben

Zytokine
IL-1 ⁴ , IL-2 ⁴ , IL-4 ⁴ , IL-5 ⁴ , IL-6 ^{2,3,4,5,6} , IL-8 ^{2,4,5} , IL-10 ^{2,3,4,6} , IL-12 ^{2,4,5} , IL-15 ⁴ , IL-17 ^{1,2,4,5} , IL-18 ^{2,4,5} , IL-21 ² , IL-22 ^{2,4} , IL-23 ^{1,4} , IL-1 <i>receptor antagonist</i> (IL-1ra) ^{3,5,6} , <i>soluble IL-2 receptor</i> (sIL-2R) ^{2,3,6} , IFN- α ⁴ , IFN- γ ^{1,2,4,5} , TNF- α ^{2,4,5} , TNFSF14/LIGHT ⁷
Wachstumsfaktoren
TGF- β ^{1,2,4} , EGF ¹ , VEGF ^{1,2} , <i>soluble VEGF receptor 1</i> (sVEGFR1) ^{1,2} , <i>platelet-derived growth factor bb</i> (PDGFbb) ¹ , <i>macrophage colony stimulating factor</i> (M-CSF) ^{5,6}
AMP
S100A8 ¹ , S100A9 ¹ , S100A12 ³ , β -Defensin 2 ¹
Entzündung
Erythrozyten-Sedimentationsrate (ESR) ^{1,3,6} , C-reaktives Protein ^{1,2,3,4,5,6} , Fibrinogen ^{4,5} , Haptoglobin ^{4,5} , Pentraxin 3 ² , Neopterin ²
Gerinnung
Fibrinopeptid A ⁵ , Prothrombin-Fragment 1 + 2 ⁵ , D-Dimer ⁵ , Protein C ⁵ , Plasminogen ⁵ , α 2-Antiplasmin ⁵
Neuropeptide
Prolaktin ^{1,2} , vasoaktives intestinales Peptid (VIP) ¹
Marker von oxidativem Stress
Superoxid-Dismutase ^{1,2} , Serum-Katalase ^{1,4} , Glutathionperoxidase ⁴ , Malondialdehyd ^{1,2,4} , Methylglyoxal ² , 8-Hydroxy-Guanosin ⁵ , oxidiertes <i>low-density lipoprotein</i> (oxLDL) ^{2,4,5} , Autoantikörper gegen oxLDL (auAb-oxLDL) ^{2,4}

Adipokine
Leptin ^{1,2,5} , Resistin ^{1,2,5} , Lipocalin ⁵ , Adiponektin ^{2,5} , Ghrelin ² (unsichere Datenlage), Visfatin ² , Omentin ² , <i>retinol binding protein</i> 4 ²
Serumlipide
Gesamtcholesterin ^{1,5} , LDL-Cholesterin ^{1,5} , Triglyceride ^{1,5} , <i>high density lipoprotein</i> (HDL)-Cholesterin ^{1,5} , apoA1 ¹ , apoB ¹ , apoC3 ¹ , apoE ¹
Knorpel-/Knochenstoffwechsel, Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM)
Hyaluronsäure ³ , RANKL ^{1,6,7} , MMP-3 ^{1,3,6,7} , COMP ^{1,6,7} , Osteoprotegerin ^{6,7} , CII:C2C-Ratio ^{1,7} , Prokollagen III ²
Weitere
Neutrophilen-Elastase ² , E-Selektin ² , P-Selektin ⁵ , <i>soluble ICAM-1</i> (sICAM-1) ² , Adenosin-Deaminase ² , miRNA-1266 ² , <i>platelet factor</i> 4 ² , Hydrogensulfat ² , DKK-1 ⁵ , Anti-Calpastatin-Antikörper ⁴

Datenquellen: Reviews von ¹ Enerbäck (2011), ² Coimbra (2014), ³ de Vlam et al. (2008), ⁴ Rashmi et al. (2009), ⁵ Villanova et al. (2013), ⁶ Bogliolo et al. (2012) sowie ⁷ Chandran et al. (2010). Da die Richtung der Konzentrationsabweichung (erhöht oder erniedrigt) oft nicht eindeutig über mehrere Studien gleichsinnig zu reproduzieren ist, wurde auf diese Angabe verzichtet

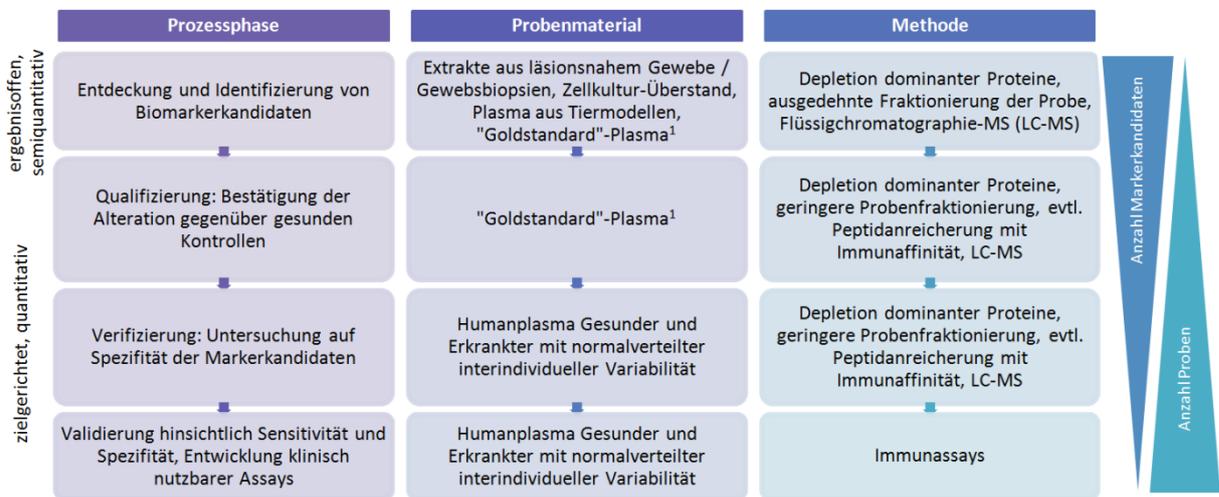
2.2.3 Prozess der Biomarkersuche

Prinzipiell unterscheiden sich gängige Biomarker-Studiendesigns in einer hypothesenfreien oder einer hypothesengebundenen Herangehensweise. Zu letzteren gehören Experimente, deren Werkzeuge auf Basis bereits gewonnener Erkenntnisse ausgewählt wurden, etwa in einer Literaturrecherche über pathophysiologisch bedeutsame Biomoleküle, wie es Chandran *et al.* bei der Auswahl der genutzten Immuntests für ihre serologischen Untersuchungen der PSA verfolgen (Chandran *et al.* 2010). Eine vereinfachende, allerdings dadurch schon in ihrer Spezifität eingeschränkte Strategie ist eine Orientierung an in ihrer Pathologie ähnlichen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis und anderer Osteoarthritiden, der atopischen Dermatitis usw.

Hypothesenfreie Studiendesigns umfassen die „Omics“-Technologien (Genomik, Transkriptomik, Proteomik, Metabolomik), die einen gesamtheitlichen Ansatz implizieren. Sie stehen typischerweise am Anfang des Prozesses einer *de-novo*-Biomarkersuche und stellen unvoreingenommene, semiquantitative und komparative Untersuchungen dar. Ein Schema (Abb. 3) zeigt den Ablauf einer Biomarkersuche mit den für die jeweiligen Stufen geeigneten Strategien und Probenmaterialien. Speziell proteomische Untersuchungen sehen sich hierbei aufgrund der Komplexität der Analytenanzahl (große Zahl der Serumproteine), interindividueller Variabilität und des Fehlens einer zuverlässigen Serumproteom-Datenbank einer großen Datenfülle gegenübergestellt, weshalb die Entdeckung von möglichen Biomarkern in einer geringen Stichprobenanzahl begonnen wird. Mit der sich anschließenden Qualifizierung, Verifi-

zierung, Validierung und zuletzt der Entwicklung klinischer Assays steigt die Zahl untersuchter Proben bei einer sinkenden Menge infrage kommender Markeranalyten (Rifai *et al.* 2006).

Abb. 3: Schema zum Prozess der Biomarkersuche, modifiziert nach Rifai *et al.* (2006)



zu ¹: „Goldstandard“-Plasma bezeichnet komparative Plasmaproben idealisierter Patienten und Kontrollen, die sich lediglich durch das Vorliegen der Erkrankung unterscheiden und sonst keine interindividuellen Unterschiede zeigen. Da es sich hierbei um eine idealisierte Modellvorstellung handelt, bedient man sich in der Praxis z. B. einander in Alter, Geschlecht usw. entsprechenden Patienten und Kontrollen

2.3 Ziel der Arbeit

Zwar präsentieren sich die meisten Fälle der Psoriasis-erkrankungen als typische Plaque-Typ-Verlaufsform und ermöglichen durchaus eine schnelle Blickdiagnose nicht nur durch den behandelnden Dermatologen. Atypische Lokalisationen (Beugeseiten bei *Psoriasis inversa*, Hautfalten bei intertriginöser Psoriasis) oder morphologische Subtypen wie die *Psoriasis guttata* und pustulöse Verlaufsformen können allerdings mit anderen Hauterkrankungen verwechselt werden, wie etwa Ekzemen, diskoidem *Lupus erythematoses*, einer Dermatophyteninfektion oder einem kutanen T-Zell-Lymphom (Cohen *et al.* 2012). An dieser Stelle fehlt es in der dermatologischen Praxis bislang an einer verlässlichen Diagnostik, was die wirksame Therapieeinleitung verzögern oder gar verhindern kann.

Auf das unberechenbare Auftreten der PsA – vor einer Manifestation an der Haut oder in einer weiten Zeitspanne nach Erkrankungsbeginn – wurde bereits hingewiesen, was die richtige und zeitige Diagnose erschwert. In der Tat legen Erhebungen aus dermatologischen Praxen und Kliniken in Deutschland nahe, dass eine Vielzahl an PsA-Erkrankten unter den Psoriasis-Patienten nicht oder fehldiagnostiziert und damit nicht adäquat behandelt bleibt (Radtko *et al.* 2009). Mit der Erkenntnis, dass es sich bei der Arthropathie um einen erosiven, fortschreiten-

den und teils mutilierenden Prozess handelt, ergibt sich die Notwendigkeit einer effektiven Therapie zum frühestmöglichen Zeitpunkt, um schwerwiegende Verläufe zu verhindern (Olivieri *et al.* 2009). Durch die Entwicklung der zielgerichteten Biologika, im Speziellen TNF- α -blockierender Moleküle, steht bereits heute ein zunehmend breiteres und effektives Spektrum an medikamentösen Therapeutika zur Verfügung, sodass aktuell eine frühe und korrekte Diagnose diese präzise Bewältigung der PsA ermöglichen sollte. In der Praxis haben sich die CASPAR-Kriterien als Diagnoseinstrument vielerorts noch nicht durchgesetzt; zudem bieten sich oft nicht die zeitlichen Ressourcen oder instrumentellen Voraussetzungen (z. B. MRT-Untersuchungen) und stehen einem Screening von Patienten im Wege. Bisweilen zeigen sich auch radiologische Befunde nicht verlässlich bei der Diagnose (Palazzi *et al.* 2010). Vom Patienten auszufüllende Fragebögen (z. B. PASE, EARP) sind wenig objektivierbar oder interindividuell vergleichbar und dienen damit eher einem orientierenden Screening.

Es ergibt sich also eine diagnostische Lücke, die mit laborchemischen Biomarkern eventuell zu erschließen wäre; diese Aufgabe haben sich viele Arbeitsgruppen, darunter auch die Arbeitsgruppe *Proteomics* am Institut für Biochemie I des Universitätsklinikums Jena, zum Ziel genommen. Da die Pathophysiologie der Erkrankung nicht vollständig aufgedeckt ist, bietet sich ein gesamtheitlicher, hypothesenfreier Ansatz in Form einer Proteomuntersuchung an.

2.4 Aufgabenstellung

Die hypothesenfreie Suche nach potenziellen Kandidaten für künftige Blut-Biomarker der Psoriasis/PsA soll mittels umfassender Proteomanalyse von EDTA-Plasma erkrankter Personen und gesunder Kontrollpersonen erfolgen. Durch den semiquantitativen Vergleich der Proteome werden Veränderungen in den Proben der Betroffenen deutlich und können nachfolgend genauer evaluiert werden.

Für die vorliegende Arbeit soll Blutplasma fraktioniert und nachfolgend die massenspektrometrische Analytik aller relevanten Fraktionen für den o. g. Vergleich genutzt werden. Dazu soll die im Institut für Biochemie entwickelte und etablierte Mikrotiterplatten-basierte, native, mehrdimensionale Proteom-Separation verwendet werden (Wendler *et al.* 2013). Hierbei sollen mindestens zwei orthogonale chromatographische Trennverfahren, die Größenausschluss-, die Anionenaustausch- und optional eine Lektin-Affinitätschromatographie eingesetzt werden. Anschließend sollen die Fraktionen massenspektrometrisch analysiert und verglichen werden. Aus den wiederholt gefundenen Veränderungen sollen Biomarkerkandidaten abgelei-

tet, anschließend mittels Immuntests evaluiert und für eine nachfolgende klinische Validierung vorgeschlagen werden.

3 Material und Methode

3.1 Materialien

3.1.1 Blutentnahme

- Venenpunktionsbesteck (Safety Multifly® 21 G x 3/4", 85.1638.205, SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland)
- EDTA-Monovette (9ml, 02.1066.001, SARSTEDT AG & Co)

3.1.2 Fraktionierung

- Äkta purifier™ system (GE Healthcare, München, Deutschland)
- HiLoad Superdex™ 200 column (16/60, GE Healthcare)
- 96-well deep-well-Mikrotiterplatten (Deepwell Plate 96, 1.1ml, Polypropylen, 701350, BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland)
- TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) (108382, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- HCl (Salzsäure rauchend 37%, ROTIPURAN®, 4625, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- NaCl (Natriumchlorid > 99,8%, 9265, Carl Roth)
- EDTA (E-9884, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- 96fach-Dialysekammern (WO03/049841A1, Eigenentwicklung der Arbeitsgruppe) mit Membran 0,025µm, white VSWP14250 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)
- 96 well UV-Star® Microplates (655801, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- 384-well UV-Star® Microplates (781801, Greiner Bio-One GmbH)
- SpectraMax Plus³⁸⁴ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- automatisierte Analyseplattform CyBi®-Robospense: Pipettierer CyBi®-Well, Roboterarm SCARA (*Selective Compliance Assembly Robot Arm*) (CyBio AG, Jena, Deutschland)
- Chromatographiesäulchen mit Toyopearl DEAE-650M (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Deutschland), Eigenentwicklung der Arbeitsgruppe

- Chromatographiesäulchen mit Toyopearl AF-Tresyl 650M (Tosoh Bioscience GmbH)
- Methyl- α -Mannopyranosid (M6882, Sigma-Aldrich)
- GlcNAc (N-Acetyl-D-glucosamin, 8993, Carl Roth)

3.1.3 Tryptischer Verdau

- 96-well twin.tec PCR-Mikrotiterplatten (0030128.648, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Guanidin-HCl (Guanidin-Hydrochlorid, Fluka, 50940, Sigma-Aldrich)
- Thermocycler (TB1 Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Dithiothreitol (20710, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Jodacetamid (26710, SERVA)
- Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3 , 7094, Carl Roth)
- Mikrodialysekammern (Micro Dialyzer MD 100 GridKit48, 40840, scienova GmbH, Jena, Deutschland)
- Trypsin (T1426, Sigma-Aldrich)
- Ameisensäure (1.00264, Merck KGaA)

3.1.4 LC-HESI-MS/MS

- H_2O (ROTISOLV® LC-MS-Grade, AE72, Carl Roth)
- Acetonitril (ROTISOLV® HPLC Gradient Grade, 8825, Carl Roth)
- 1-Propanol (>99,5 %, zur Synthese, 9169, Carl Roth)
- automatisierter Probengeber Accela™ Autosampler (60057-60020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
- Pumpe Thermo Scientific™ Accela 1250 (60057-60111, Thermo Fisher Scientific)
- HPLC-Säule Thermo Scientific Hypersil GOLD, 50×1 mm (Thermo Fisher Scientific)
- LTQ Orbitrap™ Discovery (Thermo Fisher Scientific)

3.1.5 ELISA-Kits

- KCl (Kaliumchlorid, 104936, Merck Millipore)
- Na_2HPO_4 (di-Natriumhydrogenphosphat, S-7907, Sigma-Aldrich)
- KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat, 104873, Merck Millipore)

- Human Desmoplakin (DSP) Elisa kit (BlueGene Biotech, Shanghai, China), Katalog-Nr.: E01D0059
- Human haptoglobin (Hpt/HP) ELISA Kit (CUSABIO Biotech Co., Ltd., Wuhan, China), Katalog-Nr.: CSB-E08584h
- Human S100 Calcium Binding Protein A7 (S100A7) Elisa kit (BlueGene Biotech), Katalog-Nr.: E01S0037
- Human Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) Elisa kit (BlueGene Biotech), Katalog-Nr.: E01C0205
- Human Vitamin D-binding protein, DBP ELISA Kit (NOVATEINBIO, Cambridge, MA, USA), Katalog-Nr.: NB-E10771
- Human N-acetylmuramoyl-L-alanine-amidase ELISA Kit (WUHAN EIAAB SCIENCE Co., Ltd., Wuhan, China), Katalog-Nr.: E15019h
- Human Complement C3 ELISA Kit (Assaypro LLC, St.Charles, MO, USA), Katalog-Nr.: EC2101-1
- Human zinc-alpha-2-glycoprotein (AZGP1) ELISA Kit (CUSABIO Biotech Co., Ltd.), Katalog-Nr.: CSB-EL002479HU
- Human Kallikrein-8, hK8 ELISA Kit (WUHAN EIAAB SCIENCE Co., Ltd.), Katalog-Nr.: E0690h
- Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Profilin 1 (PFN1) (Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA), Katalog-Nr.: SEC233Hu
- Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Junction Plakoglobin (JUP) (Cloud-Clone Corp.), Katalog-Nr.: SEC196Hu
- Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Polymeric Immunoglobulin Receptor (PIGR) (Cloud-Clone Corp.), Katalog-Nr.: SEB074Hu
- Human Haptoglobin (Hpt/HP) ELISA Kit (CUSABIO Biotech Co., Ltd.), Katalog-Nr.: CSB-E08584h
- Human Protein FAM83H (FAM83H) ELISA Kit (CUSABIO Biotech Co., Ltd.), Katalog-Nr.: CSB-EL008346HU
- Human plasma kallikrein (KLKB1) ELISA Kit (CUSABIO Biotech Co., Ltd.), Katalog-Nr.: CSB-E14339h
- Human Cytokeratin 17 (Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Wuhan, China), Katalog-Nr.: E-EL-H2071

3.1.6 Software

- Windows (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)
- CyBio® Composer (CyBio AG)
- SoftMax® Pro (Molecular Devices)
- UNICORN™ Control Software (GE Healthcare)
- Xcalibur® 2.1 (Thermo Fisher Scientific)
- *SIEVE*™ 2.0 (Thermo Fisher Scientific)
- *Proteome Discoverer*™ 1.3 (Thermo Fisher Scientific)
- *MetaboAnalyst* 2.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>)
- Microsoft Excel, Microsoft Word (Microsoft Corporation)
- IBM® SPSS® Statistics, Version 22 (International Business Machines Corp., Armonk, NY, USA)

3.1.7 Charakterisierung der massenspektrometrisch analysierten Probanden

Die Studie wurde durch das Votum (1940-01/07) der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt. Alle Patienten stimmten der Verwendung ihrer Blutproben in einer Einverständniserklärung vor der Blutentnahme zu. Blutproben von sechs Patienten (zwei weibliche, vier männliche Patienten, Alter im Mittel 47,5 Jahre [SD 9,7]) mit der Diagnose Psoriasis (Patient 5) bzw. PsA (Patienten 1 – 4 und 6) wurden jeweils entsprechenden Vergleichsproben von hinsichtlich Schuppenflechte und muskuloskelettalen Beschwerden anamnestisch gesunden Kontrollpersonen (zwei weibliche, vier männliche Kontrollpersonen, Alter im Mittel 47,0 Jahre [SD 8,7]) gegenübergestellt. Letztere wurden dafür hinsichtlich Alter, Geschlecht und, soweit möglich, nach Körpergröße und -gewicht bzw. BMI einander passend zugeordnet („gematcht“). Zusätzlich wurden weitere Parameter, wie Komorbiditäten oder weitere Erkrankte im familiären Umfeld, erfasst (s. Tab. 2).

Die Paarung der Patienten- und Kontrollproben blieb während des gesamten Versuchs- und Analyseverlaufs gewahrt; d. h., die Aufarbeitung der Blutproben, ihre Fraktionierung und schließlich ihre Analyse im Massenspektrometer erfolgte stets parallel, um für ein Probenpaar jeweils möglichst gleiche Versuchsbedingungen zu erzielen.

Das Patientenkollektiv entstammte der Klinik für Dermatologie am Universitätsklinikum Jena. Die Diagnose der Psoriasis wurde anhand anamnestischer Angaben sowie der klinischen Inspektion gestellt; sämtliche Patienten präsentierten die *Vulgaris*-Form der Schuppenflechte in leicht- bis mittelgradigen Schweregraden der Erkrankung, gemessen mithilfe des *Psoriasis*

Area and Severity Index (PASI)-Scores, der als rein klinisches Instrument aus der Ausbreitung und der Morphe der Hautveränderungen errechnet wird. Hierbei gelten Werte ≤ 10 als leichte, höhere Werte als mittelgradige und schwere Ausprägung bei maximal möglichen 72 Punkten. Die subjektive Einschätzung aus Patientensicht wurde über den *Dermatology Life Quality Index* (DLQI), eines spezifisch dermatologischen Patientenfragebogens für dessen Lebensqualität, erfasst und zeigt eine breiter gefächerte Aufstellung von leichter (2-5) über moderater (6-10) bis zu schwerer (11-20) Beeinträchtigung der Patienten bei maximal erreichbaren 30 Punkten (Finlay und Khan 1994). Die Diagnose einer PsA wurde zum einen anhand klinischer Symptome (Gelenksbeschwerden), zum anderen apparativ mithilfe fluoreszenzoptischer Bildgebung (*fluorescence optical imaging*, FOI) gestellt. Diese Untersuchung wurde realisiert an einem Xiralite® X4 -System (mivenion GmbH, Berlin) und von einem unabhängigen Arzt befundet, der mit den klinischen Angaben der Patienten nicht vertraut war. Die FOI ist eine zwar unspezifische, aber sehr sensitive Methode, bei der durch Detektion eines intravenös applizierten Farbstoffes (Indozyanin-Grün) entzündliche Gelenkprozesse an beiden Händen nachgewiesen werden können, die sich in krankheitstypischen Anreicherungsmustern äußern (Werner *et al.* 2012). Weitere Gelenke werden bei der FOI nicht berücksichtigt.

Vier der sechs Patienten waren mit einem BMI von $> 25,0$ übergewichtig, zwei davon mit einem BMI $> 30,0$ sogar leichtgradig adipös. Ein Patient war mit einem BMI von 15,15 stark untergewichtig. An Komorbiditäten, die im Rahmen der Psoriasis erwähnenswert erscheinen, fanden sich eine Depression, eine aufgrund ihrer Häufung bei Psoriasis-Patienten oft in der Literatur berichteten Komorbidität (Kurd *et al.* 2010), ebenso ein Vitamin D-Mangel (Gisondi *et al.* 2012) sowie Erkrankungen aus dem Formenkreis des Metabolischen Syndroms, d. h. Hypertonie und Hypercholesterinämie neben der bereits erwähnten Adipositas.

Als Kontrollpersonen konnten Erwachsene zwischen 27 und 53 Jahren rekrutiert werden, die hinsichtlich Hauterkrankungen klinisch gesund imponierten und auch familienanamnestisch über keine Psoriasiserkrankungen berichteten. Bei zwei Patienten fanden sich medikamentös behandelte Vorerkrankungen; zum einen ein Bluthochdruck, zum anderen ein Lymphödem. Ähnlich zu den Patienten lag bei vier der Kontrollpersonen gemessen an ihren BMI-Werten ein Übergewicht, bei einer Adipositas vor.

Tab. 2: Charakterisierung der Probanden

	Paar 1		Paar 2		Paar 3		Paar 4		Paar 5		Paar 6	
Diagnose ¹	PsA	Kon- trolle	PsA	Kon- trolle	PsA	Kon- trolle	PsA	Kon- trolle	Ps	Kon- trolle	PsA	Kon- trolle
Geschlecht	w	w	m	m	w	w	m	m	m	m	m	m
Alter [J] ²	53	53	48	48	49	50	29	28	57	53	49	50
Beginn Haut- ver-änderung [LJ] ³	22	/	15	/	19	/	6	/	26	/	34	/
Beginn Gelenkbe- schwerden [LJ]	51	/	35	/	47	/	k. A.	/	47	/	49	/
PASI ⁴	3,5	/	48	/	12,6	/	14,5	/	8,4	/	18,8	/
DLQI ⁵	19	/	20	/	4	/	14	/	13	/	10	/
Psoriasis in der Familie	Ja	/	Nein	/	Ja	/	k. A.	/	Ja	/	Ja	/
Komorbiditäten	Hyper- tonie, Depres- sion	Lymph- ödem	Herz- rhyth- musstö- rung	/	Herz- klappen- fehler, Koxar- throse, Vit. D- Mangel	/	/	/	/	Hyper- tonie	Hyper- choleste- rinämie	/
Rauchen ⁶	20	NR	20	NR	5-10	NR	13	NR	NR	NR	NR	20
Alkohol ⁷	1	1	3	1	1	3	2	2	1	2	2	2
Medikation	Antide- pressiva	Diuretika	/	/	Metho- trexat, Folsäure, Vit. D	/	/	/	Schmerz- medika- tion bei Bedarf	Antihy- pertoni- kum (ACE- Hem- mer)	/	/

	Paar 1		Paar 2		Paar 3		Paar 4		Paar 5		Paar 6	
Größe [m]	1,65	1,63	1,78	1,75	1,72	1,64	1,76	1,83	1,73	1,76	1,70	1,78
Gewicht [kg]	86	100	48	72	81	69	72	88	97	88	79	70
BMI ⁸	31,59	37,62	15,15	23,51	27,38	25,65	23,24	26,28	32,41	28,41	27,34	22,09
Protein total [mg] ⁹	78,25	74,26	83,6	78,29	88,89	70,28	69,11	74,04	61,39	73,83	75,31	70,54
Protein-Konzentration [mg/ml] ¹⁰	120,39	114,25	128,61	120,45	136,76	108,13	106,32	113,91	94,45	113,59	115,86	108,52

k. A.: keine Angabe

¹: PsA: Psoriasis-Arthritis, Ps: Psoriasis

²: J: Jahre

³: LJ: Lebensjahr

⁴: PASI: Psoriasis Area and Severity Index, ≤ 10 leichtgradig, > 10 mittel- und schwergradig

⁵: DLQI: Dermatology Life Quality Index, 0-1 keine, 2-5 leichte, 6-10 moderate, 11-20 schwere, 21-30 sehr schwere Beeinträchtigung

⁶: Angabe als Anzahl der Zigaretten pro Tag. NR: Nichtraucher

⁷: „1“: kein regelmäßiger Konsum oder nur zu Anlässen; „2“: Konsum ein- bis zweimal pro Woche eine Flasche Bier oder ein Glas Wein; „3“: täglich

⁸: BMI: Body Mass Index, Körpergewicht (kg)/Körperlänge (m)²

⁹, ¹⁰: Daten spektrometrisch gemessen aus den Serumproben im Institut für Biochemie nach Wendler et al. (2013)

3.1.8 Proben für die Evaluierung mit Immuntests

Für die Immuntests wurden EDTA-Plasmaproben von bis zu 73 Probanden (davon je 25 Kontrollen und Psoriasis-Patienten [in den ELISA-Tests abgekürzt mit „Ps“], 23 PsA-Patienten) verwendet (s. Tab. 3). Dabei wurde jedes Sample in einer Zweifachbestimmung getestet.

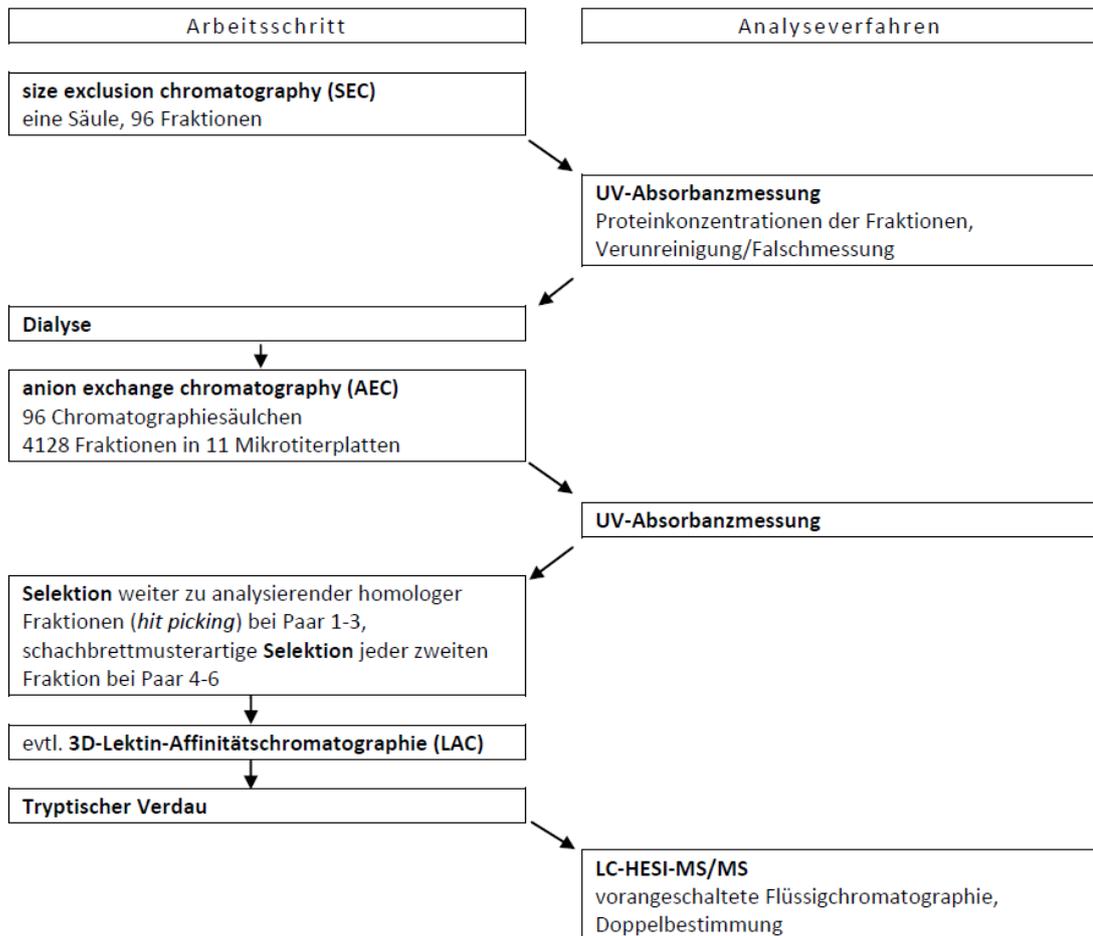
Tab. 3: Übersicht der für die ELISA-Tests verwendeten Proben

	Kontrollen	Ps	PsA
Gesamt (davon weiblich, w)	25 (15)	25 (8)	23 (11)
Lebensjahre – Mittelwert (SD)	42,6 (11,3)	44,2 (13,7)	51,0 (10,1)
Lebensjahre – Median	46	47	51
Desmoplakin (w)	25 (15)	25 (8)	23 (11)
S100A7 (w)	11 (5)	11 (5)	11 (4)
COMP (w)	25 (15)	25 (8)	23 (11)
Vit-D-bind. Protein (w)	8 (3)	8 (2)	8 (3)
NAAA (w)	24 (15)	24 (8)	22 (10)
C3 (w)	11 (5)	11 (5)	11 (4)
Zn- α -GP (w)	23 (15)	23 (8)	21 (9)
Kallikrein 8 (w)	8 (3)	8 (2)	8 (3)
Profilin 1 (w)	11 (5)	11 (5)	11 (4)
Plakoglobin (w)	8 (3)	8 (2)	8 (3)
PIGR (w)	11 (5)	11 (5)	11 (4)
Haptoglobin (w)	8 (3)	8 (2)	8 (3)
FAM83H (w)	11 (5)	11 (5)	11 (4)
Plasma-Kallikrein (w)	11 (5)	11 (5)	11 (4)
Cytokeratin 17 (w)	11 (5)	11 (5)	11 (4)

3.2 Methode: Workflow zur Proteomuntersuchung

Einen Überblick über die im Folgenden genauer beschriebenen Arbeits- und Analyseschritte gibt das Schema in Abb. 4.

Abb. 4: Schematische Darstellung der Probenaufarbeitung mittels zwei- bzw. dreidimensionaler chromatographischer Fraktionierung



3.2.1 Probengewinnung, -aufarbeitung und -lagerung

Die Blutentnahme erfolgte standardisiert mittels peripherer Venenpunktion vormittags am nüchternen Patienten bzw. Kontrollprobanden. Für die vorliegende Fragestellung wurde in eine EDTA-Monovette Blut abgenommen, dessen Plasma nach zeitnaher Zentrifugierung (10 min bei 1500 g) aliquotiert in mehreren, für weitere Untersuchungen handlicheren 1,5-2 ml-tubes bis zur weiteren Probenaufarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert wurde. Vor der 1D-Trennung wurde die Plasmaprobe 10 min im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Probe wurde nach dem Auftauen erneut 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert, um Schmutzpartikel und aggregierte oder denaturierte Proteine zu entfernen; im

Anschluss wurden 1,3 ml Plasma mit 700 µl Puffer A (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) verdünnt.

3.2.2 Fraktionierung

1. Dimension: *size exclusion chromatography* (SEC)

Die Separation nach Teilchengröße erfolgte an der *fast performance liquid chromatography* (FPLC)-Anlage ÄKTA™ der Firma GE, die mit einer kommerziell hergestellten 16/60 Hi-Load-Superdex™ 200-Säule bestückt wurde, welche mit dem Puffer A äquilibriert wurde. 1 ml der verdünnten Plasma-Probe wurde auf die Säule aufgetragen. An Trennungsbedingungen fanden sich folgende Spezifikationen: Flussrate 1 ml/min, (maximal anliegender) Druck 0,5 MPa. Das Säulenvolumen betrug 120 ml; die Sammlung der Fraktionen begann nach dem Durchlaufen des Totvolumens von etwa einem Drittel des Säulenvolumens. Die Fraktionierung erfolgte in 1,1 ml-*deep-well*-Platten mit 96 *wells*, resultierend in einer Fraktionsgröße von jeweils 0,75 ml.

Anschließend wurde eine erste Absorbanzmessung durchgeführt, indem von den erhaltenen 96 Fraktionen je Mikrotiterplatte zwischenzeitig 150 µl in eine 96er UV-Star™-Platte pipetiert und bei 205, 215, 280, 340, 460 und 700 nm im Absorbanz-Reader SPECTRAMax PLUS™ spektrometrisch gemessen wurden. Hierdurch konnte bereits ein Elutionsprofil erstellt, einzelne Proteinkonzentrationen mit den zugehörigen -größen abgeleitet und eventuell verunreinigte oder anderweitige Falschmessungen festgestellt werden, indem bei 700 nm eine Kontroll-Absorbanzmessung mit Ermittlung eines Blindwertes durchgeführt worden war.

Zwischenschritt: Dialyse

Zur Entsalzung der Proben aus der 1D-Chromatographie wurde eine Dialyse eingesetzt. Jeweils zwei 180 µl-Aliquots aus jeder der 96 Fraktionen der einzelnen Mikrotiterplatte wurden auf zwei eigens konstruierte Dialyseplatten aufgegeben. Diese bestehen aus mit 96 Bohrlöchern, analog zu den *wells* der 96er Mikrotiterplatten, versehenen Platten, an deren Boden eine Dialysemembran angebracht wurde. Der untere Teil der Dialyseplatten taucht in die Dialysatflüssigkeit ein, die in diesem Fall aus 1000 ml Puffer B (10 mM Tris/HCl, 25 mM NaCl, pH 7,4) bestand. Die Dialyse wurde für eine Dauer von 2 Stunden durchgeführt, wobei der Dialysepuffer nach einer Stunde komplett erneuert wurde. Somit blieb ein beständiges Konzentrationsgefälle für Salze über die Membran erhalten und die aus der 1D-Fraktionierung resultierenden hohen NaCl-Konzentrationen der Proben konnten auf ausreichend kleine Konzentrationen gesenkt werden, was für die nachfolgende weitere Separation essenziell war. Für diese wurden die beiden getrennten 180 µl-Aliquots wieder in einer 500 µl-*deep-well*-Platte

zusammengeführt.

2. Dimension: *anion exchange chromatography* (AEC)

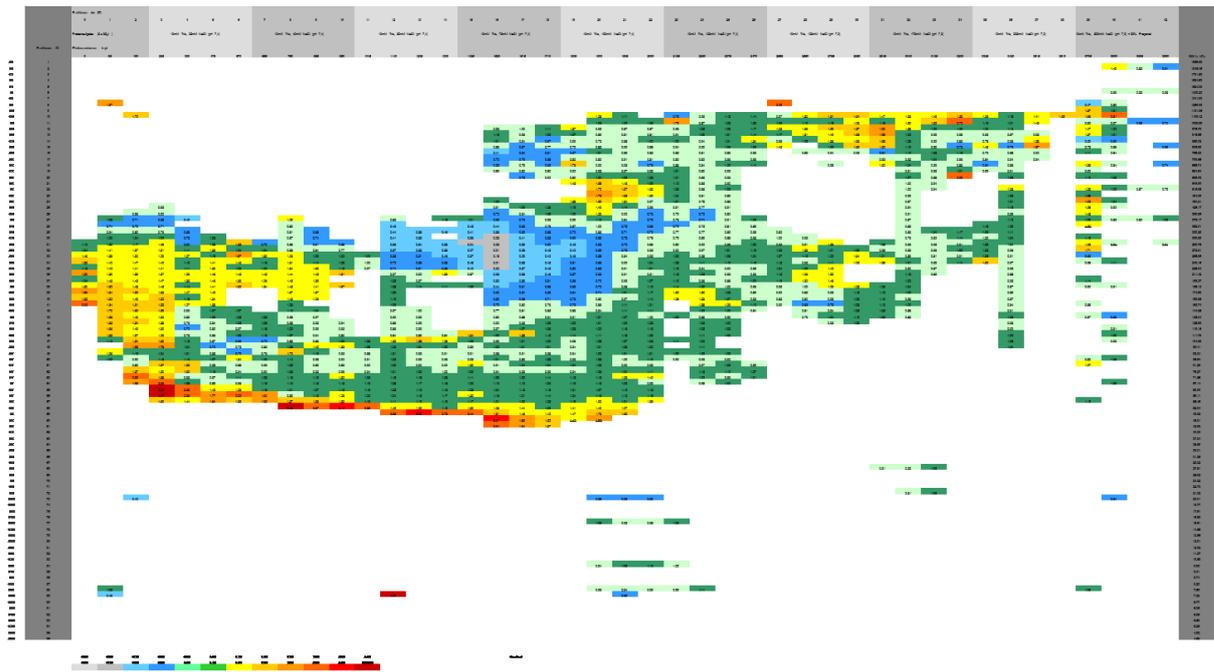
Für die Proteinseparation nach Ladung kamen ebenfalls speziell konstruierte Instrumente zum Einsatz. Es handelt sich um Arrays für 96 Chromatographiesäulen, welche in ihrer Anordnung dem Muster herkömmlicher Mikrotiterplatten entsprechen. Als Triebkraft für die Chromatographie dient allein der hydrostatische Druck und die Kapillarkräfte, wobei ein mechanisches Andrücken auf die Kartuschenblöcke den Durchfluss anstößt und begünstigt. Die Toyopearl™-Säulen wurden äquilibriert mit Puffer B und besitzen ein Gelbett mit einem Volumen von 100 µl. Die zum Sammeln der Eluate eingesetzten 384-*well*-Platten (s.u.) können ca. 110 µl pro *well* aufnehmen. Daher erfolgte die Aufgabe der jeweils 96 dialysierten Fraktionen aus der 1D-Trennung in 3 x 95 µl-Schritten. Dies sowie alle weiteren Schritte der Elutionspuffer-Aufgabe geschahen durch einen, u. a. mit 96 Pipettierspitzen ausgestatteten, automatisierten Roboter, dem CyBi™-*Well*-Roboter (CyBio AG), an einer Analyseplattform. Eluiert wurde durch ansteigende Salzkonzentration, einen pH-Ansäuerungsschritt und zuletzt Zugabe von 1-Propanol nach dem in Tab. 4 dargestellten Elutionsschema. Diese zehn Elutionspuffer wurden jeweils viermal mit einem Volumen von 95 µl auf die Säulen aufgegeben. Gesammelt wurde wie folgt in 384er UV-Star™-Mikrotiterplatten: drei 2D-Fraktionen resultierten aus der (3 x 95 µl) Probenaufgabe, je Puffer (4 x 95 µl) wurden vier 2D-Fraktionen pro 1D-Fraktion gewonnen, sodass für jeden Elutionspuffer aus den 96 1D-Fraktionen 384 2D-Fraktionen entstanden, die genau einer 384-Mikrotiterplatte entsprechen. Das Ergebnis bestand in elf zu messenden Mikrotiterplatten: eine Elutionsplatte 0 aus der Probenaufgabe sowie die Elutionsplatten 1-10 der jeweiligen Elutionspuffer. Parallel zur Applikation der Elutionspuffer führte die Analyseplattform die bereits erhaltenen 384er UV-Star™-Mikroplatten der Absorbanzmessung im SpectraMax Plus³⁸⁴-Gerät zu, welche ebenfalls bei den Wellenlängen 205, 215, 280, 340, 460 und 700 nm erfolgte. Die AEC-Separation bestand zusammengefasst aus 43 vollautomatisierten Schritten, die für bis zu vier 1D-Sätze in etwa 4-5 Stunden abgeschlossen waren. Aus der 2D-Proteinseparation einer Serumprobe resultierten also 4 x 96 x 10 (Elutionsplatten 1-10) + 3 x 96 (Elutionsplatte 0) = 4128 Fraktionen, die nach spektrometrischer Ausmessung grafisch in einem Schema nach Größe (1D), Ladung (2D) und ihrer Konzentration dargestellt werden konnten.

Tab. 4: Elutionsschema 2D-Trennung

Elutionsplatte	2D-Fraktion	Konzentration			pH-Wert
		Tris (mM)	NaCl (mM)	Propanol (%)	
0	0-2	10	25	0	7,4
1	3-6	10	25	0	7,4
2	7-10	10	40	0	7,4
3	11-14	10	50	0	7,4
4	15-18	10	75	0	7,4
5	19-22	10	100	0	7,4
6	23-26	10	125	0	7,4
7	27-30	10	125	0	7,2
8	31-34	10	175	0	7,2
9	35-38	10	225	0	7,2
10	39-42	10	500	20	7,2

Auf Basis dieser Daten konnte auch eine Gegenüberstellung von Patienten- und Kontrollprobe angefertigt und die Quotienten der absorptiomtrisch ermittelten Proteinkonzentrationen jeweils einander entsprechender Fraktionen errechnet werden, was schnell einen Überblick ermöglichte über grobe Alterationen im Proteom im Plasma von erkrankten Versuchspersonen (s. beispielhaft Abb. 5, die diesen Quotienten farbcodiert wiedergibt). Diese Analyse und die absoluten Konzentrationen ($\geq 0,03$ mg/ml) hervorstechender Fraktionen bildeten die Grundlage für die automatisierte Selektion der später massenspektrometrisch analysierten Fraktionen (*hit picking*) durch den Pipettierer der Analyseplattform, welche anschließend einem enzymatischen Verdau mit Trypsin unterzogen wurden. Nach Sichtung erster Ergebnisse nach Analyse zusätzlicher Fraktionen in Paar 4 zeigte sich, dass sich Unterschiede in den Konzentrationen diverser Serumpeptide nicht ausschließlich in den Fraktionen finden ließen, die sich in der UV-spektrometrisch gemessenen Gesamtproteinkonzentration unterschieden, sondern auch in augenscheinlich unauffälligen Fraktionen, die bei Patient und Kontrolle etwa dieselben Proteingesamtkonzentrationen aufwiesen, da die UV-Absorbanzmessung ja keine Rückschlüsse auf die Identität und Arten der Proteine in den Fraktionen erlaubt. Daher wurde die Auswahl weiter zu analysierender Fraktionen mittels *hit picking* bei den Paaren 4, 5 und 6 verlassen und es erfolgte stattdessen die standardmäßige Analyse jeder zweiten Fraktion, die sich schachbrettmusterartig auf das 1D-2D-Diagramm verteilten. Die Messung jeder zweiten Fraktion bildete einen Kompromiss zwischen begrenzten Kapazitäten des Massenspektrometers und einer dennoch möglichst breit abdeckenden Analyse des Serumproteoms mit ausreichender Auflösung.

Abb. 5: Quotienten der Proteinkonzentrationen aller 2D-Fractionen des Probenpaares 6 in einer zweidimensionalen Matrix



Die Quotienten der Proteinkonzentrationen von Psoriasis-Patient zu Kontrolle sind sowohl als Zahl als auch farbcodiert dargestellt (Konz. Patient / Konz. Kontrolle). Fraktionen mit absorptimetrisch gemessenen geringeren Proteinkonzentrationen ($< 0,03$ mg/ml) sind von der Quotientenbildung ausgeschlossen und erscheinen daher in der Matrix nicht

Lektin-Affinitäts-Chromatographie (LAC)

Fraktionen der Paare 5 und 6 mit auffallend hohen Proteinkonzentrationen in der UV-Absorbanzmessung nach der zweidimensionalen Fraktionierung wurden einem weiteren Auftrennungsschritt unterzogen, der Lektin-Affinitätschromatographie (LAC). Konkret wurden dafür 15 Fraktionen des Probenpaares 5 sowie 11 Fraktionen des Probenpaares 6 ausgewählt.

Das Prinzip der LAC beruht auf der unterschiedlich hohen Bindungsaffinität der zu analysierenden Glykoproteine in der Probe an Lektine, welche die feste Phase der Trennsäulen darstellt. Da keine fertigen LAC-Säulen mit den hier geforderten Spezifikationen erhältlich waren, erfolgte die Synthese eigener LAC-Säulen im Institut auf Basis der Kopplung von Concanavalin A und Weizenkeim-Lektin an Toyopearl AF-Tresyl 650M (Tosoh Bioscience GmbH)-Säulen (s. Wendler *et al.* (2013)). Der Trennvorgang gliederte sich in vier Schritte, die in vier 3D-Fractionen pro aufzutrennender 2D-Fraktion resultierte: Nach Probenaufgabe wurden durch die Spülung mit dem Bindepuffer, in dem die Säulen äquilibriert wurden, zunächst Proteine ohne Lektin-Bindungsaffinität aufgefangen (I). Die Elution, d. h. kompetitive Verdrängung gebundener Proteine durch Zugabe von in Bindepuffer gelöstem 0,5 M Methyl- α -Mannopyranosid (II) und anschließend 0,2 M GlcNAc (III), trennte Proteine mit Mannose-

reichen Glykanen (II) bzw. Glukose- und GlcNAc-reichen Glykanen (III). Die Elution mit Regenerationspuffer (20 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0) löste zuletzt Proteine andersartiger Kohlenhydratmodifikationen mit hoher Lektinaffinität (IV). Das aufgefangene Volumen jeder 3D-Fraktion betrug ca. 400 μ l, welches bedingt durch eine maximale Kapazität der *wells* der Mikrotiterplatten von 100 μ l allerdings in vier Aliquots gesammelt und anschließend vereinigt wurde.

Tryptischer Verdau

Zur Denaturierung der Proben wurden 75 μ l der selektierten Fraktionen mit 25 μ l 8 M Guanidin-HCl-Lösung in einer 96er PCR-Mikrotiterplatte gemischt, 20 min bei 90 °C in einem Thermoblock inkubiert und anschließend auf einem Eisbad abgekühlt. Die Zugabe von 5 μ l 210 mM Dithiothreitol-Lösung und anschließende Inkubation für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad diente der Reduktion der Disulfidbrücken. Um deren erneute Ausbildung zu verhindern, wurden die freien Thiolgruppen (an der Aminosäure Cystein) irreversibel alkyliert, indem 5 μ l 1,1 M Jodacetamid-Lösung zugegeben wurden. Anschließend wurde für 30 min bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss inkubiert. Es folgte eine Dialyse in 96 einzelnen, U-förmigen Mikrodialysekammern (MD100) unter Rühren gegen 2 l einer 20 mM NH_4HCO_3 -Lösung für die Dauer von 60 min ohne Dialysepufferwechsel.

Für den eigentlichen Trypsin-Verdau wurden die vorbereiteten Fraktionen zunächst wieder in jeweils frische PCR-Platten überführt und mit 1 mg/ml Trypsin-Lösung (1 mg Trypsin auf 1 ml 20 mM NH_4HCO_3) versetzt. Die zugegebene Trypsinmenge errechnet sich aus dem optimalen Verhältnis von Trypsin zu Protein von 1:40. Es wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Verdau durch Zugabe von 5 μ l 280 mM Ameisensäure gestoppt und bis zur weiteren massenspektrometrischen Analyse bei -80 °C eingefroren.

3.2.3 LC-HESI-MS/MS

Die Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse erfolgte automatisiert mittels eines Accela™-Autosamplers. Es erfolgte zunächst eine weitere Flüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC), um die Auflösung der Analyse zusätzlich zu erhöhen. Die flüssige Phase der Chromatographiesäule (Hypersil Gold™) bestand aus Lösungen aus Acetonitril und H_2O , wobei die Acetonitril-Konzentration zur Elution schrittweise gesteigert wurde (s. Elutionsschema Tab. 5). Eine Accela-1250-Pumpe generierte einen anliegenden Druck von maximal 1250 bar, was als Triebkraft der HPLC diente. Das injizierte und damit analysierte Volumen betrug je Durchlauf 20 μ l; jede Fraktion wurde dabei doppelt gemessen, d. h., insgesamt wurden 40 μ l in das Massenspektrometer gegeben. Zwischen den

einzelnen Zyklen wurde mit H₂O gespült. Zur internen Kalibrierung bzw. Kontrolle der Chromatographiesäule wurden vier Positionen mit Transferrin bei der Messung mitgeführt (zu Beginn und Ende sowie zweimal während des Messdurchlaufs einer Platte).

Tab. 5: Trennbedingungen HPLC

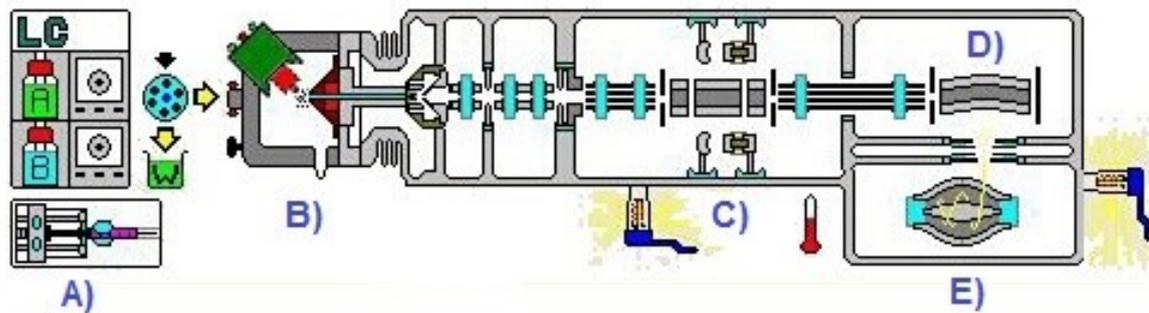
Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussgeschwindigkeit [μl/min]
0-1	95	5	150
1-21	95-70 linear fallend	5-30 linear steigend	150
21-24	70-60 linear fallend	30-40 linear steigend	150
24-25	60-10 linear fallend	40-90 linear steigend	150
25-26	10	90	150
26-26,1	10-95	90-5	150
26,1-30	95	5	150

Eluent A: 0,1% HCOOH in H₂O

Eluent B: 0,1% HCOOH in Acetonitril

Das Prinzip eines Massenspektrometers beruht auf der Detektion von ionisierten Analyten in der Gasphase und deren Auftrennung und Identifikation anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (*m/z*-Ratio) in einem elektrischen Spannungsfeld. Das im Institut eingesetzte Massenspektrometer, LTQ Orbitrap™ Discovery (Thermo Fisher Scientific), ist in Abb. 6 schematisch dargestellt. Teil A) der Abbildung stellt die vorgeschaltete HPLC dar. Die Ionisation erfolgte im vorliegenden Fall mit positiven Ladungen durch eine sog. H-ESI (*heated electro spray ionisation*, Teil B) in Abb. 6). Das verwendete Massenspektrometer ist ein Tandem-Massenspektrometer (MS/MS), d. h., es finden sich zwei hintereinandergeschaltete Analysatoren für tryptisch verdaute Peptide und deren Fragmente: eine „Voranalyse“ in einer linearen Ionenfalle (Thermo Scientific LTQ XL, Teil C) in Abb. 6) dient der Speicherung, gegebenenfalls gezielten Selektion (nach Masse) und kontrollierten axialen Ausgabe der Ionenpakete in eine zwischengeschaltete gebogene Ionenfalle (*C-Trap*, Teil D) in Abb. 6). Diese überführt die Ionen in den zweiten Analysator: die *Orbitrap*™ (Teil E) in Abb. 6). Erfasste Peptide lagen in einem Bereich von *m/z*-Ratios von 350,00 – 1 700,00. Nach der *Top10*-Methode wurden die zehn signalintensivsten Ionen aus dem ersten Scanvorgang fragmentiert (*collision-induced dissociation*) und einer höherauflösenden Analyse unterzogen. Der Betrieb des Massenspektrometers erfolgte über die Software Thermo Xcalibur®, die die gewonnenen MS-Daten als Rohdateien (*.raw*-Dateien) ausgab. Die gesamte Injektions- und Analysezeit eines Zyklus des Massenspektrometers betrug ca. 30 min.

Abb. 6: Schema des eingesetzten Massenspektrometers



A) HPLC; B) H-ESI; C) lineare Ionenfalle; D) C-Trap; E) Orbitrap™

Die Identifikation und Zuordnung der m/z -Ratios der Peaks zu Protein-Sequenzen erfolgte mithilfe der Software *Proteome Discoverer*™ der Firma Thermo Scientific. Die benutzte Datenbank „HUMAN_3.fasta“ ist online frei erhältlich. Es wurde der Suchalgorithmus SEQUEST™ verwendet.

3.2.4 Auswertung der MS-Daten

3.2.4.1 SIEVE™

Die quantitative Auswertung der MS-Dateien der Probenpaare mit dem Programm *SIEVE*™ (Thermo Scientific), Version 2.0, vergleicht zwei einander zugehörige Fraktionen (Patient und Kontrolle) gegeneinander („*Two Sample Differential Analysis*“). Das Material für die rechnerische Auswertung bestand hierbei direkt in den *.raw*-Dateien aus dem Massenspektrometer. Die gemessenen Fraktionen aus den 2D- oder 3D-Trennungen wurden einzeln ausgewertet, d. h., es wurden je zwei Rohdateien (Doppelbestimmung) der Patienten- und Kontrollfraktion importiert, auf ihre Kompatibilität hin „gescannt“ und ausgewertet. In einem ersten Schritt erfolgte eine Angleichung der vier Chromatogramme („*Alignment*“), um messtechnisch bedingte Varianzen zu minimieren. Anschließend generierte die Software relative Werte (Ratio Patient vs. Kontrolle) auf Basis der einzelnen Peptidfragmente in homologen Abschnitten des m/z -Ratio-Retentionszeit-Diagramms in Patient- und Kontrollsamples (sog. *frames*). Absolute Werte sind bei dem Auswerteprotokoll „*Two Sample Differential Analysis*“ nicht mehr einsehbar. Die Identifizierung der gefundenen Proteine ist zwar auch durch das Programm *SIEVE*™ möglich, wurde jedoch im vorliegenden Experiment ausgelagert zugunsten einer externen Identifizierung mit dem Programm *Proteome Discoverer*™. Dazu wurden die vom *Proteome Discoverer*™ im Vorfeld separat ausgewerteten Daten (*.msf*-Dateien) in das Programm *SIEVE*™ implementiert. Zuletzt wurden die Daten auf Basis des p -Werts gefiltert, sodass nur statistisch signifikante Ergebnisse berücksichtigt wurden ($pvalue < 0.05$).

Die weitere, nun manuelle Auswertung der Daten erfolgte nach einem Export der Daten in das Programm Microsoft Excel, was in je einer separaten Tabelle pro analysierter Fraktion eines Probenpaares resultierte. Nun wurden die Ergebnisse nach ihrer Ratio kategorisiert: Quotient Patient vs. Kontrolle > 4 (Erhöhung), 2-4, 0,5-2, 0,25-0,5 (indifferent) sowie $< 0,25$ (Erniedrigung). Die Daten wurden in einer einzigen Tabelle zusammengeführt und nach der Proteinidentität (Protein-ID) sortiert, sodass die gefundenen Proteine in den einzelnen Fraktionen nun gruppiert vorzufinden waren und eventuell ihr Vorkommen in mehreren Fraktionen ersichtlich wurde. Dies war die Voraussetzung für die Bildung von Clustern, d. h. von gleichsinnigen Abweichungen der Proteinkonzentrationen in benachbarten oder in Nähe zueinander liegenden Fraktionen, die ihre Entsprechung in der zweidimensionalen Auftrennung mittels 2D-Chromatographieverfahren finden. Proteine, die nur in einer einzigen Fraktion nachgewiesen wurden, wurden daher ignoriert und als fehlerhafte Messung oder Identifizierung betrachtet. Um keine potenziellen Biomarkerkandidaten zu verlieren, wurde die Abgrenzung der Cluster auf Basis ihrer Fraktionsspezifikation dynamisch variiert: je geringer die Zahl der Fraktionen, in denen das Protein gefunden wurde, desto großzügiger wurde ein Cluster gefasst, insbesondere wenn sich über den Großteil der davon gefundenen Peptide eine eindeutige Tendenz des Verhältnisses Patient zu Kontrolle abzeichnete. Anhand dieses Schemas wurden die Proteincluster weiter gesichtet. Hochverdächtig für erkrankungstypische Plasmaaberrationen bestimmter Proteine erschienen ausschließlich positive oder ausschließlich negative Protein-Cluster. Gegenläufige Cluster einzelner Proteine oder abgrenzbare Cluster bei daneben uneindeutigen, nicht zu Clustern zusammenfassbaren Fraktionen wurden in einer separaten Tabelle gesammelt und gegebenenfalls gegenübergestellt.

Auffällige Protein-Cluster und damit mögliche Biomarkerkandidaten konnten so erkennbar gemacht und für die weitergehende Betrachtung selektiert werden. Somit konnte für jedes Patient-Kontrolle-Paar eine Liste der auffälligen Protein-Cluster zusammengestellt werden. Daran schloss sich der Abgleich dieser Listen unter allen sechs Paaren an, indem nach dem jeweils in einem Paar auffälligen Protein auch in den Reports der anderen Paare gesucht wurde. Eine separate Tabelle enthielt dann eine Liste mit ausgewählten Proteinen und ihrem jeweiligen Verhalten in den sechs Probenpaaren und machte damit auch mögliche gleichsinnige Abweichungen der Ratios eines Proteins in mehreren Paaren sichtbar. Diese Konstellation ist von besonderem Interesse; da jedoch die Cluster oder einzelnen „Treffer“ eines Proteins zwischen den Paaren nicht gleichbedeutend untereinander vergleichbar waren, erfolgte zur Auswahl einer Ergebnisliste zusätzlich eine Evaluierung der Proteine, die in einer Sichtung bereits bekannter Information über das betreffende Protein bestand.

3.2.4.2 *MetaboAnalyst*

Eine rein mathematische, statistische Analyse der Daten erfolgte mithilfe der für Metabolomik-Studien entwickelten Software *MetaboAnalyst* (Version 2.0). Es handelt sich um ein frei verfügbares, Web-basiertes Programm (www.metaboanalyst.ca/), das Daten aus einer Vielzahl von spektrometrischen Analysen (u. a. Massenspektrometrie) verarbeitet und auswertet. Es ermöglicht dadurch schnelle statistische Ergebnisse der zumeist sehr großen Datenmengen proteomischer oder metabolomischer Experimente. Nach einer ersten Integritätsprüfung und Prozessierung der hochgeladenen und in das Programm importierten Daten erfolgt deren Normalisierung und anschließend die Auswertung; hierfür stehen vor allem uni- wie multivariate und Cluster-basierte Analysen zur Auswahl. Weiterhin bietet das Programm auch die Möglichkeit der Einbindung von Biomolekülen in Stoffwechselwege, um dem Anspruch eines Programms für metabolomische Studien gerecht zu werden (Xia *et al.* 2009).

Für die Auswertung der von uns generierten Daten wurden die *.raw*-Dateien mit dem Programm *Proteome Discoverer*TM für eine multidimensionale Analyse aufbereitet und in sog. MudPIT-Samples (*Multidimensional Protein Identification Technology*) umgewandelt. Hier wurden die zahlreichen Messungen der einzelnen Fraktionen der Plasmaprobe zusammengeführt und als eine Gesamtanalyse aller gemessener Fraktionen in einer einzigen Ergebnisdatei ausgegeben. Es erfolgte eine Quantifizierung mithilfe des Programmmoduls „*Precursor Ions Area Detector*“: berücksichtigt wurden dabei jeweils die signalintensivsten Treffer der einzelnen Proteine über alle Fraktionen hinweg in Form der *area under the curve* (AUC)-Werte; die Akkumulation von „Treffern“ eines Peptids in benachbarten Fraktionen, also die Bildung von Clustern, kam hier nicht mehr zum Tragen. Die so entstandenen MudPIT-Dateien waren als Tabelle mit dem Programm Excel zu öffnen; hier erfolgte ein manuelles Aussortieren von Variablen-Duplikaten, d. h. von mehreren verschiedenen Isoformen eines Proteins, die auf lediglich ein zugrundeliegendes detektiertes Peptidfragment zurückzuführen waren, um eine Überrepräsentation desselbigen zu vermeiden.

Die MudPIT-Samples der Patienten 1, 2, 3, 4 und 6 und der dazugehörigen Kontrollen wurden zur Auswertung mit dem *MetaboAnalyst*-Programm herangezogen; das Probenpaar 5 wurde hier ausgeschlossen, da beim Patienten keine PsA vorlag. Die zehn einzelnen MudPIT-Dateien wurden, ebenfalls mit dem Programm *Proteome Discoverer*TM, in eine einzige Datentabelle im *.csv*-Format exportiert und für die Verarbeitung mit *MetaboAnalyst* vorbereitet. Bei der folgenden Auswertung wurde die Zuordnung der Patienten zu ihren jeweils gematchten Kontrollen allerdings nicht beibehalten, sodass nur eine Unterscheidung zwischen Patienten-

MudPIT-Auswertung, die – neben der Identifizierungsfunktion der gefundenen Signale als die jeweiligen Proteine – die Informationen der einzelnen untersuchten Fraktionen der 2D- oder 3D-Trennungen der Plasmaproben in einer einzigen Betrachtung zusammenführte. Damit wurden also auch hier die detaillierten Informationen der einzelnen Fraktionen zugunsten einer überblickenden Betrachtung verlassen. Weiterhin wurden ebenfalls nur die Plasmapaare 1, 2, 3, 4 und 6 mit der Diagnose PsA untersucht.

Die quantitative Analyse der Software generierte eine Proteinliste, in der die Signale in Form der maximalen AUC aus den Spektrogrammen als absolute Werte tabellarisch für die jeweils untersuchte Sample einzusehen waren. Damit waren sie einem direkten Vergleich zwischen Patient und jeweils gematchter Kontrolle zugänglich. Dieser erfolgte über die Berechnung der Ratios (max. AUC Patient / max. AUC Kontrolle) im Programm Excel. Hierauf zeigten sich Proteine mit gleichläufiger Aberration ihrer Ratios über die einzelnen Patient-Kontrolle-Paare hinweg als von Interesse, die in einer separaten Ergebnisliste gesammelt und in vier Kategorien gegliedert wurden: Proteine, die in fünf der Paare positiv reguliert waren, Proteine, die vierfach positiv reguliert waren, Proteine, die fünffach negativ reguliert waren und Proteine, die vierfach negativ reguliert waren. Entscheidend war hierfür also das Kriterium, dass das betreffende Protein in vier bzw. fünf Paaren gefunden wurde und dann auch jeweils mit derselben Tendenz (höher oder niedriger konzentriert) reguliert imponierte. Der genaue Wert der errechneten Ratio spielte hierbei keine Rolle.

Zusätzlich stellt die *Proteome Discoverer*TM-Software weitere Informationen über die gefundenen Proteine zur Verfügung, wie etwa die Aminosäuresequenz des eigentlich massenspektrometrisch detektierten Proteolysefragments des Proteins, Software-generierte Scores, die im Rahmen der MS-Datenanalyse bei der Filterung und Verifizierung der Peptidpeaks erhoben wurden und für das Protein, für das mehrere Peptide (mit jeweils einzelnen Scores) gefunden werden, zu einem Protein-Score subsumiert werden, weiterhin Parameter über die Verlässlichkeit der richtigen Proteinidentifizierung („*Identity*“, Angabe über die Konfidenz der Proteinidentität in %). Weiterhin ist anzumerken, dass das Programm im Falle der Detektion eines Peptidfragmentes, das mehreren Proteinen (bzw. mehreren bekannten Isoformen eines Proteins) zuzuordnen ist, auch alle diese Isoformen in den Resultaten aufführt. Dies ist zu beachten, um einer augenscheinlichen Verzerrung der Resultate und einem Überwiegen eines Proteins und seiner Isoformen, die im Grunde auf lediglich ein gemessenes Peptidfragment zurückzuführen sind, zuvorzukommen.

3.2.4.4 Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse aus den drei verschiedenen Auswertemethoden

Nach dem Zusammenführen der Daten aus den drei Ergebnistabellen (in Tab. 10, „Gesamttabelle proteomisch auffälliger Proteine“) stand die Erkennung gleicher, also auf mehr als einer Ergebnisliste aufgeführter Proteine und ihre Wichtung im Vordergrund, um aus den vorgeschlagenen Ergebnissen solide und plausible Biomarkerkandidaten herausfiltern zu können – eine Betrachtung der Funktion und Charakterisierung der Proteine erfolgte ja bei der Auswertung mit *MetaboAnalyst* und der MudPIT-Analyse mit *Proteome Discoverer*TM bislang noch nicht. Mithilfe eines vierdimensionalen Bewertungsschemas wurde weiter evaluiert, wobei jedoch – aufgrund der unterschiedlichen Ausgabeformate und den damit verbundenen Zusatzinformationen durch die drei Programme *SIEVE*TM, *MetaboAnalyst* und *Proteome Discoverer*TM – nicht für jedes Protein eine vollständige Erhebung der von uns vorgegebenen Kategorien möglich war. Die Kriterien gestalteten sich wie folgt:

Regulation	Wie verhält sich die Ratio des Proteins in den einzelnen Paaren über die drei Auswertemethoden hinweg?	Je 1 Punkt für gleichsinnige Regulation, -1 Punkt für eine gegensinnige Regulation
Literatur	Wurde über dieses Protein bereits im Zusammenhang mit Psoriasis berichtet?	1 Punkt für gefundene Evidenzen, ansonsten 0
Datensicherheit	Wie verlässlich ist die Identität des Proteins, basierend auf dem Protein-Score, der in der Software <i>Proteome Discoverer</i> TM ausgegeben wird?	Score 0-99: 0 Punkte Score 100-199: 1 Punkt Score >200: 2 Punkte

Aus den hieraus verteilten Punkten wurde eine erste Zwischensumme gebildet; erst danach erfolgte die separate Beurteilung mit dem vierten Kriterium, welches in der Frage bestand, ob das betreffende Protein als Akute-Phase-Protein bekannt ist und somit dessen Krankheitsspezifität mit Vorsicht interpretiert werden sollte. Gab es Daten über die Rolle eines Proteins als typisches (positives oder negatives) Akute-Phase-Protein, so wurden der Zwischensumme fünf Punkte abgezogen (-5), ansonsten blieb das Ergebnis der Endsumme dasselbe wie das der Zwischensumme. Einige Akute-Phase-Proteine, die in den proteomischen Daten auffielen, wurden dennoch ausgewählt, sofern die Abweichungsrichtung nicht der der typischen Akute-Phase-Reaktion entsprach oder über die betreffenden Proteine bereits im Zusammenhang mit der Psoriasis berichtet wurde. Dies betraf die unspezifisch erscheinenden Proteine Haptoglobin, Komplement C3 und C5, Antithrombin III, Ceruloplasmin und Faktor XII. Darauf basierend wurden potenzielle Biomarkerkandidaten in einer eigenen Liste (Tab. 11, „Selektierte Biomarkerkandidaten“) gesammelt; der Summenscore diente als Orientierung über die Relevanz der Proteine. Außerdem wurden Proteine besonders berücksichtigt, zu dem andere Ar-

beitsgruppen bereits im Zusammenhang mit der Schuppenflechte berichtet haben: diese, namentlich Cytokeratin 17, S100A7, Profilin 1, Kallikrein 8 und COMP, wurden weniger streng bewertet und somit ebenfalls auf die Liste übernommen.

3.2.5 ELISA-Immuntestdurchführung

Zur Verifizierung der identifizierten Biomarkerkandidaten kamen kommerziell erhältliche *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)-Kits, jeweils für Desmoplakin, Haptoglobin, S100A7, COMP, Vitamin D-bindendes Protein, N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase (NAAA), C3, Zink- α -Glykoprotein (Zn- α -GP), Kallikrein 8, Profilin 1, Plakoglobin, PIGR, Protein FAM83H, Plasma-Kallikrein und Cytokeratin 17, zur Anwendung. Probenvorbereitung und Durchführung der Immuntests erfolgten gemäß der Herstellerangaben; eine Verdünnung der Proben, falls erforderlich, wurde mit 10 mM Phosphat-Puffer (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,2) oder dem jeweiligen Kit beigelegten Diluens vorgenommen. Die Absorbanzmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm am Gerät SpectraMax Plus³⁸⁴; mittels Kalibrierung über eine Standardreihe wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration des Analyten berechnet. Zunächst erfolgte die orientierende Untersuchung von lediglich acht Plasmaproben je Subgruppe; bei Hinweisen auf auffällige Konzentrationen der Proteine zwischen den Gruppen wurde, wenn möglich, die Analyse stufenweise auf eine Anzahl von bis zu je 25 Probandenplasmen erweitert.

3.2.6 Statistische Auswertung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen

Die statistische Auswertung der Daten wurde im Programm SPSS® (Version 22) vorgenommen. Hierfür wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen als Datengrundlage herangezogen. Es wurde zu Beginn ein Vortest auf Normalverteilung in Form eines Kolmogorow-Smirnow-Tests sowie ein Test auf Varianzgleichheit in Form eines Levene-Tests durchgeführt. Bei Nicht-Normalverteilung der Variablen erfolgte eine Transformation der Daten durch Logarithmierung (ln), um auf diesem Wege eine Normalverteilung zu erreichen und die Anwendung statistisch verlässlicherer Tests zu gestatten. Dies gelang bei den Variablen Zn- α -GP, Profilin 1, Plasma-Kallikrein und Cytokeratin 17; die restlichen, nicht-normalverteilten Variablen wurden untransformiert ausgewertet.

Zunächst wurden die drei Gruppen („Kontrolle“, „Ps“, „PsA“) in einer Varianzanalyse für mehr als zwei ungepaarte Stichprobengruppen verglichen („Kontrolle“ vs. „Ps“ vs. „PsA“); je nach Ergebnis des Normalverteilungs- und Varianzgleichheitstests erfolgte dies in Form einer univariaten Varianzanalyse (parametrisch) und anschließenden post-hoc-Tests (Tukey-

HSD-Test) bzw. eines Kruskal-Wallis-Tests („*Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks*“, nicht-parametrisch). Anschließend wurden mithilfe von Korrelationsanalysen (nach Pearson und Spearman) potenzielle Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen der jeweiligen Proteine und im Vorfeld erhobenen Patientendaten untersucht. Als interessante unabhängige Variablen wurden ausgewählt: Geschlecht, Alter, BMI sowie PASI als Indikator der Erkrankungsschwere. In einem dritten Schritt erfolgten nun Korrelationsanalysen (nach Pearson und Spearman) der jeweiligen Biomarkerkandidaten untereinander.

Ein mögliches Muster von gleichzeitigen Plasmaaberrationen mehrerer Biomarkerkandidaten könnte die Spezifität eines Tests erhöhen. Um mögliche distinkte Plasmaprofile aus mehreren Biomarkerkandidaten grob zu identifizieren, wurde eine mathematische Kombinatorik der Daten angeschlossen: nach einer manuellen Auswahl möglicher pathogenetisch in Zusammenhang stehender Proteine unserer Kandidatenliste und den Resultaten der Korrelationsanalysen erfolgte hierzu bei gleichsinniger Tendenz der Konzentration eine Multiplikation, bei gegensinniger eine Division der ELISA-Messdaten. Die so generierte virtuelle Variable wurde statistisch mithilfe eines Kruskal-Wallis-Tests und post-hoc in Form eines Bonferroni-korrigierten Dunn-Tests ausgewertet. Die kombinierten Variablen sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Kombinationen der Biomarkerkandidaten

	Desmoplakin	Haptoglobin	S100A7	COMP	Vit.D-bind.Protein	NAAA	C3	Zn-α-GP	Kallikrein 8	Profilin1	Plakoglob	PIGR	FAM83H	Plasma Kallikrein	Cytokeratin 17
Desmoplakin		P	Q		Q						P		P		
Haptoglobin	P		P	P	P	P	P								P
S100A7	Q	P		P	P	P	P		P						P
COMP		P	P		P	P	P						Q		P
Vit.D-bind. Protein	Q	P	P	P		P	P								P
NAAA		P	P	P	P		P			P		Q	Q		
C3		P	P	P	P	P				P				Q	P
Zn-α-GP												P	P	P	
Kallikrein 8			P												P
Profilin 1						P	P								
Plakoglobin	P												P		
PIGR						Q		P					P	P	
FAM83H	P			Q		Q		P			P	P			
Plasma-Kallikrein							Q	P				P			Q
Cytokeratin 17		P	P		P		P		P					Q	P

P: Produkt, Q: Quotient

Dazu kommen die Produkte Plakoglobin*Desmoplakin*FAM83H sowie NAAA*C3*Cytokeratin 17.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse *SIEVE*TM-Auswertung

Die Ergebnistabelle (Tab. 7) der MS-Daten mit der Software *SIEVE*TM beinhaltet die selektierten Proteine und ist gruppiert nach den aus der Literatur bekannten charakterisierenden Funktionen der Proteine (wie etwa „Akute-Phase-Proteine“). Die Spalte „Ratios“ listet das Verhalten des Proteins in den jeweiligen Patient-Kontrolle-Probenpaaren: je ein Pfeil repräsentiert den Quotienten (Konzentration des Proteins im Patientenplasma) / (Konzentration des Proteins im Kontrollplasma) eines Probenpaars. Hierbei entspricht ein positiver Pfeil (↑) einer auffälligen oder gar ausschließlichen Konzentrationsaberration des Proteins von ≥ 4 (entsprechend einem Anstieg im Patientensample gegenüber der Kontrolle), ein negativer Pfeil (↓) einem auffälligen oder ausschließlichen Konzentrationsquotienten von $< 0,25$ (entsprechend einem Abfall im Patientensample gegenüber der Kontrolle). Interessant präsentieren sich hier besonders Proteine mit gleichsinnigen Ratios über mehrere Paare, wie beispielsweise Gelsolin (↓↓↓), sowie Proteine, die sich in mehr als der Hälfte der Probenpaare identifizieren ließen (z. B. Hemorphin [↓↓↓↓]).

Tab. 7: Ergebnistabelle *SIEVE*TM. Ein Pfeil entspricht dabei jeweils einem Patient-Kontrolle-Paar

Protein-ID	Protein	Regulation <i>SIEVE</i> TM
Akute-Phase-Proteine		
J3QR68,	Haptoglobin	↑↑↑
G3V5I3	alpha-1-Antichymotrypsin	↓↓
P01009, P01009-2 P01009-3	alpha-1-Antitrypsin	↓
P0DJI9-2	Serum-Amyloid A	↑↑↓
P02763	alpha-1- saures Glykoprotein	↑↓↓
P00450	Ceruloplasmin	↓↓
F5H4W9	Paraoxonase/Arylesterase 1	↓↓
Q5T0H9	Gelsolin	↓↓↓
P04196	Histidine-rich glycoprotein	↑↑↓
P04003	C4b-binding protein	↑
EZM / Knorpel		
P02751-9	Isoform 9 of Fibronectin FN1	↓↑
G3XAP6	Cartilage oligomeric matrix protein COMP	↓
Q16610-4	Isoform 4 of Extracellular matrix protein 1 GN=ECM1	↓
Q92954-6	Isoform F of Proteoglycan 4 (PRG4)	↑
I3L3D5	Profilin	↑

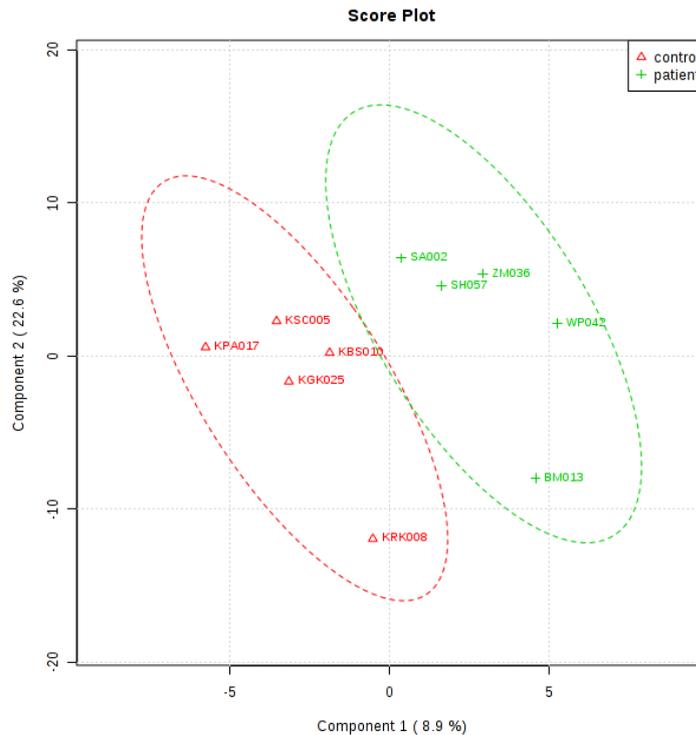
Protein-ID	Protein	Regulation SIEVE™
P38567-2	Isoform 2 of Hyaluronidase PH_20	↓↓↓↑
Proteaseinhibitoren		
F8W7L3 P01023	alpha-2-Makroglobulin	↑↓
E9PGN7	Plasma-Protease C1 Inhibitor	↓↓
Q5T985	Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor (heavy chain H2)	↓↓
Barrierefunktion der Haut		
H0YJV2	Serine palmitoyltransferase 2	↑
P17405-4	Isoform 4 of Sphingomyelin phosphodiesterase	↓
Immunsystem		
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	↑↑↑
D6RD17	Immunoglobulin J chain (IGJ)	↑↓
Q6UXL0	Interleukin-20-Rezeptor	↓↓
M0R2W8	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (PGLYRP2)	↓
O43866	CD5 antigen-like CD5L	↑↑↓
P0C7P3-2	Isoform 2 of Schlafen family member 14	↑
Metabolisches Syndrom, Insulinresistenz, Adipositas		
H7BZJ8	Zink-alpha-2-Glykoprotein	↓↓↓
I3L4Z0	Pigment epithelium-derived factor	↑
P10909-5 H0YAS8	Clusterin	↓↓
andere Funktionen		
P69905 P68871 P02042	Hemoglobin (subunits alpha, beta, delta)	↓↓↓↓
P02774-3	Vitamin-D-bindendes Protein	↓↓↑
Q5JX83	HSP70	↑
J3KPZ2	cGMP-gated cation channel alpha 1	↓
B7Z359	Synaptophysin	↓↓
O75157-2	Isoform 2 of TSC22 domain family protein 2 TSC22D2	↓↓↑↑
Q01484	Ankyrin 2	↓
Q9NZ71-9	Isoform 9 of Regulator of telomere elongation helicase 1 (RTEL1)	↓↓↑↑
Q96PN6-2	Isoform 2 of Adenylate cyclase type 10 (ADCY10)	↑
Q7Z4N8-2	Isoform 2 of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 3 P4HA3	↓
F8W6P5	Hemorphin	↓↓↓↓
H0YAC1	Plasma-Kallikrein	↑

4.2 Ergebnisse *MetaboAnalyst*-Auswertung

Nach Spezifikation der Auswertekriterien resultierten insgesamt 226 Proteine, die vom Programm *MetaboAnalyst* zur Analyse herangezogen wurden. Abb. 7 zeigt die Ergebnisse der PLS-DA in einer „Score Plot“-Darstellung: aufgetragen sind die zehn Probensamples anhand des Verhaltens der Proteine der *Component 1* und der *Component 2* (d. h. ähnliche Konzentrationen der Proteine in zwei Proben führen zu einer räumlichen Nähe dieser Proben in der Grafik). Durch die Farbcodierung (grün: PsA, rot: Kontrolle) wird eine Trennung der beiden Gruppen mit nur minimalem Überschneiden ersichtlich; die umgebenden Ellipsen stellen hier

grafisch das 95%-Konfidenzintervall dar. Die Proteine in der *Component 1*, auf denen diese Separation beruht, tragen zu 8,9 % zur gesamten Unterscheidung der Gruppen „PsA“ und „Kontrolle“ bei.

Abb. 7: PLS-DA 2D Score Plot



Trennung der Kontrollsamples (rot) und der Patientensamples (grün) durch die in Component 1 und 2 subsumierten Proteine; die Ellipsen repräsentieren grafisch das 95%-Konfidenzintervall

Sie sind, identifiziert durch ihre Protein-ID, als hierarchische Listung in der *VIP-score*-Tabelle aufgelistet, die Konzentrationen in den beiden Gruppen sind als gradueller Farbumschlag ebenfalls angegeben. Tab. 8 zeigt ebendiese 30 Proteine aus der *VIP-score*-Liste mit den zugehörigen Namen und einer Darstellung der Konzentrationsabweichung im Plasma der Patienten gegenüber den Kontrollen (Spalte „Regulation *MetaboAnalyst*“). Ein positiver Pfeil (↑) ergibt sich also aus einer hohen Konzentration, ein negativer Pfeil (↓) aus einer niedrigen Konzentration in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

Tab. 8: Ergebnistabelle *MetaboAnalyst*, basierend auf *VIP-score*-Liste. Regulation (↑ oder ↓) stellt die Plasmaabweichung der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe dar

Protein-ID	Protein	Regulation <i>MetaboAnalyst</i>
Q58A45	PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit 3	↓
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	↑
F5GWP8	Junction plakoglobin	↑
P02774	Vitamin D-binding protein	↓
Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17	↑
Q9NZ71	Regulator of telomere elongation helicase 1	↓

Protein-ID	Protein	Regulation <i>MetaboAnalyst</i>
Q9P2M7	Cingulin	↓
Q5VYK3	Proteasome-associated protein ECM29 homolog	↑
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16	↑
P68871	Hemoglobin subunit beta	↓
P69905	Hemoglobin subunit alpha	↓
P02042	Hemoglobin subunit delta	↓
Q15149	Plectin	↓
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	↑
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	↑
Q9UHL3	Protein FAM153A	↓
Q14106	Protein Tob2	↓
Q969T7-2	7-methylguanosine phosphate-specific 5'-nucleotidase, Isoform 2	↑
P17014	Zinc finger protein 12	↓
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	↑
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	↑
P04196	Histidine-rich glycoprotein	↑
P05160	Coagulation factor XIII B chain	↑
P00739	Haptoglobin-related protein	↑
P00738	Haptoglobin	↑
P01610	Ig kappa chain V-I region WEA	↑
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	↑
P01594	Ig kappa chain V-I region AU	↑
B6ZDN3	Doublecortin domain-containing protein 1	↓
P02654	Apolipoprotein C-I	↓

4.3 Ergebnisse *Proteome Discoverer*TM-Auswertung

Da bei der Auswertung mit dem Programm *Proteome Discoverer*TM keine absoluten Grenzen für den Quotienten (Konzentration Patient) / (Konzentration Kontrolle) festgelegt und damit keine Proteine *a priori* ausgeschlossen wurden, findet sich in der Ergebnistabelle (Tab. 9) eine größere Anzahl an Proteinen, die in allen (fünf) oder den meisten (vier) untersuchten Probenpaaren zu detektieren waren und hier zudem durchweg gleichsinnige Ratios präsentierten. Als besonders hervorstechend sind hier die Proteine im Tabellenabschnitt „5-fach positiv reguliert“ sowie „5-fach negativ reguliert“ zu sehen, die sich über die Paare hinweg konstant verhielten. Eine Ordnung nach der Höhe der absoluten Konzentrationsabweichung ist jedoch nicht möglich.

Tab. 9: Ergebnistabelle *Proteome Discoverer*TM-Auswertung

Protein-ID	Protein
5-fach positiv reguliert:	
P02675	Fibrinogen beta chain
C9JPQ9	Fibrinogen gamma chain (Fragment)
C9JU00	Fibrinogen gamma chain (Fragment)
P01594	Ig kappa chain V-I region AU
P01599	Ig kappa chain V-I region Gal

Protein-ID	Protein
P01605	Ig kappa chain V-I region Lay
4-fach positiv reguliert:	
B7ZKJ8	35 kDa inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2
P01023	Alpha-2-macroglobulin
P02749	Beta-2-glycoprotein 1
J3QRN2	Beta-2-glycoprotein 1 (Fragment)
P13671	Complement component C6
P98073	Enteropeptidase
P02671	Fibrinogen alpha chain
P02679	Fibrinogen gamma chain
P01861	Ig gamma-4 chain C region
P23083	Ig heavy chain V-I region V35
P01774	Ig heavy chain V-III region POM
P01777	Ig heavy chain V-III region TEI
P01779	Ig heavy chain V-III region TUR
P01593	Ig kappa chain V-I region AG
P01600	Ig kappa chain V-I region Hau
P01607	Ig kappa chain V-I region Rei
P01609	Ig kappa chain V-I region Scw
P80362	Ig kappa chain V-I region WAT
P01610	Ig kappa chain V-I region WEA
P01614	Ig kappa chain V-II region Cum
P06309	Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment)
P06310	Ig kappa chain V-II region RPMI 6410
P01619	Ig kappa chain V-III region B6
P01621	Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment)
P01624	Ig kappa chain V-III region POM
P01620	Ig kappa chain V-III region SIE
P01622	Ig kappa chain V-III region Ti
P04434	Ig kappa chain V-III region VH (Fragment)
P01623	Ig kappa chain V-III region WOL
P06312	Ig kappa chain V-IV region (Fragment)
P06313	Ig kappa chain V-IV region JI
P01625	Ig kappa chain V-IV region Len
P01699	Ig lambda chain V-I region VOR
P04208	Ig lambda chain V-I region WAH
P80748	Ig lambda chain V-III region LOI
P01717	Ig lambda chain V-IV region Hil
Q16610-2	Isoform 2 of Extracellular matrix protein 1
P02671-2	Isoform 2 of Fibrinogen alpha chain
Q14624-2	Isoform 2 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
P13646-2	Isoform 2 of Keratin, type I cytoskeletal 13
Q96PD5-2	Isoform 2 of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
Q14624-3	Isoform 3 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4
P13646-3	Isoform 3 of Keratin, type I cytoskeletal 13
P02679-2	Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain
F5GWP8	Junction plakoglobin
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13
Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17
Q96PD5	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
Q5VY30	Plasma retinol-binding protein(1-182)

Protein-ID	Protein
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
J3KN16	Proteasome-associated protein ECM29 homolog
Q5VYK3	Proteasome-associated protein ECM29 homolog
P02753	Retinol-binding protein 4
H7C1X1	Uncharacterized protein (Fragment)
5-fach negativ reguliert:	
P43652	Afamin
P02654	Apolipoprotein C-I
P02774-3	Isoform 3 of Vitamin D-binding protein
P02768	Serum albumin
K7ERI9	Truncated apolipoprotein C-I (Fragment)
D6RF35	Vitamin D-binding protein
P02774	Vitamin D-binding protein
4-fach negativ reguliert:	
Q7Z5M8	Abhydrolase domain-containing protein 12B
P01019	Angiotensinogen
B0YIW2	Apolipoprotein C-III
G8JL88	Apolipoprotein L1
O14791	Apolipoprotein L1
O95445	Apolipoprotein M
H0Y4A8	Cingulin
Q9P2M7	Cingulin
P00748	Coagulation factor XII
D6R934	Complement C1q subcomponent subunit B
P02746	Complement C1q subcomponent subunit B
D6RA08	Complement C1q subcomponent subunit B (Fragment)
P02747	Complement C1q subcomponent subunit C
M0R0Q9	Complement C3 (Fragment)
P01031	Complement C5
P08185	Corticosteroid-binding globulin
P69905	Hemoglobin subunit alpha
P68871	Hemoglobin subunit beta
E7EWH8	Hydroxypyruvate isomerase
Q7Z5M8-2	Isoform 2 of Abhydrolase domain-containing protein 12B
O14791-2	Isoform 2 of Apolipoprotein L1
O95445-2	Isoform 2 of Apolipoprotein M
Q9P2M7-2	Isoform 2 of Cingulin
Q5T013-2	Isoform 2 of Putative hydroxypyruvate isomerase
O14791-3	Isoform 3 of Apolipoprotein L1
Q5T013-3	Isoform 3 of Putative hydroxypyruvate isomerase
Q5T013-4	Isoform 4 of Putative hydroxypyruvate isomerase
P00747	Plasminogen
D6RA70	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2
D6RF50	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2
Q9H6S0	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2
A8MWQ6	Protein FAM153A
D6RF32	Protein FAM153A
Q9UHL3	Protein FAM153A
D6REX6	Protein FAM153A (Fragment)
D6RF84	Protein FAM153B
H0YMR7	Protein FAM153B
P0C7A2	Protein FAM153B

Protein-ID	Protein
D6RF56	Protein FAM153C
Q494X1	Protein FAM153C
Q5T013	Putative hydroxypyruvate isomerase
F6UJY9	Putative hydroxypyruvate isomerase (Fragment)
H0YB18	Putative hydroxypyruvate isomerase (Fragment)
H0YB70	Putative hydroxypyruvate isomerase (Fragment)
J9JIE9	Putative hydroxypyruvate isomerase (Fragment)
B4DPI2	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial
Q5SYV2	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial
Q9UL12	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial
P02787	Serotransferrin
H7C013	Serum albumin (Fragment)
C9J0E8	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2 (Fragment)
F8W8V8	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2
P11168	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2
Q92922	SWI/SNF complex subunit SMARCC1
E9PHX8	Tyrosine-protein kinase Mer
Q12866	Tyrosine-protein kinase Mer
H7C3L9	Tyrosine-protein kinase Mer (Fragment)

4.4 Gesamttabelle aller auffälliger Proteine der Proteomdaten

Die Zusammenführung der drei einzelnen Ergebnistabellen ergibt nachfolgende Tab. 10, „Gesamttabelle proteomisch auffälliger Proteine“, und umfasst alle Proteine, die aus der Auswertung der MS-Daten anhand ihres Verhaltens in den Probenpaaren als auffällig bewertet wurden. Die Proteine sind, soweit möglich, nach Funktion subsumiert. Dazu dargestellt sind die Plasmakonzentrationsabweichungen in den drei Analyseprogrammen, falls das jeweilige Protein dort in der Ergebnistabelle identifiziert wurde. Für die Codierung in den drei Spalten „*SIEVE*TM“, „*MetaboAnalyst*“ und „*Proteome Discoverer*TM“ gelten dieselben Spezifikationen wie in den separaten Tabellen:

„*SIEVE*TM“: jeweiliges Protein weist in einem Patient-Kontrolle-Paar eine Konzentrationserniedrigung um den Faktor 0,25 (↓) oder -erhöhung um den Faktor 4 (↑) auf.

„*MetaboAnalyst*“: die 30 Proteine, die zum größten Teil für die Diskriminierung der Patienten- von der Kontrollgruppe verantwortlich sind, werden mit ihrer jeweiligen Plasmakonzentrationsabweichung (↑ oder ↓) dargestellt.

„*Proteome Discoverer*TM“: jeder Pfeil steht für eine Plasmakonzentrationsalteration der Ratios der Maximal-AUC-Werte der Proteine in je einem Patient-Kontrolle-Paar, der absolute Wert der Ratio ist hierbei irrelevant.

Die Spalte „Gesamtregulation“ summiert die Ergebnisse der drei vorhergehenden Spalten; hierbei werden die Pfeile gegeneinander aufgewogen und die dominierende Abweichung als Gesamtregulation angenommen. Hierbei ist zu beachten, dass bei der Auswertung mit *SIE*

*VE*TM sechs, bei den Auswertungen mit *MetaboAnalyst* und *Proteome Discoverer*TM fünf Probenpaare analysiert wurden, sodass diese Gesamtregulation der MS-Daten vielmehr orientierend zu betrachten ist. In der Spalte „Weitere Evaluation“ sind Angaben über eine eventuelle Selektion und nachfolgende Quantifizierung mittels Immuntest aufgeführt. Die ausgewählten Proteine finden sich in der nachfolgenden Tab. 11 gesammelt wieder.

Tab. 10: Ergebnistabelle „Gesamttabelle proteomisch auffälliger Proteine“; soweit möglich gruppiert nach Proteinfunktion und mit Aufschlüsselung der Ergebnisse der einzelnen Auswertemethoden und einer Gesamt-Regulation. Bedeutung der Pfeile: s. Text. Die Spalte „Weitere Evaluation“ umfasst die Selektion (S) und mögliche anschließende Evaluation mit Immuntests (I)

Protein-ID	Protein	<i>SIEVE</i> TM	<i>Metabo-Analyst</i>	<i>Proteome Discoverer</i> TM	Gesamt-Regulation	Weitere Evaluation
Protease-Inhibitoren						
Q5T985	Inter_alpha_trypsin inhibitor heavy chain H2	↓↓	-	↓↑	↓	S
B7ZKJ8	35 kDa inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	-	-	↑↑↑↑	↑	S
Q14624-2	Isoform 2 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	-	-	↑↑↑↑	↑	S
Q14624-3	Isoform 3 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	-	-	↑↑↑↑	↑	S
G3V5I3	Alpha_1_antichymotrypsin	↓↓↓	-	↓↑	↓	S
Oxidativer Stress						
F5H4W9	Serum paraoxonase/arylesterase 1	↓↓	-	↑↓↓	↓	S
P00450	Ceruloplasmin	↓↓	-	↑↓	↓	S
P02787	Serotransferrin	-	-	↓↓↓↓	↓	
P68871	Hemoglobin subunit beta	↓↓↓↑	↓	↓↓↓↓	↓	
P69905	Hemoglobin subunit alpha	↓↓↓↓	↓	↓↓↓↓	↓	
P02042	Hemoglobin subunit delta	↓↓↓	↓	-	↓	
J3QR68	Haptoglobin (Fragment)	↑↑↑	-	-	↑	
P00738	Haptoglobin	-	↑	-	↑	S, I
P00739	Haptoglobin-related protein	-	↑	-	↑	
Binde-/Transportproteine						
P08185	Corticosteroid-binding globulin (CBG)	-	-	↓↓↓↓	↓	
P43652	Afamin	↓↓	-	↓↓↓↓↓	↓	
Q5VY30	Plasma retinol-binding protein(1-182)	-	-	↑↑↑↑	↑	S
P02753	Retinol-binding protein 4	-	-	↑↑↑↑	↑	S
D6RF35	Vitamin D-binding protein	↑↓	-	↓↓↓↓↓	↓	S, I
P02774	Vitamin D-binding protein	-	↓	↓↓↓↓↓	↓	S, I
P02774-3	Isoform 3 of Vitamin D-binding protein	↓↓↑	-	↓↓↓↓↓	↓	S, I
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	↓↓↑	↑	-	↓/↑	
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	↓	↑	↑↑↑↑	↑	

Protein-ID	Protein	SIEVE™	Metabo-Analyst	Proteome Discoverer™	Gesamt-Regulation	Weitere Evaluation
Zell-Zell-/Zell-Matrix-Kontakte, Zytoskelett, ECM-Bestandteile						
Q04695	Keratin, type I cytoskeletal 17	-	↑	↑↑↑↑	↑	S, I
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	-	-	↑↑↑↑	↑	
P13646-2	Isoform 2 of Keratin, type I cytoskeletal 13	-	-	↑↑↑↑	↑	
P13646-3	Isoform 3 of Keratin, type I cytoskeletal 13	-	-	↑↑↑↑	↑	
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16	-	↑	-	↑	
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	-	↑	-	↑	
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	-	↑	-	↑	
F5GWP8	Junction plakoglobin	-	↑	↑↑↑↑	↑	S, I
P15924	Desmoplakin	-	-	↑↑↑	↑	S, I
Q15149	Plectin	-	↓	-	↓	
H0Y4A8	Cingulin	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q9P2M7	Cingulin	-	↓	↓↓↓↓	↓	
Q9P2M7-2	Isoform 2 of Cingulin	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q16610-2	Isoform 2 of Extracellular matrix protein 1	-	-	↑↑↑↑	↑	
G3XAP6	COMP (Cartilage oligomeric matrix protein)	↓	-	↓	↓	S, I
B4DKJ3	COMP (Cartilage oligomeric matrix protein)	-	-	↓	↓	S, I
P49747	COMP (Cartilage oligomeric matrix protein)	-	-	↓	↓	S, I
Immunabwehr/AMP						
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	↑↑↑	↑	↑↑↑↑	↑	S, I
Q6UXL0	Interleukin_20 receptor subunit beta	↓↓	-	-	↓	
O43866	CD5 antigen_like	↓↓↑↑	-	↓↓↑↑	↓/↑	
P31151	Protein S100-A7 (Psoriasin)	-	-	↓↑	↓/↑	S, I
Komplement						
D6R934	Complement C1q subcomponent subunit B	-	-	↓↓↓↓	↓	
D6RA08	Complement C1q subcomponent subunit B (Fragment)	-	-	↓↓↓↓	↓	
P02746	Complement C1q subcomponent subunit B	-	-	↓↓↓↓	↓	
P02747	Complement C1q subcomponent subunit C	-	-	↓↓↓↓	↓	
P01024	Complement C3	↓↓↓↓	-	↑↓↓↓	↓	S, I
M0R0Q9	Complement C3 (Fragment)	↓	-	↓↓↓↓	↓	

Protein-ID	Protein	SIEVE™	Metabo-Analyst	Proteome Discoverer™	Gesamt-Regulation	Weitere Evaluation
M0QXZ3	Complement C3 (Fragment)	↑↓↓	-	-	↓	
M0QYC8	Complement C3 (Fragment)	↓↓	-	-	↓	
P01031	Complement C5	↓↓	-	↓↓↓↓	↓	S
P13671	Complement component C6	-	-	↑↑↑↑	↑	
E9PGN7	Plasma protease C1 inhibitor	↓↓	-	↓↓↑	↓	
Blutgerinnung						
P00748	Coagulation factor XII	-	-	↓↓↓↓	↓	S
P05160	Coagulation factor XIII B chain	-	↑	-	↑	
P00747	Plasminogen	-	-	↓↓↓↓	↓	
P02671	Fibrinogen alpha chain	-	-	↑↑↑↑	↑	
P02671-2	Isoform 2 of Fibrinogen alpha chain	-	-	↑↑↑↑	↑	
P02671-2	Isoform 2 of Fibrinogen alpha chain	↓↓↓	-	↑↓↓	↓	
P02675	Fibrinogen beta chain	↑↓↓	-	↑↑↑↑↑	↑	
P02675	Fibrinogen beta chain	↓↓↑	-	↑↓	↓	
D6REL8	Fibrinogen beta chain	↓↓↓	-	-	↓	
P02679	Fibrinogen gamma chain	-	-	↑↑↑↑	↑	
P02679-2	Isoform Gamma-A of Fibrinogen gamma chain	-	-	↑↑↑↑	↑	
P02679-2	Isoform Gamma_A of Fibrinogen gamma chain	↓↓↓	-	↑↓	↓	
C9JPQ9	Fibrinogen gamma chain (Fragment)	-	-	↑↑↑↑↑	↑	
C9JU00	Fibrinogen gamma chain (Fragment)	↑↑	-	↑↑↑↑↑	↑	
C9JU00	Fibrinogen gamma chain (Fragment)	↑↑	-	↓↑	↑	
P00734	Prothrombin	↓	-	↓↓	↓	S
P01008	Antithrombin-III	↓↓	-	↑↓↓	↓	S
Entzündungsmarker						
P35542	Serum amyloid A-4 protein	↑↑↑↓	-	↑↑↓↓↓	↑	
Q5VVP7	C_reactive protein(1_205)	↓	-	-	↓	
P02768	Serum albumin	↓	-	↓↓↓↓↓	↓	
H7C013	Serum albumin (Fragment)	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q5T0H9	Gelsolin	↓↓↓↓	-	-	↓	
Q5T0H8	Gelsolin	↓↓↑	-	-	↓	

Protein-ID	Protein	SIEVE™	Metabo-Analyst	Proteome Discoverer™	Gesamt-Regulation	Weitere Evaluation
Apolipoproteine						
F8W696	Truncated apolipoprotein A_I	↓↓↓	-	-	↓	
P02647	Apolipoprotein A_I	↓↓↓	-	-	↓	
A8MUN2	Apolipoprotein B_48	↓↓	-	-	↓	
P02654	Apolipoprotein C-I	-	↓	↓↓↓↓↓	↓	
K7ERI9	Truncated apolipoprotein C-I (Fragment)	↓↓↓↑↑	-	↓↓↓↓↓	↓	
B0YIW2	Apolipoprotein C_III	↓	-	↓↓↓↓	↓	
G8JL88	Apolipoprotein L1	-	-	↓↓↓↓	↓	
O14791	Apolipoprotein L1	-	-	↓↓↓↓	↓	
O14791-2	Isoform 2 of Apolipoprotein L1	-	-	↓↓↓↓	↓	
O14791-3	Isoform 3 of Apolipoprotein L1	↑↓	-	↓↓↓↓	↓	
O95445	Apolipoprotein M	-	-	↓↓↓↓	↓	
O95445-2	Isoform 2 of Apolipoprotein M	↓	-	↓↓↓↓	↓	
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	-	↑	↑↑↑↑	↑	
J3QRN2	Beta-2-glycoprotein 1 (Fragment)	↑↓	-	↑↑↑↑	↑	
Immunglobuline						
P01593	Ig kappa chain V-I region AG	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01594	Ig kappa chain V-I region AU	↓	↑	↑↑↑↑↑	↑	
P01599	Ig kappa chain V-I region Gal	-	-	↑↑↑↑↑	↑	
P01600	Ig kappa chain V-I region Hau	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01605	Ig kappa chain V-I region Lay	-	-	↑↑↑↑↑	↑	
P01607	Ig kappa chain V-I region Rei	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01609	Ig kappa chain V-I region Scw	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01610	Ig kappa chain V-I region WEA	-	↑	↑↑↑↑	↑	
P80362	Ig kappa chain V-I region WAT	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01614	Ig kappa chain V-II region Cum	-	-	↑↑↑↑	↑	
P06309	Ig kappa chain V-II region GM607 (Fragment)	-	-	↑↑↑↑	↑	
P06310	Ig kappa chain V-II region RPMI 6410	-	-	↑↑↑↑	↑	
P04434	Ig kappa chain V-III region VH (Fragment)	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01619	Ig kappa chain V-III region B6	-	-	↑↑↑↑	↑	

Protein-ID	Protein	SIEVE™	Metabo-Analyst	Proteome Discoverer™	Gesamt-Regulation	Weitere Evaluation
P01620	Ig kappa chain V-III region SIE	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01621	Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment)	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01622	Ig kappa chain V-III region Ti	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01623	Ig kappa chain V-III region WOL	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01624	Ig kappa chain V-III region POM	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01625	Ig kappa chain V-IV region Len	-	-	↑↑↑↑	↑	
P06312	Ig kappa chain V-IV region (Fragment)	-	-	↑↑↑↑	↑	
P06313	Ig kappa chain V-IV region JI	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01699	Ig lambda chain V-I region VOR	-	-	↑↑↑↑	↑	
P04208	Ig lambda chain V-I region WAH	-	-	↑↑↑↑	↑	
P80748	Ig lambda chain V-III region LOI	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01717	Ig lambda chain V-IV region Hil	-	-	↑↑↑↑	↑	
P23083	Ig heavy chain V-I region V35	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01774	Ig heavy chain V-III region POM	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01777	Ig heavy chain V-III region TEI	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01779	Ig heavy chain V-III region TUR	-	-	↑↑↑↑	↑	
P01861	Ig gamma-4 chain C region	-	-	↑↑↑↑	↑	
Protein FAM (family with sequence similarity), FAM83, FAM153						
Q9UHL3	Protein FAM153A	-	↓	↓↓↓↓	↓	
A8MWQ6	Protein FAM153A	-	-	↓↓↓↓	↓	
D6RF32	Protein FAM153A	-	-	↓↓↓↓	↓	
D6REX6	Protein FAM153A (Fragment)	-	-	↓↓↓↓	↓	
D6RF84	Protein FAM153B	-	-	↓↓↓↓	↓	
P0C7A2	Protein FAM153B	-	-	↓↓↓↓	↓	
H0YMR7	Protein FAM153B	-	-	↓↓↓↓	↓	
D6RF56	Protein FAM153C	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q494X1	Protein FAM153C	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q6ZRV2	Protein FAM83H	-	-	↓↓↓	↓	S, I
J3KPS2	Protein FAM83H	-	-	↓↓↓	↓	S, I

Protein-ID	Protein	SIEVE™	Metabo-Analyst	Proteome Discoverer™	Gesamt-Regulation	Weitere Evaluation
Profilin						
K7EJ44	Profilin 1_ isoform CRA_b	↑	-	↓	↑/↓	
P07737	Profilin-1	-	-	↓	↓	S, I
I3L3D5	Profilin_1 (Fragment)	↑	-	-	↑	
Weitere, nicht gruppierte Proteine						
J3KN16	Proteasome-associated protein ECM29 homolog	-	-	↑↑↑↑	↑	
Q5VYK3	Proteasome-associated protein ECM29 homolog	-	↑	↑↑↑↑	↑	
H7BZJ8	Zinc_alpha_2_glycoprotein (Fragment)	↓↓↓	-	-	↓	S, I
P01023	Alpha_2_macrolobulin	↓↓	-	↑↑↑↓	↑	
H0YFH1	Alpha_2_macrolobulin (Fragment)	↑↑	-	-	↑	
P98073	Enteropeptidase	-	-	↑↑↑↑	↑	
Q96PD5	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	↑↓	-	↑↑↑↓	↑	S, I
Q96PD5-2	Isoform 2 of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	↓	-	↑↑↑↓	↑	S, I
H7C1X1	Uncharacterized protein (Fragment)	-	-	↑↑↑↑	↑	
B4DPI2	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q5SYV2	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q9UL12	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial	-	-	↓↓↓↓	↓	
F8W8V8	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2	-	-	↓↓↓↓	↓	
P11168	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2	-	-	↓↓↓↓	↓	
C9J0E8	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 2 (Fragment)	-	-	↓↓↓↓	↓	
D6RA70	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2	-	-	↓↓↓↓	↓	
D6RF50	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q9H6S0	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2	-	-	↓↓↓↓	↓	
E7EWH8	Hydroxypyruvate isomerase	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q5T013	Putative hydroxypyruvate isomerase	-	-	↓↓↓↓	↓	
F6UJY9	Putative hydroxypyruvate isomerase (Fragment)	-	-	↓↓↓↓	↓	
J9JIE9	Putative hydroxypyruvate isomerase (Fragment)	-	-	↓↓↓↓	↓	
H0YB18	Putative hydroxypyruvate isomerase (Fragment)	-	-	↓↓↓↓	↓	
H0YB70	Putative hydroxypyruvate isomerase (Fragment)	-	-	↓↓↓↓	↓	

Protein-ID	Protein	SIEVE™	Metabo-Analyst	Proteome Discoverer™	Gesamt-Regulation	Weitere Evaluation
Q5T013-2	Isoform 2 of Putative hydroxypyruvate isomerase	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q5T013-3	Isoform 3 of Putative hydroxypyruvate isomerase	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q5T013-4	Isoform 4 of Putative hydroxypyruvate isomerase	-	-	↓↓↓↓	↓	
E9PHX8	Tyrosine-protein kinase Mer	-	-	↓↓↓↓	↓	
H7C3L9	Tyrosine-protein kinase Mer (Fragment)	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q12866	Tyrosine-protein kinase Mer	-	-	↓↓↓↓	↓	
P01019	Angiotensinogen	↓↓↓	-	↓↓↓↓	↓	
Q7Z5M8	Abhydrolase domain-containing protein 12B	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q7Z5M8-2	Isoform 2 of Abhydrolase domain-containing protein 12B	-	-	↓↓↓↓	↓	
Q92922	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	-	-	↓↓↓↓	↓	
P04196	Histidine_rich glycoprotein	↑↑↓	↑	-	↑	
P38567-2	Isoform 2 of Hyaluronidase PH_20	↓↓↓↑	-	-	↓	
P49959-2	Isoform 2 of Double_strand break repair protein MRE11A	↓↓↑↑↑	-	-	↑	
Q5SSB9	Ficolin (Collagen/fibrinogen domain containing) 3 (Hakata antigen)	↓	-	-	↓	
Q58A45	PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit 3 (PAN3)	-	↓	-	↓	
Q9NZ71	Regulator of telomere elongation helicase 1	↓↓↑↑	↓		↓	
Q969T7-2	7-methylguanosine phosphate-specific 5'-nucleotidase, Isoform 2	-	↑	-	↑	
Q14106	Protein Tob2	-	↓	-	↓	
B6ZDN3	Doublecortin domain-containing protein 1	-	↓	-	↓	
P17014	Zinc finger protein 12	-	↓	-	↓	
H0YAC1	Plasma kallikrein heavy chain	↑	-	-	↑	S, I
O60259	Kallikrein-8	-	-	-	-	S, I

4.5 Ergebnistabelle selektierter Biomarkerkandidaten

Proteine, die wir anhand der Einzelergebnisse und der Gesamtregulation sowie nach Sicht aktueller Literatur über die jeweiligen Spezifikationen oder Funktionen als mögliche Biomarkerkandidaten für eine Evaluierung in Betracht ziehen wollen, wurden aus obiger Tab. 10 selektiert und in einer kompakteren Liste gesammelt (Tab. 11, „Selektierte Biomarkerkandidaten“). So finden sich neben Proteinen, die durch ihre häufige Detektion und eindeutige Ratio auffielen (z. B. *polymeric immunoglobulin receptor*), auch Kandidaten, die v. a. aufgrund ihres empirischen Zusammenhangs mit der Psoriasis, basierend auf in der Literatur beschriebenen Funktionen oder bereits veröffentlichten Aberrationen des Proteins in jedweder Art bei Erkrankung, ausgewählt wurden. Zu letzteren zählen etwa S100A7, das sich in den MS-Daten gegenseitig reguliert darstellte, jedoch wiederholt im Kontext der Psoriasis auffallend berichtet wurde, sowie Kallikrein 8, welches sich – im Gegensatz zu Plasma-Kallikrein – nicht in den MS-Ergebnistabellen auffallend präsentierte, jedoch durch seine bekannte Expression in der Haut eine pathomechanistische Verbindung zum betroffenen Organ der Psoriasis darstellen könnte. Keine Berücksichtigung fanden hier sämtliche Immunglobuline sowie Apolipoproteine, die im Hinblick auf Methodik und Zielstellung der Arbeit nicht als mögliche Biomarkerkandidaten geeignet imponieren. In der Spalte „Immuntest“ sind zudem diejenigen Proteine markiert, die einer Evaluierung mittels Immuntests unterzogen wurden.

Tab. 11: „Selektierte Biomarkerkandidaten“. Spalte „Immuntest“: Buchstabe „I“ markiert die Proteine, für die ein ELISA kommerziell verfügbar war und die so weiter evaluiert wurden

Protein-ID	Protein	Regulation in MS-Daten	Immuntest
H7BZJ8	Zn-alpha2-glycoprotein	↓	I
K7EJ44	Profilin 1	↓	I
M0QXZ3 P01024 M0QYC8 M0R0Q9	Complement C3	↓	I
F5GWP8	Plakoglobin	↑	I
P02753 Q5VY30	Retinol-binding protein	↑	
D6RF35 P02774 P02774-3	Vitamin D-binding protein	↓	I
Q6ZRV2 J3KPS2	Protein FAM83H	↓	I
P15924	Desmoplakin	↑	I
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	↑	I

Protein-ID	Protein	Regulation in MS-Daten	Immuntest
J3QR68 J3QQI8 P00738 P00739 P00739-2	Haptoglobin	↑	I
P01008	Antithrombin III	↓	
P00734	Prothrombin	↓	
P00450	Ceruloplasmin	↓	
F5H4W9	Serum paraoxonase/arylesterase	↓	
Q96PD5 Q96PD5-2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	↑	I
Q5T985	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	↓	
Q14624-2	Isoform 2 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	↑	
Q14624-3	Isoform 3 of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	↑	
B7ZKJ8	35 kDa inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	↑	
G3V5I3	Alpha-1-antichymotrypsin	↓	
H0YAC1	Kallikrein-8 (KLK-8)	-	I
G3XAP6 B4DKJ3 P49747	COMP (Cartilage oligomeric matrix protein)	↓	I
P31151	S100A7 (Psoriasin)	↑/↓	I
P00748	Coagulation factor XII	↓	
P01019	Angiotensinogen	↓	
P01031	Complement C5	↓	
P03952	Plasma-Kallikrein	↑	I
Q04695	Cytokeratin 17	↑	I

4.6 Ergebnisse ELISA

Eine überblickende Darstellung der Ergebnisse der ELISA-Tests zeigt Abb. 8. Gezeigt sind die immunologisch gemessenen Proteinkonzentrationen in Form einer Boxplot-Darstellung, aufgeteilt nach den drei untersuchten Gruppen „Kontrolle“, „Ps“ und „PsA“. Die „Boxen“ stellen hier den Interquartilsabstand zwischen der 25. und der 75. Perzentile dar, der Median ist als Strich darin erkenntlich. Die Konzentrationen der untransformierten Variablen sind auf der Ordinate in absoluten Werten aufgetragen. Die transformierten Daten (der Proteine Zn- α -GP, Profilin 1, Plasma-Kallikrein und Cytokeratin 17) sind mit ln-logarithmierten Werten angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Signifikanzniveau $p < 0,05$) sind durch eine Klammer spezifiziert und markiert („*“).

ma-Kallikrein (transformierte Daten) und Zn- α -GP (transformierte Daten) zeigten alleine auffällige Ergebnisse auf einem Signifikanzniveau von $p < .05$.

Ein signifikanter Gruppenunterschied bei C3 sowie bei PIGR konnte im post-hoc-Test weiter spezifiziert werden als ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte der Gruppe „Kontrolle“ gegenüber der Gruppe „PsA“ ($p=.024$ [C3] bzw. $p=.034$ [PIGR]), allerdings nicht zwischen den Gruppen „Ps“ und „PsA“ sowie zwischen den Gruppen „Kontrolle“ und „Ps“.

Die Konzentrationen sowohl an Plasma-Kallikrein als auch an Zn- α -GP (jeweils transformierte Daten) unterschieden sich signifikant in der Gruppe „Kontrolle“ gegenüber der Gruppe „Ps“ ($p=.049$ [Plasma-Kallikrein] bzw. $p=.001$ [Zn- α -GP]) sowie der Gruppe „PsA“ ($p=.010$ [Plasma-Kallikrein] bzw. $p=.012$ [Zn- α -GP]), jedoch nicht zwischen den Gruppen „Ps“ und „PsA“ ($p=.779$). Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. Mediane und Interquartilsabstände sind der Tab. 17 im Anhang zu entnehmen.

4.6.2 Korrelation der Kandidatenproteine mit Probandendaten

Da die fehlende Signifikanz der meisten Markerandidaten vermutlich durch die hohe Streuung der individuellen Konzentrationen im jeweiligen Gruppenkollektiv zustande kommt (s. Abb. 8), wurde geprüft, ob die Konzentrationen der gemessenen Proteine mit anderen Patienten-bezogenen Daten korrelieren. Die Ergebnisse der Korrelationsanalysen (nach Spearman oder Pearson) zeigt Tab. 12. Bei den Variablen „Geschlecht“, „Alter“ und „BMI“ dienten sowohl erkrankte als auch gesunde Probanden als Testkollektiv, bei der Variable „PASI“ erfolgte die Analyse der Daten der Ps- und PsA-Patienten. Diese Variable ist nochmals nach Subgruppen aufgeteilt dargestellt, um insbesondere signifikante Korrelationen (z. B. Desmoplakin) in den Gruppen „Ps“ und „PsA“ genauer beleuchten zu können (z. B. Korrelation Desmoplakin in der Subgruppe „Ps“). Es ist zu erkennen, dass die Markerandidaten Desmoplakin, C3, PIGR und Cytokeratin (transformierte Daten) positiv mit dem PASI-Wert korrelierten, Plasma-Kallikrein (transformierte Daten) hingegen negativ. Korrelationen der Proteine mit den Patientendaten Alter und Geschlecht sind, bei Reproduktion in weiteren Tests, insbesondere im Hinblick auf den Einsatz in der Laborchemie zu berücksichtigen, um künftige Referenzwerte anpassen zu können. Dies betrifft die Proteine Desmoplakin, S100A7, COMP, Zn- α -GP, Kallikrein 8, Plasma-Kallikrein und Cytokeratin 17 (s. Tab. 12).

Tab. 12: Signifikante Korrelationskoeffizienten und p -Werte der Markerproteine bei Probandendaten

Protein	Geschlecht	Alter	BMI	PASI Ps+PsA	PASI Ps	PASI PsA
Desmoplakin	n.s.	$r=-.243$, $p=.038$	n.s.	$r=.317$, $p=.034$	$r=.458$ $p=.024$	n.s.
S100A7	n.s.	$r=.350$, $p=.046$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
COMP	n.s.	$r=.313$, $p=.007$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Vit.D-bind._Protein	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
NAAA	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C3	n.s.	n.s.	$r=.427$, $p=.015$	$r=.480$, $p=.038$	n.s.	$r=.700$ $p=.036$
Zn- α -GP_In	$r=.288$, $p=.021$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Kallikrein 8	n.s.	$r=-.418$, $p=.042$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Profilin 1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Plakoglobin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PIGR	n.s.	n.s.	n.s.	$r=.565$, $p=.012$	n.s.	n.s.
Haptoglobin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FAM83H	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Plasma-Kallikrein_In	$r=.505$, $p=.003$	n.s.	n.s.	$r=-.638$, $p=.003$	$r=-.818$ $p=.004$	n.s.
Cytokeratin 17_In	$r=-.357$, $p=.045$	n.s.	n.s.	$r=.696$, $p=.001$	n.s.	$r=.905$ $p=.002$

n. s.: nicht signifikant, r: Korrelationskoeffizient, p: p-Wert. Grün hinterlegt sind positive, rötlich negative Korrelationen. Positive Korrelation mit dem Geschlecht bedeutet eine Assoziation mit dem weiblichen, negative Korrelation eine Assoziation mit dem männlichen Geschlecht

4.6.3 Korrelationen der Biomarkerkandidaten untereinander

Die Korrelationskoeffizienten (nach Pearson und Spearman) und dazugehörige Signifikanzwerte zeigt nachfolgende Tabelle (Tab. 13). Positive Korrelationen bedeuten gleichsinnige, negative gegensinnige Plasmakonzentrationsabweichungen. Es zeigten sich insbesondere positive Korrelationen des Proteins Cytokeratin 17 mit Desmoplakin, Vit.D-bind. Protein, C3 und PIGR. Die negativen Korrelationen zwischen NAAA und PIGR, FAM83H und NAAA sowie Plasma-Kallikrein und C3 sind die Grundlage der divisorischen Kombination der Variablen in der anschließenden Analyse.

Tab. 13: Korrelationen der Biomarkerkandidaten untereinander (n.s.: nicht signifikant, positive Korrelationen grünlich, negative rötlich hinterlegt)

	Desmo- plakin	S100A7	COMP	Vit.D-bind. Protein	NAAA	C3	Zn- α -GP	Kallikrein 8	Profilin 1	Plako- globin	PIGR	Hapto- globin	FAM83H	Plasma- Kallikrein	Cytoke- ratin 17
Desmoplakin		$r=-.581$ $p<.001$	n.s.	$r=-.511$ $p=.011$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$r=.427$ $p=.013$	n.s.	n.s.	n.s.	$r=.394$ $p=.026$
S100A7	$r=-.581$ $p<.001$		n.s.	n.s.	$r=.645$ $p<.001$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$r=-.430$ $p=.036$	n.s.	n.s.	n.s.
COMP	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$r=-.348$ $p=.047$	n.s.	n.s.
Vit.D-bind. Protein	$r=-.511$ $p=.011$	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$r=.529$ $p=.008$	n.s.	$r=.488$ $p=.018$
NAAA	n.s.	$r=.645$ $p<.001$	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$r=-.414$ $p=.018$	n.s.	$r=-.374$ $p=.035$	n.s.	n.s.
C3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$r=-.393$ $p=.024$	$r=.503$ $p=.003$
Zn- α -GP	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Kallikrein 8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Profilin 1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Plakoglobin	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PIGR	$r=.427$ $p=.013$	n.s.	n.s.	n.s.	$r=-.414$ $p=.018$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	$r=.362$ $p=.042$
Haptoglobin	n.s.	$r=-.430$ $p=.036$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.
FAM83H	n.s.	n.s.	$r=-.348$ $p=.047$	$r=.529$ $p=.008$	$r=-.374$ $p=.035$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		n.s.	n.s.
Plasma- Kallikrein	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$r=-.393$ $p=.024$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		$r=-.657$ $p<.001$
Cytokeratin 17	$r=.394$ $p=.026$	n.s.	n.s.	$r=.488$ $p=.018$	n.s.	$r=.503$ $p=.003$	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$r=.362$ $p=.042$	n.s.	n.s.	$r=-.657$ $p<.001$	

4.6.4 Ergebnisse Kombinatorik

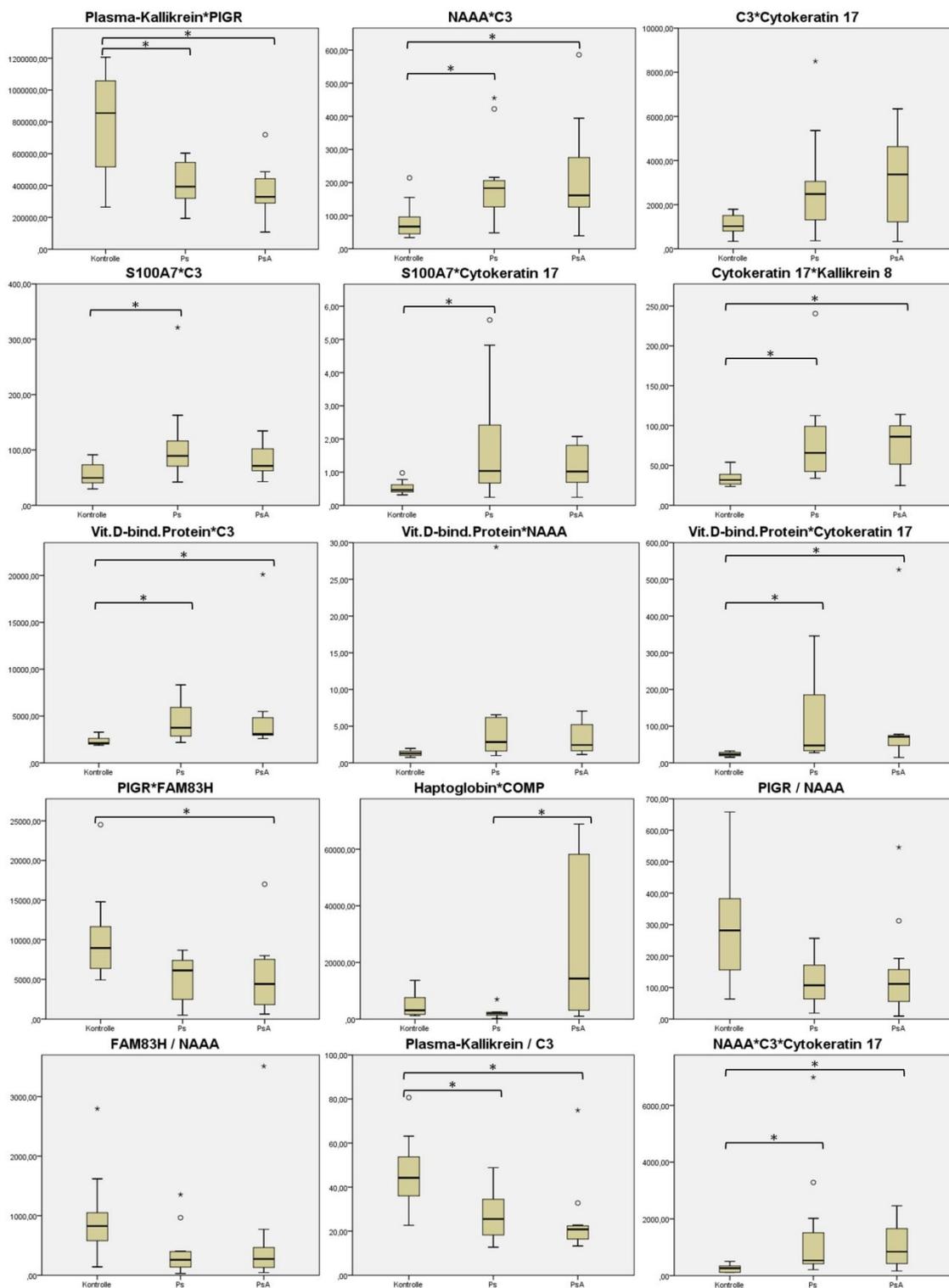
Aus den gut korrelierenden Biomarkerkombinationen wurde eine Vielzahl an Kombinationen (s. Tab. 6) dahingehend geprüft, ob eine mathematische Verknüpfung der Plasmakonzentrationen mittels Produkt- bzw. Quotientbildung Werte generiert, die besser zur Gruppendifferenzierung verwendet werden können als die Einzelparameter. Nicht alle theoretisch sinnvollen, aber 15 Biomarkerkombinationen daraus erbrachten einen signifikanten Gruppenunterschied in der statistischen Analyse. Diese sind grafisch als Boxplots, aufgeteilt nach den drei Probandengruppen, in Abb. 9 dargestellt. Da bei der Multiplikation bzw. Division der absoluten Werte der Konzentrationen die Einheiten der einzelnen Variablen ignoriert wurden, ist der so konstruierte Wert auf der Ordinate als einheitslos angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Signifikanzniveau $p < 0,05$) sind durch eine Klammer spezifiziert und markiert („^{cc}“).

Die exakten p -Werte der signifikanten Gruppenunterschiede im paarweisen Vergleich der Subgruppen zeigt nachfolgend Tab. 14:

Tab. 14: Signifikante Gruppenunterschiede der Biomarkerkombinationen (Kruskal-Wallis-Test und *post-hoc* Bonferroni-korrigierter Dunn-Test)

	Kruskal-Wallis $H(2)/p$	korr. Dunn-Test (p)		
		Kontrolle-Ps	Kontrolle-PsA	Ps-PsA
Plasmakallikrein*PIGR	11,856 / .003	.046	.003	n.s.
NAAA*C3	8,334 / .015	.033	.038	n.s.
C3*Cytokeratin 17	6,188 / .045	n.s.	n.s.	n.s.
S100A7*C3	6,687 / .035	.032	n.s.	n.s.
S100A7*Cytokeratin 17	7,124 / .028	.037	n.s.	n.s.
Cytokeratin 17*Kallikrein 8	8,443 / .015	.037	.037	n.s.
Vit.D bind. Protein*C3	9,755 / .008	.022	.019	n.s.
Vit.D-bind. Protein*NAAA	6,495 / .039	n.s.	n.s.	n.s.
Vit.D bind. Protein*Cytokeratin 17	9,602 / .008	.021	.024	n.s.
PIGR*FAM83H	8,018 / .018	n.s.	.034	n.s.
Haptoglobin*COMP	6,045 / .049	n.s.	n.s.	.044
PIGR/NAAA	5,992 / .050	n.s.	n.s.	n.s.
FAM83H/NAAA	6,569 / .037	n.s.	n.s.	n.s.
Plasmakallikrein/C3	11,489 / .003	.046	.003	n.s.
NAAA*C3*Cytokeratin 17	13,216 / .001	.004	.006	n.s.

Abb. 9: Überblickende Boxplot-Darstellung der Kombinatorik-Tests



Dargestellt sind Biomarkerkombinationen, bei denen sich ein signifikanter Einfluss der Variable „Gruppe“ zeigte. Unterschiede zwischen Gruppen auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ sind markiert (*)

Mittelwerte und Standardabweichungen der kombinatorisch errechneten Variablen finden sich in Tab. 18 im Anhang.

5 Diskussion

5.1 Immunglobuline

In den von uns erhobenen Daten finden sich auch zahlreiche Konzentrationsschwankungen von Immunglobulinen bzw. deren Varianten von insbesondere variablen Kettenabschnitten zwischen jeweils den Patienten- und Kontroll-Plasmaproben. Die nach der Proteolyse erhaltenen Fragmente von Antikörpern lassen mit unserer Methodenkombination keine Vorhersagen über deren Spezifität im intakten Immunglobulinmolekül zu. Ob es sich um physiologische Immunglobulinprofile oder mögliche Komponenten von Autoantikörpern handelt, ist also nicht beurteilbar. Die Detektion möglicher pathophysiologisch bedeutender Antikörper bei der Psoriasis ist damit, obwohl bedeutend, kein primäres Ziel der vorliegenden Arbeit und des gewählten Studiendesigns, daher soll hier auf anderweitige Studien mit dementsprechendem Schwerpunkt verwiesen sein.

5.2 Apolipoproteine

Aberrationen von Serumlipiden und Lipoproteinen im Blut von Psoriasis-Erkrankten sind ein vielfach beobachtetes und beschriebenes Phänomen. Die Dyslipidämie ist ein etablierter Risikofaktor für koronare Herzkrankheit und kardiovaskuläre Ereignisse, die ebenfalls mit der Psoriasis assoziiert sind und als deren Komorbiditäten bekannt sind. Zudem gehört die Dyslipidämie zum Symptomkomplex des Metabolischen Syndroms, dessen Prävalenz bei Psoriasis-Patienten signifikant erhöht ist. Das Ausmaß der Dyslipidämie korreliert auch mit der Schwere der Schuppenflechte bei Betroffenen, was einen Hinweis auf einen pathomechanistischen Zusammenhang anstelle einer reinen Disposition oder überzufälliger Häufung darstellt.

Die durchgeführte *Proteomics*-basierte massenspektrometrische Analyse erfasst die Proteinanteile der Lipoproteine, d. h. Apolipoproteine. Da diese weitgehend in hochmolekularen Plasmaproteinfraktionen gefunden wurden, kann aber indirekt auch auf Konzentrationen der zugehörigen Komplexe, der Lipoproteine, geschlossen werden. Für die vorliegende Fragestellung, die Biomarkersuche, sehen wir jedoch von der eingehenderen Analyse der Apolipoproteine ab, da sie, auch im Hinblick auf metabolische Komorbiditäten, nicht spezifisch genug imponieren – wenngleich die Möglichkeit der Risikostratifizierung kardiovaskulärer und metabolischer Komplikationen ein mögliches Einsatzgebiet dieser Biomoleküle darstellen könnte. Eine spezialisierte Auswertung der Apolipoprotein-Plasmakonzentrationen bei der Schuppenflechte ist in diversen Reviews und Meta-Analysen einzusehen (s. beispielsweise Pietrzak *et al.* (2010), Ma *et al.* (2013)).

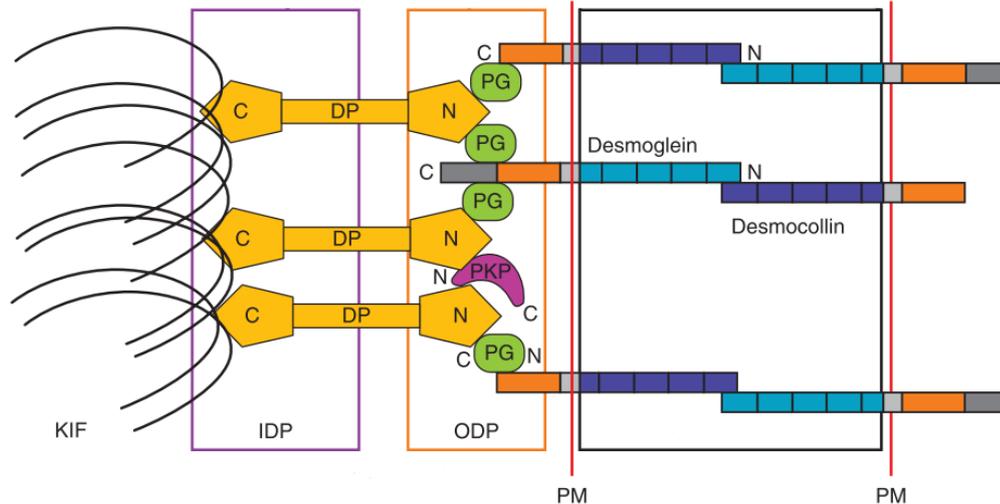
5.3 Charakterisierung der Biomarkerkandidaten

5.3.1 Strukturproteine: Desmoplakin, Plakoglobin, Cytokeratin 17

Alle als unter Psoriasis bzw. PsA im Blutplasma auffällig erscheinenden Strukturproteine sind vermutlich als *Leakage*-Komponenten bei erhöhtem fokalen Zellumsatz, u. U. aus unzureichend bzw. verändert differenzierten Zellen anzusehen und werden entsprechend diskutiert.

Aktinfilamente und Intermediärfilamente bilden Teile des Zytoskeletts, die über die Zellmembran mit Zell-zu-Zell- und Zell-zu-ECM (extrazelluläre Matrix)-Kontakten in Verbindung stehen. Die Verankerung der intrazellulären Filamente an die Membran und damit an die Verbindungsstellen des Zellverbandes ist essenziell für die Gewebsarchitektur und wird über sog. submembranöse Plaques aus spezialisierten Adapterproteinen realisiert. Zellkontakte, die an solche Plaques gebunden sind, sind zum einen Desmosomen, denen intrazellulär das Intermediärfilament-Zytoskelett zugeordnet ist (Delva *et al.* 2009), zum anderen Junctionverbindungen der *Zonula adhaerens*, die an das Aktin-Zytoskelett anknüpfen (Meng und Takeichi 2009). Strukturmodelle der subplasmalemalen Plaques der Desmosomen gehen heute von einem Aufbau aus, der einen dem Zytoplasma zugewandten Teil, die *inner dense plaque* (IDP), und einen der Zellmembran zugewandten Teil, die *outer dense plaque* (ODP), unterscheidet. An der IDP erfolgt die Verankerung intrazellulärer Keratin-Intermediärfilamente an Desmoplakin, welches gleichzeitig die Brücke zur ODP darstellt, an welchem unterschiedliche Adapterproteine an den N-Terminus von Desmoplakin einerseits und andererseits an die transmembranären Cadherine binden. Letztere sind eine Gruppe von Glykoproteinen, deren extrazelluläre Komponenten über mehrere Bindungsdomänen mit Bestandteilen von Nachbarzellen in Kontakt treten (Delva *et al.* 2009, Meng und Takeichi 2009). Eine schematische Darstellung einer desmosomalen Struktur an der Zellmembran zeigt Abb. 10.

Abb. 10 : Modell der Desmosomenstruktur (aus Delva *et al.* (2009))



Cadherine wie Desmoglein und Desmocollin erstrecken sich durch die Plasmamembran (PM) und binden intrazellulär an Linkerproteine wie Plakoglobin (PG) und Plakophilin (PKP) an der outer dense plaque (ODP). Desmoplakin (DP) verbindet die ODP mit der IDP (inner dense plaque), an der Elemente des Zytoskeletts, Keratin-Intermediärfilamente (KIF), binden. C: Carboxyterminus, N: Aminoterminus des Proteins

Desmoplakin ist das quantitativ dominierende Protein der Desmosomen und das Schlüsselement bei der Vernetzung der Intermediärfilamente des Zytoskeletts mit der Plasmamembran. Der aminotermine „Kopf“ bindet vornehmlich das Adapterprotein Plakoglobin (Kowalczyk *et al.* 1997). Der carboxyterminale „Schwanz“ bindet die Intermediärfilamente des Zytoskeletts, beispielsweise Keratine in epithelialen Zellen (Kouklis *et al.* 1994). Fehlfunktion des Desmoplakin-Proteins im Rahmen hereditärer Defekte im Gen führen oft zu ähnlichen Symptomen wie ein Ausfall von Plakoglobin, was den Funktionsverlust der desmosomalen Zellkontakte als gemeinsame pathomechanistische Grundlage vermuten lässt: die palmoplantare Keratose der Haut und Syndrome wie das *skin fragility-woolly hair syndrome* sind hierbei ein Zeichen der Hautbeteiligung bei Ausfällen des Proteins (Cheong *et al.* 2005). Einen möglichen Zusammenhang zu Pathomechanismen der Psoriasis könnte man in der offensichtlichen Manifestation eines Gendefekts in einer Keratodermatose vermuten. Zusätzlich berichten Wan *et al.* über eine keratinozytäre Hyperproliferation nach Ausschalten der Desmoplakin-mRNA-Translation durch siRNA-Interferenz (Wan *et al.* 2007).

Literaturdaten zu auffälligen Desmoplakinmengen im Plasma, insbesondere bei Erkrankungen der Haut wie der Schuppenflechte, sind uns nicht bekannt. In den von uns erhobenen Immunquantitäten zeigt sich eine signifikante direkte Korrelation der Konzentration des Proteins im Plasma mit dem PASI-Wert der Erkrankten, welche besonders in der Subgruppe „Psoriasis“ wiederzufinden ist. Unter der Betrachtung der Bedeutung des Adapterproteins für die

korrekte Funktionalität epithelialer Gewebe erscheint dieser Zusammenhang mit einer Erkrankung, die durch eine gestörte Hautarchitektur bzw. einen übersteigerten Keratinozyten-*turnover* gekennzeichnet ist, pathomechanistisch einleuchtend; allerdings kann nicht sicher die betroffene Haut als Ursprung der Desmoplakinkonzentrationen angenommen werden. Weiterhin zeigen sich signifikante positive Korrelationen des Proteins mit PIGR und Cytokeratin 17 sowie ein negativer Zusammenhang mit dem Alter der Probanden. Letzteres könnte eventuell physiologisch durch eine altersbedingte Atrophie der Haut zu erklären sein.

Plakoglobin, ein Adapterprotein in Desmosomen, verbindet die intrazellulären Strukturen der transmembranären Cadherine und die N-Termini der Desmoplakin-Moleküle. *Silencing* des Plakoglobin-Gens führt zu verminderter Kohäsion kultivierter Keratinozyten (Spindler *et al.* 2014); das *Keratoderma* ist eine Form der hereditären Hyperkeratose und Akanthose, die an Handflächen und Fußsohlen auftritt und im Tierexperiment auch beim isolierten Defekt von *Jup*, dem Plakoglobin-Gen, selektiv in den Keratinozyten auftritt (Li *et al.* 2012). In psoriatischen Plaques finden sich signifikant größere Mengen unter anderem an ungespaltenem Plakoglobin (Simon *et al.* 2008), ein Anhalt auf eine verminderte (physiologische) Degradation der corneodesmosomalen Strukturproteine als (Mit-)Ursache der übermäßigen Verhornung. Den Einfluss von IL-17 – bei Psoriasis lokal in den Plaques und im Serum in erhöhten Konzentrationen vorzufinden – untersuchten Gutowska-Owsiak *et al.* und beobachteten eine verminderte Transkription von diversen Adhäsions- und Verbindungsproteinen wie Plakoglobin (Gutowska-Owsiak *et al.* 2012). Wir können hingegen anhand der semiquantitativen Ergebnisse der Massenspektrometrie über erhöhte Mengen des Proteins im Plasma der Patienten berichten.

Keratine sind eine Gruppe von intrazellulären Strukturproteinen und machen die Untergruppen Typ I und II der Intermediärfilamente aus. Sie bilden den größten Anteil des Intermediärfilament-Zytoskeletts und sorgen durch ihre Interaktion mit Desmosomen und Hemidesmosomen für die strukturelle Integrität und Polarität von Zellen in Gewebeverbänden. Daneben sind Keratine auch essenziell für Proliferation, Wundheilung, Gewebs-*Remodelling* und Apoptose.

Cytokeratin 17, ein Typ I-Keratin, wird physiologischerweise in Epithelzellen komplexer Gewebe wie dem Nagelbett und der Nagelmatrix, Haarfollikeln, Talgdrüsen und ekkrinen Schweißdrüsen exprimiert, jedoch nicht in gesunder Haut. Somit ist seine Hauptaufgabe in der Differenzierung und Bildung epithelialer Hautanhängsel zu sehen (Jin und Wang 2014). Früh wurde die – aberrante – Expression von Cytokeratin 17 in den suprabasalen Schichten

betroffener Haut bei der Schuppenflechte berichtet und seit den 90er Jahren vielfach reproduziert. So rückte das Protein ins Licht der Psoriasis-Forschung als mögliches pathomechanistisches Schlüsselement der Erkrankung. Die pathophysiologisch bedeutendsten Zytokine der Psoriasis, IFN- γ , IL-17A und IL-22, sind potente Induktoren der Cytokeratin 17-Expression in Keratinozyten (Shi *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2012, Jin und Wang 2014). Dazu kommt die Rolle von Cytokeratin 17 als mögliches Antigen autoreaktiver T-Zellen bei der Psoriasis, das eine Th1-Immunantwort in Form einer IFN- γ -Freisetzung hervorruft. Besonders CD8⁺-T-Zellen mit speziellen *Homing*-Rezeptoren für die Haut reagieren auf die Exposition mit Cytokeratin 17 (Johnston *et al.* 2004). Eine mögliche Erklärung hierfür sind die bereits erwähnten Strukturähnlichkeiten des Proteins mit dem M-Protein, einem Virulenzfaktor der Streptokokken, welches als mögliches Antigen diskutiert wird, da Streptokokkeninfekte der oberen Atemwege oftmals einen Schub der Psoriasis triggern können (Gudmundsdottir *et al.* 1999).

Zentrale Bedeutung erlangt Cytokeratin 17 als Teil einer autoimmun bedingten, entzündlichen Feedback-Schleife: es ist zur Initiation einer Immunantwort durch autoreaktive Th1-Zellen in der Lage, welche daraufhin durch IFN- γ die Entzündungsreaktion amplifizieren – die freigesetzten Zytokine selbst induzieren wiederum die Expression von Cytokeratin 17. Ein Durchbrechen dieses Kreises könnte künftig vielversprechende Therapieoptionen darstellen, und in der Tat konnten die Symptome der Psoriasis (Leukozyteninfiltrat, Parakeratose, Akanthose) *in vitro* und *in vivo* gebessert werden, wenn Cytokeratin 17 therapeutisch angesteuert wurde (im Mausmodell als experimentelle *down*-Regulation des Proteins, in Keratinozyten-Zelllinien über *Antisense*- und RNA-Interferenz-Strategien) (Chang *et al.* 2011). Allerdings zeigen auch aktuell in klinischer Anwendung befindliche Therapeutika Cytokeratin 17-blockierende Wirkmechanismen: Dithranol und Dimethylfumarat unterdrücken die IFN- γ -induzierte Cytokeratin 17-Expression bereits in geringen Konzentrationen, was sicherlich einen Teil ihrer Wirksamkeit bei der Behandlung der Schuppenflechte erklärt (Bonnekoh *et al.* 2001). Auch Kortikosteroide und Retinoide hemmen die Cytokeratin 17-Transkription direkt. Zytostatika wie Tacrolimus und Ciclosporin A könnten durch eine Blockade intrazellulärer Signalwege auch die Cytokeratin 17-Induktion beeinflussen (Jin und Wang 2014).

Aufgrund dieser gewichtigen Bedeutung des Proteins bei der Psoriasis fand es auch besondere Berücksichtigung in der Auswahl der von uns mittels ELISA evaluierten Biomarkerkandidaten. In der multivariaten Analyse zeigte sich zwar nur ein insignifikanter Anstieg der Cytokeratin 17-Plasmakonzentrationen über die drei Gruppen Kontrolle, Psoriasis und PsA hinweg, allerdings findet sich eine direkte Korrelation zwischen der Cytokeratin-17-Plasmaspiegel und dem PASI-Wert. Dieses Ergebnis erscheint vor dem Hintergrund der Stellung des Proteins in

(auto-)entzündlichen Vorgängen an betroffener Haut schlüssig: bei zunehmend inflammatorischem Geschehen an der Haut (gemessen als PASI) steigt die im Blut nachweisbare Konzentration an Cytokeratin 17. Allerdings fand sich diese Korrelation mit dem PASI-Wert in besonderem Maße in der Gruppe der PsA-Patienten. Hierin könnte ein Korrelat einer stärkeren generalisierten Reaktion des Körpers bei der PsA vermutet werden, da also lokale Prozesse systemisch sichtbar werden, wenn davon ausgegangen wird, dass die psoriatisch veränderten Hautareale der Ursprung der gemessenen Cytokeratin 17-Mengen sind. Wir finden daneben auch eine positive Korrelation mit aktueller topischer Medikation der Patienten mit Vitamin D₃-Analoga ($r=.525$, $p=.015$), was zunächst in Analogie zur Cytokeratin 17-Repression durch o. g. Therapeutika überrascht. Dennoch könnte diese dynamische Reaktion auf eine Behandlung das Protein als künftigen Indikator für ein Ansprechen der Therapie qualifizieren.

5.3.2 Regulatoren von Zytoskelett und ECM: Profilin 1, FAM83H, COMP

Profilin 1 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist. Es ist ein Rezeptor für freies, unpolymerisiertes Aktin und spielt damit eine Rolle bei der Zellmotilität (Schlüter *et al.* 1997, Witke 2004).

Im bioptischen Material von betroffener Haut sowie im Plasma von Psoriasis-Patienten wurde Profilin 1 ebenfalls in erhöhten Konzentrationen detektiert, wenngleich nur wenige Daten vorhanden sind (Plavina *et al.* 2008, Williamson *et al.* 2013). Unsere MS-Daten zeigen hingegen erniedrigte Plasmaspiegel, die bei der Evaluierung mit Immuntests nicht reproduziert werden konnten.

FAM83H (*family with sequence similarity 83 member H*) ist ein wahrscheinlich ubiquitäres Protein, welches besonders bei der Entwicklung von extrazellulären Strukturen wie dem Zahnschmelz involviert zu sein scheint (Lee *et al.* 2008). Weiterhin ist es an der zytoskelettalen Keratinfilament-Organisation beteiligt und scheint die dynamische Stabilität der Filamente via De-/Polymerisation zu kontrollieren, entscheidend für Migration von Zellen beispielsweise bei der Wundheilung oder in Tumorzellen (Kuga *et al.* 2013). Die MS-Daten zeigen einen Abfall der FAM83H-Konzentrationen im Plasma bei Psoriasis-Patienten – eine Tendenz, die sich auch optisch in den grafisch dargestellten Ergebnissen des ELISA widerspiegelt (Abb. 8), wenngleich sich der Abfall nicht signifikant demarkierte.

COMP (*cartilage oligomeric matrix protein*) ist ein verhältnismäßig großes Glykoprotein der ECM des Knorpels. Es wird im adulten Knorpelgewebe von Chondrozyten synthetisiert und territorial in die umgebenden Lakunen sezerniert (Koelling *et al.* 2006), ist aber in geringeren

Mengen auch in Sehnen und Ligamenten nachzuweisen (Smith *et al.* 1997). Die Aufgabe des Proteins besteht in der Organisation und Aufrechterhaltung der Knorpel-ECM (DiCesare *et al.* 1995), wozu es eine Vielzahl von Bindungsstellen für Bestandteile sowohl von Zellmembranen, ECM als auch löslichen Molekülen aufweist: Typ I- oder Typ II-Kollagen, Aggrecan, Glykosaminoglykane, Fibronectin, Integrine, Vitamin D₃, all-*trans*-Retinol und weitere hydrophobe Partikel sind Liganden des Proteins (Guo *et al.* 1998, Acharya *et al.* 2014). Durch seine spezifische Assoziation zu Knorpel und in geringerem Maße Sehnen und Bändern und seine Dynamik bei Schädigung und Umbauprozessen dieser Gewebe ist COMP mittlerweile als ein vielfach berichteter Serum-Biomarker für arthritische und rheumatoide Erkrankungen bekannt (Lotz *et al.* 2013).

COMP fungiert auch als Marker des Bindegewebsschadens bei der PsA (Bogliolo *et al.* 2012). Bei erfolgreicher Therapie mit Biologika verringern sich die COMP-Spiegel im Serum signifikant (Cauza *et al.* 2006). Chandran *et al.* zeigten allerdings, dass COMP-Spiegel nicht zur Unterscheidung zwischen einer rein dermalen Manifestation der Psoriasis und einer PsA geeignet sind (Chandran *et al.* 2010); ähnliche Ergebnisse, bei Korrelation der COMP-Konzentrationen mit dem Ausmaß der Gelenk-Pathologie und des Entzündungsstatus der Erkrankten, zeigen Skoumal *et al.* und vermuten eine bereits präklinische Beteiligung des periartikulären Bindegewebes bei Patienten, bei denen alleinig eine Psoriasis diagnostiziert wurde, als mögliche Erklärung für die erhöhten COMP-Mengen im Serum im Vergleich zu gesunden Probanden (Skoumal *et al.* 2008). Unsere ELISA-Daten bilden diese Berichte visuell eindrücklich ab: die COMP-Konzentrationen erscheinen isoliert erhöht bei PsA-Patienten. Jedoch bleibt dieser Trend, sicher auch wegen der weiten Streuung der COMP-Mengen in dieser Gruppe, unter einem 0,05-Signifikanzniveau. Weiterhin berichten wir über eine positive Korrelation der COMP-Plasmaspiegel mit dem Probandenalter.

5.3.3 Binde- und Transportproteine: RBP4, Vit.D-bindendes Protein, Haptoglobin, Ceruloplasmin

Retinol-bindendes Protein 4 (RBP4) ist das Transportprotein für Retinol (Vitamin A₁) im Blut und liefert dieses von der Leber, dem Vitamin A-Speicher des Körpers, in die peripheren Gewebe. Zudem wurde es auch als Adipokin identifiziert, das in nicht geringen Mengen von reifen Adipozyten des viszeralen und auch subkutanen Fettgewebes produziert wird und bei metabolischen Erkrankungen im Zusammenhang mit Insulin- und Glukosestoffwechsel Aberrationen zeigt (Kotnik *et al.* 2011). RBP4 wird als Korrelat-Marker des Metabolischen Syndroms diskutiert, das durch systemische und lokale unterschwellige Entzündungsvorgänge in

endokrin aktivem weißen Fettgewebe gekennzeichnet ist (Lin *et al.* 2009). Das Metabolische Syndrom gilt als Komorbidität der Schuppenflechte, dessen Prävalenz bei Psoriasis-Patienten zwei- bis dreifach erhöht ist gegenüber dem Durchschnitt (Armstrong *et al.* 2013) – unter diesem Gesichtspunkt sind Beobachtungen von RBP4-Alterationen bei Erkrankten zu betrachten: Romani *et al.* berichten über erhöhte RBP-Serumspiegel bei Betroffenen und zusätzlich eine Korrelation mit der Krankheitsschwere (gemessen mit dem PASI-Score) (Romani *et al.* 2013). Die Ergebnisse erhöhter RBP4-Spiegel können wir orientierend mit MS-Daten reproduzieren. Eine Immunoquantifizierung steht noch aus. Allerdings berichten Rollman und Vahlquist erniedrigte RBP4-Serumlevel bei Patienten mit schwerer Psoriasis (Rollman und Vahlquist 1985).

Vitamin D-bindendes Protein (Vit.D-bind. Protein) ist ein in der Leber synthetisiertes Transportprotein für Vitamin D im Blut und sorgt für die Aufrechterhaltung vergleichsweise konstanter systemischer Speicher des Vitamins (Chun 2012). Vitamin D₃ selbst wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder in der Haut unter Sonneneinstrahlung gebildet und anschließend in der Leber, dann in der Niere jeweils einmal hydroxyliert, sodass aktives 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D) (Calcitriol) entsteht, welches in die Körperzellen gelangt und dort mit seinem Rezeptor in Verbindung tritt. Einem Risiko für einen Mangel an Vitamin D sind vor allem Ältere, Frühgeborene, Personen mit starker Hautpigmentierung oder niedriger UV-Licht-Exposition, einer Adipositas oder Malabsorption ausgesetzt. Schwere Mangelzustände führen zu Knochenmineralisationsstörungen. Bei Psoriasis-Erkrankten wurden ebenso pathologische Vitamin D-Mängel berichtet, insbesondere in den Wintermonaten (Gisondi *et al.* 2012). Allerdings macht man sich eine antiproliferative Wirkung von Vitamin D₃ bei der lokalen Therapie der Schuppenflechte zunutze (Lu *et al.* 2005), zur Anwendung kommen Externa wie Calcitriol- oder Calcipotriol-haltige Salben. Alterationen in Vitamin D- oder Vit.D-bind.-Protein-Plasmaspiegeln könnten daher auch Ausdruck einer Therapie mit Vitamin D-Analoga sein.

In unseren Daten zeigte sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Applikation dieser Externa und den Vit.D-bind. Protein-Konzentrationen (Daten nicht dargestellt). Unsere Ergebnisse aus dem Proteomvergleich zeigen erniedrigte Vit.D-bind. Prot.-Spiegel bei an Psoriasis Erkrankten, welche sich in den Evaluationstests nicht signifikant darstellten. Allerdings imponiert eine starke Streuung der Proteinkonzentrationen insbesondere bei den Psoriasis-Patienten gegenüber den Gesunden.

Haptoglobin ist ein tetrameres, von Hepatozyten produziertes Serumprotein, dessen biologische Funktion in der Bindung und damit Neutralisierung von freiem, potenziell zytotoxischem Hämoglobin besteht. Es verhindert die Bildung von Sauerstoffradikalen durch freies Häm-Eisen und wirkt als potentes Antioxidans (Alayash 2011). Haptoglobin zählt zu den Akute-Phase-Proteinen, daher zeigt seine Konzentration im Serum eine große Spannweite (Baumann *et al.* 1989). Massenspektrometrische Untersuchungen konnten im Plasma von Psoriasis-Patienten veränderte und heterogenere Glykosylierungsmuster nachweisen (Maresca *et al.* 2010). Haptoglobin von Psoriasis-Patienten zeigt verminderte Bindungskapazitäten für Hämoglobin und weitere seiner physiologischen Liganden, was eventuell in einer strukturellen Aberration des zirkulierenden Haptoglobins bei der Psoriasis begründet sein könnte (Cigliano *et al.* 2008).

Li *et al.* zeigten, dass auch die epidermalen Keratinozyten der gesunden Haut Haptoglobin exprimieren, bei dermatologischen Erkrankungen jedoch, unter anderem auch der Psoriasis, signifikant höhere Mengen an Haptoglobin in den Keratinozyten translatiert werden (Li *et al.* 2005). Eine rein quantitative Analyse ergibt aber auch – unabhängig seines Glykosylierungsmusters – signifikant erhöhte Haptoglobin-Serumspiegel bei Psoriasis-Patienten, wobei jedoch keine Unterscheidung zwischen einem aktiven oder inaktivem Stadium der Erkrankung möglich ist (Rocha-Pereira *et al.* 2004). Trotzdem berichten Kanelleas *et al.* über eine signifikant reduzierte Haptoglobinkonzentration nach erfolgreicher Therapie mit dem TNF- α -Blocker Etanercept (Kanelleas *et al.* 2011). Unsere MS-Daten zeigen ebenfalls höhere Haptoglobin-Konzentrationen bei Psoriatikern, was in den Immuntests jedoch nicht mehr nachzuvollziehen war.

Ceruloplasmin ist ein konstitutiv im Plasma vorkommendes, bläuliches, Kupfer-bindendes Protein. Es gehört zu den positiven Akute-Phase-Proteinen, dessen Serumspiegel sich dann zwei- bis dreifach erhöht (Gitlin 1988). Freies Cu^{2+} wirkt zytotoxisch über die Bildung von Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2), sodass die schnelle Elimination des Metalls, über Bindung an Ceruloplasmin, notwendig wird. Ceruloplasmin ist in der Lage, Fe^{2+} zu Fe^{3+} zu oxidieren und dadurch intrazelluläre Eisenspeicher zu mobilisieren (Mzhel'skaya 2000). Neben der kupfer- und ferrooxidativen Aktivität zeigt Ceruloplasmin weitere antioxidative Effekte wie eine Glutathion-Peroxidase-Aktivität oder das Abfangen von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) (Healy und Tipton 2007).

Im Plasma an Psoriasis Erkrankter finden sich teils signifikant (Rocha-Pereira *et al.* 2004, Karabudak *et al.* 2008), teils insignifikant erhöhte oder unauffällige Ceruloplasmin-Spiegel

(Kekki *et al.* 1966), allerdings erhöhte Konzentrationen an freiem Kupfer (Basavaraj 2011), die überdies auch mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren. Allerdings berichten Kanelleas *et al.* über ein Absinken der Serum-Ceruloplasminspiegel nach erfolgreicher Therapie der Psoriasis-Patienten mit dem TNF- α -Blocker Etanercept (Kanelleas *et al.* 2011). Als Index für den Kupferstatus des Organismus kann der Kupfer/Ceruloplasmin-Quotient dienen, der analog erhöht vorgefunden wurde und ebenfalls als Marker für den Erkrankungsgrad dienen könnte (Rashmi *et al.* 2010).

Auch bei der PsA finden sich Serum-Ceruloplasminspiegel, die signifikant erhöht sind sowohl gegenüber gesunden Kontrollen, aber auch gegenüber Patienten mit rein kutaner Manifestation einer Psoriasis (Oriente *et al.* 1984, Dixon *et al.* 1988). Unsere Ergebnisse aus den MS-Analysen legen hingegen erniedrigte Ceruloplasmin-Mengen nahe.

5.3.4 Gerinnung: Antithrombin III, Prothrombin, Faktor XII

Antithrombin III ist ein Serinprotease-Inhibitor und das wichtigste und effektivste antikoagulatorische Molekül im Blutkreislauf des Menschen. Das systemisch zirkulierende Antithrombin III stammt aus der Leber, die den Hauptsyntheseort des Proteins darstellt (Quinsey *et al.* 2004). Seine Expression wird durch Zytokine wie IL-6 und IL-1 β gehemmt, sodass Antithrombin III als negatives Akute-Phase-Protein anzusehen ist (Niessen *et al.* 1997). Zu den Enzymen, die Antithrombin III als Substrat dienen, gehören die Proteasen der intrinsischen Gerinnungskaskade Faktor IXa, Xa, XIa und v. a. Thrombin. Für die Aktivität von Antithrombin III ist allerdings ein Kofaktor, das Polysaccharid Heparin, vonnöten (Mourey *et al.* 1990). Durch die Antikoagulation zum einen – Gerinnungsaktivierung ist ein proinflammatorischer Zustand –, zum anderen auch durch direkte Wirkung des Proteins auf Zellen des Immunsystems und Endothelzellen wirkt Antithrombin III entzündungshemmend (Wiedermann und Römisch 2002). Karabudak *et al.* berichten über erniedrigte Antithrombin III-Serumspiegel bei Psoriasis-Patienten (Karabudak *et al.* 2008) – ein Ergebnis, zu dem auch die hier durchgeführten MS-Experimente führen. Gisondi *et al.* konnten dies nicht bestätigen und berichten, wie zuvor Marongiu *et al.*, über unauffällige Antithrombin III-Konzentrationen der Patienten gegenüber gesunden Kontrollen (Marongiu *et al.* 1994, Gisondi *et al.* 2010).

Prothrombin gehört zu den Vitamin-K-abhängig synthetisierten Gerinnungsfaktoren und stellt das Zymogen der Serinprotease Thrombin dar. Die proteolytische Aktivierung wird vermittelt durch den Komplex aus Faktor Xa, Ca²⁺, Faktor Va und Phospholipiden (d. h. in Kontakt mit Zellmembranen) und erzeugt das Fibrinogen-spaltende α -Thrombin, eines der bedeutendsten Enzyme der Blutgerinnung. Durch eine Bindung an das transmembranäre Thrombo-

modulin an Endothelzellen wird Thrombin in seiner Wirkung dahingehend verändert, dass es nun nicht mehr Fibrinogen spaltet, sondern Protein C und Protein S aktiviert, welches potente Inhibitoren der Faktoren V und VIII sind. So wirkt Thrombin je nach umgebendem Milieu einerseits stark thrombogen und andererseits gerinnungshemmend (Lancellotti *et al.* 2013). Prothrombin wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert, die durch die Sekretion des Proteins die systemischen Spiegel an Prothrombin bereitstellt (Degen 1992). Frühe Studien konnten Prothrombin nicht als ein Akute-Phase-Protein identifizieren (Koj *et al.* 1984). In unseren MS-Daten findet sich überblickend eine erniedrigte Konzentration an Prothrombin im Plasma der Psoriasis-Patienten.

Faktor XII oder auch **Hageman-Faktor** ist ein Zymogen an der Schnittstelle zwischen Gerinnungs- und Kallikrein-Kinin-System (KKS). Zusammen mit Präkallikrein und *high molecular weight* (HMW)-Kininogen kommt es auf negativ geladenen Oberflächen zur sog. Kontaktaktivierung, die in der Genese von aktivem Faktor XII und Kallikrein mündet. Aktive Spaltprodukte von Faktor XII initiieren die proteolytische Aktivierung von Faktor XI, der den intrinsischen Pfad der Gerinnungskaskade einleitet (Cochrane und Griffin 1979) und sind außerdem zur Aktivierung der klassischen Komplementkaskade in der Lage (Ghebrehiwet *et al.* 1981). Citarella *et al.* konnten an kultivierten Hepatozyten zeigen, dass IL-6, das großenteils für die Induktion der Zytokine der Akute-Phase-Reaktion verantwortlich ist, die Expression von Faktor XII reprimiert. Die Autoren schließen daraus, dass Faktor XII als negatives Akute-Phase-Protein anzusehen ist (Citarella *et al.* 1997).

Schopf *et al.* konnten zeigen, dass insbesondere Monozyten aus dem Blut von Patienten mit einer Psoriasis eine erhöhte prokoagulatorische Aktivität aufweisen, die am ehesten auf die Expression von Gewebsfaktor und Thromboplastin zurückzuführen ist und damit die extrinsische Gerinnungskaskade triggert. Die prokoagulatorische Aktivität im Blut der Betroffenen korreliert dabei auch mit der Schwere der Erkrankungsphase, da eine erfolgreiche topische Behandlung (mit Anthralin) die Gerinnungsaktivität normalisieren konnte (Schopf *et al.* 1993). In den von uns erhobenen MS-Daten scheinen die Faktor XII-Spiegel vermindert. Ob es sich hier eventuell um den Effekt eines erhöhten Verbrauchs des Gerinnungsfaktors handeln könnte und damit Alterationen im Gerinnungsstatus der Betroffenen zu suchen sind, kann aus diesem isolierten Ergebnis aber nicht geschlossen werden.

5.3.5 Komplement: C3, C5

Das **Komplement-System** ist ein Element der angeborenen, humoralen Immunabwehr und besteht aus etwa 34 einzelnen Proteinen mit meist proteolytischer Aktivität. Es wird von zahl-

reichen Regulatorproteinen im Plasma in Homöostase gehalten und kann über drei unterschiedliche Wege aktiviert werden: ein klassischer, ein alternativer und ein Lektin-*pathway* münden jeweils in die enzymatische Aktivierung des Komplementfaktors C3, der wiederum (zusammen mit weiteren Faktoren) als C5-Konvertase dient, deren Spaltprodukt C5b mit C6, C7, C8 und mehreren C9-Molekülen den C5b-9-Komplex oder *membrane attacking complex* (MAC) bildet, der eine Pore in Zellmembranen formt und so die Lyse der betreffenden Zelle einleitet. Die zahlreichen entstehenden, enzymatisch abgespaltenen Komplementfragmente haben chemotaktische und stimulatorische Wirkungen auf Immunzellen (Kotnik 2011). Für die Synthese des systemisch aktiven Komplementsystems ist größtenteils die Leber verantwortlich, die die Komplementproteine konstitutiv, aber insbesondere auf Zytokin-Stimuli wie IL-6 bei einer Infektion des Organismus vermehrt synthetisiert und ins Blut sezerniert.

C3 ist das quantitativ bedeutendste Komplementprotein im Serum. Natives C3 ist ein multifunktionelles Protein mit Möglichkeit zur Bindung von über 25 löslichen oder membran-gebundenen Partikeln. Durch die in der klassischen, Lektin- oder alternativen Komplementkaskade gebildete C3-Konvertase C3bBb erfolgt die proteolytische Aktivierung von C3: es entstehen C3b und das weitaus kleinere Fragment C3a. C3b ist zur Bindung weiterer Komplementkomponenten befähigt. In Abhängigkeit von diesen Bindungspartnern und den Oberflächenstrukturen, an denen C3b angelagert ist, kommt es dann entweder zur Amplifikation der C3-Konvertase und zur nachfolgenden Initiation des MAC oder zur Inaktivierung von C3b. Das zur Gruppe der Anaphylatoxine gehörige C3a ist ein potentes Chemokin (Carroll 2004).

C5 ist der Initiator der Effektorphase des Komplementsystems. Die Leber stellt den Hauptsyntheseort von C5 für dessen systemische Verfügbarkeit dar, lokal sind auch residente Makrophagen zur Synthese befähigt (Manthey *et al.* 2009). Sowohl die im klassischen oder Lektin-*pathway* gebildete C5-Konvertase C4b2a3b als auch die C5-Konvertase C3bBb3b der alternativen Komplementkaskade spalten die α -Kette des Proteins und generieren damit das kleinere Fragment C5a und das größere C5b (Woodruff *et al.* 2011).

Das Anaphylatoxin C5a gilt als eines der potentesten Chemokine des Immunsystems: es stimuliert Aktivitäten der neutrophilen Granulozyten wie die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Freisetzung von Enzymen und Zytokinen aus den Granula, begünstigt die Phagozytose, Chemotaxis und die Zytokinfreisetzung von Makrophagen und Monozyten, aktiviert Mastzellen, kostimuliert T-Lymphozyten – eine Brücke zur adaptiven Immunität – und erhöht die Endothelpermeabilität.

C5b ist das Schlüsselmolekül für die Bildung des MAC. Der Verlust von intrazellulären Energiesubstraten sowie ein massiver Ca^{2+} -Einstrom mit nachfolgendem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials sind die Pathomechanismen der Lyse von Zellen durch Bildung mehrerer MAC an der Zelloberfläche (*multi-hit characteristics*) (Tegla *et al.* 2011).

Humane Keratinozyten sind in der Lage, u. a. Faktor C3 teils konstitutiv, aber insbesondere auf Zytokinstimuli wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{IL-1}\alpha$ hin zu produzieren (Pasch *et al.* 2000), die Synthese von C3 in Fibroblasten der Haut wird durch IL-6, TNF und IL-17 gesteigert (Katz *et al.* 1989, Katz *et al.* 2000). Immunhistochemisch konnten nahe des *Stratum corneum* der psoriatischen Plaques granuläre Ansammlungen von C3b, in geringerem Ausmaß auch C3a, nachgewiesen werden, nicht jedoch in der Haut Gesunder und nicht betroffenen Hautarealen von Psoriasis-Patienten – ein Hinweis auf eine Aktivierung des Komplementsystems in läsionaler Haut (Ozawa *et al.* 2005). Pathogenetische Bedeutung erfährt dieser Befund dahingehend, als dass C3a als ein starkes Chemokin für DC wirkt, deren Rezeptor-besatz an C3aR (C3a-Rezeptor) zuvor durch Interferon-Stimulation vermehrt wurde (Gutzmer *et al.* 2004), und da C3a und dessen Spaltprodukte selbst antimikrobielle Wirkung besitzen, ähnlich den klassischen AMP der Keratinozyten (wie etwa Defensine, LL-37 oder Cathelicidine) (Nordahl *et al.* 2004). Ähnlich kann auch C5a aus psoriatischen Plaques extrahiert werden (Tagami 1992). Im Plasma und im Serum von Erkrankten fanden sich bisweilen signifikant erhöhte Spiegel an C3 und C3a (Kapp *et al.* 1985), weiterhin fanden sich erhöhte Konzentrationen an iC3b (inaktiviertes C3b) (Rosenberg *et al.* 1990). Auch genetische Polymorphismen für C3 bei Psoriasis wurden beschrieben (Acevedo und Hammar 1989).

Wir fanden in der multivariaten Analyse der ELISA-Daten einen signifikanten Anstieg der C3-Konzentration im Plasma der PsA-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen. Die absoluten Mittelwerte lassen auch eine Tendenz zu höheren C3-Spiegeln bei der Ps-Gruppe vermuten, welcher sich jedoch nicht signifikant ($p < .05$) darstellen ließ. Mit diesem Resultat können wir bereits berichtete C3-Spiegelaberrationen bestätigen. Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation jeweils mit den Variablen BMI und PASI – letzteres ist auf die Korrelation in der Subgruppe PsA zurückzuführen –, was unter dem Gesichtspunkt der Funktion als Akute-Phase-Protein des C3 zu sehen ist; außerdem sei an den Zusammenhang zwischen inflammatorischen Zytokinen und der induzierten lokalen Produktion von C3 in Keratinozyten erinnert. Der Ursprung der C3-Mengen im Plasma könnte unter Umständen auch zu geringen Teilen aus dieser lokalen Synthese stammen und somit zu den von uns gemessenen C3-Spiegeln beitragen.

Bei den C5-Konzentrationen berichten wir, basierend auf den Proteomvergleichen, über ten-

denziell niedrigere Mengen bei Erkrankung. Da auch C5 zu den positiven Akute-Phase-Proteinen zählt (Gabay und Kushner 1999), ist der tendenzielle Konzentrationsabfall in den untersuchten Proben der Erkrankten eventuell als erhöhter Verbrauch des Proteins zu diskutieren. So könnte eine zunehmende Spaltung und Transformation, welche aufgrund signifikant erhöhter Serummengen an C5b-9-Komplexen, den Endprodukten der Komplementkaskade, vermutet werden kann (Fleming *et al.* 1996), die Detektion von nativem C5 maskieren.

5.3.6 Proteaseinhibitoren: Inter- α -Trypsin-Inhibitor, α -1-Antichymotrypsin

Inter- α -Trypsin-Inhibitor (I α I) ist ein Serumprotein mit Proteinase-Inhibitoraktivität und ein Regulatorprotein der ECM. Trotz seiner konstitutiv relativ hohen Serumspiegel trägt es nur zu etwa 5% zur gesamten Protease-Inhibitor-Kapazität des Serums bei (Bost *et al.* 1998). Hepatozyten stellen den Hauptsyntheseort für die im Blut vorzufindenden I α I-Mengen dar. Akute Entzündungsreaktionen bzw. deren Effektorzytokine IL-1 und IL-6 führen zu einer differenzierten Induktion und Repression der einzelnen Proteinkomponenten (den schweren Ketten, H): es erfolgt eine Repression von H2/ITIH2, andererseits aber zu einer Induktion von H3/ITIH3 und H4/ITIH4 (Salier *et al.* 1996). In den letzten Jahren konnte sich ITIH4 dadurch als eigenständiges positives Akute-Phase-Protein etablieren (Piñeiro *et al.* 1999).

Eine weitere, wohl physiologisch bedeutendere Funktion des I α I, die ausschließlich von den schweren Ketten nach deren Abspaltung vom I α I-Komplex vermittelt wird, ist die kovalente Bindung an Hyaluronsäure, ein bedeutendes Makromolekül der ECM. Der dadurch gebildete Komplex ist robuster gegenüber freien Radikalen, bindet bevorzugt andere ECM-Moleküle und induziert damit die Aggregation größerer, makromolekularer Strukturen – die ECM wird also stabilisiert und deren weiterer Aufbau gefördert. Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen sind die gebildeten Hyaluronsäure-Schwerketten-Komplexe auffällig vorzufinden, wie etwa in der Gelenkflüssigkeit sowie im Serum bei der Rheumatoiden Arthritis (Zhuo *et al.* 2004).

In der vorliegenden Arbeit berichten wir, dem beschriebenen unterschiedlichen Transkriptionsmuster der Peptidketten nach Zytokinstimulation entsprechend, über auffällige Konzentrationen von drei ITIH4-Spaltprodukten (Protein-ID B7ZKJ8, Q14624-2 und Q14624-3) und einem ITIH2-Spaltprodukt (Protein-ID Q5T985). Erstere sind auch unter dem Gesichtspunkt der Induktion durch ein chronisch-entzündliches Milieu bei der Psoriasis zu betrachten, letzteres, ITIH2, zeigt eine verminderte Transkription nach Exposition mit den Initiatorzytokinen der Akutphase IL-1 und TNF- α (s. o.). Ein Anhalt für eine diagnostische Aussagekraft bei der PsA könnte die berichtete Assoziation von I α I mit der Rheumatoiden Arthritis bieten.

α 1-Antichymotrypsin (auch SERPINA3) ist ein Plasma-Serinprotease-Inhibitor. Die stärkste Expression zeigen Hepatozyten, die den Serumpool an α 1-Antichymotrypsin produzieren. α 1-Antichymotrypsin ist ein typisches Akute-Phase-Protein, dessen Serumspiegel durch eine IL-1-, IL-6-getriggerte Induktion in der Leber sich stark vervielfacht (Baker *et al.* 2007). Als Serummarker der aktuellen Krankheitsaktivität bei der Rheumatoiden Arthritis wurde α 1-Antichymotrypsin bereits 1988 vorgeschlagen (Chard *et al.* 1988).

Einen möglichen pathogenetischen Zusammenhang zu entzündlichen Hauterkrankungen wie der Psoriasis zeigen Han *et al.* in ihrer Studie über die spezifische Inhibitoraktivität von α 1-Antichymotrypsin auf MMP-9 in entzündeter Haut, welches von Keratinozyten und dermalen Fibroblasten auf Zytokinstimuli hin synthetisiert wird. Akut entzündete Haut (in der Studie durch Brandblasen induziert) zeigt erhöhte Mengen an α 1-Antichymotrypsin, welche durch die Inhibition der ECM-degradierenden MMP-9 die Wundheilung zu unterstützen scheinen. In chronischen Wunden jedoch findet sich vermehrt fragmentiertes und inaktives α 1-Antichymotrypsin und eine nachfolgend erhöhte Aktivität an MMP-9, welche für die Wundheilungsstörung mitverantwortlich sein könnten (Han *et al.* 2008). MMP-9, aber auch MMP-1 und -2 zeigen erhöhte Transkriptionsraten in psoriatisch veränderter Haut (Lee und Lew 2009).

Entgegen dem Verhalten des Proteins bei akuten Entzündungsgeschehen legen die massenspektrometrisch erhobenen Daten in vorliegender Arbeit erniedrigte α 1-Antichymotrypsin-Spiegel nahe, u. U. ein Korrelat der inaktiven Proteinmengen bei chronischer Entzündung.

5.3.7 Immunabwehr: NAAA, S100A7, PIGR

N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase (NAAA), auch *peptidoglycan-recognition protein 2* (PGLYRP2), ist ein hochkonserviertes Serum-Glykoprotein der angeborenen Immunabwehr mit antibakteriellen und inflammatorischen Funktionen. Es ist zur Hydrolyse von Peptidoglykanen, den Bestandteilen der bakteriellen Zellwände, befähigt und wirkt auch immunstimulatorisch (Dziarski und Gupta 2010).

Neben der konstitutiven Synthese durch Hepatozyten kann die NAAA-Expression auch in Keratinozyten induziert werden. In gesunder Haut ist es nicht nachweisbar; eine Stimulation durch Antigene Gram-positiver wie -negativer Bakterien bewirkt jedoch eine starke Induktion der NAAA-Expression in den Keratinozyten, die zugleich mit einer Expression von keratinozytären Differenzierungsmarkern wie Zytokeratinen einhergeht (Wang *et al.* 2005, Li *et al.* 2006). Park *et al.* konnten im Mausmodell zeigen, dass ein Fehlen von NAAA zu einer verstärkten, psoriasiformen Entzündung der Haut nach experimentell induzierter Irritation führt (Park *et al.* 2011). Daher scheint NAAA zum Schutz vor psoriasiformen Hautveränderungen

beizutragen und rückt damit ins Interesse der vorliegenden Arbeit. Die massenspektrometrischen Proteomvergleiche zeigen erhöhte NAAA-Konzentrationen bei der Schuppenflechte. Im angeschlossenen Immuntest ist der Anstieg in der grafischen Darstellung nachzuvollziehen, wenngleich sich dieser als nicht signifikant erwiesen hat.

S100A7 (Psoriasin) ist ein AMP, das erstmals in den frühen 90er Jahren aufgrund seiner starken Expression in Keratinozyten aus psoriatisch veränderter Haut identifiziert wurde, worauf sein Name zurückzuführen ist (Madsen *et al.* 1991). Es ist eines von mittlerweile über 20 Mitgliedern der S100-Familie, niedrigmolekulare, Calcium-bindende Proteine (Schäfer und Heizmann 1996), die in einem Gencluster auf dem q-Arm von Chromosom 1 codiert sind; es handelt sich bei diesem Genort (mit der Bezeichnung „*epidermal differentiation complex*“) um einen von mehreren Psoriasis-Suszeptibilitätsloci, die durch Genomanalysen bei hereditären Psoriasisfällen identifiziert wurden (die geschätzte Erblichkeit der Psoriasis liegt bei etwa 70-90 %). Allerdings finden sich (noch) keine typischen Mutationen/Polymorphismen des S100A7-Gens, die mit der Erkrankung assoziiert sind (Semprini *et al.* 1999). Die Expression von S100A7 ist gewebsspezifisch und ausschließlich auf Epithelzellen der Brustdrüse und Keratinozyten beschränkt; hierbei zeigt sich eine direkte Abhängigkeit vom Alter (Wittersheim *et al.* 2013), die wir mit unseren Daten reproduzieren konnten. Seine Transkription in der Zellkultur kann durch Retinsäure induziert werden (Watson *et al.* 1998, Gläser *et al.* 2011) – hierzu ist anzumerken, dass Derivate der Retinsäure (Retinoide) systemisch und auch lokal bei der Therapie der Psoriasis zum Einsatz kommen (Van De Kerkhof 2006).

Seine wichtigste Aufgabe erfüllt S100A7 als antimikrobielles Agens bei der angeborenen Immunabwehr. *In vivo*- und *in vitro*-Analysen haben es als das Schlüsselmolekül bei der immunologischen Haut- und Schleimhautbarriere und der Wundheilung der Haut identifiziert, da es für die effiziente Abtötung von Mikroorganismen verantwortlich ist. Ein Mechanismus der bakteriziden Aktivität ist die Fähigkeit des Proteins zur Porenbildung in den Membranen der pathogenen Organismen (Michalek *et al.* 2009), ein weiterer potenziell zytotoxischer Effekt könnte in der S100A7-bedingten Induktion von ROS in epithelialen und endothelialen Zellen liegen (Shubbar *et al.* 2012); hierbei ist zu ergänzen, dass auch S100A7 selbst durch ROS induzierbar ist (Carlsson *et al.* 2005). Hierzu kommt eine chemotaktische Aktivität des Proteins, besonders auf Lymphozyten und Granulozyten (Wolf *et al.* 2008). Johnston *et al.* konnten zeigen, dass IL-17C, die quantitativ bedeutendste Unterform von IL-17 in psoriatisch veränderter Haut, zur Induktion u. a. von S100A7 in Keratinozyten sowie bei einer keratinozytären Überexpression im Tierversuch zu einer psoriasiformen Hautveränderung führt (Johnston *et*

al. 2013). Auch IL-22, in psoriatischen Plaques und im Serum von Psoriasis-Patienten in erhöhten Spiegeln vorzufinden, induziert u. a. die Transkription der AMP S100A7, aber auch Calgranulin A (S100A8) und B (S100A9) (Wolk *et al.* 2006).

Die starke Aberration des Proteins bei der Schuppenflechte und seine hinreichende Gewebsspezifität prädestinieren es als einen Biomarker für die Krankheitsentität. Als Gewebsmarker ist es zuverlässig in Hautbiopsien aus klinisch auffälligen Arealen erhöht nachweisbar, was zur nachfolgenden Prüfung von S100A7 als möglicher Serumbiomarker geführt hat (Williamson *et al.* 2013). In der Tat zeigten sich bei Patienten mit kutaner Psoriasis signifikant erhöhte Serumspiegel gegenüber gesunden Kontrollpersonen sowie gegenüber Patienten mit PsA. Weiterhin korrelierten die S100A7-Serumspiegel mit dem PASI-Score und zeigten außerdem eine unabhängige Assoziation mit dem Vorhandensein einer Adipositas der Patienten (Salama *et al.* 2013). Es sei an dieser Stelle ergänzt, dass auch andere AMP, namentlich S100A8/9 (Calgranulin A/B) und besonders β -Defensin, in den Seren von Psoriasis-Patienten in erhöhten Spiegeln nachzuweisen waren (Enerbäck 2011). Allerdings ist eine Alteration der S100A7-Expression auch bei weiteren Hauterkrankungen und akuten und chronischen Wunden bekannt (Gläser *et al.* 2011), sodass S100A7 eher einen symptom-spezifischen Marker für eine Hyperproliferation und inflammatorische Veränderung der Haut darzustellen scheint als einen Psoriasis-typischen Marker.

Uneinheitliche Plasmaspiegelaberrationen zeigen sich sowohl in den von uns vorgestellten MS-Daten als auch im angeschlossenen ELISA. Dessen grafisch dargestellte Ergebnisse ermöglichen allerdings eine potenzielle Erklärung hierfür: während sich die S100A7-Mengen in der PsA-Gruppe eher unauffällig präsentieren, zeigt die Psoriasis-Gruppe eine Tendenz zu höheren und variableren Plasmaspiegeln.

Der ***polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)*** ist ein Transmembranprotein, das von Mukosa-Epithelzellen, insbesondere im Intestinum, dem Respirations- sowie dem Urogenitaltrakt, exprimiert wird. In seiner Funktion, Immunglobulin A (IgA) zu binden, spielt es eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der immunologischen Schleimhautbarriere des Menschen: die Zellmembran der auf der Basalmembran aufsitzenden Epithelzellen wird durch kranzförmig um die säulenartige Zelle verlaufende Zell-zu-Zell-Verbindungen, den sog. *tight junctions*, in eine basolaterale und eine apikale Seite getrennt. Die *tight junctions* verhindern einen Transfer von Membranproteinen zwischen beiden Membrankompartimenten. Neu synthetisierter PIGR gelangt zunächst an die basolaterale Zellmembran. Dort bindet er dimeres IgA (zwei IgA-Moleküle, die durch eine verbindende J-Kette gekoppelt sind), das von Plas-

mazellen in der subepithelialen *Lamina propria* der Schleimhäute sezerniert wird, an der J-Kette und wird daraufhin endozytiert. Das Endosom verschmilzt schließlich mit der apikalen Zellmembran. Der nun membranständige IgA/PIGR-Komplex wird von einem bisher nicht genauer identifizierten Enzym gespalten, sodass ein Komplex aus dem dimeren IgA, der J-Kette und einem Bruchstück des PIGR (der sog. sekretorischen Komponente) freigesetzt wird, das sekretorische IgA (sIgA) (Kaetzel 2005, Asano und Komiyama 2011). Dieses ist elementarer Bestandteil der Mukosabarriere und schützt den Organismus vor mikrobiellen Pathogenen (Brandtzaeg 2013). Die Regulation der Expression von PIGR wird in besonderem Maße von Zytokinen beeinflusst. IFN- γ , IL-1 β , IL-4 und TNF- α fördern die PIGR-Expression (Piskurich *et al.* 1997, Blanch *et al.* 1999, Bruno und Kaetzel 2005). Auch körperfremde Moleküle, sog. *microbial-associated molecular patterns* wie etwa Lipopolysaccharide oder Doppelstrang-RNA, sind in der Lage, die Produktion von PIGR in den Epithelzellen zu stimulieren (Johansen und Kaetzel 2011). Jaffar *et al.* beschrieben die starke Korrelation zwischen der Infiltration des Lungengewebes mit Th17-Zellen sowie dem Vorhandensein von IL-17 und der dortigen verstärkten Expression von PIGR (Jaffar *et al.* 2009); zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Cao *et al.* im intestinalen Epithel (Cao *et al.* 2012), was auf eine bedeutende pathomechanistische Rolle von PIGR in Th17-Zell-medierten entzündlichen Erkrankungen der Lunge und des Gastrointestinaltrakts hinweist.

Nihei *et al.* konnten *in vitro* die gesteigerte Expression der sekretorischen Komponente des PIGR in Keratinozyten-Zelllinien, die von Psoriasis-Patienten stammten, nach Stimulation mit IFN- γ nachweisen (Nihei *et al.* 1996). Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte auch die regulatorischen Effekte von freier sekretorischer Komponente auf Keratinozyten: es wirkt als Inhibitor von IFN- γ , indem es dessen Effekte, die Hochregulation von ICAM-1 und HLA-DR auf der Keratinozytenoberfläche, supprimiert (Nihei *et al.* 1995). Dies suggeriert antiinflammatorische Effekte der sekretorischen Komponente in entzündlichen Hauterkrankungen.

Unsere Ergebnisse zeigen signifikant geringere PIGR-Plasmaspiegel der PsA-Patienten gegenüber den Kontrollprobanden. Eine ähnlich abfallende Tendenz zeigt sich auch in den Werten der Psoriasis-Patienten. Dieses Resultat erscheint angesichts der Induktion des Proteins durch inflammatorische Zytokine in Epithelzellen und Keratinozyten überraschend. Allerdings beschränken sich die Literaturberichte auf die Untersuchung isolierter Zellverbände und Gewebe, sodass über die Konzentrationen von PIGR in Körperflüssigkeiten wie Plasma keine definitiven Aussagen getroffen werden können. Vielmehr zeigt sich eine vermehrte Transzytose von PIGR (mit gebundenem IgA) auf Stimulation durch IFN- γ und IL-4 in Epithelien (Amin *et al.* 2007), d. h., es erfolgt ein Transport des Proteins nach intraluminal bzw. extra-

korporal, wodurch es sich einer Detektion im Blutplasma natürlich entzieht und so verminderte Blutkonzentrationen trotz Expressionsinduktion erklärt werden könnten. Zum anderen ist in Erwägung zu ziehen, dass sich die berichteten Ergebnisse auf die sekretorische Komponente des PIGR beziehen, was somit nur einen – prozessierten – Teil des Proteins darstellt und zu anderen Ergebnissen in einem Sandwich-ELISA führen könnte als das komplette Protein. Allerdings beobachten wir auch einen direkten Zusammenhang zwischen der PIGR-Konzentrationen im Plasma und dem PASI-Wert – eventuell ein Korrelat der *up*-Regulation des Proteins bei zunehmend entzündlichem Milieu im Körper (gemessen als Ausmaß und Schwere des Psoriasis-Hautbefalls im PASI).

5.3.8 Kallikreine: Plasma-Kallikrein, Kallikrein 8

Das Kallikrein-Kinin-System (KKS) ist ein Netzwerk unterschiedlicher multifunktionaler Enzyme bzw. Zymogene in Blut und Gewebe des menschlichen Organismus. Vereinfacht lassen sich die effektorischen Kinine von den diese spaltenden und damit aktivierenden Kallikreinen unterscheiden. Ein Effektormolekül des KKS ist das HMW-Kininogen-Spaltprodukt Bradykinin, welches vasodilatierende und fibrinolytische Wirkungen hat.

Plasma-Kallikrein wird von Hepatozyten als Präkallikrein in das Blut sezerniert, dort an sein künftiges Substrat HMW-Kininogen gebunden und erst durch enzymatische Spaltung in seine reife Struktur transformiert (Chung *et al.* 1986). Aktives Kallikrein ist beteiligt an der enzymatischen Aktivierung des bereits erwähnten Faktor XII und stellt damit ein Bindeglied zwischen KKS und Gerinnungssystem dar (Schmaier 2000). Es ist weiterhin ein potentes Stimulans für neutrophile Granulozyten und führt zu einer Aggregation und Aktivierung des *oxidative burst*, also der Freisetzung antimikrobiell wirksamer ROS (Schapira *et al.* 1982) sowie der Freisetzung der Neutrophilen-Elastase (Wachtfogel *et al.* 1983). Auch die dem Kallikrein in der Zymogenkaskade nachgeschalteten HMW-Kininogen-Spaltprodukte haben immunmodulatorische Funktionen und triggern beispielsweise die Freisetzung von Zyto- und Chemokinen aus Monozyten (Khan *et al.* 2006).

Diese immunmodulatorischen Effekte des KKS erlangen pathophysiologische Bedeutung bei inflammatorischen Krankheitsbildern. Bei entzündlichen Gelenkerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis stimulieren vermehrt generierte Kinine die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Effektorstoffe (darunter Prostaglandine, Leukotriene, Histamin) im Gelenk (Sharma 1991), Plasma-Kallikrein selbst lässt sich in der Synovialflüssigkeit entzündeter Gelenke bei Rheumatoider, psoriatischer und Osteoarthritis nachweisen (Rahman *et al.* 1995).

Allerdings konnte Plasma-Kallikrein auch schon früh aus psoriatischen Plaques iso-

liert werden (Toshihiko *et al.* 1988). Plasma-Präkallikrein wurde in artifiziell erzeugten Blasen der nicht-läsionalen Haut in signifikant höheren Konzentrationen nachgewiesen als bei gesunden Kontrollprobanden (Thomas *et al.* 1992). Kolosovsky beschreibt erhöhte Serumspiegel an Kallikrein und Präkallikrein bei Psoriasis-Patienten (Kolosovsky 1994).

Wir berichten über signifikant niedrigere Plasma-Kallikrein-Konzentrationen im Blut von PsA- und Psoriasis-Patienten gegenüber Gesunden und können damit die Ergebnisse von Kolosovsky nicht reproduzieren. Uns ist keine Arbeit bekannt, die über eine explizite Expressionsinduktion von Plasma-Kallikrein bei der Psoriasis berichtet. Eine Erniedrigung der Plasmakonzentration könnte also grundsätzlich auf eine Repression der Expression oder einen erhöhten Abbau zurückzuführen sein. Einen Anhaltspunkt für eine mögliche Erklärung der erniedrigten Plasma-Kallikrein-Mengen in der chronisch-inflammatorischen Systemerkrankung Psoriasis finden wir in der Tatsache, dass sich der Abbau von Plasma-Kallikrein durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in der Leber während der Akute-Phase-Reaktion einer Entzündung beschleunigt (Martins *et al.* 1992) – so könnten verminderte Plasmaspiegel durch verbesserte Clearance des Blutes resultieren. Die ebenfalls von uns identifizierte negative Korrelation mit dem PASI, speziell in der Gruppe der Psoriasis-Patienten, könnte hier ihre Entsprechung finden, wenn der PASI-Wert vereinfachend als Marker der Entzündungsaktivität der Erkrankung angesehen werden kann.

Gewebskallikreine sind phylogenetisch mittel- bis hochgradig konservierte Serinproteasen. Für die vorliegende Arbeit interessieren die Kallikreine in der Haut. Quantifizierung der einzelnen Kallikreine zeigten dort die relativ höchsten Mengen an den Gewebeskallikreinen 7, 8 und 11, gefolgt von 5, während die Gewebeskallikreine 10, 14, 6 und 13 in sehr geringen Mengen nachzuweisen waren (Komatsu *et al.* 2005b).

Kallikrein 8 (Genname KLK8) ist ein Kallikrein, das von seiner Expression in der Haut und im zentralen Nervensystem bzw. den diese Organe betreffenden Krankheitsbildern bei einem Defekt von Kallikrein 8 geprägt ist (Yoshida 2010). Bestandteile der ECM (z. B. Typ IV-Keratin) und Fibronectin dienen als Substrate für Kallikrein 8 (Kishi *et al.* 2006). In der Haut ist die Kallikrein 8-Sekretion auf Keratinozyten beschränkt, weder Melanozyten noch dermale Fibroblasten sind im gesunden Gewebe dazu in der Lage. Die Sekretion zeigt eine Abhängigkeit vom Reifungsstatus der epidermalen Keratinozyten und nimmt zur terminalen Ausdifferenzierung hin zu (Eissa *et al.* 2011). Bei der Regeneration der Haut nach Entzündung oder der Wundheilung erfolgt eine Hochregulation von Kallikrein 8 in der Epidermis (Kirihara *et al.* 2003). Dies legt einen möglichen pathophysiologischen Zusammenhang zur Psoriasis be-

reits nahe. In der Tat zeigen sich immunfluoreszenzanalytisch in Hautbiopsien aus psoriatischen Plaques signalintensive Ablagerungen von markiertem Kallikrein 8 im *Stratum spinosum* und *granulosum*. Nicht betroffene Haut von Psoriasis-Patienten hingegen zeigte nur schwache Signale, entsprechend der niedrigen physiologischen Expression in gesundem, adultem Gewebe. Allerdings zeigte sich, wenngleich in geringerem Ausmaß, ein ähnliches Ergebnis bei anderen Hauterkrankungen, die mit einer Hyperkeratose einhergehen, wie der seborrhoischen Keratose, dem *Lichen planus*, der atopischen Dermatitis oder dem verhornenden Plattenepithelkarzinom (Kuwaie *et al.* 2002, Komatsu *et al.* 2005a, Komatsu *et al.* 2007). Kallikrein 8 ist besonders in die terminale Differenzierung der Keratinozyten involviert; somit scheint sich seine Spezifität als Gewebemarker auf hyperkeratotische Zustände einzuschränken (Kuwaie *et al.* 2002). Kishibe *et al.* zeigten im experimentell induzierten Psoriasis-Mausmodell eine starke Hochregulation der Expression von KLK8 und in dessen Abhängigkeit auch von KLK6 und KLK7. *Klk8*^{-/-} -*knockout*-Mäuse hingegen zeigen kaum Mehrexpression der Kallikreine 6 und 7 und imponierten mit epidermaler Hypoproliferation und einer parakeratotischen Verhornungsstörung. Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus könnte die ausbleibende Aufspaltung von corneodesmosomalen Adhäsionsmolekülen durch die drei induzierten Kallikreine sein (Kishibe *et al.* 2007).

Eissa *et al.* konnten erhöhte Konzentrationen an Kallikrein 8 zum einen in der Synovialflüssigkeit betroffener Gelenke bei PsA, zum anderen aber auch im Serum von Psoriasis-Patienten zeigen. Die Serumspiegel erlaubten jedoch keine Unterscheidung zwischen Patienten mit rein kutaner Psoriasis und solchen mit PsA, dafür korrelierten sie, unabhängig von Alter, Geschlecht oder Krankheitsdauer, mit dem PASI-Score; ein Anhalt auf einen kutanen Fokus als Quelle. Von einer möglichen Verwendung von Kallikrein 8 als Biomarker für die PsA sehen die Autoren daher ab, ziehen es dafür aber als Möglichkeit zum Monitoring der Krankheitsaktivität und des Therapieerfolgs der kutanen Psoriasis und der PsA in Betracht (Eissa *et al.* 2013).

Aufgrund dieser vielversprechenden Berichte über das Protein wurde es von uns mit einem ELISA im Plasma quantifiziert, obwohl die MS-Daten keine Informationen über Kallikrein 8 gewähren konnten. Mit den immunologischen Daten können wir in unserem Probandenkollektiv keine auffälligen Plasmaspiegelschwankungen des Proteins ausmachen.

5.3.9 Nicht funktionell gruppierte Proteine

Zink- α -Glykoprotein (Zn- α -GP) ist ein den MHC-I-Molekülen strukturverwandtes Mitglied der Immunoglobulin-Superfamilie, welches von diversen Drüsen des menschlichen Körpers,

Adipozyten und einigen Tumorzelllinien produziert und in Körperflüssigkeiten sezerniert wird. Im Serum vorzufindendes Zn- α -GP wird von den Hepatozyten in das Blut abgegeben. Seine Expression wird vornehmlich von Androgenen und Progestagenen reguliert; Glukokortikoide induzieren besonders die Zn- α -GP-Synthese in Adipozyten. Trotz derzeit noch nicht sicher geklärter Funktion des Proteins gilt Zn- α -GP als ein multidisziplinäres Biomolekül. Ähnlich den strukturverwandten MHC-I-Molekülen ist auch Zn- α -GP zur Bindung von beispielsweise RNA oder RNA-Abbauprodukten befähigt und könnte auch eine Rolle bei der Immunregulation spielen. Seine klinisch bedeutsamste Funktion liegt jedoch am ehesten in seiner Aktivität auf den Fettstoffwechsel: es induziert in Adipozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Lipolyse (Hassan *et al.* 2008). Beim Menschen finden sich signifikant reduzierte Serum-Zn- α -GP-Spiegel in adipösen Versuchspersonen im Vergleich zu Gesunden (Ceperuelo-Mallafre *et al.* 2009), allerdings finden sich bei Yeung *et al.* erhöhte Plasmaspiegel an Zn- α -GP in Assoziation mit dem Vorhandensein von Symptomen des Metabolischen Syndroms (Yeung *et al.* 2009).

Die Bedeutung von Zn- α -GP in der Haut ist bislang kaum definiert. Lei *et al.* konnten seine Expression in Epidermiszellen und auch seine Assoziation mit einer zunehmenden Differenzierung der Keratinozyten zeigen (Lei *et al.* 1997). Eine Beschreibung des Proteins im Zusammenhang mit nicht-neoplastischen Erkrankungen der Haut zeigte sich in einer überblickenden Literaturrecherche nicht. Allerdings erscheint die Bedeutung von Zn- α -GP auf den Fettstoffwechsel auch im Hinblick auf die Psoriasis insofern erwähnenswert, da Symptome des Metabolischen Syndroms eine gut bekannte Komorbidität der Erkrankung darstellen.

Es zeigten sich in der vorliegenden Arbeit signifikante Erniedrigungen der Zn- α -GP-Plasmaspiegel in Psoriasis- und PsA-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Zwar könnte eine Parallele zu den Ergebnissen erniedrigter Zn- α -GP-Spiegel bei adipösen gegenüber normalgewichtigen Personen, d. h. unabhängig von einer zusätzlich vorliegenden Hauterkrankung, gezogen werden, allerdings zeigte sich bei den von uns erhobenen Daten keine Korrelation der Zn- α -GP-Konzentrationen mit dem BMI der Probanden, was diesen als mögliche Kovariate in den Hintergrund treten lässt. Allerdings zeigte sich ein Zusammenhang mit dem weiblichen Geschlecht der Patienten (Tab. 12) – eventuell findet sich hier das Korrelat eines bei Frauen physiologisch höheren Körperfettanteils.

Angiotensinogen (SERPINA8) ist ein Plasma-Glykoprotein und bildet das systemische Reservoir für Angiotensin I, das aus seiner Spaltung gebildet wird. Die Leber ist der Hauptproduktionsort für Angiotensinogen, welches sie nach Synthese komplett sezerniert. Die Plasma-

spiegel von Angiotensinogen steigen in der Akute-Phase-Reaktion auf bis das Fünffache an, was auf die Induktion durch IL-1 und TNF in den Leberzellen zurückzuführen ist; Angiotensinogen gehört daher zu den positiven Akute-Phase-Proteinen (Morgan *et al.* 1996). Die Spaltung von Angiotensinogen ist *in vivo* dem Renin vorbehalten, einer Protease der Zellen des juxtaglomerulären Apparats in der Niere. Diese enzymatische Reaktion ist der erste und zugleich geschwindigkeitslimitierende Schritt des Renin-Angiotensin-Systems. Da Angiotensinogen (bzw. dessen aktive Fragmente) seine Hauptaufgabe bei der Blutdruckregulation erfüllt, erscheint es auch einleuchtend, dass es in hypertensiven Konditionen pathophysiologisch beteiligt ist: Jeunemaitre *et al.* berichten aus Geschwister- und Populations-basierten Studien über die Assoziation bestimmter Genotypen und Varianten des codierenden Angiotensinogen-Gens mit der Prävalenz eines Hypertonus und teils erhöhten Serum-Angiotensinogenspiegeln (Jeunemaitre *et al.* 1992). Bei dem Krankheitsbild der arteriellen Hypertonie kommt auch eine lokale Produktion von Angiotensinogen durch das subkutane Fettgewebe zum Tragen: Die Aktivität von Angiotensin/Angiotensinogen im Fettgewebe wurde, in Abgrenzung zum plasmatischen Renin-Angiotensin-System, als lokales Renin-Angiotensin-System bezeichnet, obwohl es neben seiner auto- und parakrinen Effekte auf die Adipozyten auch systemisch wirksam ist: *knockout* der fettgewebsspezifischen Angiotensinogen-Expression führt zu um 25 % reduzierten Serum-Angiotensinogenspiegeln, eine Überexpression hingegen zu etwa 30 % erhöhten Serumspiegeln, Hypertonie und einer Insulinresistenz im Mausmodell (Kalupahana und Moustaid-Moussa 2012b). Letztere schlägt die Brücke zwischen Angiotensinogen, entzündlich aktivem Fettgewebe, einer metabolischen Dysbalance des Glukosestoffwechsels und einer Adipositas (Kalupahana *et al.* 2012, Kalupahana und Moustaid-Moussa 2012a).

Im Zusammenhang mit der Psoriasis – neben der Verbindung zum Metabolischen Syndrom – konnten Vašků *et al.* zeigen, dass bestimmte Angiotensinogen-Genotypen mit dem Erkrankungsrisiko und einer positiven Eigenanamnese für ein oder mehrere Tonsillitiden (in der Kindheit) assoziiert ist (Vašků *et al.* 2000). An eine molekulare Mimikry der Streptokokkenantigene, welche durch Infektion mit Streptokokken – typischerweise in Form einer solchen Tonsillitis – möglicherweise eine Psoriasis in prädisponierten Personen triggern kann, sei in diesem Zusammenhang verwiesen. Unsere MS-Daten zeigen orientierend allerdings erniedrigte Angiotensinogen-Konzentrationen im Plasma der Erkrankten.

Paraoxonasen (PON) sind eine Gruppe von Enzymen, die für die Hydrolyse von Organophosphaten und anderen Xenobiotika zuständig sind. Ein kleiner Teil der von den Hepatozy-

ten synthetisierten **Serum-Paraoxonase (PON1)** wird auch in das Blut sezerniert. Neben der Hydrolyse aktiver Metaboliten von Organophosphat-basierten Insektiziden und Nervengiften hat es auch eine bedeutende physiologische Aufgabe für endogene, körpereigene Substrate: es inhibiert die Oxidation von LDL- sowie HDL-Partikeln und fördert die Clearance von bereits oxidiertem LDL oder HDL. Damit scheint PON1 eine essenzielle pathomechanistische Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen zu spielen, da es vor oxidierten Lipoproteinen, besonders oxLDL, die entscheidend mit der subintimalen Ansammlung von Schaumzellen und Genese arteriosklerotischer Plaques in Verbindung gebracht werden, zu schützen scheint (Costa *et al.* 2005). Vielfach berichtet ist die Assoziation von PON1 mit kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der Arteriosklerose, daher ist PON1 bzw. seine Aktivität im Serum bereits als möglicher Biomarker für die Schwere einer koronaren Herzkrankheit in Diskussion (Zhou *et al.* 2013).

Bei der Psoriasis fanden Ramadan *et al.* erniedrigte PON1-Mengen in Biopsien betroffener Haut sowie in der venösen Blutprobe (Ramadan *et al.* 2013). Letzteres bestätigen auch Ferretti *et al.* (Ferretti *et al.* 2012) sowie unsere eigenen Resultate der MS-Proteomanalyse. Die reduzierte PON1-Aktivität wird durch das zusätzliche Vorhandensein einer Adipositas der Patienten noch verstärkt (Usta *et al.* 2011). Toker *et al.* berichten hingegen über erhöhte PON1-Spiegel und -Aktivität im Blut von Psoriasis-Patienten bei zugleich unauffälligen Serumlipidprofilen gegenüber Gesunden (Toker *et al.* 2009).

5.4 Ergebnisse der Kombinatorik: Biomarkermuster

Durch die Kombination mehrerer Biomarkerkandidaten können wir weitaus spezifischere Parameter präsentieren, die die Diskriminierung zwischen den Gruppen Kontrolle, Psoriasis und PsA augenscheinlich besser ermöglichen. Schon bei den relativ kleinen Stichprobenzahlen der vorliegenden Arbeit zeigten sich hier 15 Kombinationen zweier bzw. dreier Kandidatenproteine mit signifikanten Gruppenunterschieden. Für die Diskriminierung der Zustände „gesund“, „Psoriasis“ und „PsA“ ist die Aussagekraft der Biomarkermuster hinsichtlich signifikanter Unterschiede in einem paarweisen Vergleich erforderlich. Wir können über elf Biomarkerprofile berichten, die hier zu einer hinreichenden Abgrenzung einzelner Gruppen in der Lage sind und mit ihren jeweiligen signifikanten Subgruppenunterschieden nochmals vereinfacht in Tab. 15 dargestellt sind:

Tab. 15: Biomarkerkombinationen und signifikante Subgruppenunterschiede (dargestellt als x entsprechend p -Werten <0.05)

	Kontrolle – Ps	Kontrolle – PsA	Ps – PsA
Plasmakallikrein*PIGR	x	x	
NAAA*C3	x	x	
S100A7*C3	x		
S100A7*Cytokeratin 17	x		
Cytokeratin 17*Kallikrein 8	x	x	
Vit.D bind. Protein*C3	x	x	
Vit.D bind. Protein*Cytokeratin 17	x	x	
PIGR*FAM83H		x	
Haptoglobin*COMP			x
Plasmakallikrein/C3	x	x	
NAAA*C3*Cytokeratin 17	x	x	

Diese Muster könnten sich für jeweilige Fragestellungen eignen, wie etwa die Abgrenzung der Psoriasis gegen gesunde Kontrollen durch die Kombinationen S100A7*C3 und S100A7*Cytokeratin 17. Da wir den Ursprung der detektierten S100A7- und Cytokeratin 17-Mengen in der psoriatisch betroffenen Haut vermuten und zudem sowohl Cytokeratin 17 als auch C3 positiv mit dem PASI-Wert korrelieren, erscheinen uns diese beiden Biomarkermuster als mögliche Indikatoren der Schwere der Hautbeteiligung.

Ebenso auffallend präsentiert sich die Kombination Haptoglobin*COMP, durch die die Abgrenzung der PsA von Psoriasis-Erkrankten ohne Arthritis gelang und die eventuell bei der Diagnostik unklarer Gelenkbeschwerden bei Psoriasis-Patienten Anwendung finden könnte, um eine PsA gegenüber anderen Arthritiden ausschließen oder frühzeitig detektieren zu können.

Eine weitere Biomarkerkombination erscheint uns in besonderem Maße erwähnenswert: PIGR*FAM83H zeigt eine signifikante Unterscheidung zwischen PsA-Patienten und Gesunden. Hierin liegt künftig die Möglichkeit, die PsA unabhängig von einer vorherigen Diagnose einer Psoriasis der Haut zu detektieren, d. h., dermatologisch gesund erscheinende Patienten mit Gelenkbeschwerden könnten gezielt auf eine mögliche Manifestation einer PsA ohne vorherige Manifestation an der Haut untersucht werden.

5.5 Methodenkritik

5.5.1 Auswertung der MS-Daten

In unserem sehr breit aufgestellten Ansatz einer hypothesenfreien Suche nach Biomarkerkandidaten kam die von der AG *Proteomics* entwickelte Probenaufbereitung der zwei- bzw. dreidimensionalen, chromatographischen Proteinseparation zum Einsatz. Da die Konzentrationen

der im Plasma vorzufindenden Proteine in Dimensionen von bis zu Faktor 10^{10} schwanken können und eine einzelne massenspektrometrische Analyse dieses Spektrum nicht hinreichend umfassen kann, erfolgt eine präzise Probenprozessierung und Separation in viele, zwischen verschiedenen Proben vergleichbare Einzelfraktionen. Damit wird versucht, auch niedrigkonzentrierte Biomoleküle noch detektieren zu können, die sonst möglicherweise unter der Redundanz und Signalsuppression „typischer“, hochkonzentrierter Plasmaproteine unentdeckt bleiben (Jacobs *et al.* 2005). Die Automatisierung der Sampleprozessierung in dieser Art und Weise hat bereits zu vielversprechenden Biomarkerkandidaten geführt (Baum *et al.* 2008, Pohl *et al.* 2013), ist allerdings dennoch neu und eine noch selten genutzte Methode, für die übliche Auswerteprogramme nicht konzipiert wurden. Aus diesem Grund stellte sich die Frage einer möglichst geeigneten Auswertemethode der von uns erhobenen Daten, die ja in ihrer Menge aufgrund der feingliedrigen Fraktionierung das Ausmaß üblicher massenspektrometrischer Analysen weit übersteigen. Ein Analyseprogramm, das alle Informationen in den einzelnen Fraktionen und zugleich die Informationen, die die Fraktionen in ihrer Beziehung zueinander (Clusterbildung) und ihrer Lokalisation in der 2D-Matrix (Größe, Ladung als Verhalten in SEC und AEC) berücksichtigt, ist uns bislang nicht bekannt, daher sollte die Auswertung unserer Daten durch mehrere verschiedene Programme parallel erfolgen, die sich in ihren Schwerpunkten möglichst ergänzen und deren Schwächen im Umgang mit den vorliegenden Datenmengen damit möglichst minimiert werden sollen. Es wurden die drei Programme *SIEVE*TM, *MetaboAnalyst* und *Proteome Discoverer*TM gewählt. Deren Auswertemechanismen sind bereits schematisch beschrieben worden; eine stichpunktartige Charakterisierung der Methoden zeigt nachfolgende Tabelle (Tab. 16).

Tab. 16: Methodencharakterisierung der Auswertung der MS-Daten

<i>SIEVE</i> TM	<i>MetaboAnalyst</i>	<i>Proteome Discoverer</i> TM
<ul style="list-style-type: none"> • Erhalt der Information über Masse, Ladung, Glycosylierung, mögliche Proteincluster und damit verlässlichere Interpretation der Daten als bei Einzelfraktion-Werten • manuelle Auswertung (Clusterbildung) stark untersucherabhängig und schwer reproduzierbar • es erfolgt bereits eine zielgerichtete Sichtung der Proteine (Information in Literatur) 	<ul style="list-style-type: none"> • massive Datenreduktion • keine Abhängigkeit vom auswertenden Untersucher, reproduzierbar • Verlust der Vorteile der 2D-/3D-Chromatographie und Verlust der Information über Proteincluster (nur maximale AUC einer Fraktion) 	<ul style="list-style-type: none"> • keine Untersucherabhängigkeit, reproduzierbar • Möglichkeit der Nutzung weiterer massenspektrometrischer Informationen des Programms über die detektierten Peptide • Verlust der Information über Proteincluster (nur maximale AUC einer Fraktion) • Ausgabe eines detektierten Peptidfragments als mehrere Isoformen möglich

Durch die Kombination und parallele Auswertung der Daten durch diese drei Programme und der anschließenden zusammenführenden Evaluation der Ergebnisse durch ein viertes *Scoring*-System erreichen wir die uns derzeit bestmögliche Auswahl von Biomarkerkandidaten. Dennoch ist nicht von der Hand zu weisen, dass keine der drei Optionen optimal auf die Auswertung der fraktionierten Daten ausgelegt ist und deren jeweilige Einzel-Ergebnistabellen mit Bedacht zu interpretieren sind. Die mit unseren Verfahren vorgeschlagenen Biomarkerkandidaten sind daher das dominierende Resultat aus sehr komplexen Analyseverfahren. Möglicherweise wurden trotz der größtmöglichen Plausibilität wertvolle Biomarkerkandidaten übersehen, weil sie durch die notgedrungenermaßen angewandte Software-Kombination nicht redundant genug aufgefallen sind. Für künftige Studien mit ähnlichem Design würde sich also eine primär komplementäre Analyseverfahren, die insbesondere die Fraktionierung des Plasmaproteoms und der darin zu findenden Proteincluster berücksichtigt, empfehlen. Zu diesem Zweck befindet sich die AG *Proteomics* derzeit bereits in Zusammenarbeit mit Entwicklern der X-CASE GmbH, um eine auf die Detektion von Biomarkern und Plasmaproteomaberrationen spezialisierte Software zu erstellen, die dann den umfangreichen Auswerteprozess vereinfachen und automatisieren soll.

5.5.2 Design der gematchten Patient-Kontrolle-Paare

Die Plasmaproben wurden paarweise analysiert mit jeweils zu den Patientenprofilen gematchten Kontrollplasmen. Dieser Ansatz wurde von uns gewählt analog zu vorangegangenen *Proteomics*-Studien der Arbeitsgruppe (Baum *et al.* 2008, Pohl *et al.* 2013). Mit der angestrebten Zuordnung von Patienten und Kontrollpersonen nach den Kriterien Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht und BMI sollen physiologische, interindividuelle Aberrationen der Plasma-proteine, die durch diese Größen beeinflussbar wären, weitgehend minimiert werden. Trotzdem sind, wie aus unseren und Ergebnissen anderer Studien (Alsaif *et al.* 2012) bereits ersichtlich, individuell voneinander abweichende Plasmaproteom-Profile, unabhängig vom Vorhandensein einer Erkrankung, zu erwarten (Horn *et al.* 2006). Daher erfolgte die Interpretation der Ergebnisse von unserer Seite aus unter dem Schwerpunkt der Abweichungen in mehreren Paaren (*SIEVE*TM und *Proteome Discoverer*TM) bzw. der Unterscheidung der Patienten- und Kontrollgruppe (*MetaboAnalyst*); stark variable Blutproteine, wie etwa die Fraktion der γ -Globuline, treten in den Hintergrund. Durch die Tatsache, dass viele der gefundenen Proteine in den jeweiligen Isoformen mit spezifischer Protein-ID nicht in allen gematchten Samples zu finden waren, wird eine mögliche Vergleichbarkeit der einzelnen Plasma-Paare erschwert; wir versuchten diese Problematik durch das Scoring am Ende der Auswertung aller

drei Alternativen auszugleichen.

Ein möglicher Ansatz, die personenbezogenen Variabilitäten zu umgehen, wäre eine intraindividuelle Analyse, wie sie bereits von der AG *Proteomics* durchgeführt wurde im Rahmen der Untersuchung temporärer Proteinalterationen bei schwerer Entzündung/Sepsis (Baum *et al.* 2008). Jedoch ist diese Option für die Betrachtung einer lebenslangen Systemerkrankung wie der Psoriasis nicht aussagekräftig; ferner ergibt sich die Schwierigkeit der Identifizierung von dermatologisch unauffälligen, noch nicht diagnostizierten Patienten ohne klinische Symptomatik oder die mit einer isolierten Gelenkproblematik, d. h. einer Manifestation einer PsA vor der Psoriasis an der Haut, imponieren, deren Plasmaproteom dann als Referenz für im Krankheitsstadium gewonnene Plasmaproben dienen soll. Alternativ könnte ein Pooling mehrerer entnommener Plasma-Samples erfolgen, um die interindividuellen Schwankungen durch Mittelung zu eliminieren. Dies würde den Analyseaufwand zwar erheblich reduzieren, aber auch kleine Konzentrationsänderungen in nur einem Teil der Proben maskieren. Wir sahen deshalb in der vorliegenden Arbeit von dieser Möglichkeit ab. Da sich die Patienten zudem in ihrer Krankheitsaktivität und teils auch in ihrer Diagnose (Psoriasis + PsA bzw. Psoriasis alleine) unterscheiden, besteht die Gefahr, dass durch ein Poolen mögliche „Ausreißer“ fehlinterpretiert werden. Für zukünftige Studien mit dem Fokus auf der Suche nach Biomarkerproteinen würde sich also ein Design empfehlen, das ein Pooling einer größeren Stichprobenanzahl mit möglichst homogenem klinischen Erkrankungsstatus umfasst.

5.5.3 Anmerkungen zu der Interpretation der MS-Ergebnisse

Wir schlagen eine Liste von Proteinen als mögliche Biomarkerkandidaten für die Psoriasis und im Besonderen die PsA vor, die durch komparative Proteomanalysen erarbeitet wurde. Speziell die Gruppe der Protease-Inhibitoren, der Proteine im Zusammenhang mit oxidativem Stress, der Binde- und Transportproteine, das Komplement- sowie das Gerinnungssystem zeigen sich in den Patienten-Plasmaproben wiederholt auffällig.

Wir fanden auch Proteine, über die durch andere Autoren bereits im Zusammenhang mit der Psoriasis berichtet wurde. Dabei fällt ins Auge, dass die von uns massenspektrometrisch erhobenen Daten nicht immer den in der Literatur vorherrschenden Trend reproduzieren konnten. Dafür gibt es mehrere mögliche Gründe, die sowohl durch das jeweils verfügbare Probandenkollektiv als auch durch methodische Unterschiede bedingt sein können. Die von uns gewählte Methode der Massenspektrometrie ist ein semiquantitatives Verfahren, bei dem relative Abweichungen zwischen Probanden(kollektiven) im Mittelpunkt stehen anstatt einer absoluten Quantifizierung der Plasmakonzentrationen. Zum anderen ist zu berücksichtigen, dass

mögliche Alterationen in der Struktur der Proteine, die auf pathologische Prozesse zurückzuführen sein könnten, wie etwa abweichende Glykosylierungen oder Aminosäure-Sequenzen, zu einem veränderten Verhalten der Proteine in der Probenaufbereitung führen können. Das kann dazu führen, dass Alterationen einer Fraktion eines Proteins bei unveränderter Konzentration des Hauptteils desselben Proteins überbewertet werden. Andererseits liegt darin auch eine potenzielle Stärke des Verfahrens, die zu einer genaueren Diagnostik unter Nutzung solcher Fraktionen führen könnte, die jedoch aus Kapazitätsgründen in dieser Arbeit bisher nicht tiefergehend analysiert werden konnte. Krankheitsbedingte veränderte posttranslationale Modifikationen von Proteinen können auch deshalb unentdeckt bleiben, weil sie oft zu einer alterierten Suszeptibilität für die proteolytische Spaltung mit Trypsin führen, sodass es zu einem scheinbaren Überwiegen der aus den physiologischen Normvarianten gebildeten Fragmente kommen kann. Daher ist es wichtig, dass die von uns vorgestellten Ergebnisse der MS-Analyse noch einmal gesichtet und mit dafür spezifischeren Tests zuverlässiger und absolut quantifiziert werden.

Einige der von uns gelisteten Proteine sind typische Akute-Phase-Proteine (z. B. C3, Serum-Protease-Inhibitoren) und damit augenscheinlich wenig geeignet als ein „spezifischer“ Biomarker, die jedoch von anderen Autoren im Kontext mit der Erkrankung beschrieben wurden. Da es sich bei der Psoriasis um eine schubartig verlaufende, chronisch entzündliche Erkrankung handelt, sind Aberrationen dieser Proteine im Plasma zwangsläufig zu erwarten und daher nicht vollkommen zu ignorieren bzw. zumindest ein Beweis für die Verlässlichkeit unseres Verfahrens. Wir stellen diese Proteine, mit gesicherter Dynamik ihrer Plasmakonzentrationen während inflammatorischer Prozesse, also ebenso dar.

Von besonderem Interesse für das vorliegende Krankheitsbild der Schuppenflechte sind die Proteine, die im Zusammenhang mit Bestandteilen der ECM, den Zytoskelettsystemen und Zell-Zell-/Zell-ECM-Kontakten stehen, da diese ja im pathomechanistischen Modell bei der Genese der typischen Psoriasis-Plaques eine zentrale Rolle spielen. Insbesondere Keratine als Zytoskelett-Element und – bei Ausdifferenzierung der Keratinozyten – Bestandteil der Hornschicht des *Stratum corneum* rücken in den Fokus bei der Betrachtung einer Hauterkrankung. Dennoch bewerten wir die Aberrationen der Keratinproteine in den gewonnenen Daten zurückhaltend: aus vorhergehenden massenspektrometrischen Experimenten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die hochsensitive Analyse auch Kontaminationen durch die Probenaufbereitung erfasst. Trotz konsequent kontaminationsarmer Arbeitsweise sind Verunreinigungen durch beispielsweise abgeschilferte Hautschüppchen nicht vollständig zu vermeiden und erlangen durch die kleinen Volumina der Mikrotiter-*wells* Relevanz. Um diese Fehlmes-

sungen als solche erkennen zu können, eignet sich die Berücksichtigung der 2D-Trennung und der Lokalisation der detektierten Keratine, d. h. in der Zuordnung zu Fraktionen bestimmter Nummerierung. Treten die Konzentrationsabweichungen eines Keratinfragments in einem Cluster in benachbarten Fraktionen auf, ist die Wahrscheinlichkeit einer experimentell bedingten Kontamination geringer als bei vereinzelt auftretenden Keratin-*hits*. Diese Betrachtung ist in den von uns gewählten Auswertoptionen nur in der *SIEVE*TM-basierten Methode möglich, wo sich der größte Teil der detektierten Keratine als ebensolche definierte, verunreinigte Messungen herausstellte. Die Programme *MetaboAnalyst* und *Proteome Discoverer*TM basieren auf einer Fraktionen-unabhängigen Auswertung; hier hilft die Wahl alternativer Analysen, um die gefundenen Aberrationen zu relativieren.

Im Unterschied dazu hat sich das auch immunoquantifizierte Cytokeratin 17, sowohl isoliert als auch in Kombination mit anderen Biomarkerkandidaten, als gut Gruppen-diskriminierend erwiesen. Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden anderer Autoren, die dieses Protein als pathogenetisch bedeutsamen Spieler bei der Schuppenflechte ausweisen.

5.5.4 Methode ELISA-Kits

Bei den von uns zur Evaluierung der vorgeschlagenen Biomarkerkandidaten eingesetzten ELISA-Kits handelt es sich zwar um kommerzielle Tests, deren Validität der Ergebnisse bei fachgerechter Anwendung durch den Hersteller sichergestellt wird. Die genaue Epitop-Spezifität und auch eine eventuelle Kreuzreaktivität ist jedoch durchweg nicht offengelegt. Ein grober Anhaltspunkt über die Validität des Verfahrens für den Anwender stellen nur die Daten zur internen Kalibrierung und die Präzision der Doppelbestimmungen dar. Auffallend sind die oft starken Varianzen der ermittelten Konzentrationen innerhalb der jeweiligen Probandengruppen. Wir führen dies auf das relativ heterogene Probandenkollektiv sowie die kleine Stichprobengröße zurück. So wurde stets mit acht zufällig ausgewählten Probensamples pro Gruppe (Kontrolle, Ps, PsA) begonnen, ehe größere Analysenzahlen anvisiert wurden. Dabei können theoretisch auch wertvolle Biomarkerkandidaten bereits ungewollt ausgeschlossen worden sein. Diese Restriktion ist ein Nachteil, jedoch in Anbetracht der erforderlichen Doppelbestimmung der Proben, der Limitation der Probenanzahl je Kit (40-44 Proben pro Kit), des begrenzten Probenvolumens, der Vielzahl der eigentlich zu evaluierenden Parameter und der finanziellen Ressourcen der Arbeitsgruppe nicht zu umgehen.

Eine mögliche Schwäche der kommerziellen ELISA-Kits ist deren unsichere Spezifität bei der Detektion molekular veränderter Zielproteine, wie etwa von Aminosäurenaberrationen, Spalt-

produkten oder Modifizierungen am Protein. Bis zum gegenwärtigen Stand der Validierung konnte dies nicht überprüft werden, wird aber in Folgeuntersuchungen berücksichtigt.

6 Ausblick: Verifizierung der Biomarkerkandidaten

In der vorliegenden Proteom-Studie ist es gelungen, aus massenspektrometrisch analysierten Plasmaproteomen von an Psoriasis- und PsA-Erkrankten potenzielle Biomarkerproteine zu identifizieren und teilweise mittels Immuntests zu evaluieren. Dabei können wir einerseits bereits berichtete Ergebnisse bestätigen; dies betrifft die teils signifikanten Plasmakonzentrationsaberrationen von COMP, RBP4, Antithrombin III, C3, S100A7 und Serum-Paraoxonase sowie die Korrelation von Cytokeratin 17 mit dem PASI-Wert. Andererseits stehen unauffällige Plasmamengen von Cytokeratin 17, Profilin 1, Haptoglobin, Kallikrein 8 und erniedrigte Konzentrationen an Ceruloplasmin, C5 und Plasma-Kallikrein – letzteres signifikant – im Widerspruch zu Befunden vorhergehender Veröffentlichungen, deren Ergebnisse also nicht reproduziert werden konnten. Die in dieser Arbeit vorgestellten, massenspektrometrisch gemessenen Plasmaspiegel an Plakoglobin, Prothrombin, Faktor XII, IαI, α-1-Antichymotrypsin und Angiotensinogen sind neue Erkenntnisse, zu denen bei Fertigstellung dieser Arbeit noch keine publizierten Daten vorlagen. Hierzu kommen ebenfalls die Resultate der Immunoquantifizierungen: der tendenzielle Abfall an Vit.D-bind. Protein und der Anstieg an NAAA, weiterhin signifikant erniedrigte Mengen an PIGR und Zn-α-GP, die hier somit als mögliche Kandidaten für neue Plasmabiomarker besonders der PsA zur Evaluierung vorgeschlagen werden. Wir berichten weiterhin über Zusammenhänge der Konzentrationen der Markerkandidaten mit dem PASI-Wert, einem Maß der Erkrankungsschwere, sowie der Kandidatenproteine untereinander. Zusätzlich stellen wir bereits erste Ergebnisse von Biomarkermustern vor, die aus einer Kombination mehrerer Kandidatenproteine entstehen und hinsichtlich ihrer Diskrimination zwischen Gesunden und in verschiedenem Maße Erkrankten spezifischer imponieren als einzelne Markerproteine. Um diese charakteristischen Profile zusammenhängender Markerkandidaten hinsichtlich ihrer Tauglichkeit, diagnostischen Sensitivität und Spezifität in unterschiedlichen Stadien oder anderen morphologischen Erscheinungsformen der Psoriasis zu validieren, sind nun zielgerichtete, quantitative Tests mit einer erheblich größeren Stichprobenzahl erforderlich. Große Probandenkollektive könnten in Subgruppen auch Einflüsse von Therapie, Komorbiditäten oder Zusammenhänge zu weiteren laborchemisch oder apparativ erhobenen pathologischen Befunden beleuchten. Zudem sind Konsistenz oder Nutzbarkeit PsA-spezifischer Biomarkermuster, Haptoglobin*COMP und PIGR*FAM83H, in anderen

arthritischen Krankheitsbildern zu eruieren, um deren Krankheitsspezifität zu prüfen.

Wir können hier die Ergebnisse der ersten Schritte einer hypothesenfreien Biomarkersuche bei der Psoriasis bzw. PsA vorstellen, an dessen Ende ein praktikabler, schneller und möglichst kostengünstiger (Immun-)Test stehen sollte, der eine Anzahl mehrerer krankheitsspezifischer Plasmaproteinaberrationen kombiniert detektieren kann. Ein solcher Test kann im klinischen Einsatz, im stationären oder ambulanten Bereich, frühzeitige korrekte Diagnosestellungen und damit adaptierte therapeutische Interventionen, besonders bei der PsA, erleichtern, den Erfolg einer Therapie abbilden oder der Abschätzung des Schweregrades oder der Prognose der Krankheit dienen.

7 Literaturverzeichnis

- Acevedo F, Hammar H. 1989. Complement C3 proteins in psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 121 (3):329-335.
- Acharya C, Yik JHN, Kishore A, Van Dinh V, Di Cesare PE, Haudenschild DR. 2014. Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: Interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biology*, 37 (0):102-111.
- Alayash AI. 2011. Haptoglobin: old protein with new functions. *Clin Chim Acta*, 412 (7-8):493-498.
- Alsaif M, Guest PC, Schwarz E, Reif A, Kittel-Schneider S, Spain M, Rahmoune H, Bahn S. 2012. Analysis of serum and plasma identifies differences in molecular coverage, measurement variability, and candidate biomarker selection. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 6 (5-6):297-303.
- Amin PB, Diebel LN, Liberati DM. 2007. T-cell cytokines affect mucosal immunoglobulin A transport. *Am J Surg*, 194 (1):128-133.
- Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. 2013. Psoriasis and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Am Acad Dermatol*, 68 (4):654-662.
- Armstrong AW, Armstrong EJ, Fuller EN, Sockolov ME, Voyles SV. 2011. Smoking and pathogenesis of psoriasis: a review of oxidative, inflammatory and genetic mechanisms. *Br J Dermatol*, 165 (6):1162-1168.
- Asano M, Komiyama K. 2011. Polymeric immunoglobulin receptor. *Journal of Oral Science*, 53 (2):147-156.
- Augustin M, Reich K, Glaeske G, Schaefer I, Radtke M. 2010. Co-morbidity and age-related prevalence of psoriasis: Analysis of health insurance data in Germany. *Acta Derm Venereol*, 90 (2):147-151.
- Baker C, Belbin O, Kalsheker N, Morgan K. 2007. SERPINA3 (aka alpha-1-antichymotrypsin). *Front Biosci*, 1 (12):2821-2835.
- Basavaraj KH. 2011. Copper and ceruloplasmin as markers of severity in psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64 (2):AB151.
- Basavaraj KH, Ashok NM, Rashmi R, Praveen TK. 2010. The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *Int J Dermatol*, 49 (12):1351-1361.

- Baum A, Pohl M, Kreuzsch S, Cumme GA, Ditze G, Misselwitz J, Kiehntopf M, Udby L, Meier-Hellmann A, Rhode H. 2008. Searching biomarker candidates in serum using multidimensional native chromatography. II Method evaluation with Alport syndrome and severe inflammation. *Journal of Chromatography B*, 876 (1):31-40.
- Baumann H, Prowse KR, Marinkovic S, Won KA, Jahreis GP. 1989. Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci*, 557:280-295, discussion 295-286.
- Biomarkers Definitions Working Group. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 69 (3):89-95.
- Blanch VJ, Piskurich JF, Kaetzel CS. 1999. Cutting Edge: Coordinate Regulation of IFN Regulatory Factor-1 and the Polymeric Ig Receptor by Proinflammatory Cytokines. *The Journal of Immunology*, 162 (3):1232-1235.
- Bogliolo L, Crepaldi G, Caporali R. 2012. Biomarkers and prognostic stratification in psoriatic arthritis. *Reumatismo*:88-98.
- Bonnekoh B, Böckelmann R, Ambach A, Gollnick H. 2001. Dithranol and Dimethylfumarate Suppress the Interferon- γ -Induced Up-Regulation of Cytokeratin 17 as a Putative Psoriasis Autoantigen in vitro. *Skin Pharmacology and Physiology*, 14 (4):217-225.
- Bost F, Diarra-Mehrpour M, Martin J-P. 1998. Inter- α -trypsin inhibitor proteoglycan family. *European Journal of Biochemistry*, 252 (3):339-346.
- Bowcock AM, Cookson WO. 2004. The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet*, 13 Spec No 1:R43-55.
- Brandtzaeg P. 2013. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front Immunol*, 4:222.
- Bruno MEC, Kaetzel CS. 2005. Long-Term Exposure of the HT-29 Human Intestinal Epithelial Cell Line to TNF Causes Sustained Up-Regulation of the Polymeric Ig Receptor and Proinflammatory Genes through Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms. *The Journal of Immunology*, 174 (11):7278-7284.
- Cao AT, Yao S, Gong B, Elson CO, Cong Y. 2012. Th17 Cells Upregulate Polymeric Ig Receptor and Intestinal IgA and Contribute to Intestinal Homeostasis. *The Journal of Immunology*, 189 (9):4666-4673.
- Carlsson H, Yhr M, Petersson S, Collins N, Polyak K, Enerbäck C. 2005. Psoriasin (S100A7) and calgranulin-B (S100A9) induction is dependent on reactive oxygen species and is downregulated by Bcl-2 and antioxidants. *Cancer Biology & Therapy*, 4 (9):998-1005.

- Carroll MC. 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol*, 5 (10):981-986.
- Cauza E, Hanusch-Enserer U, Frischmuth K, Fabian B, Dunky A, Kostner K. 2006. Short-term infliximab therapy improves symptoms of psoriatic arthritis and decreases concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 31 (2):149-152.
- Ceperuelo-Mallafre V, Naf S, Escote X, Caubet E, Gomez JM, Miranda M, Chacon MR, Gonzalez-Clemente JM, Gallart L, Gutierrez C, Vendrell J. 2009. Circulating and adipose tissue gene expression of zinc-alpha2-glycoprotein in obesity: its relationship with adipokine and lipolytic gene markers in subcutaneous and visceral fat. *J Clin Endocrinol Metab*, 94 (12):5062-5069.
- Chandran V, Cook RJ, Edwin J, Shen H, Pellett FJ, Shanmugarajah S, Rosen CF, Gladman DD. 2010. Soluble biomarkers differentiate patients with psoriatic arthritis from those with psoriasis without arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 49 (7):1399-1405.
- Chang T, Sun L, Wang Y, Wang D, Li W, Li C, Gao T, Liu Y, Wang G. 2011. Inhibition of keratin 17 expression with antisense and RNAi strategies: exploring novel therapy for psoriasis. *Exp Dermatol*, 20 (7):555-560.
- Chard MD, Calvin J, Price CP, Cawston TE, Hazleman BL. 1988. Serum alpha 1 antichymotrypsin concentration as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 47 (8):665-671.
- Cheong JEL, Wessagowit V, McGrath JA. 2005. Molecular abnormalities of the desmosomal protein desmoplakin in human disease. *Clinical and Experimental Dermatology*, 30 (3):261-266.
- Chun RF. 2012. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochem Funct*, 30 (6):445-456.
- Chung DW, Fujikawa K, McMullen BA, Davie EW. 1986. Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry*, 25 (9):2410-2417.
- Cigliano L, Maresca B, Salvatore A, Nino M, Monfrecola G, Ayala F, Carlucci A, Pugliese RC, Pedone C, Abrescia P. 2008. Haptoglobin from psoriatic patients exhibits decreased activity in binding haemoglobin and inhibiting lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 22 (4):417-425.

- Citarella F, Felici A, Brouwer M, Wagstaff J, Fantoni A, Hack CE. 1997. Interleukin-6 Downregulates Factor XII Production by Human Hepatoma Cell Line (HepG2). *Blood*, 90 (4):1501-1507.
- Cochrane CG, Griffin JH. 1979. Molecular assembly in the contact phase of the Hageman factor system. *The American Journal of Medicine*, 67 (4):657-664.
- Cohen SN, Baron SE, Archer CB, British Association of D, Royal College of General P. 2012. Guidance on the diagnosis and clinical management of psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, 37 Suppl 1:13-18.
- Coimbra SS-S, Alice. 2014. Biomarkers of psoriasis severity and therapy monitoring. *World Journal of Dermatology*, 3 (2):15-27.
- Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. 2005. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol*, 69 (4):541-550.
- de Jongh GJ, Zeeuwen PL, Kucharekova M, Pfundt R, van der Valk PG, Blokkx W, Dogan A, Hiemstra PS, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J. 2005. High expression levels of keratinocyte antimicrobial proteins in psoriasis compared with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 125 (6):1163-1173.
- de Vlam K, Gottlieb AB, Fitzgerald O. 2008. Biological biomarkers in psoriatic disease. A review. *J Rheumatol*, 35 (7):1443-1448.
- Degen SJ. 1992. The prothrombin gene and its liver-specific expression. *Semin Thromb Hemost*, 18 (2):230-242.
- Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP. 2009. The Desmosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1 (2):a002543.
- DiCesare PE, Mörgelin M, Carlson CS, Pasumarti S, Paulsson M. 1995. Cartilage oligomeric matrix protein: Isolation and characterization from human articular cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*, 13 (3):422-428.
- Dixon JS, Greenwood M, Lowe JR. 1988. Caeruloplasmin concentration and oxidase activity in polyarthritis. *Rheumatol Int*, 8 (1):11-14.
- Dominguez PL, Husni ME, Holt EW, Tyler S, Qureshi AA. 2009. Validity, reliability, and sensitivity-to-change properties of the psoriatic arthritis screening and evaluation questionnaire. *Arch Dermatol Res*, 301 (8):573-579.
- Duffin KC, Chandran V, Gladman DD, Krueger GG, Elder JT, Rahman P. 2008. Genetics of psoriasis and psoriatic arthritis: update and future direction. *J Rheumatol*, 35 (7):1449-1453.
- Dunphy S, Gardiner CM. 2011. NK cells and psoriasis. *J Biomed Biotechnol*, 2011:248317.

- Dziarski R, Gupta D. 2010. Review: Mammalian peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) in innate immunity. *Innate Immunity*, 16 (3):168-174.
- Eissa A, Amodeo V, Smith CR, Diamandis EP. 2011. Kallikrein-related Peptidase-8 (KLK8) Is an Active Serine Protease in Human Epidermis and Sweat and Is Involved in a Skin Barrier Proteolytic Cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 286 (1):687-706.
- Eissa A, Cretu D, Soosaipillai A, Thavaneswaran A, Pellett F, Diamandis A, Cevikbas F, Steinhoff M, Diamandis Eleftherios P, Gladman D, Chandran V. 2013. Serum kallikrein-8 correlates with skin activity, but not psoriatic arthritis, in patients with psoriatic disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51 (2):317.
- Enerbäck C. 2011. Soluble biomarkers in psoriasis. *Eur J Dermatol*, 21 (6):844-850.
- Eriksen KW, Lovato P, Skov L, Krejsgaard T, Kaltoft K, Geisler C, Odum N. 2005. Increased sensitivity to interferon-alpha in psoriatic T cells. *J Invest Dermatol*, 125 (5):936-944.
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*, 119 (12):3573-3585.
- Ferretti G, Bacchetti T, Campanati A, Simonetti O, Liberati G, Offidani A. 2012. Correlation between lipoprotein(a) and lipid peroxidation in psoriasis: role of the enzyme paraoxonase-1. *Br J Dermatol*, 166 (1):204-207.
- Finlay AY, Khan GK. 1994. Dermatology Life Quality Index (DLQI)—a simple practical measure for routine clinical use. *Clinical and Experimental Dermatology*, 19 (3):210-216.
- Fitzgerald O, Chandran V. 2012. Update on Biomarkers in Psoriatic Arthritis: A Report from the GRAPPA 2010 Annual Meeting. *The Journal of Rheumatology*, 39 (2):427-430.
- Fleming CJ, Holme ER, Mackie RM. 1996. Systemic complement activation in psoriasis vulgaris. *Clinical and Experimental Dermatology*, 21 (6):415-418.
- Gabay C, Kushner I. 1999. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 340 (6):448-454.
- Gelfand JM, Troxel AB, Lewis JD, et al. 2007. The risk of mortality in patients with psoriasis: Results from a population-based study. *Archives of Dermatology*, 143 (12):1493-1499.
- Ghebrehiwet B, Silverberg M, Kaplan AP. 1981. Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Exp Med*, 153 (3):665-676.

- Gisoni P, Malerba M, Malara G, Puglisi Guerra A, Sala R, Radaeli A, Calzavara-Pinton P, Girolomoni G. 2010. C-reactive protein and markers for thrombophilia in patients with chronic plaque psoriasis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 23 (4):1195-1202.
- Gisoni P, Rossini M, Di Cesare A, Idolazzi L, Farina S, Beltrami G, Peris K, Girolomoni G. 2012. Vitamin D status in patients with chronic plaque psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 166 (3):505-510.
- Gitlin JD. 1988. Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 263 (13):6281-6287.
- Gläser R, Köten B, Wittersheim M, Harder J. 2011. Psoriasin: key molecule of the cutaneous barrier? *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9 (11):897-902.
- Goldenstein-Schainberg C, Favarato MH, Ranza R. 2012. Current and relevant concepts in psoriatic arthritis. *Rev Bras Reumatol*, 52 (1):98-106.
- González-Gay MA, González-Vela C, González-Juanatey C. 2012. Psoriasis: a Skin Disease Associated With Increased Cardiovascular Risk. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 103 (7):595-598.
- Gosho M, Nagashima K, Sato Y. 2012. Study Designs and Statistical Analyses for Biomarker Research. *Sensors*, 12 (7):8966-8986.
- Gottlieb AB, Chao C, Dann F. 2008. Psoriasis comorbidities. *J Dermatolog Treat*, 19 (1):5-21.
- Griffiths CE, Christophers E, Barker JN, Chalmers RJ, Chimenti S, Krueger GG, Leonardi C, Menter A, Ortonne JP, Fry L. 2007. A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *Br J Dermatol*, 156 (2):258-262.
- Gudjonsson JE, Karason A, Runarsdottir EH, Antonsdottir AA, Hauksson VB, Jonsson HH, Gulcher J, Stefansson K, Valdimarsson H. 2006. Distinct clinical differences between HLA-Cw*0602 positive and negative psoriasis patients--an analysis of 1019 HLA-C- and HLA-B-typed patients. *J Invest Dermatol*, 126 (4):740-745.
- Gudmundsdottir AS, Sigmundsdottir H, Sigurgeirsson B, Good MF, Valdimarsson H, Jonsdottir I. 1999. Is an epitope on keratin 17 a major target for autoreactive T lymphocytes in psoriasis? *Clin Exp Immunol*, 117 (3):580-586.
- Guo Y, Bozic D, Malashkevich VN, Kammerer RA, Schulthess T, Engel J. 1998. All-trans retinol, vitamin D and other hydrophobic compounds bind in the axial pore of the five-stranded coiled-coil domain of cartilage oligomeric matrix protein. *EMBO J*, 17 (18):5265-5272.

- Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Selvakumar TA, McPherson T, Taylor S, Ogg GS. 2012. IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Experimental Dermatology*, 21 (2):104-110.
- Gutzmer R, Lisewski M, Zwirner J, Mommert S, Diesel C, Wittmann M, Kapp A, Werfel T. 2004. Human monocyte-derived dendritic cells are chemoattracted to C3a after up-regulation of the C3a receptor with interferons. *Immunology*, 111 (4):435-443.
- Han Y-P, Yan C, Garner WL. 2008. Proteolytic Activation of Matrix Metalloproteinase-9 in Skin Wound Healing Is Inhibited by [alpha]-1-Antichymotrypsin. *J Invest Dermatol*, 128 (9):2334-2342.
- Harland CC, Whitaker RP, Barron JL, Holden CA. 1992. Increased urine neopterin levels in psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 127 (5):453-457.
- Hassan MI, Waheed A, Yadav S, Singh TP, Ahmad F. 2008. Zinc alpha 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. *Mol Cancer Res*, 6 (6):892-906.
- Healy J, Tipton K. 2007. Ceruloplasmin and what it might do. *Journal of Neural Transmission*, 114 (6):777-781.
- Henseler T, Christophers E. 1985. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol*, 13 (3):450-456.
- Horn A, Kreuzsch S, Bublitz R, Hoppe H, Cumme GA, Schulze M, Moore T, Ditze G, Rhode H. 2006. Multidimensional proteomics of human serum using parallel chromatography of native constituents and microplate technology. *PROTEOMICS*, 6 (2):559-570.
- Horreau C, Pouplard C, Brenaut E, Barnetche T, Misery L, Cribier B, Jullien D, Aractingi S, Aubin F, Joly P, Le Maitre M, Ortonne JP, Paul C, Richard MA. 2013. Cardiovascular morbidity and mortality in psoriasis and psoriatic arthritis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 27 Suppl 3:12-29.
- Jacobs JM, Adkins JN, Qian W-J, Liu T, Shen Y, Camp DG, Smith RD. 2005. Utilizing Human Blood Plasma for Proteomic Biomarker Discovery. *Journal of Proteome Research*, 4 (4):1073-1085.
- Jaffar Z, Ferrini ME, Herritt LA, Roberts K. 2009. Cutting Edge: Lung Mucosal Th17-Mediated Responses Induce Polymeric Ig Receptor Expression by the Airway Epithelium and Elevate Secretory IgA Levels. *The Journal of Immunology*, 182 (8):4507-4511.
- Jamnitski A, Symmons D, Peters MJ, Sattar N, McInnes I, Nurmohamed MT. 2013. Cardiovascular comorbidities in patients with psoriatic arthritis: a systematic review. *Ann Rheum Dis*, 72 (2):211-216.

- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel J-M, Corvol P. 1992. Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell*, 71 (1):169-180.
- Jin L, Wang G. 2014. Keratin 17: a critical player in the pathogenesis of psoriasis. *Med Res Rev*, 34 (2):438-454.
- Johansen FE, Kaetzel CS. 2011. Regulation of the polymeric immunoglobulin receptor and IgA transport: new advances in environmental factors that stimulate pIgR expression and its role in mucosal immunity. *Mucosal Immunol*, 4 (6):598-602.
- Johnston A, Gudjonsson JE, Sigmundsdottir H, Love TJ, Valdimarsson H. 2004. Peripheral blood T cell responses to keratin peptides that share sequences with streptococcal M proteins are largely restricted to skin-homing CD8⁺ T cells. *Clinical & Experimental Immunology*, 138 (1):83-93.
- Johnston A, Fritz Y, Dawes SM, Diaconu D, Al-Attar PM, Guzman AM, Chen CS, Fu W, Gudjonsson JE, McCormick TS, Ward NL. 2013. Keratinocyte overexpression of IL-17C promotes psoriasiform skin inflammation. *J Immunol*, 190 (5):2252-2262.
- Kaetzel CS. 2005. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunological Reviews*, 206 (1):83-99.
- Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. 2010. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol*, 130 (5):1373-1383.
- Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. 2012a. The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obes Rev*, 13 (2):136-149.
- Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. 2012b. The adipose tissue renin-angiotensin system and metabolic disorders: a review of molecular mechanisms. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 47 (4):379-390.
- Kalupahana NS, Massiera F, Quignard-Boulangé A, Ailhaud G, Voy BH, Wasserman DH, Moustaid-Moussa N. 2012. Overproduction of angiotensinogen from adipose tissue induces adipose inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)*, 20 (1):48-56.
- Kanelleas A, Liapi C, Katoulis A, Stavropoulos P, Avgerinou G, Georgala S, Economopoulos T, Stavrianeas NG, Katsambas A. 2011. The role of inflammatory markers in assessing disease severity and response to treatment in patients with psoriasis treated with etanercept. *Clinical and Experimental Dermatology*, 36 (8):845-850.

- Kapp A, Wokalek H, Schöpf E. 1985. Involvement of complement in psoriasis and atopic dermatitis — Measurement of C3a and C5a, C3, C4 and C1 inactivator. *Archives of Dermatological Research*, 277 (5):359-361.
- Karabudak O, Ulusoy RE, Erikci AA, Solmazgul E, Dogan B, Harmanyeri Y. 2008. Inflammation and hypercoagulable state in adult psoriatic men. *Acta Derm Venereol*, 88 (4):337-340.
- Katz Y, Revel M, Strunk RC. 1989. Interleukin 6 stimulates synthesis of complement proteins factor B and C3 in human skin fibroblasts. *European Journal of Immunology*, 19 (6):983-988.
- Katz Y, Nativ O, Rapoport MJ, Loos M. 2000. IL-17 regulates gene expression and protein synthesis of the complement system, C3 and factor B, in skin fibroblasts. *Clinical & Experimental Immunology*, 120 (1):22-29.
- Kekki M, Koskelo P, Lassus A. 1966. Serum Ceruloplasmin-Bound Copper and Non-Ceruloplasmin Copper in Uncomplicated Psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*, 47:159-161.
- Khan MM, Bradford HN, Isordia-Salas I, Liu Y, Wu Y, Espinola RG, Ghebrehiwet B, Colman RW. 2006. High-Molecular-Weight Kininogen Fragments Stimulate the Secretion of Cytokines and Chemokines Through uPAR, Mac-1, and gC1qR in Monocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26 (10):2260-2266.
- Kirihara T, Matsumoto-Miyai K, Nakamura Y, Sadayama T, Yoshida S, Shiosaka S. 2003. Prolonged recovery of ultraviolet B-irradiated skin in neuropsin (KLK8)-deficient mice. *British Journal of Dermatology*, 149 (4):700-706.
- Kishi T, Cloutier Sylvain M, Kündig C, Deperthes D, Diamandis Eleftherios P. 2006. Activation and enzymatic characterization of recombinant human kallikrein 8. *Biological Chemistry*, 387 (6):723.
- Kishibe M, Bando Y, Terayama R, Namikawa K, Takahashi H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Jiang Y-P, Mitrovic B, Perez D, Iizuka H, Yoshida S. 2007. Kallikrein 8 Is Involved in Skin Desquamation in Cooperation with Other Kallikreins. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (8):5834-5841.
- Koçak M, Bozdoğan O, Erkek E, Atasoy P, Birol A. 2003. Examination of Bcl-2, Bcl-X and bax protein expression in psoriasis. *Int J Dermatol*, 42 (10):789-793.
- Koelling S, Clauditz TS, Kaste M, Miosge N. 2006. Cartilage oligomeric matrix protein is involved in human limb development and in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 8 (3):R56.

- Koj A, Regoeczi E, Chindemi PA, Gauldie J. 1984. Synthesis and turnover of prothrombin during experimental inflammation in rats. *Br J Exp Pathol*, 65 (6):691-700.
- Kolosovsky ED. 1994. Evaluation of Different Treatment Methods in Patients with Psoriasis and Content of Kallikrein and Kallikreinogen in Blood Plasma. *Dermatology*, 188 (2):140-141.
- Komatsu N, Saijoh K, Toyama T, Ohka R, Otsuki N, Hussack G, Takehara K, Diamandis EP. 2005a. Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *British Journal of Dermatology*, 153 (2):274-281.
- Komatsu N, Saijoh K, Sidiropoulos M, Tsai B, Levesque MA, Elliott MB, Takehara K, Diamandis EP. 2005b. Quantification of Human Tissue Kallikreins in the Stratum Corneum: Dependence on Age and Gender. *J Investig Dermatol*, 125 (6):1182-1189.
- Komatsu N, Saijoh K, Kuk C, Liu AC, Khan S, Shirasaki F, Takehara K, Diamandis EP. 2007. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Experimental Dermatology*, 16 (6):513-519.
- Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. 2011. RBP4: a controversial adipokine. *European Journal of Endocrinology*, 165 (5):703-711.
- Kotnik V. 2011. Complement in skin diseases. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, 20 (1):3-11.
- Kouklis PD, Hutton E, Fuchs E. 1994. Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *The Journal of Cell Biology*, 127 (4):1049-1060.
- Kowalczyk AP, Bornslaeger EA, Borgwardt JE, Palka HL, Dhaliwal AS, Corcoran CM, Denning MF, Green KJ. 1997. The Amino-terminal Domain of Desmoplakin Binds to Plakoglobin and Clusters Desmosomal Cadherin–Plakoglobin Complexes. *The Journal of Cell Biology*, 139 (3):773-784.
- Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Nishimori T, Matsubara H, Tomonaga T. 2013. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I α and FAM83H in colorectal cancer. *Journal of Cell Science*, 126 (20):4721-4731.
- Kurd SK, Troxel AB, Crits-Christoph P, Gelfand JM. 2010. The risk of depression, anxiety, and suicidality in patients with psoriasis: a population-based cohort study. *Arch Dermatol*, 146 (8):891-895.

- Kuwae K, Matsumoto-Miyai K, Yoshida S, Sadayama T, Yoshikawa K, Hosokawa K, Shiosaka S. 2002. Epidermal expression of serine protease, neuropsin (KLK8) in normal and pathological skin samples. *Molecular Pathology*, 55 (4):235-241.
- Lancellotti S, Basso M, De Cristofaro R. 2013. Congenital prothrombin deficiency: an update. *Semin Thromb Hemost*, 39 (6):596-606.
- Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F, Dhodapkar M, Krueger JG. 2004. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med*, 199 (1):125-130.
- Lee S-K, Hu JCC, Bartlett JD, Lee K-E, Lin BPJ, Simmer JP, Kim J-W. 2008. Mutational spectrum of FAM83H: the C-terminal portion is required for tooth enamel calcification. *Human Mutation*, 29 (8):E95-E99.
- Lee SE, Lew W. 2009. The Increased Expression of Matrix Metalloproteinase-9 Messenger RNA in the Non-lesional Skin of Patients with Large Plaque Psoriasis Vulgaris. *Annals of dermatology*, 21 (1):27-34.
- Lei G, Arany I, Selvanayagam P, Rajaraman S, Ram S, Brysk H, Tying SK, Brysk MM. 1997. Detection and cloning of epidermal zinc- α 2-glycoprotein cDNA and expression in normal human skin and in tumors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 67 (2):216-222.
- Li D, Zhang W, Liu Y, Haneline LS, Shou W. 2012. Lack of Plakoglobin in Epidermis Leads to Keratoderma. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (13):10435-10443.
- Li P, Gao X-H, Chen H-D, Zhang Y, Wang Y, Wang H, Wang Y, Xie Y. 2005. Localization of haptoglobin in normal human skin and some skin diseases. *International Journal of Dermatology*, 44 (4):280-284.
- Li X, Wang S, Wang H, Gupta D. 2006. Differential Expression of Peptidoglycan Recognition Protein 2 in the Skin and Liver Requires Different Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (30):20738-20748.
- Lin CC, Lai MM, Li TC, Li CI, Liu CS, Chen CC, Wu MT. 2009. Relationship between serum retinol-binding protein 4 and visfatin and the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*, 85 (1):24-29.
- Lotz M, Martel-Pelletier J, Christiansen C, Brandi ML, Bruyere O, Chapurlat R, Collette J, Cooper C, Giacovelli G, Kanis JA, Karsdal MA, Kraus V, Lems WF, Meulenbelt I, Pelletier JP, Raynaud JP, Reiter-Niesert S, Rizzoli R, Sandell LJ, Van Spil WE, Reginster JY. 2013. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Ann Rheum Dis*, 72 (11):1756-1763.

- Lu J, Goldstein KM, Chen P, Huang S, Gelbert LM, Nagpal S. 2005. Transcriptional Profiling of Keratinocytes Reveals a Vitamin D-Regulated Epidermal Differentiation Network. *J Investig Dermatol*, 124 (4):778-785.
- Ma C, Harskamp CT, Armstrong EJ, Armstrong AW. 2013. The association between psoriasis and dyslipidaemia: a systematic review. *British Journal of Dermatology*, 168 (3):486-495.
- Madsen P, Rasmussen HH, Leffers H, Honore B, Dejgaard K, Olsen E, Kiil J, Walbum E, Andersen AH, Basse B, Lauridsen JB, Ratz GP, Celis A, Vandekerckhove J, Celis JE. 1991. Molecular Cloning, Occurrence, and Expression of a Novel Partially Secreted Protein "Psoriasin" That Is Highly Up-Regulated in Psoriatic Skin. *J Investig Dermatol*, 97 (4):701-712.
- Manthey HD, Woodruff TM, Taylor SM, Monk PN. 2009. Complement component 5a (C5a). *Int J Biochem Cell Biol*, 41 (11):2114-2117.
- Maresca B, Cigliano L, Corsaro MM, Pieretti G, Natale M, Bucci EM, Dal Piaz F, Balato N, Nino M, Ayala F, Abrescia P. 2010. Quantitative determination of haptoglobin glycoform variants in psoriasis. *Biol Chem*, 391 (12):1429-1439.
- Marongiu F, Sorano GG, Bibbó C, Pistis MP, Conti M, Mulas P, Balestrieri A, Biggio P. 1994. Abnormalities of Blood Coagulation and Fibrinolysis in Psoriasis. *Dermatology*, 189 (1):32-37.
- Martins B, Kouyoumdjian M, Limaos EA, Borges DR. 1992. The clearance rate of plasma kallikrein by the liver increases during the acute-phase response to inflammation. *Agents and Actions*, 37 (1-2):111-113.
- Meng W, Takeichi M. 2009. Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1 (6):a002899.
- Michalek M, Gelhaus C, Hecht O, Podschun R, Schroder JM, Leippe M, Grotzinger J. 2009. The human antimicrobial protein psoriasin acts by permeabilization of bacterial membranes. *Dev Comp Immunol*, 33 (6):740-746.
- Morgan L, Broughton Pipkin F, Kalsheker N. 1996. Angiotensinogen: Molecular biology, biochemistry and physiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28 (11):1211-1222.
- Mourey L, Samama JP, Delarue M, Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Moras D. 1990. Antithrombin III: structural and functional aspects. *Biochimie*, 72 (8):599-608.

- Mzhel'skaya TI. 2000. Biological functions of ceruloplasmin and their deficiency caused by mutation in genes regulating copper and iron metabolism. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 130 (8):719-727.
- Nast A, Boehncke W-H, Mrowietz U, Ockenfels H-M, Philipp S, Reich K, Rosenbach T, Sammain A, Schlaeger M, Sebastian M, Sterry W, Streit V, Augustin M, Erdmann R, Klaus J, Koza J, Müller S, Orzechowski H-D, Rosumeck S, Schmid-Ott G, Weberschock T, Rzany B. 2011. S3-Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris Update 2011. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 9:S1-S104.
- Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. 2009. Psoriasis. *New England Journal of Medicine*, 361 (5):496-509.
- Nickoloff BJ, Mitra RS, Green J, Zheng XG, Shimizu Y, Thompson C, Turka LA. 1993. Accessory cell function of keratinocytes for superantigens. Dependence on lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. *J Immunol*, 150 (6):2148-2159.
- Niessen RW, Lamping RJ, Jansen PM, Prins MH, Peters M, Taylor FB, Jr., de Vijlder JJ, ten Cate JW, Hack CE, Sturk A. 1997. Antithrombin acts as a negative acute phase protein as established with studies on HepG2 cells and in baboons. *Thromb Haemost*, 78 (3):1088-1092.
- Nihei Y, Maruyama K, Zhang JZ, Kaneko F, Kobayashi K. 1995. Secretory component (polymeric immunoglobulin receptor) as an intrinsic inhibitor of biological functions of interferon gamma in keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, 287 (6):546-552.
- Nihei Y, Maruyama K, Endo Y, Sato T, Kobayashi K, Kaneko F. 1996. Secretory component (polymeric immunoglobulin receptor) expression on human keratinocytes by stimulation with interferon- γ and differences in response. *Journal of Dermatological Science*, 11 (3):214-222.
- Nordahl EA, Rydengard V, Nyberg P, Nitsche DP, Morgelin M, Malmsten M, Bjorck L, Schmidtchen A. 2004. Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (48):16879-16884.
- Olivieri I, D'Angelo S, Palazzi C, Padula A. 2009. Treatment strategies for early psoriatic arthritis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 10 (2):271-282.
- Oriente P, Scarpa R, Pucino A, Torella M, Riccio A, Biondi Oriente C. 1984. Supportive laboratory findings in psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol*, 3 (2):189-193.

- Ozawa M, Terui T, Tagami H. 2005. Localization of IL-8 and Complement Components in Lesional Skin of Psoriasis vulgaris and Pustulosis palmaris et plantaris. *Dermatology*, 211 (3):249-255.
- Palazzi C, Lubrano E, D'Angelo S, Olivieri I. 2010. Beyond early diagnosis: occult psoriatic arthritis. *J Rheumatol*, 37 (8):1556-1558.
- Park SY, Gupta D, Hurwich R, Kim CH, Dziarski R. 2011. Peptidoglycan Recognition Protein Pglyrp2 Protects Mice from Psoriasis-like Skin Inflammation by Promoting Regulatory T Cells and Limiting Th17 Responses. *The Journal of Immunology*, 187 (11):5813-5823.
- Pasch MC, van den Bosch NHA, Daha MR, Bos JD, Asghar SS. 2000. Synthesis of Complement Components C3 and Factor B in Human Keratinocytes is Differentially Regulated by Cytokines. *J Investig Dermatol*, 114 (1):78-82.
- Perera GK, Di Meglio P, Nestle FO. 2012. Psoriasis. *Annu Rev Pathol*, 7:385-422.
- Pietrzak A, Chodorowska G, Szepietowski J, Zalewska-Janowska A, Krasowska D, Hercogová J. 2010. Psoriasis and serum lipid abnormalities. *Dermatologic Therapy*, 23 (2):160-173.
- Piñeiro M, Alava M, A., González-Ramón N, Osada J, Lasierra P, Larrad L, Piñeiro A, Lampreave F. 1999. ITIH4 Serum Concentration Increases during Acute-Phase Processes in Human Patients and Is Up-Regulated by Interleukin-6 in Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263 (1):224-229.
- Piskurich JF, Youngman KR, Phillips KM, Hempen PM, Blanchard MH, France JA, Kaetzel CS. 1997. Transcriptional regulation of the human polymeric immunoglobulin receptor gene by interferon- γ . *Molecular Immunology*, 34 (1):75-91.
- Plavina T, Hincapie M, Wakshull E, Subramanyam M, Hancock WS. 2008. Increased plasma concentrations of cytoskeletal and Ca²⁺-binding proteins and their peptides in psoriasis patients. *Clin Chem*, 54 (11):1805-1814.
- Pohl M, Danz K, Gross O, John U, Urban J, Patzer L, Habbig S, Feldkotter M, Witzke O, Walther M, Rhode H. 2013. Diagnosis of Alport syndrome--search for proteomic biomarkers in body fluids. *Pediatr Nephrol*, 28 (11):2117-2123.
- Portugal-Cohen M, Horev L, Ruffer C, Schlippe G, Voss W, Ma'or Z, Oron M, Soroka Y, Frusic-Zlotkin M, Milner Y, Kohen R. 2012. Non-invasive skin biomarkers quantification of psoriasis and atopic dermatitis: cytokines, antioxidants and psoriatic skin auto-fluorescence. *Biomed Pharmacother*, 66 (4):293-299.

- Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN. 2004. Antithrombin: in control of coagulation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 (3):386-389.
- Radtke MA, Reich K, Blome C, Rustenbach S, Augustin M. 2009. Prevalence and clinical features of psoriatic arthritis and joint complaints in 2009 patients with psoriasis: results of a German national survey. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 23 (6):683-691.
- Rahman MM, Bhoola KD, Elson CJ, Lemon M, Dieppe PA. 1995. Identification and functional importance of plasma kallikrein in the synovial fluids of patients with rheumatoid, psoriatic, and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 54 (5):345-350.
- Ramadan R, Tawdy A, Abdel Hay R, Rashed L, Tawfik D. 2013. The Antioxidant Role of Paraoxonase 1 and Vitamin E in Three Autoimmune Diseases. *Skin Pharmacology and Physiology*, 26 (1):2-7.
- Rashmi R, Rao KS, Basavaraj KH. 2009. A comprehensive review of biomarkers in psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, 34 (6):658-663.
- Rashmi R, Yuti AM, Basavaraj KH. 2010. Relevance of copper and ceruloplasmin in psoriasis. *Clinica Chimica Acta*, 411 (17-18):1390-1392.
- Raychaudhuri SP, Jiang WY, Raychaudhuri SK. 2008. Revisiting the Koebner phenomenon: role of NGF and its receptor system in the pathogenesis of psoriasis. *Am J Pathol*, 172 (4):961-971.
- Rifai N, Gillette MA, Carr SA. 2006. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol*, 24 (8):971-983.
- Rocha-Pereira P, Santos-Silva A, Rebelo I, Figueiredo A, Quintanilha A, Teixeira F. 2004. The inflammatory response in mild and in severe psoriasis. *Br J Dermatol*, 150 (5):917-928.
- Rollman O, Vahlquist A. 1985. Psoriasis and vitamin A. *Archives of Dermatological Research*, 278 (1):17-24.
- Romani J, Caixas A, Ceperuelo-Mallafre V, Carrascosa JM, Ribera M, Rigla M, Vendrell J, Luelmo J. 2013. Circulating levels of lipocalin-2 and retinol-binding protein-4 are increased in psoriatic patients and correlated with baseline PASI. *Arch Dermatol Res*, 305 (2):105-112.
- Rosenberg EW, Noah PW, Wyatt RJ, Jones RM, Kolb WP. 1990. Complement activation in psoriasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 15 (1):16-20.

- Russolillo A, Iervolino S, Peluso R, Lupoli R, Di Minno A, Pappone N, Di Minno MN. 2013. Obesity and psoriatic arthritis: from pathogenesis to clinical outcome and management. *Rheumatology (Oxford)*, 52 (1):62-67.
- Sabat R, Philipp S, Hoflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Wolk K. 2007. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol*, 16 (10):779-798.
- Salama RHM, Al-Shobaili HA, Al Robaee AA, Alzolibani AA. 2013. Psoriasis: A Novel Marker Linked Obesity with Psoriasis. *Disease Markers*, 34 (1):33–39.
- Salier JP, Rouet P, Raguenez G, Daveau M. 1996. The inter-alpha-inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem J*, 315 (1):1-9.
- Schäfer BW, Heizmann CW. 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, 21 (4):134-140.
- Schapira M, Despland E, Scott CF, Boxer LA, Colman RW. 1982. Purified human plasma kallikrein aggregates human blood neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 69 (5):1199-1202.
- Schlüter K, Jockusch BM, Rothkegel M. 1997. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1359 (2):97-109.
- Schmaier AH. 2000. Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions. *Curr Opin Hematol*, 7 (5):261-265.
- Schnabel RB, Wilde S, Wild PS, Munzel T, Blankenberg S. 2012. Atrial fibrillation: its prevalence and risk factor profile in the German general population. *Dtsch Arztebl Int*, 109 (16):293-299.
- Schopf RE, Weber H, Morsches B. 1993. Enhanced procoagulant activity of mononuclear leukocytes in patients with atopic dermatitis and psoriasis. *Archives of Dermatological Research*, 285 (5):305-309.
- Schultz GS, White M, Mitchell R, Brown G, Lynch J, Twardzik DR, Todaro GJ. 1987. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and vaccinia growth factor. *Science*, 235 (4786):350-352.
- Semprini S, Capon F, Bovolenta S, Bruscia E, Pizzuti A, Fabrizi G, Schietroma C, Zambruno G, Dallapiccola B, Novelli G. 1999. Genomic structure, promoter characterisation and mutational analysis of the S100A7 gene: exclusion of a candidate for familial psoriasis susceptibility. *Human Genetics*, 104 (2):130-134.
- Sharma JN. 1991. The role of the kallikrein-kinin system in joint inflammatory disease. *Pharmacological Research*, 23 (2):105-112.

- Shi X, Jin L, Dang E, Chang T, Feng Z, Liu Y, Wang G. 2011. IL-17A upregulates keratin 17 expression in keratinocytes through STAT1- and STAT3-dependent mechanisms. *J Invest Dermatol*, 131 (12):2401-2408.
- Shubbar E, Vegfors J, Carlstrom M, Petersson S, Enerback C. 2012. Psoriasin (S100A7) increases the expression of ROS and VEGF and acts through RAGE to promote endothelial cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat*, 134 (1):71-80.
- Simon M, Tazi-Ahnini R, Jonca N, Caubet C, Cork MJ, Serre G. 2008. Alterations in the desquamation-related proteolytic cleavage of corneodesmosin and other corneodesmosomal proteins in psoriatic lesional epidermis. *British Journal of Dermatology*, 159 (1):77-85.
- Skoumal M, Haberhauer G, Fink A, Steiner A, Klingler A, Varga F, Klaushofer K. 2008. Increased serum levels of cartilage oligomeric matrix protein in patients with psoriasis vulgaris - a marker for unknown peripheral joint involvement. *Clin Exp Rheumatol*, 26 (6):1087-1090.
- Smith RKW, Zunino L, Webbon PM, Heinegård D. 1997. The distribution of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. *Matrix Biology*, 16 (5):255-271.
- Spindler V, Dehner C, Hubner S, Waschke J. 2014. Plakoglobin but Not Desmoplakin Regulates Keratinocyte Cohesion via Modulation of p38MAPK Signaling. *J Invest Dermatol*, 134 (6):1655-1664.
- Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, McCormick TS, Cooper KD. 2005. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*, 174 (1):164-173.
- Tagami H. 1992. The role of complement-derived mediators in inflammatory skin diseases. *Archives of Dermatological Research*, 284 (1):S2-S9.
- Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H, Group CS. 2006. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum*, 54 (8):2665-2673.
- Tegla C, Cudrici C, Patel S, Trippe R, III, Rus V, Niculescu F, Rus H. 2011. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunologic Research*, 51 (1):45-60.

- Thomas NK, Marshman G, Worthy K, Burton J, Bhoola KD. 1992. Comparison of plasma prekallikrein levels in human skin blister and chamber fluids from volunteer subjects and psoriatic patients. *Agents Actions Suppl*, 38 (Pt 3):397-404.
- Tian S, Krueger JG, Li K, Jabbari A, Brodmerkel C, Lowes MA, Suarez-Farinas M. 2012. Meta-analysis derived (MAD) transcriptome of psoriasis defines the "core" pathogenesis of disease. *PLoS One*, 7 (9):e44274.
- Tinazzi I, Adami S, Zanolin EM, Caimmi C, Confente S, Girolomoni G, Gisondi P, Biasi D, McGonagle D. 2012. The early psoriatic arthritis screening questionnaire: a simple and fast method for the identification of arthritis in patients with psoriasis. *Rheumatology (Oxford)*, 51 (11):2058-2063.
- Toker A, Kadi M, Yildirim AK, Aksoy H, Akcay F. 2009. Serum lipid profile paraoxonase and arylesterase activities in psoriasis. *Cell Biochem Funct*, 27 (3):176-180.
- Toshihiko H, Seiichi I, Hideto K, Masakatsu I, Saiichi K. 1988. Partial Purification of Plasma and Tissue Kallikreins in Psoriatic Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 90 (4):505-510.
- Tsoi LC, Spain SL, Knight J, Ellinghaus E, Stuart PE, Capon F, Ding J, Li Y, Tejasvi T, Gudjonsson JE, Kang HM, Allen MH, McManus R, Novelli G, Samuelsson L, Schalkwijk J, Stahle M, Burden AD, Smith CH, Cork MJ, Estivill X, Bowcock AM, Krueger GG, Weger W, Worthington J, Tazi-Ahnini R, Nestle FO, Hayday A, Hoffmann P, Winkelmann J, Wijmenga C, Langford C, Edkins S, Andrews R, Blackburn H, Strange A, Band G, Pearson RD, Vukcevic D, Spencer CC, Deloukas P, Mrowietz U, Schreiber S, Weidinger S, Koks S, Kingo K, Esko T, Metspalu A, Lim HW, Voorhees JJ, Weichenthal M, Wichmann HE, Chandran V, Rosen CF, Rahman P, Gladman DD, Griffiths CE, Reis A, Kere J, Collaborative Association Study of Psoriasis, Genetic Analysis of Psoriasis Consortium, Psoriasis Association Genetics Extension, Wellcome Trust Case Control Consortium, Nair RP, Franke A, Barker JN, Abecasis GR, Elder JT, Trembath RC. 2012. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nat Genet*, 44 (12):1341-1348.
- Usta M, Turan E, Aral H, Inal BB, Gurel MS, Guvenen G. 2011. Serum paraoxonase-I activities and oxidative status in patients with plaque-type psoriasis with/without metabolic syndrome. *J Clin Lab Anal*, 25 (4):289-295.

- Valdimarsson H, Thorleifsdottir RH, Sigurdardottir SL, Gudjonsson JE, Johnston A. 2009. Psoriasis--as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol*, 30 (10):494-501.
- Van De Kerkhof PCM. 2006. Update on retinoid therapy of psoriasis in: an update on the use of retinoids in dermatology. *Dermatologic Therapy*, 19 (5):252-263.
- Vašků V, Vašků A, Izakovičová Hollá L, Tschöplová S, Kaňková K, Benáková N, Semrádová V. 2000. Polymorphisms in inflammation genes (angiotensinogen, TAP1 and TNF- β) in psoriasis. *Archives of Dermatological Research*, 292 (11):531-534.
- Villanova F, Di Meglio P, Nestle FO. 2013. Biomarkers in psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*, 72 Suppl 2:ii104-ii110.
- Wachtfogel YT, Kucich U, James HL, Scott CF, Schapira M, Zimmerman M, Cohen AB, Colman RW. 1983. Human plasma kallikrein releases neutrophil elastase during blood coagulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 72 (5):1672-1677.
- Wan H, South AP, Hart IR. 2007. Increased keratinocyte proliferation initiated through downregulation of desmoplakin by RNA interference. *Experimental Cell Research*, 313 (11):2336-2344.
- Wang H, Gupta D, Li X, Dziarski R. 2005. Peptidoglycan Recognition Protein 2 (N-Acetylmuramoyl-l-Ala Amidase) Is Induced in Keratinocytes by Bacteria through the p38 Kinase Pathway. *Infection and Immunity*, 73 (11):7216-7225.
- Watson PH, Leygue ER, Murphy LC. 1998. Psoriasin (S100A7). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30 (5):567-571.
- Wendler S, Tautkus B, Nemitz S, Pesek J, Krüger T, Opitz S, Bartz M, Richter S, Oehme H, Haenel T, Moore T, Kreusch S, Hanf B, Schmidt L, Rhode H. 2013. Automated native sample preparation for proteome analysis. *Automation Systems of the 21th Century*. NY: Nova Science Publishers, 1-50.
- Werner SG, Langer HE, Ohrndorf S, Bahner M, Schott P, Schwenke C, Schirner M, Bastian H, Lind-Albrecht G, Kurtz B, Burmester GR, Backhaus M. 2012. Inflammation assessment in patients with arthritis using a novel in vivo fluorescence optical imaging technology. *Ann Rheum Dis*, 71 (4):504-510.
- Wiedermann CJ, Römisch J. 2002. The Anti-Inflammatory Actions of Antithrombin – A Review. *Acta Medica Austriaca*, 29 (3):89-92.
- Williamson JC, Scheipers P, Schwämmle V, Zibert JR, Beck HC, Jensen ON. 2013. A proteomics approach to the identification of biomarkers for psoriasis utilising keratome biopsy. *Journal of Proteomics*, 94 (0):176-185.

- Witke W. 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol*, 14 (8):461-469.
- Wittersheim M, Cordes J, Meyer-Hoffert U, Harder J, Hedderich J, Gläser R. 2013. Differential expression and in vivo secretion of the antimicrobial peptides psoriasin (S100A7), RNase 7, human beta-defensin-2 and -3 in healthy human skin. *Experimental Dermatology*, 22 (5):364-366.
- Wolf R, Howard OMZ, Dong H-F, Voscopoulos C, Boeshans K, Winston J, Divi R, Gunsior M, Goldsmith P, Ahvazi B, Chavakis T, Oppenheim JJ, Yuspa SH. 2008. Chemotactic Activity of S100A7 (Psoriasin) Is Mediated by the Receptor for Advanced Glycation End Products and Potentiates Inflammation with Highly Homologous but Functionally Distinct S100A15. *The Journal of Immunology*, 181 (2):1499-1506.
- Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, 21 (2):241-254.
- Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. 2006. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol*, 36 (5):1309-1323.
- Woodruff TM, Nandakumar KS, Tedesco F. 2011. Inhibiting the C5-C5a receptor axis. *Mol Immunol*, 48 (14):1631-1642.
- Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. 2009. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*, 37 (suppl 2):W652-W660.
- Yeung DC, Lam KS, Wang Y, Tso AW, Xu A. 2009. Serum zinc-alpha2-glycoprotein correlates with adiposity, triglycerides, and the key components of the metabolic syndrome in Chinese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 94 (7):2531-2536.
- Yoshida S. 2010. Klk8, a multifunctional protease in the brain and skin: analysis of knockout mice. *Biol Chem*, 391 (4):375-380.
- Zhang W, Dang E, Shi X, Jin L, Feng Z, Hu L, Wu Y, Wang G. 2012. The Pro-Inflammatory Cytokine IL-22 Up-Regulates Keratin 17 Expression in Keratinocytes via STAT3 and ERK1/2. *PLoS ONE*, 7 (7):e40797.
- Zhou C, Cao J, Shang L, Tong C, Hu H, Wang H, Fan D, Yu H. 2013. Reduced paraoxonase 1 activity as a marker for severe coronary artery disease. *Dis Markers*, 35 (2):97-103.

Zhuo L, Hascall VC, Kimata K. 2004. Inter- α -trypsin Inhibitor, a Covalent Protein-Glycosaminoglycan-Protein Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (37):38079-38082.

8 Anhang

Tab. 17: Wertetabelle der mittels Immuntests gemessenen Plasmakonzentrationen der Kandidatenproteine

		Kontrolle	Ps	PsA
Desmoplakin	Mittelwert [ng/ml]	0,401	0,280	0,509
	Standardabweichung	0,409	0,395	0,886
S100A7	Mittelwert [ng/ml]	0,186	0,274	0,200
	Standardabweichung	0,090	0,154	0,117
COMP	Mittelwert [ng/ml]	1,020	0,699	2,534
	Standardabweichung	1,550	1,054	3,724
Vit.D-bind. Protein	Mittelwert [ng/ml]	6,42	11,49	12,31
	Standardabweichung	0,42	8,76	14,69
NAAA	Mittelwert [ng/ml]	0,276	0,420	0,477
	Standardabweichung	0,195	0,305	0,451
C3	Mittelwert [µg/ml]	331,40	410,55	441,51
	Standardabweichung	79,25	98,32	99,19
Kallikrein 8	Mittelwert [ng/ml]	9,196	9,270	9,435
	Standardabweichung	0,724	1,207	1,047
Plakoglobin	Mittelwert [ng/ml]	6,177	6,296	6,295
	Standardabweichung	1,031	0,819	0,819
PIGR	Mittelwert [µg/ml]	56,49	41,69	39,75
	Standardabweichung	16,24	12,75	15,46
FAM83H	Mittelwert [pg/ml]	180,56	134,17	130,34
	Standardabweichung	66,75	68,52	84,11
Haptoglobin	Mittelwert [µg/ml]	5866,0	4255,2	7870,2
	Standardabweichung	3182,7	2615,6	5574,6
Plasma-Kallikrein_In	Median	9,518	9,278	9,103
	Interquartilbereich	0,43	0,47	0,29
Zn-α-GP_In	Median	11,300	10,400	10,696
	Interquartilbereich	0,63	0,94	0,93
Profilin 1_In	Median	4,645	4,814	4,608
	Interquartilbereich	3,15	2,55	2,33
Cytokeratin 17_In	Median	1,172	1,679	1,932
	Interquartilbereich	0,40	1,36	1,59

Tab.18: Wertetabelle der errechneten Kombinationsvariablen der Kandidatenproteine

		Kontrolle	Ps	PsA
Plasma-Kallikrein *PIGR	Mittelwert	810785,7	417704,7	367976,6
	Standardabweichung	311590,8	135058,7	156642,3
NAAA *C3	Mittelwert	85,66	201,39	217,75
	Standardabweichung	56,80	129,73	159,43

		Kontrolle	Ps	PsA
C3 *Cytokeratin 17	Mittelwert	1099,3	2819,2	3195,6
	Standardabweichung	486,6	2348,2	2149,0
S100A7 *C3	Mittelwert	57,38	112,11	81,36
	Standardabweichung	21,96	76,76	31,06
S100A7 *Cytokeratin 17	Mittelwert	0,533	1,850	1,121
	Standardabweichung	0,203	1,830	0,683
Cytokeratin 17 *COMP	Mittelwert	4,126	4,621	28,345
	Standardabweichung	5,427	4,397	37,021
Cytokeratin 17 *Kallikrein 8	Mittelwert	34,03	86,17	75,37
	Standardabweichung	9,92	67,86	33,89
Vit.D-bind.Protein *C3	Mittelwert	2330,7	4443,3	5551,6
	Standardabweichung	484,3	2331,6	5956,4
Vit.D-bind.Protein *NAAA	Mittelwert	1,321	6,458	3,348
	Standardabweichung	0,469	9,489	2,199
Vit.D-bind.Protein *Cytokeratin 17	Mittelwert	23,68	113,17	122,21
	Standardabweichung	6,22	117,26	179,54
PIGR *FAM83H	Mittelwert	10254,8	5179,8	5558,3
	Standardabweichung	5692,0	2870,7	4680,7
COMP *NAAA	Mittelwert	0,364	0,360	1,508
	Standardabweichung	1,028	0,680	2,700
Haptoglobin *COMP	Mittelwert	4915,6	2314,6	27624,2
	Standardabweichung	4629,5	2014,4	28970,3
PIGR /NAAA	Mittelwert	286,9	122,6	150,1
	Standardabweichung	179,2	83,0	156,3
FAM83H /NAAA	Mittelwert	987,4	396,7	586,1
	Standardabweichung	757,5	404,9	994,5
Plasma-Kallikrein /C3	Mittelwert	45,48	27,72	24,89
	Standardabweichung	16,71	12,26	17,41
NAAA *C3 *Cytokeratin 17	Mittelwert	252,6	1499,7	1073,9
	Standardabweichung	124,0	2039,6	811,0

Danksagung

Frau PD Dr. H. Rhode, die mir diese Arbeit mit aktuellen und innovativen Methoden ermöglicht hat, danke ich für die stets sehr gute und professionelle Betreuung sowie die kontinuierliche Erreichbarkeit und Diskussionsbereitschaft. Besonders möchte ich mich bei ihr für die Freiheit, die mir bei der Arbeit an den richtigen Stellen gewährt wurde, und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken, was maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Frau Dr. P. Muckova danke ich für die hervorragenden Erklärungen besonders der Technik und die intensive Unterstützung bei der Auswertung der Daten. Für die konstruktive Hilfe bei der Bewältigung von Problemen und ihre motivierenden Worte gilt ihr mein besonderer Dank.

Frau Dr. R. Büchler danke ich für ihre erfahrene und vielseitige Unterstützung. Für die strukturierte Hilfe bei der Auswertung, ihr hohes, professionelles Engagement bei dem Projekt und die zahlreichen wegweisenden Gespräche bin ich ihr äußerst dankbar.

Herrn Dr. S. Opitz möchte ich danken für seine konstruktiven Vorschläge und kreativen Ideen, die insbesondere bei der Datenauswertung mit dem Programm *MetaboAnalyst* in die Arbeit Eingang finden durften.

Frau S. Wendler, ohne deren sorgfältige Arbeit bei der Probenaufarbeitung und Bereitstellung der Daten dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre, möchte ich besonders danken für ihre zuvorkommende und äußerst kompetente Hilfe bei zahlreichen laborchemischen Fragen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. H. Rhode, Dr. P. Muckova, Dr. R. Büchler, Dr. S. Opitz, S. Wendler.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, Mai 2015

Johanna Reindl

Anmerkung

Aus Gründen der Geheimhaltung bei beabsichtigtem Patentverfahren erfolgte das Einreichen der vorliegenden, im Februar 2015 fertiggestellten Arbeit erst nach Eingang der Patentanmeldung im Deutschen Patent- und Markenamt im Mai 2015.