

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor Prof. Dr. med. T. Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Expression von Caspase-14, Filaggrin, Loricrin und
Involucrin bei entzündlichen Hauterkrankungen
(atopisches Ekzem, Psoriasis und allergisches
Kontaktekzem) im Vergleich zu Normalpersonen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Marie-Louise Grünig

aus Brunsbüttel

Kiel 2011

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Fölster-Holst
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Kabelitz
Tag der mündlichen Prüfung:	08.02.2013
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	24.10.2012

gez.: Prof. Dr. Dr. Cascorbi

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Haut	1
1.2	Aufbau und Differenzierung	1
1.3	Strukturproteine der Epidermis	4
1.3.1	Caspase-14	4
1.3.2	Filaggrin	6
1.3.3	Loricrin	7
1.3.4	Involucrin	8
1.4	Hauterkrankungen mit Barrierestörungen	8
1.4.1	Atopisches Ekzem	9
1.4.2	Psoriasis	10
1.4.3	Allergisches Kontaktekzem	11
1.5	Zielsetzung der Dissertation	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Hautbiopsien	13
2.1.2	Antikörper	14
2.1.3	Weiteres Material	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Färbung	17
2.2.2	Auswertung	19
2.2.3	Statistik	20
3	Ergebnisse	21
3.1	Vergleich des atopischen Ekzems mit Normalhaut mittels immunhistochemischer Analyse	21
3.1.1	Anfärbung der Caspase-14 bei atopischem Ekzem und Normalhaut	21

3.1.2	Anfärbung des Filaggrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut	23
3.1.3	Anfärbung des Loricrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut	24
3.1.4	Anfärbung des Involucrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut	26
3.2	Vergleich der Psoriasis mit Normalhaut mittels immunhistochemischer Analyse	28
3.2.1	Anfärbung der Caspase-14 bei Psoriasis und Normalhaut	28
3.2.2	Anfärbung des Filaggrins bei Psoriasis und Normalhaut	29
3.2.3	Anfärbung des Loricrins bei Psoriasis und Normalhaut	31
3.2.4	Anfärbung des Involucrins bei Psoriasis und Normalhaut	32
3.3	Vergleich des allergischen Kontaktekzems mit Normalhaut mittels immunhistochemischer Analyse	34
3.3.1	Anfärbung der Caspase-14 bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	34
3.3.2	Anfärbung des Filaggrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	35
3.3.3	Anfärbung des Loricrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	37
3.3.4	Anfärbung des Involucrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	38
3.4	Vergleich der Strukturprotein-Expressionen bei entzündlichen Dermatosen	40
3.4.1	Expression der Caspase-14 bei den entzündlichen Dermatosen im Vergleich zur Normalhaut	40
3.4.2	Expression des Filaggrins bei den entzündlichen Dermatosen im Vergleich zur Normalhaut	41
3.4.3	Expression des Loricrins bei den entzündlichen Dermatosen im Vergleich zur Normalhaut	42
3.4.4	Expression des Involucrins bei den entzündlichen Dermatosen im Vergleich zur Normalhaut	43
4	Diskussion	45
4.1	Caspase-14	45
4.2	Filaggrin	50
4.3	Loricrin	55
4.4	Involucrin	57

5	Zusammenfassung	58
6	Literaturverzeichnis	60
7	Danksagung	74
8	Lebenslauf	75

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
alpha adj	alpha adjustiert
AE	Atopisches Ekzem
allerg.	allergisch
Aqua dest.	Aqua destillata
No.	Number
DAB	Diaminobenzidin, Peroxidasesubstrat
ELISA	engl.: enzyme linked immunosorbent assay; eine Methode zur Bestimmung der Konzentration von Antigenen oder Antikörpern
et al.	„und andere“
FLG	Filaggrin-Gen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IFN	Interferon
IL	Interleukin
mM	Millimolar
p-Wert	Signifikanzwert
SPSS	Statistik- und Analyse-Software
Str.	Stratum
StreptAB	Arbeitslösung bei immunhistochemischen Färbungen
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered Saline, pH 7,6
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Pufferkapazität 7,2-9,0
µm	Mikrometer, 1/1000 Millimeter

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematischer Aufbau der menschlichen Haut	2
Abb. 1.2 Schematischer Aufbau der menschlichen Epidermis	3
Abb. 1.3 Klinisches Erscheinungsbild des atopischen Ekzems	9
Abb. 1.4 Klinisches Erscheinungsbild der Psoriasis	10
Abb. 1.5 Klinisches Erscheinungsbild des allergischen Kontaktekzems	11
Abb. 3.1 Lichtmikroskopische Darstellung der Caspase-14-Expression bei atopischem Ekzem und Normalhaut	21
Abb. 3.2 Anfärbarkeit der Caspase-14 bei atopischem Ekzem und Normalhaut	22
Abb. 3.3 Lichtmikroskopische Darstellung der Filaggrin-Expression bei atopischem Ekzem und Normalhaut	23
Abb. 3.4 Anfärbarkeit des Filaggrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut	24
Abb. 3.5 Lichtmikroskopische Darstellung der Loricrin-Expression bei atopischem Ekzem und Normalhaut	24
Abb. 3.6 Anfärbarkeit des Loricrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut	25
Abb. 3.7 Lichtmikroskopische Darstellung der Involucrin-Expression bei atopischem Ekzem und Normalhaut	26
Abb. 3.8 Anfärbarkeit des Involucrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut	27
Abb. 3.9 Lichtmikroskopische Darstellung der Caspase-14-Expression bei Psoriasis und Normalhaut	28
Abb. 3.10 Anfärbarkeit der Caspase-14 bei Psoriasis und Normalhaut	29
Abb. 3.11 Lichtmikroskopische Darstellung des Filaggrin-Expression bei Psoriasis und Normalhaut	29
Abb. 3.12 Anfärbarkeit des Filaggrins bei Psoriasis und Normalhaut	30
Abb. 3.13 Lichtmikroskopische Darstellung der Loricrin-Expression bei Psoriasis und Normalhaut	31
Abb. 3.14 Anfärbarkeit des Loricrins bei Psoriasis und Normalhaut	32
Abb. 3.15 Lichtmikroskopische Darstellung der Involucrin-Expression bei Psoriasis und Normalhaut	32
Abb. 3.16 Anfärbarkeit des Involucrins bei Psoriasis und Normalhaut	33
Abb. 3.17 Lichtmikroskopische Darstellung der Caspase-14 bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	34

Abb. 3.18 Anfärbarkeit der Caspase-14 bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	35
Abb. 3.19 Lichtmikroskopische Darstellung der Filaggrin-Expression bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	35
Abb. 3.20 Anfärbarkeit des Filaggrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	36
Abb. 3.21 Lichtmikroskopische Darstellung der Loricrin-Expression bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	37
Abb. 3.22 Anfärbarkeit des Loricrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	38
Abb. 3.23 Lichtmikroskopische Darstellung der Involucrin-Expression bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	38
Abb. 3.24 Anfärbarkeit des Involucrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut	39
Abb. 3.25 Vergleich der Caspase-14-Expression bei entzündlichen Dermatosen und Normalhaut	40
Abb. 3.26 Vergleich der Filaggrin-Expression bei entzündlichen Dermatosen und Normalhaut	41
Abb. 3.27 Vergleich der Loricrin-Expression bei entzündlichen Dermatosen und Normalhaut	43
Abb. 3.28 Vergleich der Involucrin-Expression bei entzündlichen Dermatosen und Normalhaut	44

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut stellt die äußere Begrenzung des menschlichen Körpers zu seiner Umwelt dar und ist mit etwa 2 m² das größte Organ des Menschen (Lüllmann-Rauch, 2002). Sie bietet Schutz vor dem Eindringen von Krankheitserregern und dient als Barriere gegen Hitze und UV-Strahlung. Eine weitere zentrale Aufgabe besteht in der Regulation des Wasserhaushaltes. Der Aufbau der Haut verhindert einen übermäßigen Verlust von Wasser und wirkt somit einer Dehydratation entgegen (Elias, 1983). Dadurch kommt der Intaktheit der Haut in Form einer Permeabilitätsbarriere ein hoher Stellenwert zu (Denecker *et al.*, 2007).

1.2 Aufbau und Differenzierung

Die Haut des Menschen gliedert sich in verschiedene Schichten: die Epidermis, ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel, sowie die Dermis als bindegewebiger Anteil und die Subcutis bestehend aus Binde- und Fettgewebe (siehe Abb. 1.1). Die Epidermis (Oberhaut) und die Dermis (Lederhaut) bilden zusammen die Cutis, welche die äußerste Schicht der Haut darstellt. In der Dermis befinden sich Blut- und Lymphgefäße, Drüsen und Haarfollikel. Während die Talgdrüsen Talg produzieren, welcher die Haut zusätzlich vor dem Austrocknen schützt, spielen die Schweißdrüsen eine Rolle bei der Regulierung der Körpertemperatur. Die in der Dermis verlaufenden Gefäße versorgen die darüber liegende gefäßfreie Epidermis. Unterhalb der Dermis befindet sich die Subcutis (Unterhautfettgewebe). Diese Schicht enthält loses Binde- und Fettgewebe, in dem größere Nerven und Gefäße verlaufen. Sie wird auch als Hypodermis bezeichnet.

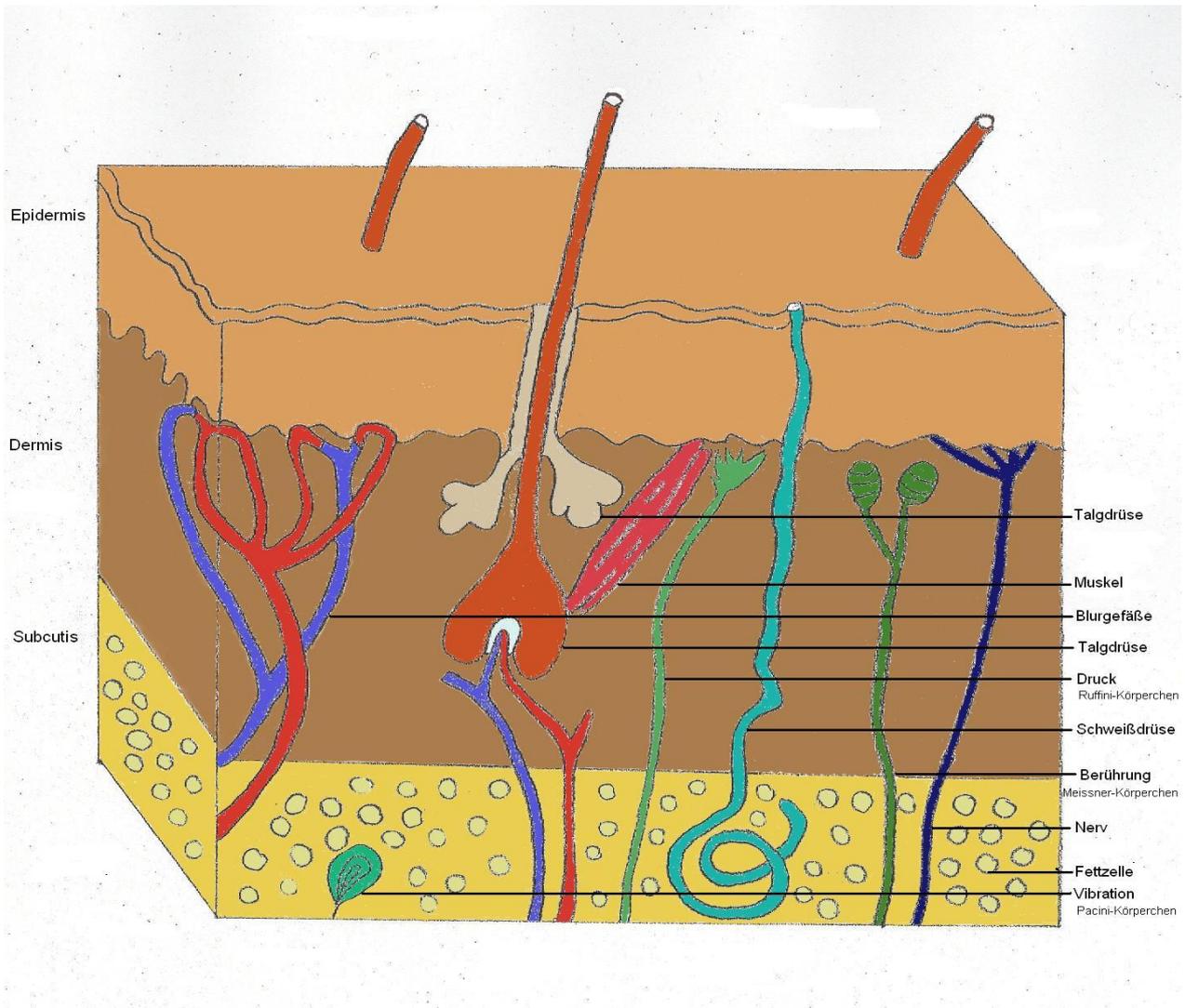


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau der menschlichen Haut

Die oberste Schicht der Haut ist die Epidermis. Darunter befindet sich die Dermis, in der sich Blut- und Lymphgefäße, Sinneszellen und Nerven sowie Talg- und Schweißdrüsen befinden. Die Subcutis ist eine fettgewebsreiche verschiebbliche Schicht. Die Unterhaut besteht aus losem Binde- und Fettgewebe.

Die Epidermis setzt sich aus den Keratinozyten zusammen. Sie bilden ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel (siehe Abb. 1.2). Die Zellteilung (Proliferation) findet in der basal gelegenen Schicht, dem einschichtigen *Stratum basale*, statt. Von hier durchlaufen die Zellen eine Differenzierung, die sie über das mehrschichtige *Stratum spinosum* und das *Stratum granulosum* bis in das *Stratum corneum* aufsteigen lässt. Dort haben die Keratinozyten ihre terminale Differenzierung erreicht und liegen nun als kernlose Korneozyten für eine Dauer von etwa zwei Wochen vor, bevor sie im Zuge der Desquamation schließlich abgeschilfert werden (Eckert, 1989). Es ist ein sich ständig wiederholender Prozess,

durch den sich die Epidermis kontinuierlich erneuert (Lüllmann-Rauch, 2002). Diese Vorgänge werden auch terminale epidermale Differenzierung genannt. Die Zeitspanne von der Neuentstehung eines Keratinozyten bis zu seiner Abschilferung beträgt in etwa vier Wochen (I. Moll, 6. Ausgabe, 2005).

Die Permeabilitätsbarriere der Haut wird vor allem durch die oberste Schicht der Epidermis gebildet, dem *Stratum corneum* (Elias, 1983; Segre, 2006). Die Korneozyten weisen dort den geringsten Wassergehalt aller Keratinozyten auf. Dieser liegt im *Stratum corneum* von gesunder Haut zwischen 10-20% (von Zglinicki *et al.*, 1993). Im Laufe der Differenzierung sinkt der Wassergehalt in den Zellen immer weiter ab. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme des Proteinanteils im Zellinneren. Diese Proteine, beispielsweise Filaggrin, Loricrin und Involucrin, spielen während des Verhornungsprozesses eine wichtige Rolle bei der Entstehung der „cornified cell envelope“ (Candi *et al.*, 2005).

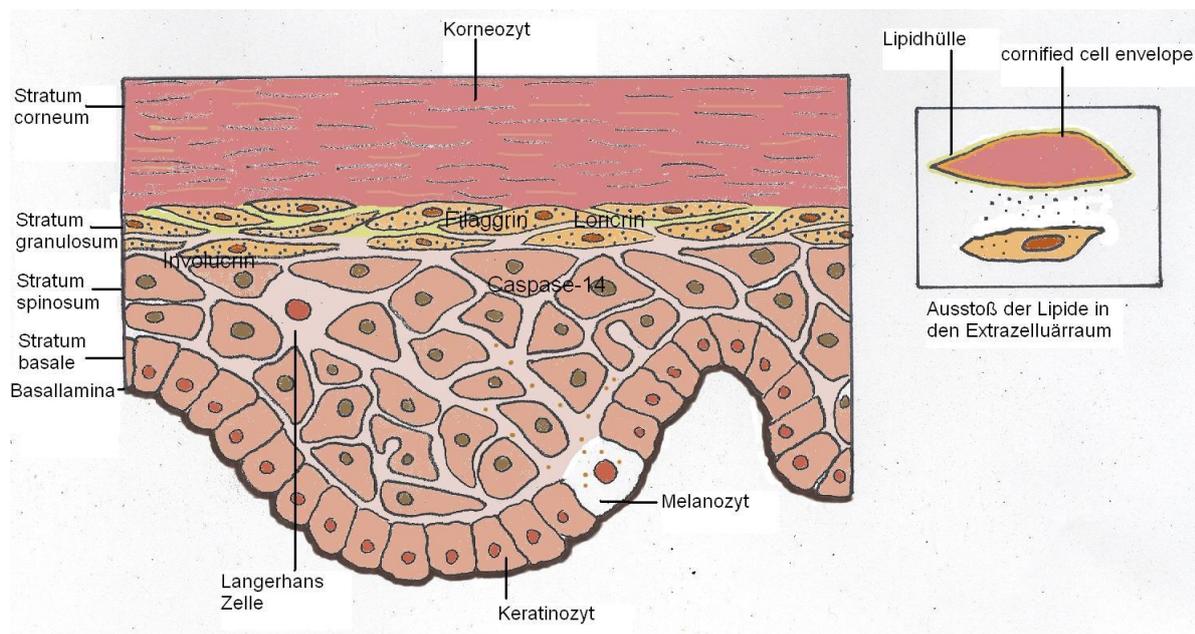


Abb. 1.2 Schematischer Aufbau der menschlichen Epidermis

Die Abbildung zeigt die Hauptvertreter der epidermalen Proteine in den entsprechenden Zellschichten. Der Aufbau der Epidermis gliedert sich in unterschiedliche Zellschichten. Im *Stratum basale* findet die Zellteilung statt. Im Laufe der Differenzierung kommt es zu einer Expression von verschiedenen Proteinen, die an der Bildung des sogenannten „cornified cell envelopes“ maßgeblich beteiligt sind. Dieser entsteht durch die Verknüpfung der Strukturproteine an der zytosolischen Seite der Plasmamembran sowie der Bindung extrazellulärer Lipide und ersetzt schließlich in der terminalen Differenzierung die Plasmamembran der Korneozyten.

1.3 Strukturproteine der Epidermis

Im Zuge der Differenzierung verlieren die Keratinozyten ihre Zellkerne und auch die Plasmamembran wird durch den stabileren „cornified cell envelope“ ersetzt. Dieser wird als widerstandsfähige Zellhülle verstanden und sorgt für die nötige Festigkeit der Korneozyten. Gebildet wird er an der zytosolischen Seite der Plasmamembran mit Hilfe von quervernetzten Strukturproteinen, wie beispielsweise Filaggrin, Loricrin und Involucrin, die mit Hilfe von Transglutaminasen kovalent verknüpft werden (Kalinin *et al.*, 2001). Gleichzeitig werden extrazelluläre Lipide gebunden.

Somit haben die Strukturproteine des „cornified cell envelopes“ für die Stabilität der Zelle eine wichtige Funktion inne (Downing, 1992). Die Lipidsynthese erfolgt im Laufe der Differenzierung im oberen *Stratum granulosum* intrazellulär in allen kernhaltigen Keratinozyten. Die Lipide werden zusammen mit hydrolytischen Enzymen in sogenannten „lamellar bodies“ gespeichert. Beim Übergang vom *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum* werden sie durch Fusion der „lamellar bodies“ mit der Plasmamembran in den Extrazellularraum ausgestoßen (Elias *et Menon*, 1991). Durch die Freisetzung der hydrolytischen Proteine erfolgt die Umwandlung der polaren in apolare Lipide, die für die eigentliche Bindung des Wassers und somit für die Verhinderung eines transepidermalen Wasserverlustes verantwortlich sind. Die Lipidschicht besteht vor allem aus freien Fettsäuren, Ceramiden (Sphingolipiden) und Cholesterol (Grubauer *et al.*, 1989). Die Ceramide stellen mengenmäßig mit etwa 50% den größten Anteil dar. Somit setzt sich die Permeabilitätsbarriere zum Einen aus dem im Verlauf der Differenzierung zugenommenen intrazellulären Proteinanteil zusammen, zum Anderen aus den extrazellulär angereicherten Lipiden (Elias, 1983; Schürer *et Elias*, 1991; Elias *et Feingold*, 1992; Elias, 1996). Diese Barriere verhindert dadurch übermäßigen Wasserverlust und bietet der Haut somit einen effektiven Schutz vor Dehydratation.

1.3.1 Caspase-14

Die Caspase-14 ist ein Mitglied der evolutionär konservierten Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen (Denecker *et al.*, 2007). Die meisten dieser Caspasen sind in Entzündungs- und Apoptose-Vorgänge involviert. Die Caspase-14 stellt jedoch eine

Ausnahme dar. Sie gilt als eine der noch am wenigsten verstandenen Caspasen und wird entgegen anderer typischer Funktionen dieser Proteinfamilie mit der Zellproliferation und -differenzierung in Verbindung gebracht. In der Haut lässt sich ihre Expression in den Differenzierungs- und Verhornungsschichten sowie in Haarfollikeln von Säugetieren beobachten (Lippens *et al.*, 2000; Alibardi *et al.*, 2005). Die begrenzte Expression, die sich hauptsächlich in verhornenden Epithelien darstellen lässt, zeigt ihre Rolle im Verhornungsprozess der terminalen Keratinozytendifferenzierung auf.

Die Expression der Caspase-14 steigt während der Differenzierung der menschlichen Keratinozyten *in vitro* (Eckhart *et al.*, 2000). Im *Stratum granulosum* ist diese Protease mit den Zellkernen, den Keratohyalin-Granula und den Desmosomen assoziiert. Im weiteren Verlauf lässt sie sich im Zytoplasma der Keratinozyten, den (Korneo-) Desmosomen und den Zellkernüberresten nachweisen. Die Beobachtung deutet auf eine Rolle der Caspase-14 im Abbau des Zellkerns hin (Denecker *et al.*, 2008). *In vivo* zeigte sich die Expression der Caspase-14 nur in den Differenzierungsphasen und beim Kernabbau. In der Proliferationsphase konnte sie nicht nachgewiesen werden (Lippens *et al.*, 2000; Rendl *et al.*, 2002).

Das direkte Substrat der Caspase-14 ist das Polyprotein Profilaggrin sowie das durch die Prozessierung entstandene Strukturprotein Filaggrin (Denecker *et al.*, 2007). Seine aktiven Filaggrin-Einheiten sind im *Stratum corneum* am Ausbau des „cornified cell envelopes“ beteiligt. Durch weiteren Abbau der Filaggrin-Monomere in Aminosäuren und ihre Derivate ist die Caspase-14 an der Entstehung von Abbauprodukten beteiligt, die als „natural moisturizing factors“ als wichtige Feuchtigkeitsspender der Haut dienen (Kezic *et al.*, 2008). Bei entzündlichen Dermatosen gibt es Hinweise auf eine gestörte Caspase-14-Expression. Für die Erkrankung atopisches Ekzem sowie Psoriasis vulgaris konnte dies bereits eindeutig nachgewiesen werden (Walsh *et al.*, 2005; Hvid *et al.*, 2011).

Untersuchungen von Caspase-14-defizienten Mäusen zeigen ebenfalls die Bedeutung dieses Enzyms im Profilaggrinabbau und im Aufbau einer effizienten Hautbarriere. Die Haut dieser Mäuse ist glänzender und stärker lichenifiziert, was auf ein verändertes *Stratum corneum* hinweist. In den Zellen befinden sich vermehrt Keratohyalin-F-Granula, die dem Profilaggrinvorrat entsprechen (Denecker *et al.*,

2007). Dass die Caspase-14 für die fehlerfreie Prozessierung des Profilaggrins eine wichtige Rolle zu spielen scheint, zeigt sich bei den knock-out-Mäusen vor allem durch ein verändertes Verarbeitungsmuster mit nachfolgend vermehrtem Wasserverlust und verminderter Hydratation. Darüber hinaus weist die Haut eine erhöhte UVB-Empfindlichkeit auf. Eine intakte Permeabilitätsbarriere bietet somit nicht nur einen Schutz vor Dehydratation, sondern auch vor schädigender UVB-Strahlung. Verschiedene frühe und späte Differenzierungsmarker wie Loricrin und Involucrin sind bei diesen Mäusen quantitativ nicht verändert gewesen.

1.3.2 Filaggrin

Eines der mengenmäßig häufigsten Strukturproteine der Epidermis ist das Filaggrin. Es wird im *Stratum granulosum* als unlösliches Polyprotein Profilaggrin synthetisiert (Resing *et al.*, 1995) und in F-Keratohyalin-Granula gespeichert (Steven *et al.*, 1990). Im Laufe der Differenzierung wird das Profilaggrin in zehn bis zwölf funktionelle Filaggrin-Einheiten gespalten.

Eine Schlüsselrolle spielt Filaggrin bei der Ausbildung des „cornified cell envelopes“ sowie beim Aufbau der epidermalen Permeabilitätsbarriere. Es verbindet Keratin 1, Keratin 10 und andere intermediäre Filamente innerhalb des Zytoskeletts der Keratinozyten. Anschließend kommt es zum Kollaps des Zytoskeletts und der Intermediärfilamente (Kalinin *et al.*, 2002). Dadurch entstehen die „cornified cell envelopes“, welche eine Permeabilitätsbarriere gegen äußere Einflüsse wie Wasser oder Allergene und mechanische Reize darstellen (Candi *et al.*, 2005). Durch eine weitere Prozessierung der Filaggrin-Monomere entstehen Abbauprodukte in Form von (hygroskopischen) freien Aminosäuren wie Urocaninsäure, Pyrrolidoncarbonsäure und Alanin, die einen Teil des sogenannten „natural moisturizing factors“ darstellen. Diese tragen als Feuchtigkeitsspender durch Wasserbindung zur Weichheit und Flexibilität der Haut bei (Kezic *et al.*, 2008).

Das Filaggrin-Gen befindet sich in der Region 1q21 des humanen Chromosom 1 im sogenannten „Epidermalen Differenzierungskomplex“. Dieser enthält über 40 Gene von Schlüsselproteinen, welche in die epidermale Differenzierung involviert sind. Dazu zählen unter anderem auch Loricrin und Involucrin (Volz *et al.*, 1993;

Mischke *et al.*, 1996). Eine Mutation im Filaggrin-Gen (FLG) geht mit einem erhöhten Wasserverlust und einem verminderten Anteil an hygroskopischen Aminosäuren einher (Rawlings *et Harding*, 2004). Bei diesen Patienten liegt eine gestörte Hautbarriere vor. Zwischen 14% und 56% der Patienten mit atopischem Ekzem tragen ein oder mehrere FLG-Null Allele. Sie haben ein 1,2-13 mal höheres Risiko diese Erkrankung zu entwickeln. Wie in Kohortenstudien gezeigt werden konnte, besteht bei betroffenen Personen ein erhöhtes Risiko an einem persistierenden Ekzem zu erkranken (Palmer *et al.*, 2006). Homozygote Patienten zeigen einen kompletten Verlust des Filaggrins und leiden unter der Hauterkrankung Ichthyosis vulgaris (Fischschuppen-Erkrankung), welche durch eine extrem trockene, schuppige Haut charakterisiert (Candi *et al.*, 2005) und mit dem atopischen Ekzem assoziiert ist.

Eine durch Zufall entstandene Mausmutante, welche als „flaky tail“ bezeichnet wird, zeigte eine trockene, schuppige Haut und vermindertes Profilaggrin/Filaggrin bei normaler Expression anderer Differenzierungsmarker (Presland *et al.*, 2000).

1.3.3 Loricrin

Ein weiteres epidermales Strukturprotein ist das Loricrin, welches reich an Glycin, Serin und Cystein ist. Es wird in der späten Phase der Differenzierung im *Stratum granulosum* der Epidermis und in anderen keratinisierten Epithelien wie beispielsweise der Gingiva exprimiert (Hohl *et al.*, 1991). Loricrin macht 65-85% der quervernetzten Proteine der menschlichen Epidermis aus (Hohl *et al.*, 1993) und trägt als ein Hauptprotein der „cornified cell envelopes“ mit ungefähr 70% den größten Anteil zur Bildung und Stabilisierung desselben bei (Koch *et al.*, 2000). Es bildet mit Filaggrin, Involucrin und weiteren Calcium-bindenden Proteinen das Grundgerüst des „cornified cell envelopes“ (Steinert *et Marekov*, 1995).

Mit Hilfe spezifischer Antikörper ist die Darstellung von Loricrin in der Epidermis möglich (Hohl *et al.*, 1993; Hohl, 1993). So konnte bei Loricrin-defizienten Mäusen ein defekter Aufbau des „cornified cell envelopes“ festgestellt werden. Die Haut wies keine gestörte Hautbarriere auf, sie war jedoch gegenüber mechanischen Reizen

anfälliger. Gleichzeitig konnte mittels ELISA ein vermehrtes Vorliegen von Profilaggrin festgestellt werden (Koch *et al.*, 2000).

Für unterschiedliche Hauterkrankungen, die mit Hyperkeratosen einhergehen, wurden Mutationen im Loricrin-Gen nachgewiesen (Maestrini *et al.*, 1996; Christiano, 1997).

1.3.4 Involucrin

Das Involucrin ist ein weiteres Protein der menschlichen Epidermis. Als Vorläuferprotein liegt es im Zytoplasma vor. Im *Stratum corneum* stellt dieses Strukturprotein eine bedeutende Komponente des „cornified cell envelopes“ dar. An dieses Gerüst binden andere intrazelluläre Proteine sowie die extrazellulären Lipide, vornehmlich Ceramide, aber auch Cholesterol und freie Fettsäuren (Marekov *et Steinert*, 1998).

Involucrin lässt sich mit spezifischen Antikörpern in der gesunden menschlichen Haut ab dem oberen *Stratum spinosum* darstellen (Ishida-Yamamoto *et Iizuka*, 1995). Bei Hauterkrankungen mit verstärkten Zellteilungsrate wie beispielsweise der Psoriasis vulgaris lässt sich das Involucrin auch in den unteren Schichten des *Stratum spinosum* anfärben (McKay *et Leigh*, 1995).

Gezielte Ablation des Involucrin-Gens bei Mäusen führte zu keiner Veränderung in der Funktion der Hautbarriere, jedoch zu einer verminderten Reparaturfähigkeit der Hautbarriere. Es zeigten experimentell erzeugte Hautbarrierestörungen eine verfrühte Expression des Proteins (Ekanayake-Mudiyanselage *et al.*, 1998).

1.4 Hauterkrankungen mit Barrierestörungen

Der Wassergehalt im *Stratum corneum* der Epidermis ist für das Hautbild entscheidend. Dieser liegt in gesunder Haut im Bereich von 10-20% (von Zglinicki *et al.*, 1993). Eine Verminderung des Wassergehaltes führt zu einer trockenen Haut mit subjektivem Spannungsgefühl, Rötung und Schuppung (Chernosky, 1972). Diese Haut ist zudem anfälliger gegenüber äußeren Einflüssen

wie beispielsweise Wasser, Allergenen und Infektionserregern. Dabei spielt der Aminosäuregehalt für die Wasserbindung im *Stratum corneum* eine entscheidende Rolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass in trockener Haut ein verminderter Aminosäuregehalt besteht (Jakobsen *et al.*, 1990). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in dehydrierter Haut der Ceramid-Anteil sowohl qualitativ als auch quantitativ gegenüber normaler Haut verändert war (Melnik *et al.*, 1988; Imokawa *et al.*, 1991; Aktimoto *et al.*, 1993; Rogers *et al.*, 1996).

Durch eine akute Störung der Hautbarriere kommt es zu einer reaktiven Sezernierung des Inhaltes vorgeformter „lamellar bodies“ als Reparaturversuch der Permeabilitätsbarriere. Dieses hat einen Anstieg der DNA- und Lipidsynthese mit epidermaler Hyperproliferation zur Folge (Proksch *et al.*, 1993). Durch Induktion verschiedener Hyperproliferationskeratine, unter anderem auch des Proteins Involucrin, kommt es zu einer veränderten epidermalen Differenzierung (Ekanayake-Mudiyanselage *et al.*, 1998).

1.4.1 Atopisches Ekzem

Das atopische Ekzem (AE), auch Neurodermitis genannt, ist eine chronisch-rezidivierende Hauterkrankung (siehe Abb. 1.3), die bis zu 15% der Kinder in westlichen Industrieländern betrifft (Leung *et al.*, 2003). Die Patienten leiden unter trockener, spröder Haut mit starkem Juckreiz.



Abb. 1.3 Klinisches Erscheinungsbild des atopischen Ekzems

Besonders sind die Hautareale an den Beugeseiten der Extremitäten, das Gesicht und die Kopfhaut betroffen. Bei multifaktoriellem Hintergrund sind komplexe Interaktionen zwischen Umwelt- und genetischen Faktoren für die Erkrankung ursächlich (Morar *et al.*, 2006). 70-80% der Patienten leiden an der

Das atopische Ekzem ist durch eine trockene, spröde Haut insbesondere an den Beugeseiten der Extremitäten, dem Gesicht und der Kopfhaut charakterisiert. Es wird ein multifaktorieller Hintergrund angenommen.

sogenannten extrinsischen Form dieses Ekzems mit erhöhten IgE-Spiegeln und einer Typ-I-Sensibilisierung gegenüber unterschiedlichen Allergenen. Bei 20-30% der Patienten fehlen eine Sensibilisierung und ein erhöhter IgE-Spiegel, welche als intrinsische Form bezeichnet wird (Fölster-Holst *et al.*, 2006). In der Akutphase des Ekzems lässt sich eine Th2-Immunantwort nachweisen. Darüber hinaus wurde mehrfach bestätigt, dass FLG-Mutationen wie R501X und 2282del4 mit AE assoziiert sind (Palmer, 2006). Vergesellschaftet mit dem AE sind die allergische Rhinitis und das Asthma bronchiale (Marenholz *et al.*, 2006). Bisher sind annähernd 40 „Loss-of-function“-Mutationen bei AE identifiziert worden (O'Regan *et al.*, 2008).

1.4.2 Psoriasis

Die Psoriasis, eher bekannt unter dem Namen der „Schuppenflechte“, ist ebenfalls eine chronisch-entzündliche, in Schüben auftretende Hauterkrankung (siehe Abb. 1.4).

Eine groblamelläre Schuppung mit silbriger Farbe ist typisch für das Hautbild (Louden *et al.*, 2004). Die Prädilektionsstellen sind die Streckseiten der Gelenke, die Kopfhaut, Fingernägel und die Anogenitalregion. Neben der



Abb. 1.4 Klinisches Erscheinungsbild der Psoriasis

Die Psoriasis ist durch groblamelläre Schuppen silbriger Farbe geprägt. Prädilektionsstellen sind die Streckseiten der Gelenke, die Kopfhaut und die Anogenitalregion.

klassischen Plaque-Psoriasis ist die pustulöse Psoriasis abzugrenzen, die vor allem die Hand- und Fußflächen betrifft. Es werden zwei Häufigkeitsgipfel beschrieben: zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr sowie zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Die Prävalenz der Psoriasis beträgt 1-3% weltweit (Bowcock *et Cookson*, 2004). In 10-30% der Fälle sind auch die Gelenke betroffen (Psoriasisarthritis) (Bowcock, 2004). Ähnlich dem atopischen Ekzem ist eine multifaktorielle Genese evident. Neben der Vermutung einer psychischen Komponente spielen möglicherweise auch Autoimmunprozesse bei der Entwicklung der Krankheit eine Rolle. Es wird angenommen, dass körpereigene Autoantigene T-Zellen stimulieren. Im Vergleich

zum atopischen Ekzem ist die Psoriasis mit einer Th1-Reaktion assoziiert (Kupper *et al.*, 2004). Es wurde bisher keine Assoziation zu FLG-Mutationen nachgewiesen, jedoch konnte eine veränderte Filaggrin-Expression gezeigt werden (Proksch *et al.*, 2006).

1.4.3 Allergisches Kontaktekzem

Das allergische Kontaktekzem ist der häufigste Ekzemytyp und eine besondere Form einer Allergie. Ausgelöst wird diese Reaktion durch sensibilisierte Th1-Lymphozyten (Kupper *et al.*, 2004). Sie entspricht einer Reaktion vom verzögerten Typ, welche auch als Typ-IV-Reaktion nach Coombs und Gell bezeichnet wird. Das wohl bekannteste Beispiel für ein allergisches Kontaktekzem ist die



Abb. 1.5 Klinisches Erscheinungsbild des allergischen Kontaktekzems

Als häufigster Ekzemytyp zeigt sich in der Akutphase eine kräftige Rötung mit Bläschenbildung, während sich die Chronifizierung mit Hyperkeratosen und Rhagaden darstellt.

Nickelallergie. Schätzungsweise 1,9 bis 4,5 Millionen Menschen in Deutschland sind gegen Nickel sensibilisiert (Schnuch *et al.*, 2002). Das allergische Kontaktekzem ist eine chronisch-rezidivierende Erkrankung mit akuten Schüben und äußert sich in Form ekzematöser Hautveränderungen. Ein akuter Schub zeigt sich als kräftige Rötung mit Bläschenbildung, während die chronische Phase von Schuppen, Hyperkeratosen und Rhagaden geprägt ist (siehe Abb. 1.5). In der Frühphase kommt es zu einer Vasodilatation, einem interzellulärem Ödem und gleichzeitiger Bläschenbildung. Nach etwa 48 Stunden zeigen sich schließlich parakeratotische Hautveränderungen. Bei der Chronifizierung präsentiert sich das Hautbild hyperkeratotisch mit Lichenifikation und Rhagaden.

Der Erkrankung geht eine Sensibilisierungszeit von mindestens 12 Stunden bis zu mehreren Tagen voraus. Dies ist individuell unterschiedlich und abhängig von der Länge und Konzentration des Allergens, des Hautzustandes und der vorliegenden Barrierefunktion sowie von der genetischen Disposition (Frosch 4th edition, 2004).

Durch die ablaufende verzögerte Typ-IV-Reaktion nach Coombs und Gell, die durch eine zellvermittelte Reaktion charakterisiert wird, kommt den T-Lymphozyten die entscheidende Bedeutung zu (Saint-Mezard *et al.*, 2004). Darüber hinaus stellt sich die Kontaktallergie als ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Handekzems dar (Bryld *et al.*, 2003).

1.5 Zielsetzung der Dissertation

Die Differenzierung der Keratinozyten unterliegt einem fein abgestimmten Regelmechanismus, um eine funktionsfähige Permeabilitätsbarriere der Haut auszubilden. Für diesen sind verschiedene Keratine und Proteine wie die Caspase-14, Filaggrin, Loricrin und Involucrin von großer Bedeutung.

Das aus dem Profilaggrin durch Prozessierung freigesetzte Filaggrin spielt für die Hydratation der Haut eine entscheidende Rolle. Es wurde eine Assoziation von Mutationen des Filaggrin-Gens mit dem atopischen Ekzem nachgewiesen. Diese betreffen jedoch nur einen Teil der Patienten und können daher nicht für alle als krankheitsursächlich angesehen werden. Es könnten aber bei der Prozessierung von Filaggrin ebenfalls Defekte auftreten, die eine verminderte Filaggrin-Expression bewirken. Eine verminderte Caspase-14-Expression wurde bereits für die entzündliche Dermatose Psoriasis vulgaris gezeigt. Im Wesentlichen wurden lückenhafte zytoplasmatische Anfärbungen sowie prominente, ungefärbte Zellkerne beschrieben (Walsh *et al.*, 2005).

Somit lag es nahe, die Patienten mit atopischem Ekzem auf die Expression von Caspase-14 und Filaggrin sowie Loricrin und Involucrin zu untersuchen. Zum Vergleich mit anderen entzündlichen Dermatosen wurden zudem Analysen an Patienten mit Psoriasis und allergischem Kontaktekzem durchgeführt. Als Kontrolle dienten Normalhautproben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Hautbiopsien

Es handelt sich bei der vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Studie. Dabei stützt sich die Arbeit auf bereits entnommene Hautbiopsien, die in den histologischen Archiven der Dermatologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel, aufbewahrt wurden. Die paraffinfixierten Präparate wurden unter gleichen Bedingungen archiviert und gelagert.

Die Zuordnung der Patienten zu den drei Krankheitsbildern erfolgte anhand der klinischen und histologischen Diagnosen, die innerhalb des Zeitraums von 2003-2007 erstellt wurden. Die jeweiligen Paraffinblöcke wurden zum Zwecke der immunhistochemischen Untersuchung herausgesucht. Es wurden die Daten von insgesamt 33 Patienten im Alter von 36 bis 85 Jahren (Durchschnittsalter: 57,2 Jahre) ausgewertet. 14 Hautproben stammten von weiblichen Patienten, 19 Hautproben wurden von männlichen Patienten entnommen.

Ausgewählt wurden Hautbiopsien mit folgenden Hauterkrankungen:

- Atopisches Ekzem
- Psoriasis
- Allergisches Kontaktekzem

Hinsichtlich der Diagnose des atopischen Ekzems ergaben sich folgende Verteilung:

- 12 Präparate
- Patienten im Alter von 36 bis 79 Jahren (Durchschnittsalter: 55,3 Jahre)
- eine Geschlechtsverteilung von 5 weiblichen zu 7 männlichen Patienten

Hinsichtlich der Diagnose der Psoriasis ergaben sich folgende Verteilungen:

- 12 Präparate
- Patienten im Alter von 41 bis 81 Jahren (Durchschnittsalter: 57,6 Jahre)
- eine Geschlechtsverteilung von 4 weiblichen zu 8 männlichen Patienten

Hinsichtlich der Diagnose des allergischen Kontaktekzems ergaben sich folgende Verteilungen:

- 9 Präparate
- Patienten im Alter von 43 bis 85 Jahren (Durchschnittsalter: 58,8 Jahre)
- eine Geschlechtsverteilung von 5 weiblichen zu 4 männlichen Patienten
- es bestanden Kontaktsensibilisierungen gegen Duftstoffe, Kaliumdichromat und Kobalt-II-Chlorid, Nickel, 4-4-Diamiondiphenylmethan und Wollwachse

Als Kontrolle dienten sieben Normalhautproben. Diese Proben wurden im Rahmen plastisch-ästhetisch chirurgischer Eingriffe gewonnen. Die histologischen Schnitte wurden aus intakter Haut, welche im Rahmen der jeweiligen Operationen entfernt wurden, entnommen. Die Probanden waren zwischen 37 und 62 Jahre alt (Durchschnittsalter: 47 Jahre). Dabei stammten 60 % der Präparate von weiblichen sowie 40 % der Präparate von männlichen Probanden.

2.1.2 Antikörper

Alle histologischen Schnitte wurden mit jeweils vier verschiedenen Antikörpern gefärbt.

Es wurden kommerzielle Antikörper verwendet, die dem histologischen Labor der Dermatologie, UKSH, Campus Kiel, für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Polyclonal Antibody to Caspase-14, Spezies: Schwein, (Imgenex; Catalog No: IMG-5713)

Monoclonal Antibody to Filaggrin, Spezies: Kaninchen, (abcam; FLG01; Catalog No: ab3137)

Polyclonal Antibody against Loricrin, Spezies: Schwein, (COVANCE; BAbCO, Catalog NO: PRB-145P)

Monoclonal Antibody to Involucrin, Spezies: Kaninchen, (Acris Antibodies GmbH; Catalog No: DM3111)

Die Beurteilung der Färbungen erfolgte nach einer Punkte-Skala von 0 bis 3, wobei die Zahl 1 das Bild einer gesunden Haut widerspiegelte.

2.1.2.1 Caspase-14

- 0: keine Anfärbung
- 1: Anfärbbarkeit ab dem unteren *Stratum spinosum*
- 2: Anfärbbarkeit erst ab dem mittleren *Stratum spinosum*
- 3: deutliche Anfärbbarkeit des *Stratum granulosum* und setzt sich optisch von den anderen Zellreihen ab

2.1.2.2 Filaggrin

- 0: keine Anfärbung
- 1: 1-2 Zellreihen des *Stratum granulosum* sind angefärbt
- 2: 1-2 Zellreihen, teilweise 3-4 Zellreihen des *Stratum granulosum* sind angefärbt
- 3: 3-4 Zellreihen des *Stratum granulosum* sind angefärbt

2.1.2.3 Loricrin

- 0: keine Anfärbung
- 1: 1-2 Zellreihen des *Stratum granulosum* sind angefärbt
- 2: 1-2 Zellreihen, teilweise 3-4 Zellreihen des *Stratum granulosum* sind angefärbt
- 3: 3-4 Zellreihen des *Stratum granulosum* sind angefärbt

2.1.2.4 Involucrin

- 0: keine Anfärbung
- 1: Anfärbbarkeit des oberen *Stratum spinosum* bis *Stratum corneum*
- 2: Anfärbbarkeit des mittleren *Stratum spinosum* bis *Stratum corneum*
- 3: Anfärbbarkeit unteres *Stratum spinosum* bis *Stratum corneum*

2.1.3 Weiteres Material

Aqua destillata	DeltaSelect, Dreieich
DAB	BioGenix, San Ramon, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycergel Mounting Serum	DAKO Glostrup, Dänemark
H ₂ O ₂	Walter, Kiel
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
StreptAB Complex HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark
Tris	Merck, Darmstadt
Xylol	Walter, Kiel

Citratpuffer:

9ml Stammlösung A und 41ml Stammlösung B in 450ml Aqua dest. gelöst

Stammlösung A: 0,1M Zitronensäure (21,0g C₆H₈O₇·xH₂O) in 1000ml Aqua dest.

Stammlösung B: 0,1M Natriumcitrat (29,41g C₆H₅O₇·xH₂O) in 1000ml Aqua dest.

TBS:

Stammlösung: pH 7,4; 56g Tris, 218,25g Natriumchlorid z.A. ad 2500ml Aqua dest.,
Gebrauchslösung mit Aqua dest. auf 1:10 verdünnen

2.2 Methoden

2.2.1 Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung wurden aus den in Paraffin eingebetteten Hautproben 1-3µm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend wurden sie auf Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen und für 40 Minuten bei 60°C getrocknet.

Zur Beurteilung der epidermalen Proliferation und Differenzierung wurden die Schnitte mit den Antikörpern Caspase-14, Filaggrin, Loricrin und Involucrin gefärbt.

Die Anfärbung erfolgte nach den Herstellerangaben im histologischen Labor der Dermatologie, UKSH, Campus Kiel.

Die Anfärbung der Antikörper Caspase-14 und Loricrin erfolgte in folgenden Schritten:

1. Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte für zweimal fünf Minuten in Xylol
Einwirken für zweimal eine Minute in 100%igem Alkohol, 96%igem Alkohol sowie 70%igem Alkohol
Spülung der Schnitte in Aqua dest.
2. Blockieren der endogenen Peroxidase durch Inkubation von 3%iger H₂O₂/Aqua dest. Lösung über fünf Minuten
3. Spülen in Aqua dest.
anschließend 30 minütiges Kochen der Schnitte in 10mM Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6.0
4. Abkühlung für weitere 30 Minuten im Citratpuffer und Spülen in Aqua dest.
Schnitte für fünf Minuten in TBS stellen
5. Schnitte für 30 Minuten mit *normal swine serum* (DAKO Code No. X0901) inkubieren
6. überschüssige Serum entfernen, Schnitte mit dem 1. Antikörper für weitere 30 Minuten inkubieren
7. Spülen für dreimal fünf Minuten in TBS
weitere Inkubation des 2. Antikörpers (*biotinylated swine-anti rabbit immunoglobulins*) für 30 Minuten.

8. Spülung für dreimal fünf Minuten in TBS, anschließende Inkubation des streptABC/Complexes
9. Schnitte dreimal fünf Minuten in TBS spülen
anschließend Peroxidase Substrat-Lösung DAB für fünf bis 15 Minuten
10. DAB mit Aqua dest. abspülen und zur Gegenfärbung für fünf bis zehn Sekunden in Hämalaun-Lösung stellen
11. "Bläuen" in Leitungswasser und Eindeckeln mit Glycergel Mounting Medium

Die Anfärbung des Antikörpers Filaggrin erfolgte in folgenden Schritten:

1. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte für zweimal fünf Minuten in Xylol
2. Einwirken für zweimal eine Minute in 100%igem Alkohol, 96%igem Alkohol sowie 70%igem Alkohol
Spülung der Schnitte in Aqua dest.
3. Blockieren der endogene Peroxidase durch Inkubation von 3%iger H_2O_2 /Aqua dest. Lösung über fünf Minuten
4. Spülen in Aqua dest.
anschließend 30 minütiges Kochen der Schnitte in 10mM Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6.0
5. Abkühlung für weitere 30 Minuten im Citratpuffer und Spülen in Aqua dest.
Schnitte für fünf Minuten in TBS stellen
6. Schnitte für 30 Minuten mit *normal rabbit serum* (DAKO Code No. X0902) inkubieren
7. überschüssiges Serum entfernen, Schnitte mit dem 1. Antikörper für weitere 30 Minuten inkubieren
8. Spülen für dreimal fünf Minuten in TBS
weitere Inkubation des 2. Antikörpers (*biotinylated rabbit-anti mouse immunoglobulins*) für 30 Minuten
9. Spülung für dreimal fünf Minuten in TBS, anschließende Inkubation des streptABC/Complexes
10. Schnitte dreimal fünf Minuten in TBS spülen
anschließende Peroxidase Substrat-Lösung DAB für fünf bis 15 Minuten
11. DAB mit Aqua dest. abspülen und zur Gegenfärbung für fünf bis zehn Sekunden in Hämalaun-Lösung stellen
12. "Bläuen" in Leitungswasser und Eindeckeln mit Glycergel Mounting Medium

Die Anfärbung des Antikörpers Involucrin erfolgte in folgenden Schritten:

1. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte für zweimal fünf Minuten in Xylol
Einwirken für zweimal eine Minute in 100%igem Alkohol, 96%igem Alkohol sowie 70%igem Alkohol
Spülung der Schnitte in Aqua dest.
2. Blockieren der endogene Peroxidase durch Inkubation von 3%iger H₂O₂/Aqua dest. Lösung über fünf Minuten
3. Spülen in Aqua dest.
anschließend sechs minütige Inkubation mit der Proteinase K
4. Spülen in Aqua dest.
Schnitte für 30 Minuten mit *normal rabbit serum* (DAKO Code No. X0902) inkubieren
5. überschüssiges Serum entfernen, Schnitte mit dem 1. Antikörper für weitere 30 Minuten inkubieren
6. Spülen für dreimal fünf Minuten in TBS
weitere Inkubation des 2. Antikörpers (*biotinylated rabbit-anti mouse immunoglobulins*) für 30 Minuten
7. Spülung für dreimal fünf Minuten in TBS, anschließende Inkubation des streptABC/Complexes
8. Schnitte dreimal fünf Minuten in TBS spülen
anschließende Peroxidase Substrat-Lösung DAB für fünf bis 15 Minuten
9. DAB mit Aqua dest. abspülen und zur Gegenfärbung für fünf bis zehn Sekunden in Hämalaun-Lösung stellen
10. "Bläuen" in Leitungswasser und Eindeckeln mit Glycergel Mounting Medium

2.2.2 Auswertung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter dem Mikroskop (Firma Zeiss) in einer 100fachen sowie 200fachen Vergrößerung. Von zwei unabhängigen Untersuchern wurde die Bewertung der Hautproben in die oben genannten Kategorien vorgenommen.

2.2.3 Statistik

Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels des statistischen Programms SPSS. Für die statistische Auswertung wurde der exakte Test nach Fisher angewandt. Dies ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit zweier Merkmale. Für die Auswertung wird hierzu die Kontingenztafel herangezogen.

Auf Grund der vorliegenden Daten, welche sich mit einer erwarteten Häufigkeit von <5 Proben in mehr als 20% der Zellen und einer beobachteten Häufigkeit in einigen Zellen mit der Anzahl Null darstellten, eignete sich somit der exakte Test nach Fisher. Das übliche Signifikanzniveau von 5% wurde durch die Bonferoni-Korrektur ($\alpha_{adj} = 0,05/3 = 0,017 = 1,7\%$) auf den p-Wert von $p = 1,7\%$ gesenkt. Das Signifikanzniveau wurde auf Grund des multiplen Testens gesenkt, um falsch positive Ergebnisse (Fehler 1. Grades) zu vermeiden.

3 Ergebnisse

Es wurden die drei entzündlichen Hauterkrankungen atopisches Ekzem, Psoriasis und allergisches Kontaktekzem untersucht. Ihnen gemeinsam ist eine gestörte Hautbarriere. Als Vergleichsgruppe wurde klinisch gesunde Haut herangezogen.

Die Hautschnitte wurden mit vier verschiedenen Antikörpern angefärbt, um die Expressionen folgender Proteine darzustellen:

- Caspase-14
- Filaggrin
- Loricrin
- Involucrin

3.1 Vergleich des atopischen Ekzems mit Normalhaut mittels immunhistochemischer Analyse

3.1.1 Anfärbung der Caspase-14 bei atopischem Ekzem und Normalhaut

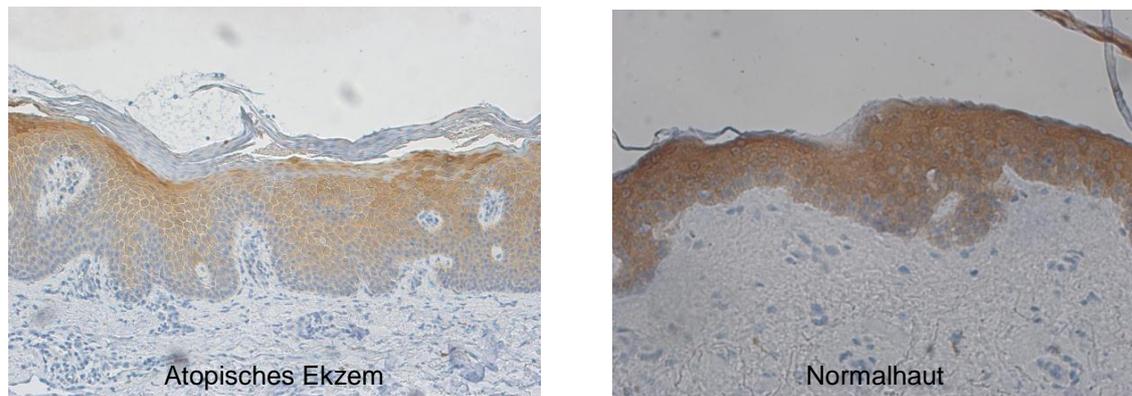


Abb. 3.1 Lichtmikroskopische Darstellung der Caspase-14-Expression bei atopischem Ekzem und Normalhaut

Die Expression der Caspase-14 stellte sich in der Mehrzahl der Präparate des atopischen Ekzems verspätet dar. Die Anfärbbarkeit war ab dem mittleren *Stratum spinosum* zu erkennen. In den Präparaten zur Normalhaut zeigte sich eine Anfärbung bereits in den basalen Zellreihen.

In der Normalhaut zeigte sich bereits ab dem *Stratum suprabasale* eine Anfärbung der Caspase-14 im Zytoplasma. Bezogen auf die gesamte Epidermis ließ sich vom *Stratum suprabasale* bis zum *Stratum corneum* eine leichte Intensitätszunahme feststellen. Die Anfärbung der Caspase-14 in der Epidermis des atopischen Ekzems bot eine deutlich verminderte Anfärbung in den unteren Schichten und nahm an Intensität in den höheren Zellschichten zu. Eine deutliche Anfärbung war in sieben von zwölf Präparaten vermehrt erst ab dem mittleren *Stratum spinosum* zu erkennen bzw. die Färbung war vom *Stratum granulosum* zum *Stratum spinosum* abnehmend. Es zeigten sich im Expressionsmuster der Caspase-14 im Vergleich des atopischen Ekzems mit der Normalhaut signifikante Unterschiede (p-Wert=0,013).

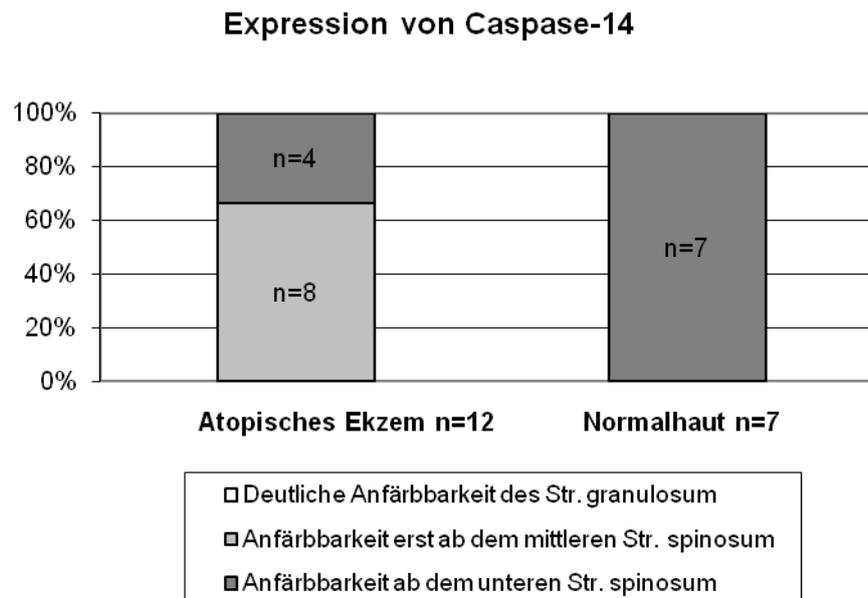


Abb. 3.2 Anfärbbarkeit der Caspase-14 bei atopischem Ekzem und Normalhaut

Beim atopischen Ekzem zeigte sich in vier Präparaten eine Anfärbbarkeit der Caspase-14 ab dem unteren *Stratum spinosum*, in acht Präparaten ließ sich eine Anfärbbarkeit erst ab dem mittleren *Stratum spinosum* feststellen. Als Vergleich dienten Normalhaut-Präparate, die eine Anfärbbarkeit ab dem unteren *Stratum spinosum* aufwiesen.

3.1.2 Anfärbung des Filaggrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut

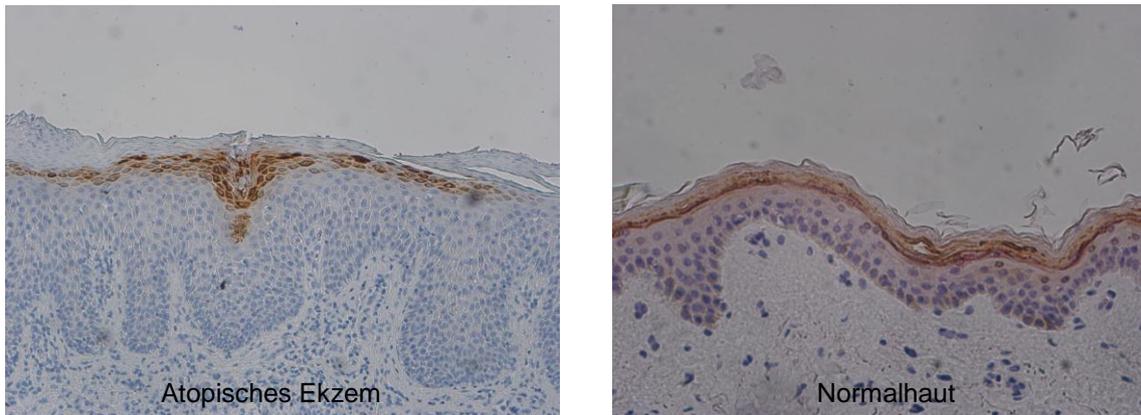


Abb. 3.3 Lichtmikroskopische Darstellung der Filaggrin-Expression bei atopischem Ekzem und Normalhaut

Die Expression von Filaggrin stellte sich in elf von zwölf Präparaten des atopischen Ekzems verbreitert auf drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum* dar. In den Präparaten zur Normalhaut zeigte sich lediglich eine Anfärbung der oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum*.

Nach Anfärbung des Filaggrins in der Normalhaut und der Haut des atopischen Ekzems zeigten sich unterschiedliche Expressionsmuster. In allen Hautschnitten der Normalhaut ließ sich eine lückenlose Anfärbung des Filaggrins in den oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* feststellen. Im Gegensatz dazu war eine Verbreiterung der Anfärbungszone in sieben von zwölf Hautproben des atopischen Ekzems bis in das obere *Stratum spinosum* zu erkennen. Die Anfärbung war jedoch lückenhaft und unregelmäßig. So zeigten Zellen im *Stratum granulosum* stellenweise keine Anfärbung, teilweise ließ sich eine Anfärbung der oberen zwei Zellreihen bis zu einer Ausbreitung der Anfärbung auf die oberen vier Zellreihen erkennen. Die Veränderung der Immunfärbung fiel beim atopischen Ekzem im Vergleich zur Normalhaut statistisch signifikant aus (p-Wert= $<0,001$).

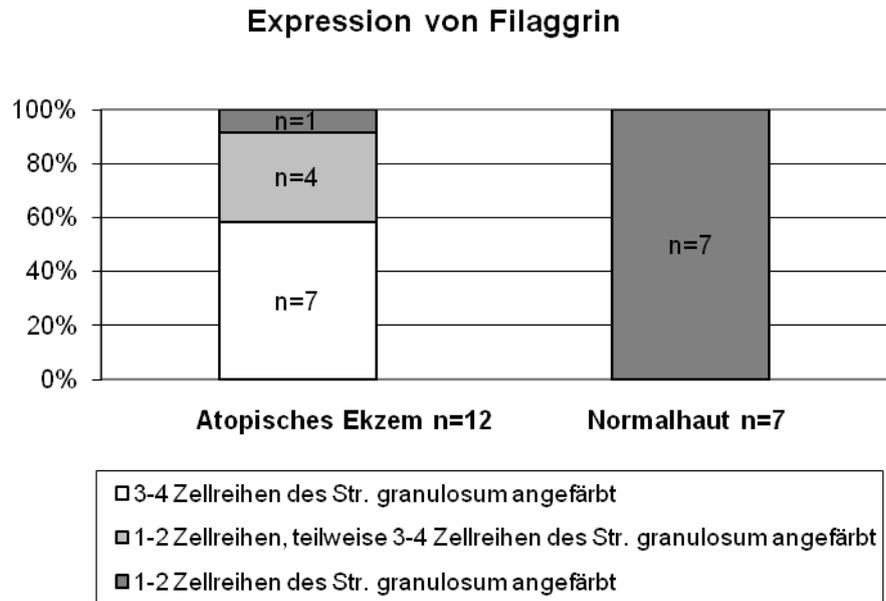


Abb. 3.4 Anfärbarkeit des Filaggrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut

In sieben Präparaten des atopischen Ekzems zeigte sich eine Verbreiterung der Filaggrin-Expression auf die oberen drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum*. In vier Präparaten stellte sich eine Filaggrin-Anfärbarkeit der oberen ein bis zwei Zellreihen mit einer Ausdehnung der Anfärbung auf insgesamt drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum* dar. In den Normalhaut-Präparaten waren die oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* angefärbt.

3.1.3 Anfärbung des Loricrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut

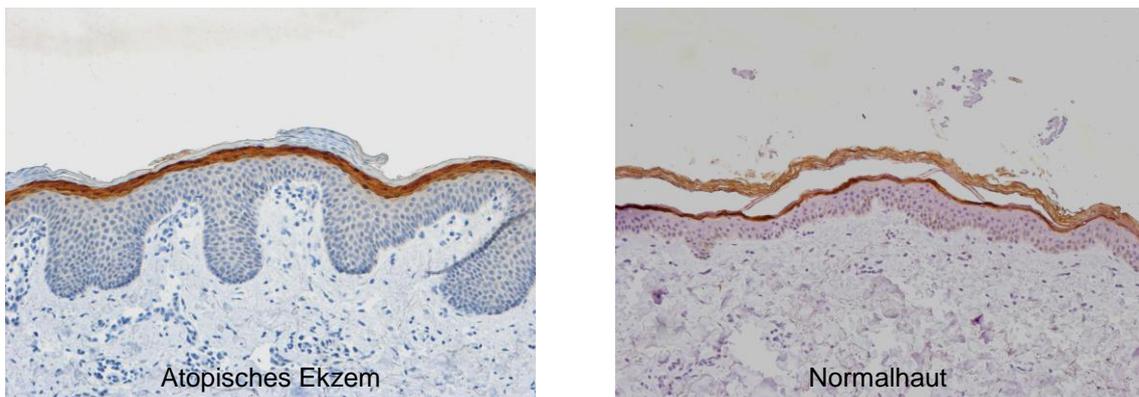


Abb. 3.5 Lichtmikroskopische Darstellung der Loricrin-Expression bei atopischem Ekzem und Normalhaut

Die Expression von Loricrin stellte sich in acht von zwölf Präparaten des atopischen Ekzems verbreitert auf drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum* dar. In den Präparaten zur Normalhaut zeigte sich lediglich eine Anfärbung der oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum*.

In der Anfärbung des Proteins Loricrin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Normalhaut und der des atopischen Ekzems (p-Wert=0,019). In allen Präparaten der Normalhaut sowie in vier von zwölf Präparaten des atopischen Ekzems wurde Loricrin in den beiden oberen Zellreihen des *Stratum granulosum* exprimiert. In sechs Präparaten des atopischen Ekzems zeigte sich eine Ausdehnung der Anfärbung auf das obere *Stratum spinosum*, die teilweise Unterbrechungen in der Kontinuität der Färbung aufwiesen.

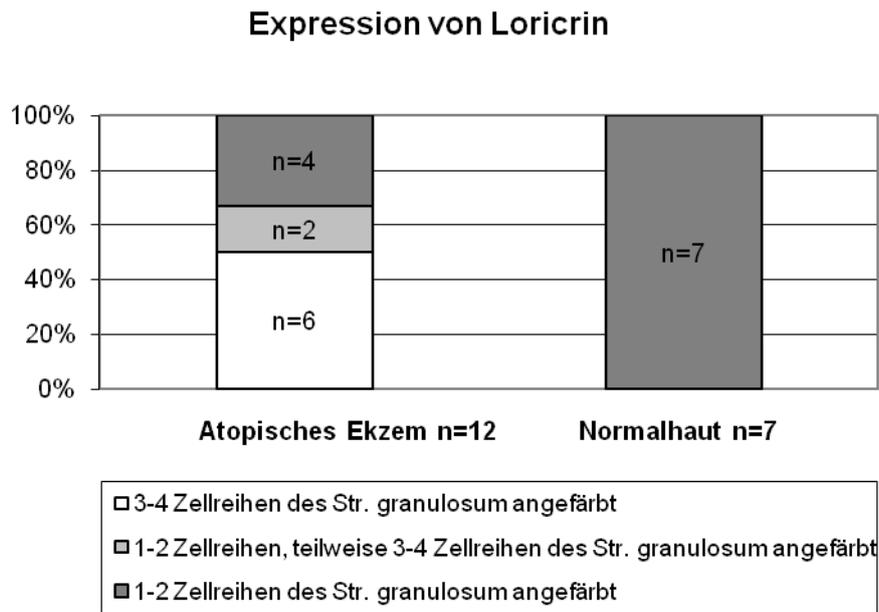


Abb. 3.6 Anfärbarkeit des Loricrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut

Die Anfärbarkeit von Loricrin bei atopischem Ekzem stellte sich in sechs von zwölf Präparaten auf drei bis vier Zellreihen verbreitert dar. Zwei von zwölf Präparaten zeigten eine teilweise Verbreiterung der Anfärbung auf drei bis vier Zellreihen des oberen *Stratum granulosum*, vier Präparate zeigten die gleiche Anfärbarkeit auf die oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* wie die Präparate der Normalhaut.

3.1.4 Anfärbung des Involucrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut

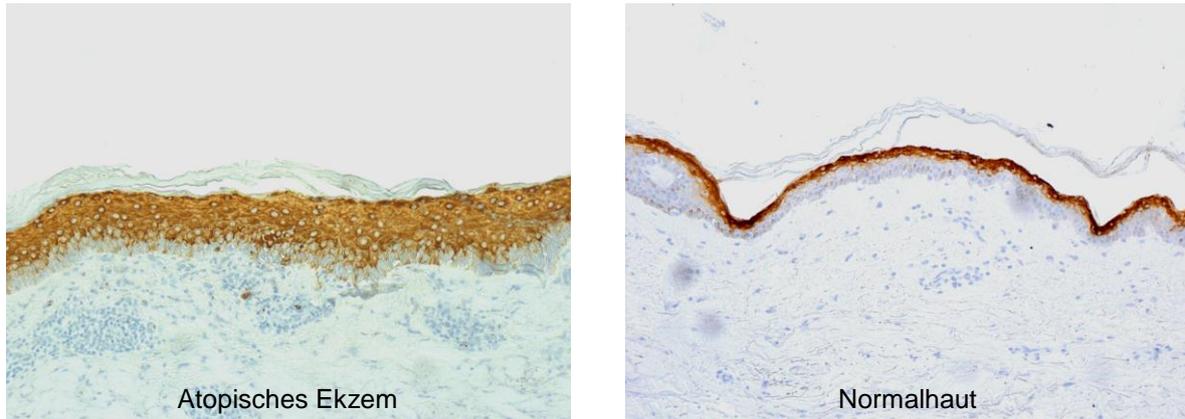


Abb. 3.7 Lichtmikroskopische Darstellung der Involucrin-Expression bei atopischem Ekzem und Normalhaut

Die Anfärbbarkeit des Involucrins bei atopischem Ekzem zeigte eine deutliche Verbreiterung innerhalb der Epidermis, die beginnend ab dem unteren bzw. mittleren *Stratum spinosum* zu erkennen war. In den Präparaten der Normalhaut stellte sich die Anfärbbarkeit ab dem oberen *Stratum spinosum* dar.

In der Normalhaut zeigte Involucrin eine Anfärbung des oberen *Stratum spinosum* und des *Stratum granulosum*. Im Vergleich dazu war die Anfärbung des Involucrins in der atopischen Haut ausgedehnter und bereits früher erkennbar. Ab dem unteren bzw. dem mittleren *Stratum spinosum* konnte eine Färbung festgestellt werden. Es ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Breite der immunhistologischen Anfärbung zwischen der atopischen und der Normalhaut aufzeigen (p-Wert=<0,001).

Expression von Involucrin

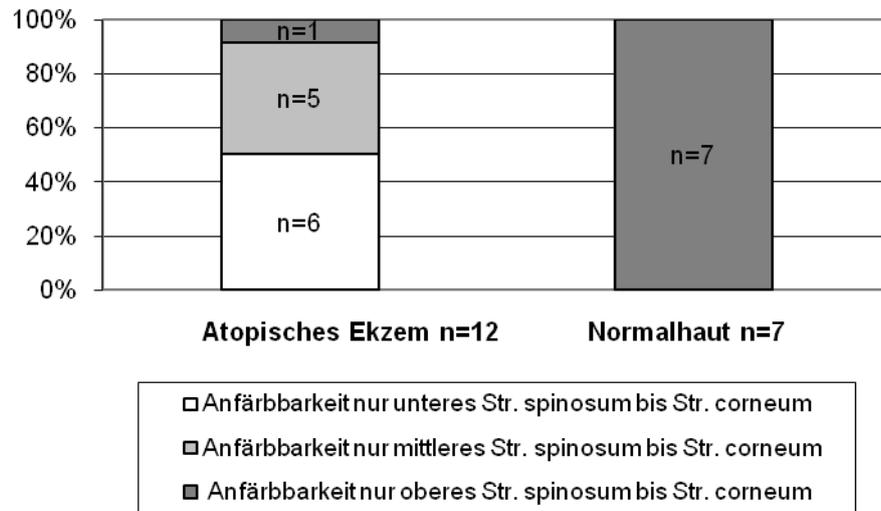


Abb. 3.8 Anfärbarkeit des Involucrins bei atopischem Ekzem und Normalhaut

Sechs Präparate des atopischen Ekzems zeigten eine Anfärbarkeit von Involucrin beginnend ab dem unteren *Stratum spinosum*. In fünf von zwölf Präparaten des atopischen Ekzems war eine Anfärbarkeit ab dem mittleren *Stratum spinosum* zu erkennen. Ein Präparat des atopischen Ekzems verhielt sich wie die Normalhaut-Präparate mit einer Involucrin-Anfärbarkeit ab dem oberen *Stratum spinosum*.

3.2 Vergleich der Psoriasis mit Normalhaut mittels immunohistochemischer Analyse

3.2.1 Anfärbung der Caspase-14 bei Psoriasis und Normalhaut

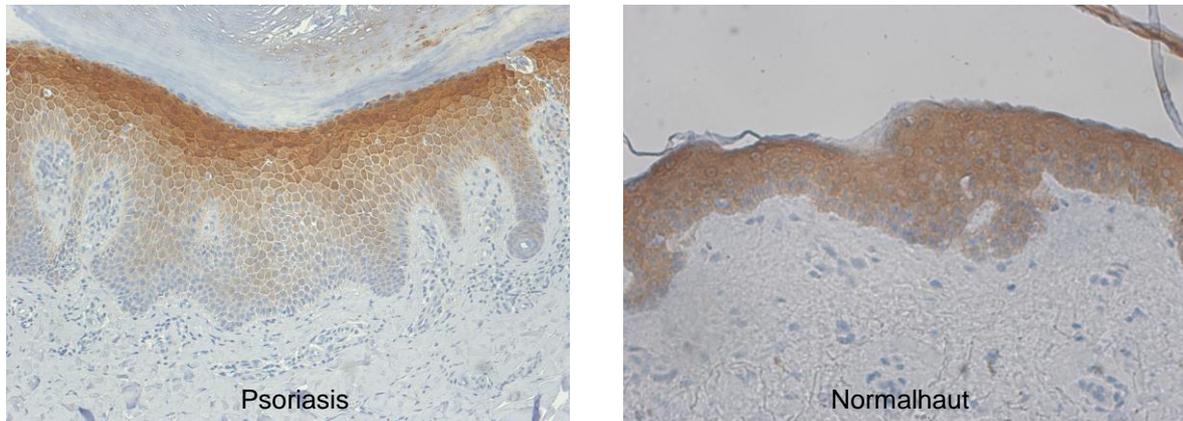


Abb. 3.9 Lichtmikroskopische Darstellung der Caspase-14-Expression bei Psoriasis und Normalhaut

Die Anfärbbarkeit der Caspase-14 bei Psoriasis zeigte in zehn Präparaten abweichende Expressionsmuster im Vergleich zur Normalhaut. Bei Psoriasis war die Caspase-14 verspätet ab dem mittleren *Stratum spinosum* nachzuweisen. Teilweise stellte sich das *Stratum granulosum* besonders farbintensiv dar. Die Normalhaut-Präparate zeigten einen Beginn der Anfärbbarkeit bereits ab dem *Stratum suprabasale*.

Die Caspase-14 zeigte in der Normalhaut eine Anfärbung der Epidermis, die ab dem *Stratum suprabasale* festzustellen war. Die Psoriasis-Haut bot eine unregelmäßige und lückenhafte Anfärbung der Epidermis. Für die Expression der Caspase-14 zeigte sich eine vom *Stratum suprabasale* zunehmende Anfärbung. Drei Hautproben ließen eine deutlich verstärkte Anfärbung des *Stratum granulosum* und des oberen *Stratum spinosum* mit einer bis zum unteren Drittel reichenden Anfärbung des *Stratum spinosum* erkennen. Einige Zellkerne zeigten keine Anfärbung im *Stratum granulosum*. Es ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Expressionsmuster der Caspase-14 im Vergleich der Psoriasis zur Normalhaut nachweisen (p-Wert=0,002).

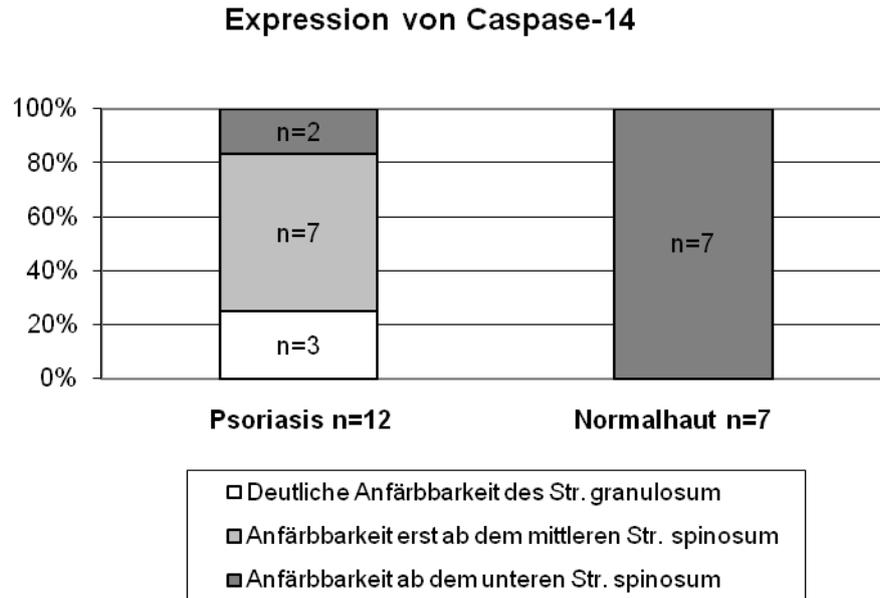


Abb. 3.10 Anfärbarkeit der Caspase-14 bei Psoriasis und Normalhaut

Die Auswertung der Psoriasis ergab eine verspätete Anfärbarkeit der Caspase-14 in sieben von zwölf Präparaten. Sie begann ab dem mittleren *Stratum spinosum*. Bei drei Präparaten zeigte sich eine besonders deutliche Anfärbung des *Stratum granulosum* mit einer schwächeren Färbung des *Stratum spinosum*. Im Vergleich der Anfärbarkeit verhielten sich zwei Psoriasis-Präparate ähnlich der Normalhaut mit einer Anfärbarkeit ab dem unteren *Stratum spinosum*.

3.2.2 Anfärbung des Filaggrins bei Psoriasis und Normalhaut

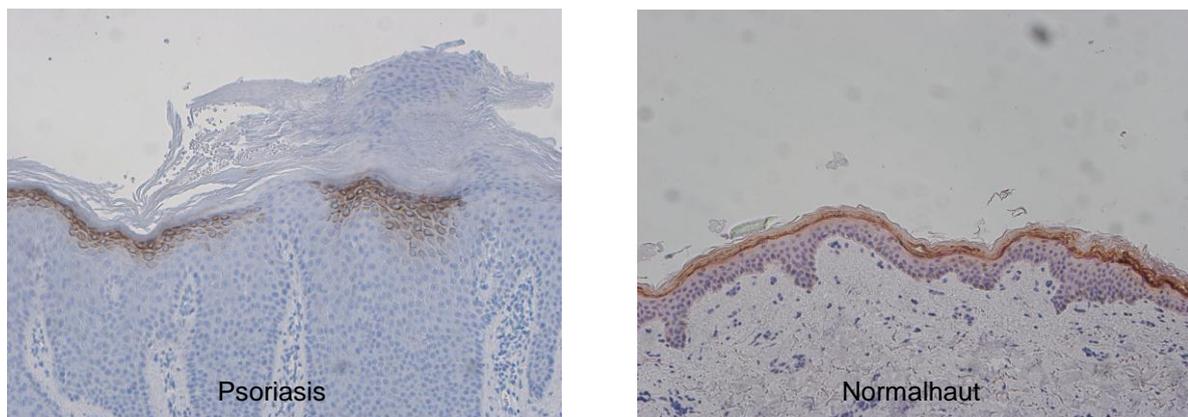


Abb. 3.11 Lichtmikroskopische Darstellung der Filaggrin-Expression bei Psoriasis und Normalhaut

In Abschnitten des Psoriasis-Präparates war eine lückenhafte Anfärbung von Filaggrin erkennbar, diese Anfärbung zeigte sich im Vergleich zur Normalhaut deutlich verbreitert. Die Filaggrin-Expression bei Normalhaut stellte sich auf die oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* begrenzt dar.

Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Expression des Filaggrins bei der Psoriasis und der Normalhaut gezeigt werden (p -Wert= $<0,001$). In der Normalhaut wurde Filaggrin lückenlos im *Stratum granulosum* exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Psoriasis eine Filaggrin-Expression, die lückenhaft war und bis in das obere *Stratum spinosum* reichte.

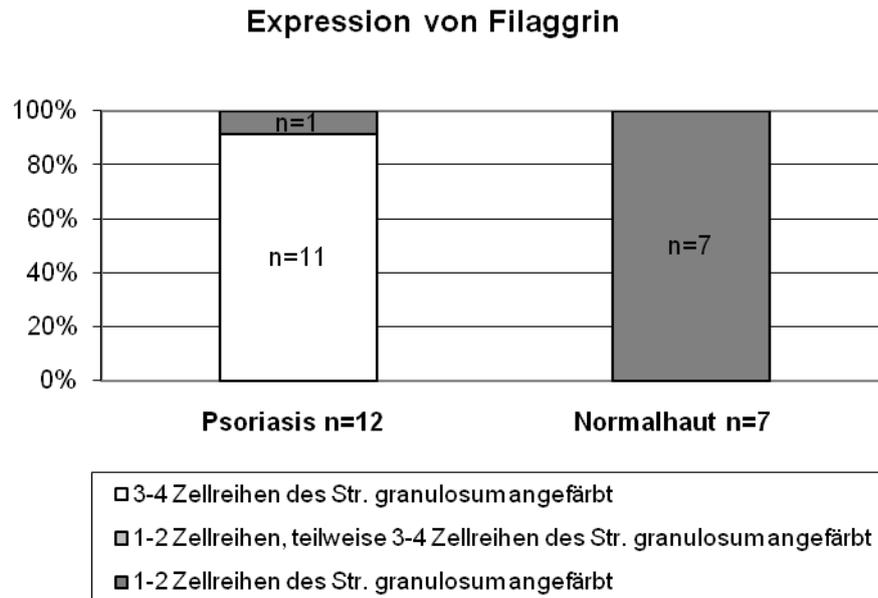


Abb. 3.12 Anfärbarkeit des Filaggrins bei Psoriasis und Normalhaut

In elf von zwölf Präparaten der Psoriasis ließ sich eine verbreiterte Anfärbarkeit des Filaggrins auf die oberen drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum* nachweisen. Die Normalhaut sowie ein Präparat der Psoriasis zeigten eine Färbung des Filaggrins beschränkt auf die oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum*.

3.2.3 Anfärbung des Loricrins bei Psoriasis und Normalhaut

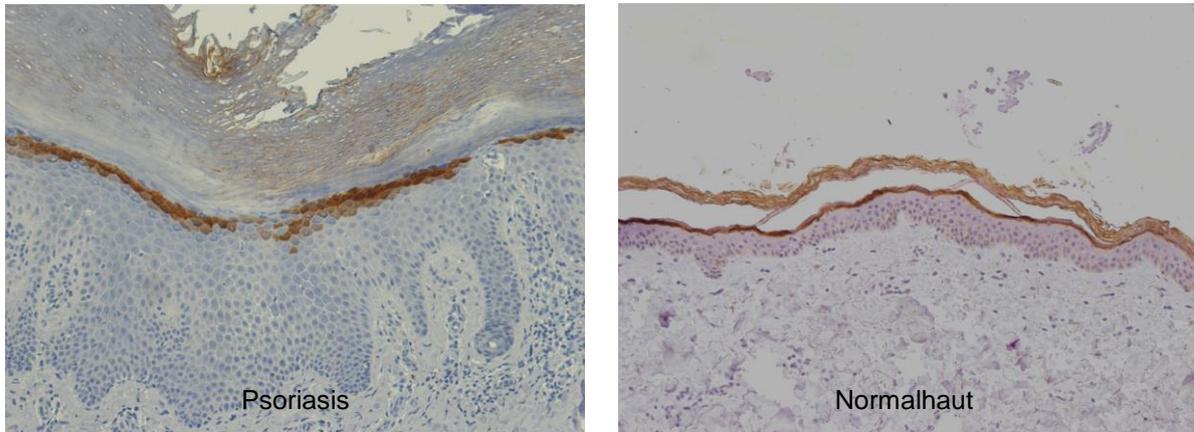


Abb. 3.13 Lichtmikroskopische Darstellung der Loricrin-Expression bei Psoriasis und Normalhaut

Die Anfärbbarkeit des Loricrins bei Psoriasis zeigte sich in zehn Präparaten verändert zur Normalhaut. Sie war auf die oberen drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum* verbreitert. Die Loricrin-Färbung bei Normalhaut stellte sich auf die oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* begrenzt dar.

In der Normalhaut zeigte sich eine Anfärbung der oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum*. Bei der Psoriasis war eine Ausweitung der Anfärbung bis in das obere *Stratum spinosum* zu erkennen. Die Anfärbung des Loricrins war nicht durchgängig und wies eine lückenhafte Expression bei der Psoriasis auf. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Anfärbung des Loricrins bei der Psoriasis und der Normalhaut (p-Wert=0,001).

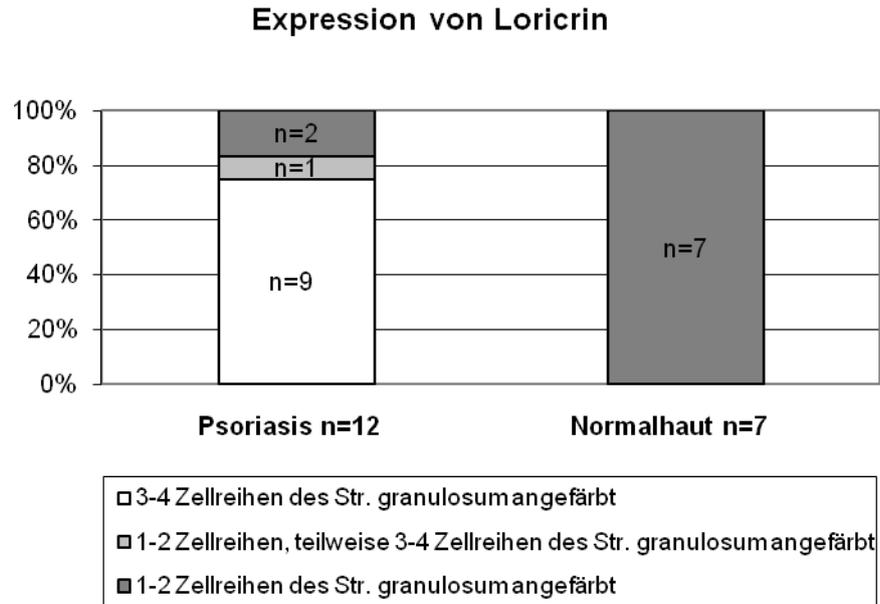


Abb. 3.14 Anfärbarkeit des Loricrins bei Psoriasis und Normalhaut

In neun von zwölf Hautpräparaten der Psoriasis stellte sich eine Anfärbarkeit ausgedehnt auf die oberen drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum* dar. Ein Präparat zeigte eine Anfärbarkeit der oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* mit zum Teil Anfärbung weiterer Zellreihen des *Stratum granulosum*. Sowohl die Normalhaut als auch zwei Präparate der Psoriasis zeigten eine Loricrin-Anfärbung der oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum*.

3.2.4 Anfärbung des Involucrins bei Psoriasis und Normalhaut

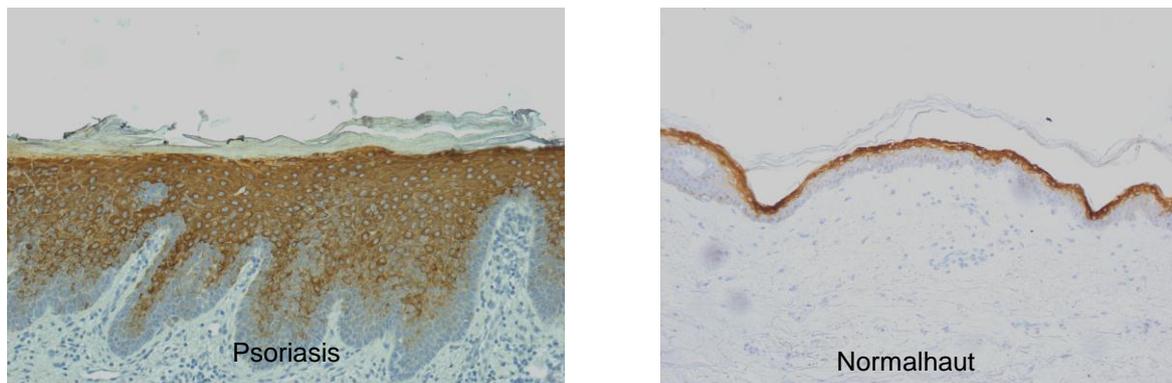


Abb. 3.15 Lichtmikroskopische Darstellung der Involucrin-Expression bei Psoriasis und Normalhaut

Die Anfärbarkeit von Involucrin in den Präparaten der Psoriasis zeigte eine Verbreiterung ausgehend vom unteren bzw. vom mittleren *Stratum spinosum* bis zum *Stratum corneum*. In der Normalhaut begrenzte sich die Anfärbung vom oberen *Stratum spinosum* bis zum *Stratum corneum*.

In der gesunden Haut führte der Antikörper für Involucrin zu einer scharfen, bandförmigen Anfärbung des *Stratum granulosum* und des oberen *Stratum*

spinosum. In der Psoriasis-Haut zeigte sich eine Ausbreitung mit diffuser Anfärbung der Epidermis bis in die mittleren und unteren Schichten des *Stratum spinosum*. Es ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Psoriasis-veränderten Epidermis im Vergleich zum Expressionsmuster der Normalhaut darstellen (p -Wert= $<0,001$).

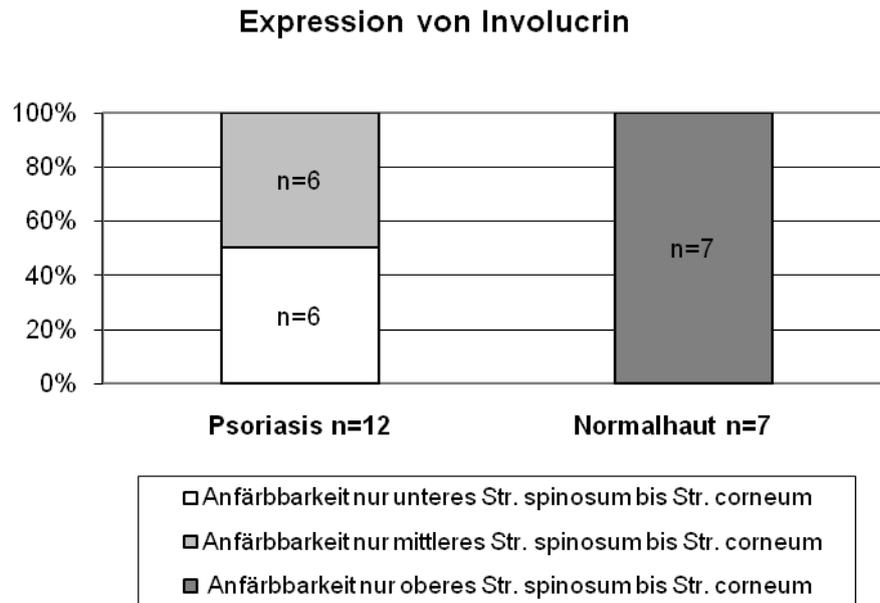


Abb. 3.16 Anfärbbarkeit des Involucrins bei Psoriasis und Normalhaut

In sechs von zwölf Präparaten der Psoriasis stellte sich eine verfrühte Anfärbung von Involucrin dar, die vom unteren *Stratum spinosum* ausging. Sechs Psoriasis-Präparate zeigten eine Anfärbbarkeit ab dem mittleren *Stratum spinosum*. Die Involucrin-Färbung bei Normalhaut war vom oberen *Stratum spinosum* bis *Stratum corneum* erkennbar.

3.3 Vergleich des allergischen Kontaktekzems mit Normalhaut mittels immunhistochemischer Analyse

3.3.1 Anfärbung der Caspase-14 bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

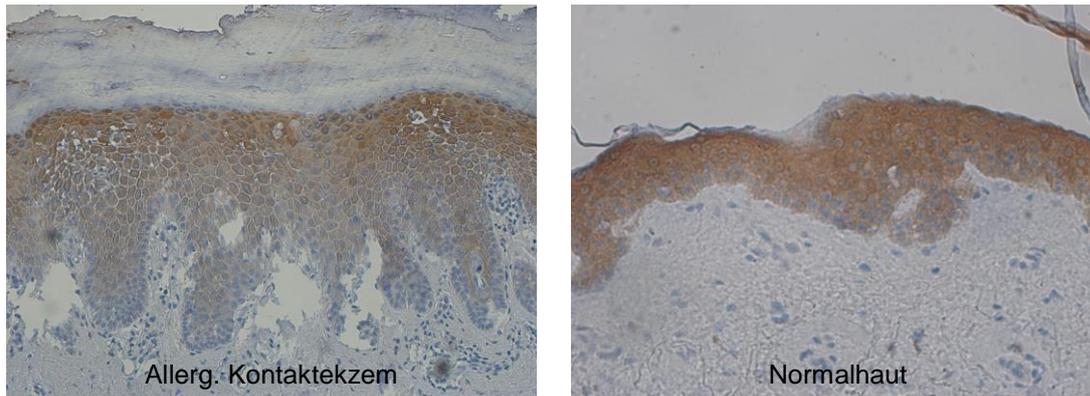


Abb. 3.17 Lichtmikroskopische Darstellung der Caspase-14 bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

Die Anfärbbarkeit von Caspase-14 bei allergischem Kontaktekzem stellte sich in der Mehrzahl der Präparate als verspätet im Vergleich zur Normalhaut dar. In fünf Präparaten war sie beginnend ab dem mittleren *Stratum spinosum*. Die Färbung der Normalhaut zeigte eine Anfärbbarkeit bereits ab dem unteren *Stratum spinosum*.

Die Caspase-14 zeigte in der Normalhaut eine Anfärbbarkeit bereits ab dem *Stratum suprabasale*. Die Anfärbung der Caspase-14 der Kontaktekzem-Haut bot in sieben von neun Präparaten eine veränderte Expression mit einer schwächeren Anfärbung der unteren Schichten der Epidermis. Eine deutliche Anfärbung des *Stratum granulosum* war in zwei dieser Hautproben zu erkennen. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Caspase-14-Expression beim Kontaktekzem und der Normalhaut nachgewiesen werden (p-Wert=0,008).

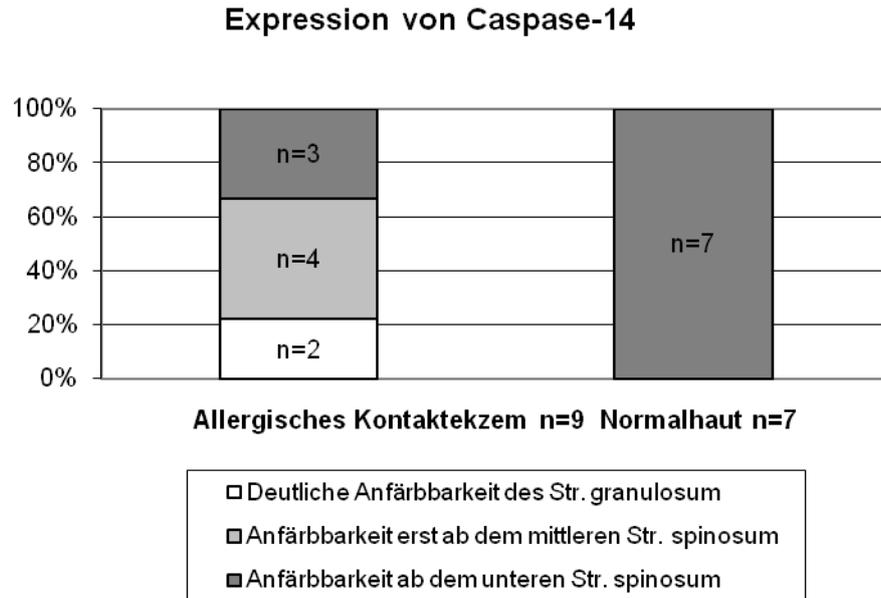


Abb. 3.18 Anfärbarkeit der Caspase-14 bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

Fünf von neun Präparaten des allergischen Kontaktekzems zeigten eine verspätete Anfärbarkeit von Caspase-14, die sich beginnend ab dem mittleren *Stratum spinosum* darstellte. In zwei Präparaten war eine besonders ausgeprägte Anfärbung des *Stratum granulosum* erkennbar. Zwei Präparate des allergischen Kontaktekzems und die Normalhaut zeigten eine Anfärbung ab dem unteren *Stratum spinosum*.

3.3.2 Anfärbung des Filaggrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

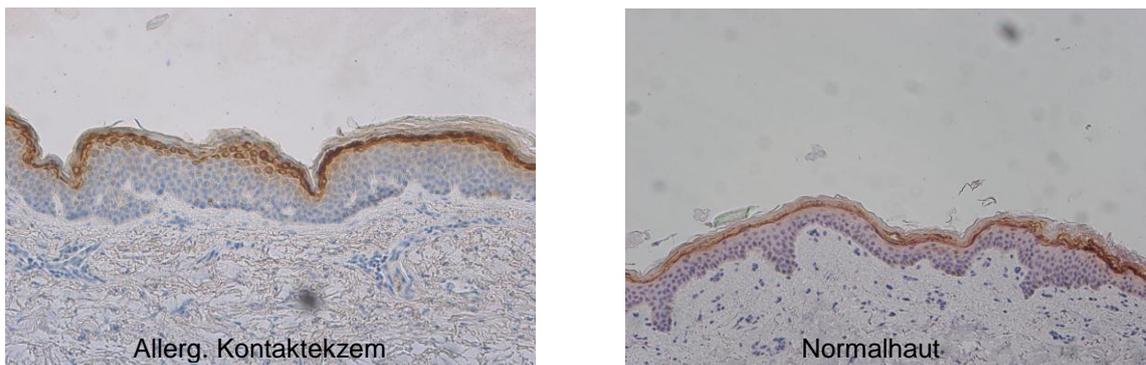


Abb. 3.19 Lichtmikroskopische Darstellung der Filaggrin-Expression bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

Die Anfärbung von Filaggrin zeigte sich in einem Großteil der Präparate auf die oberen drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum* verbreitert. In einigen Präparaten waren sowohl ein bis zwei als auch drei bis vier Zellreihen angefärbt. In drei Präparaten des allergischen Kontaktekzems und in der Normalhaut stellte sich die Färbung auf die oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* begrenzt dar.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Anfärbung von Filaggrin in der Normalhaut im Vergleich zum Kontaktekzem (p -Wert=0,030). In der Normalhaut wurde Filaggrin in den oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* angefärbt. Beim allergischen Kontaktekzem zeigten sich trotz des nicht statistisch signifikanten Ergebnisses unterschiedliche Expressionsmuster. Drei der Anfärbungen wiesen eine Expression des Filaggrins in den oberen ein bis zwei Zellreihen auf, zwei Färbungen zeigten eine Expression des Filaggrins, die nicht nur auf die oberen ein bis zwei Zellreihen beschränkt war, sondern sich teilweise auch bis ins obere *Stratum spinosum* (obere drei bis vier Zellreihen) verbreitert darstellte. Vier Präparate boten eine durchgehende Ausbreitung der Filaggrin-Expression bis ins obere *Stratum spinosum* mit einer Anfärbung der oberen drei bis vier Zellreihen.

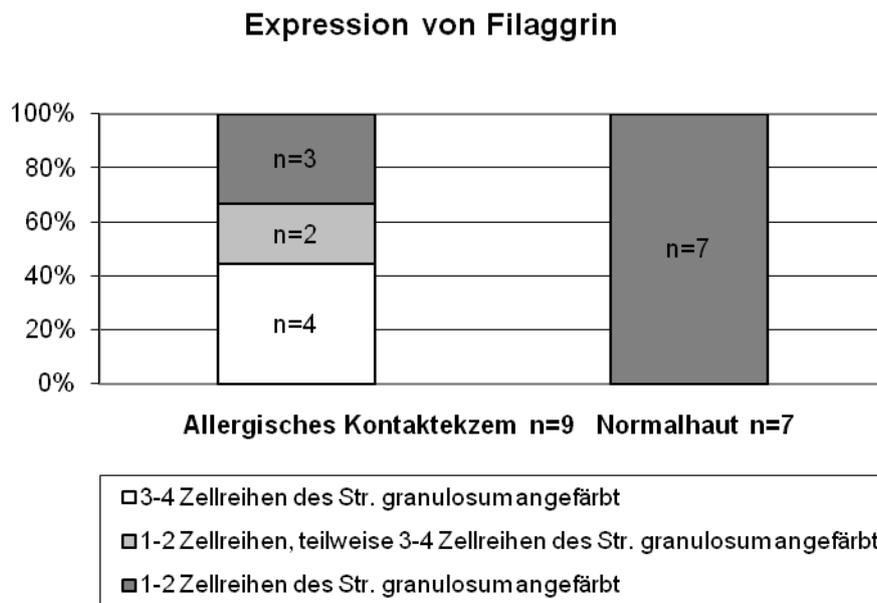


Abb. 3.20 Anfärbbarkeit des Filaggrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

In vier Präparaten des allergischen Kontaktekzems zeigte sich eine Verbreiterung der Filaggrin-Expression auf die oberen drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum*. In zwei Präparaten stellte sich eine Filaggrin-Anfärbbarkeit der oberen ein bis zwei Zellreihen mit einer teilweisen Ausdehnung der Anfärbung auf insgesamt drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum* dar. In den Normalhaut-Präparaten sowie in drei Präparaten des allergischen Kontaktekzems waren die oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* angefärbt.

3.3.3 Anfärbung des Loricrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

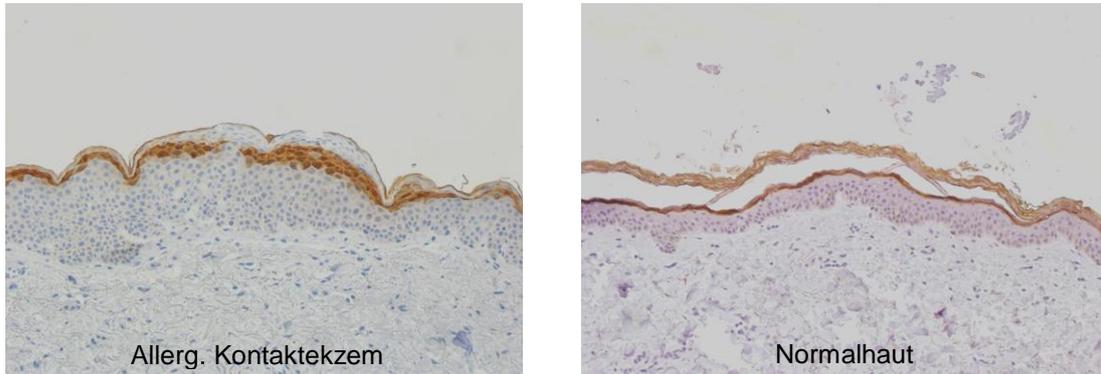


Abb. 3.21 Lichtmikroskopische Darstellung der Loricrin-Expression bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

Die Expression von Loricrin stellte sich in sechs von neun Präparaten des allergischen Kontaktekzems verändert dar. Eine Verbreiterung der Anfärbung auf die oberen drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum* war erkennbar. In den Präparaten der Normalhaut zeigte sich lediglich eine Anfärbung der oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum*.

In der Normalhaut zeigte sich eine schmale Anfärbung des Loricrins der oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum*, während beim allergischen Kontaktekzem eine Ausbreitung der Anfärbung bis in das obere *Stratum spinosum* bei zwei Drittel der Hautproben auffällig war. Bei drei Hautproben ließ sich eine durchgängig verbreiterte Loricrin-Expression feststellen. Für die Loricrin-Expression bestanden für das allergische Kontaktekzem im Vergleich zur Normalhaut statistisch signifikante Unterschiede (p -Wert=0,011).

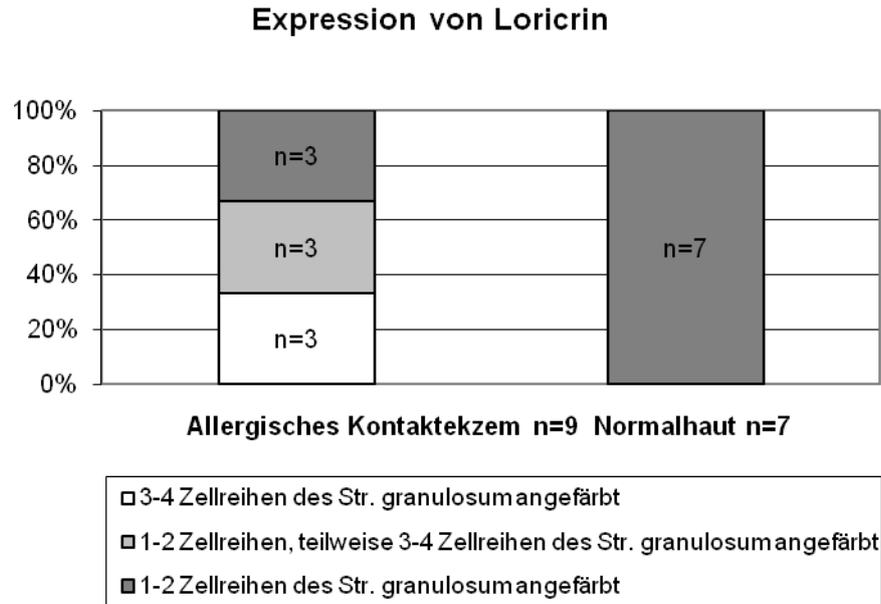


Abb. 3.22 Anfärbarkeit des Loricrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

Die Anfärbarkeit des Loricrins bei allergischem Kontaktekzem zeigte sich in sechs Präparaten verändert zur Normalhaut. Drei Präparate waren auf die oberen drei bis vier Zellreihen des *Stratum granulosum* verbreitert. Drei weitere Präparate zeigten eine Verbreiterung der Anfärbung über große Bereiche des Präparates neben Bereichen mit nur ein bis zwei Zellreihen Färbung. Die Loricrin-Färbung bei Normalhaut sowie drei Präparate des allergischen Kontaktekzems stellten sich auf die oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* begrenzt dar.

3.3.4 Anfärbung des Involucrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

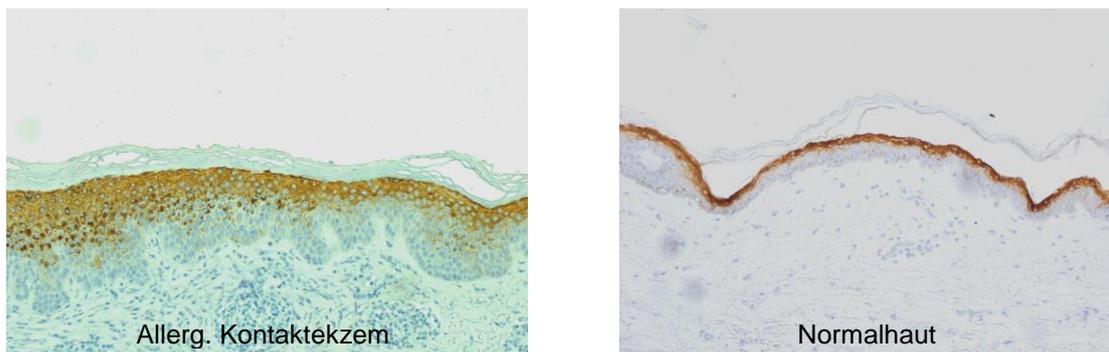


Abb. 3.23 Lichtmikroskopische Darstellung der Involucrin-Expression bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

Die Anfärbarkeit von Involucrin bei allergischem Kontaktekzem zeigte sich in sieben von neun Präparaten verbreitert. Sie war beginnend ab dem unteren bzw. mittleren *Stratum granulosum* bis zum *Stratum corneum*. Die Normalhaut ließ eine Anfärbarkeit des Involucrins ab dem oberen *Stratum granulosum* erkennen.

Involucrin zeigte eine Anfärbung des *Stratum granulosum* und der oberen Zellreihen des *Stratum spinosum* in der Normalhaut. Eine Ausdehnung der Expression des Involucrins war bei dem Kontaktekzem bis zum mittleren bzw. zum unteren *Stratum spinosum* in sieben von neun Hautproben zu erkennen. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Involucrin-Expression der Normalhaut verglichen mit der des allergischen Kontaktekzems zeigen (p-Wert=0,009).

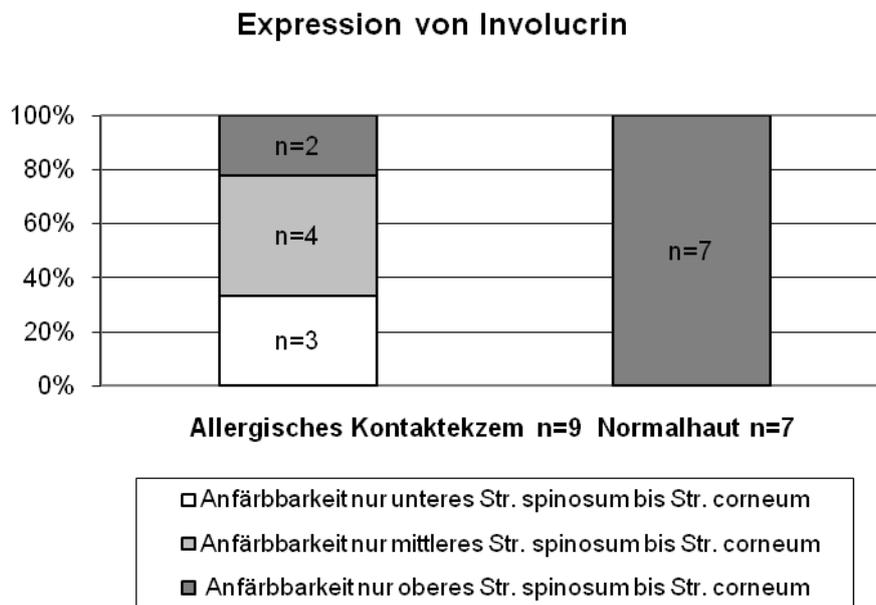


Abb. 3.24 Anfärbarkeit des Involucrins bei allergischem Kontaktekzem und Normalhaut

Die Anfärbarkeit von Involucrin stellte sich in drei Präparaten des allergischen Kontaktekzems verbreitert ab dem unteren *Stratum spinosum* dar. Vier Präparate zeigten eine Färbung beginnend ab dem mittleren *Stratum spinosum*. Die Involucrin-Anfärbung in der Normalhaut sowie in zwei Präparaten des allergischen Kontaktekzems ließ eine Expression ab dem oberen *Stratum spinosum* erkennen.

3.4 Vergleich der Strukturprotein-Expressionen bei entzündlichen Dermatosen

3.4.1 Expression der Caspase-14 bei den entzündlichen Dermatosen im Vergleich zur Normalhaut

Es zeigte sich eine veränderte Expression der Caspase-14 im Vergleich der drei Hauterkrankungen mit der Normalhaut (p-Wert=0,003). Innerhalb dieser Krankheitsbilder ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Expression der untersuchten Proteine erkennen (p-Wert=0,448).

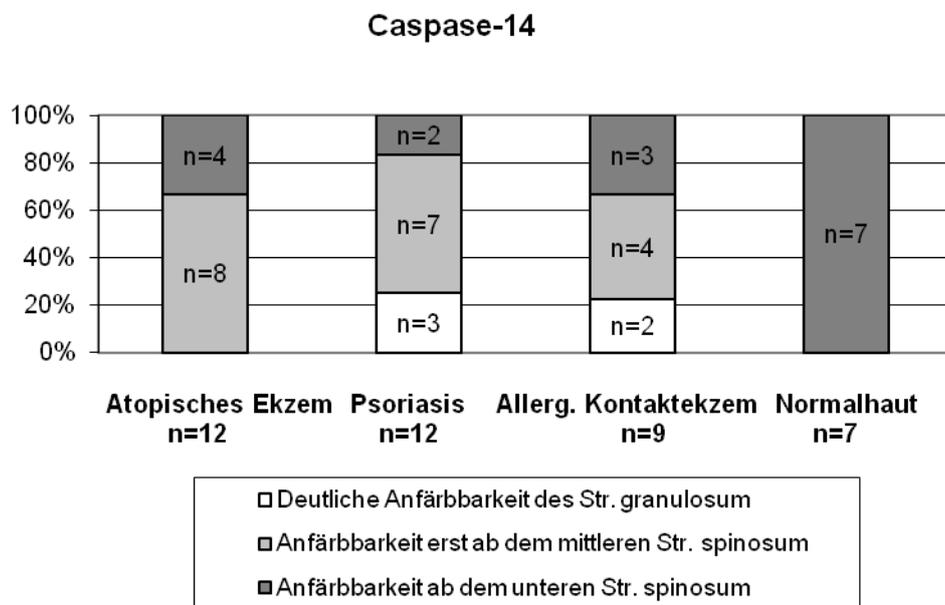


Abb. 3.25 Vergleich der Caspase-14-Expression bei entzündlichen Dermatosen und Normalhaut

Darstellung der Expression der Caspase-14 bei den Krankheitsbildern und in der Normalhaut. Unter Zuhilfenahme des exakten Tests nach Fisher konnten folgende Ergebnisse berechnet werden: p-Wert=0,003 (einschließlich Normalhaut); p-Wert=0,448 (die drei Hautkrankheiten ohne Normalhaut).

In den Präparaten der Normalhaut zeigte sich in allen Proben eine Färbung der Epidermis, welche sich beginnend ab dem *Stratum suprabasale* bis zum *Stratum corneum* mit diskreter Intensitätszunahme darstellte. Vier von zwölf Präparaten des atopischen Ekzems, zwei von zwölf Präparaten der Psoriasis und zwei von neun Präparaten des allergischen Kontaktekzems wiesen ebenfalls diese Färbung auf.

Bei den Präparaten des atopischen Ekzems war die Färbung der Epidermis mittels

Caspase-14 in acht von zwölf Präparaten, in den Präparaten der Psoriasis in sieben von zwölf Präparaten sowie in den Präparaten des Kontaktekzems in fünf von neun Präparaten nur bis zur Mitte des *Stratum spinosum* bzw. eine Intensitätsabnahme vom *Stratum granulosum* zum *Stratum suprabasale* erkennbar.

Eine veränderte Anfärbbarkeit von Caspase-14 mit einem Expressionsmuster, welches sich mit einer deutlichen Anfärbung des *Stratum granulosum* gegenüber den übrigen Zellreihen im Vergleich zur Normalhaut darstellte, war beim atopischen Ekzem nicht erkennbar, bei der Psoriasis in drei von zwölf Präparaten und bei allergischen Kontaktekzemen zeigte es sich in zwei von neun Präparaten.

3.4.2 Expression des Filaggrins bei den entzündlichen Dermatosen im Vergleich zur Normalhaut

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression des Filaggrins im Vergleich der drei Hauterkrankungen und der Normalhaut (p -Wert= $<0,001$). Im Vergleich der Filaggrin-Expression innerhalb der drei Hauterkrankungen ohne Berücksichtigung der Normalhaut zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression (p -Wert= $0,057$).

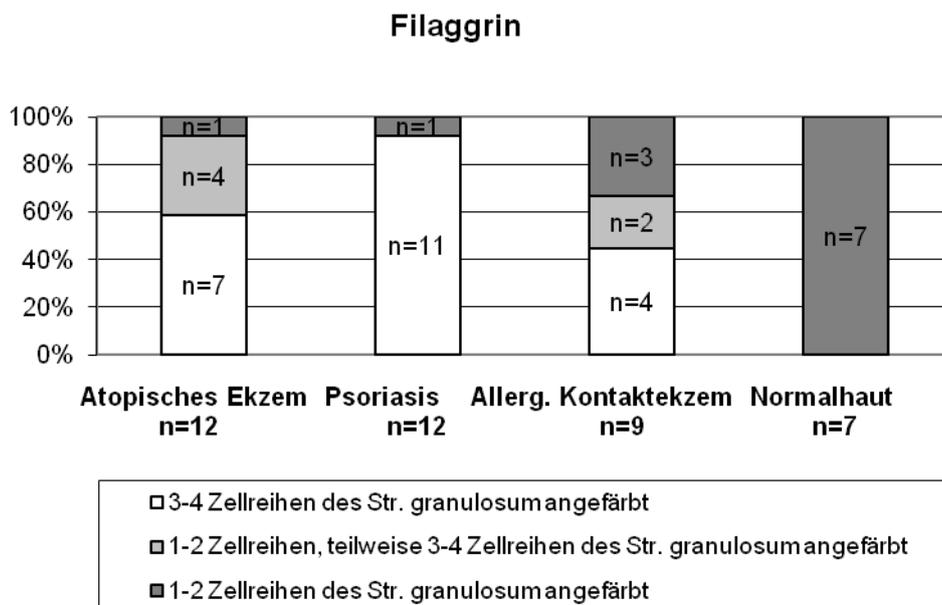


Abb. 3.26 Vergleich der Filaggrin-Expression bei entzündlichen Dermatosen und Normalhaut

Darstellung der Expression des Filaggrins bei den Krankheitsbildern und in der Normalhaut. Unter Zuhilfenahme des exakten Tests nach Fisher konnten folgende Ergebnisse berechnet werden: p -Wert= $<0,001$ (einschließlich Normalhaut); p -Wert= $0,057$ (die drei Hautkrankheiten ohne Normalhaut).

Bei den Präparaten der Normalhaut waren durchgängig die obersten ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* angefärbt, beim atopischen Ekzem waren bei einem von zwölf Präparaten die oberen zwei Zellreihen angefärbt. Ein solches Anfärbemuster zeigte sich ebenfalls bei der Psoriasis in einem von zwölf Präparaten und beim allergischen Kontaktekzem in drei von neun Präparaten.

Bei vier von zwölf Präparaten des atopischen Ekzems und bei zwei von neun Präparaten des Kontaktekzems waren die oberen ein bis zwei Zellreihen und darüber hinaus teilweise auch die oberen drei bis vier Zellreihen angefärbt.

Bei sieben von zwölf Präparaten des atopischen Ekzems, bei elf von zwölf Psoriasis-Präparaten sowie in vier von neun Präparaten des allergischen Kontaktekzems waren durchgängig drei bis vier Zellreihen angefärbt.

3.4.3 Expression des Loricrins bei den entzündlichen Dermatosen im Vergleich zur Normalhaut

Es ließen sich im Vergleich der Hauterkrankungen unter Hinzunahme der Normalhaut (p -Wert=0,007) ein statistisch signifikanter Unterschied feststellen. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Vergleich der Hauterkrankungen ohne Normalhaut (p -Wert=0,392) keine statistisch signifikanten Unterschiede in den histologischen Färbungen für Loricrin.

Loricrin

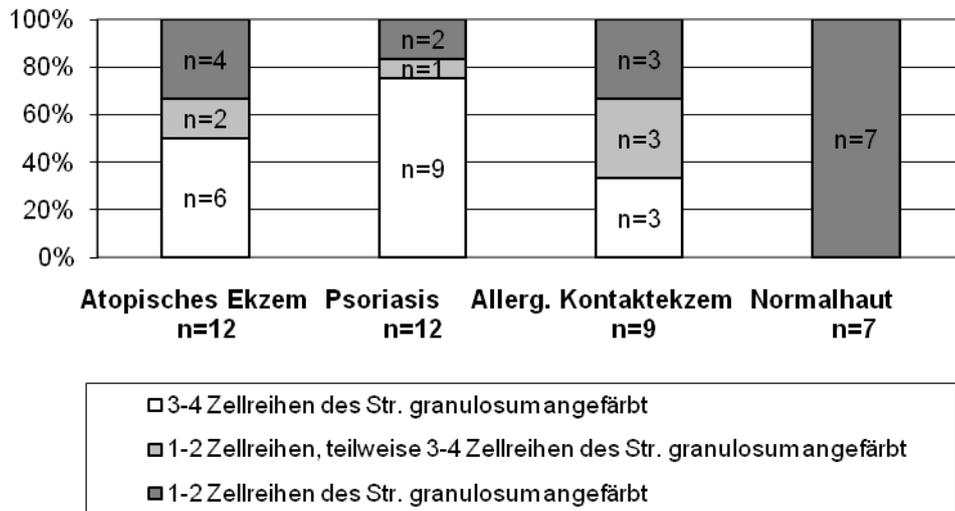


Abb. 3.27 Vergleich der Loricrin-Expression bei entzündlichen Dermatosen und Normalhaut

Darstellung der Expression des Loricrins bei den Krankheitsbildern und in der Normalhaut. Unter Zuhilfenahme des exakten Tests nach Fisher konnten folgende Ergebnisse berechnet werden: p-Wert=0,007 (einschließlich Normalhaut); p-Wert=0,392 (die drei Hautkrankheiten ohne Normalhaut).

In den Präparaten der Normalhaut waren die oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* angefärbt wie auch in vier von zwölf Präparaten des atopischen Ekzems, zwei von zwölf Präparaten der Psoriasis und drei von neun Präparaten des Kontaktekzems.

Eine Färbung von den oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* mit Ausbreitung der Anfärbung auf die oberen drei bis vier Zellreihen zeigte sich in zwei von zwölf der Präparaten des atopischen Ekzems sowie in einem der zwölf Psoriasis-Präparate und in drei von neun Präparaten des allergischen Kontaktekzems.

Bei den Präparaten des atopischen Ekzems waren in fünf von zwölf, bei der Psoriasis in neun von zwölf und bei dem allergischen Kontaktekzem in drei von neun Präparaten die oberen drei bis vier Zellreihen konstant angefärbt.

3.4.4 Expression des Involucrins bei den entzündlichen Dermatosen im Vergleich zur Normalhaut

Beim Auswerten der Ergebnisse zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der

Expression des Involucrins in der Vergleichsgruppe der drei Hauterkrankungen unter Hinzunahme der Normalhaut (p-Wert= $<0,001$). Dagegen konnte kein Unterschied der Involucrin-Färbung innerhalb der Hauterkrankungen festgestellt werden (p-Wert=0,622).

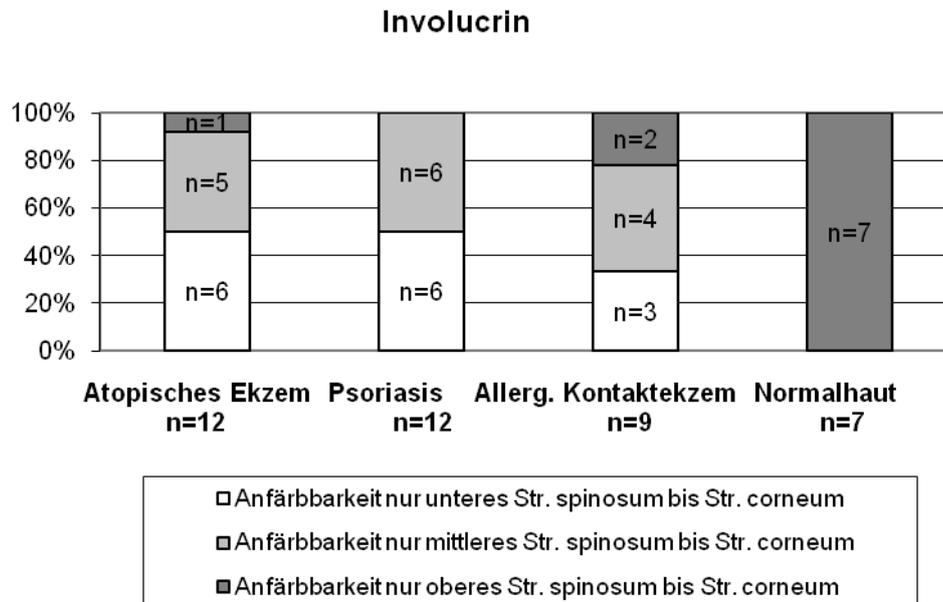


Abb. 3.28 Vergleich der Involucrin-Expression bei entzündlichen Dermatosen und Normalhaut

Darstellung der Expression des Involucrins bei den Krankheitsbildern und in der Normalhaut. Unter Zuhilfenahme des exakten Tests nach Fisher konnten folgende Ergebnisse berechnet werden: p-Wert= $<0,001$ (unter Hinzunahme der Normalhaut); p-Wert=0,622 (die drei Hautkrankheiten ohne Normalhaut).

Eine Färbung des *Stratum granulosum* bis höchstens zum oberen *Stratum spinosum* zeigte sich bei allen Präparaten der normalen Haut. Ein Präparat des atopischen Ekzems und zwei von neun Präparaten des Kontaktekzems zeigten ebenfalls eine solche Färbung.

Eine Färbung des Involucrins bis zur Mitte des *Stratum spinosum* war bei fünf von zwölf der AE-Präparate, bei sechs von zwölf der Psoriasis-Präparate und bei vier von neun Präparaten des allergischen Kontaktekzems erkennbar.

In sechs von zwölf Präparaten des atopischen Ekzems, sechs von zwölf Psoriasis-Präparaten sowie in drei von neun Präparaten des allergischen Kontaktekzems zeigte sich eine Anfärbung bis zum unteren *Stratum spinosum*.

4 Diskussion

Um eine intakte Hautbarriere zu gewährleisten und Erkrankungen entgegenwirken zu können, ist eine sich ständig erneuernde Epidermis notwendig. Sie sollte den transepidermalen Wasserverlust verhindern und vor Dehydratation schützen (Hoffjan *et al.*, 2007). Voraussetzung hierfür ist die regelrechte Differenzierung der Keratinozyten. An diesem Prozess sind zahlreiche Proteine beteiligt, die für die Ausbildung eines funktionsfähigen „cornified cell envelope“ essentiell sind.

4.1 Caspase-14

Eines der Proteine, die an der Formation des *Stratum corneum* und der Ausbildung eines funktionsfähigen „cornified cell envelope“ beteiligt sind, ist die Protease Caspase-14. Sie wird bei klinisch gesunder Haut in Zellschichten, in denen vornehmlich die Differenzierung stattfindet, exprimiert (Lippens *et al.*, 2000; Alibardi *et al.*, 2005). Diese Erkenntnis lässt auf eine zentrale Rolle dieses Enzyms in der terminalen Differenzierung der Keratinozyten schließen. So beschrieben Walsh *et al.* eine leichte Anfärbung der basalen Zellreihen mit einer Anfärbung des Zytoplasmas ab dem *Stratum suprabasale* und eine Anfärbung der Zellkerne der Keratinozyten ab dem *Stratum granulosum* in der normalen Epidermis (Walsh *et al.*, 2005). Die Ergebnisse konnten wir im Expressionsmuster in unseren Kontrollpräparaten mit Normalhaut bestätigen. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper für die Caspase-14 färbt sowohl die inaktive als auch die aktive Form an. Das inaktive Proenzym besteht aus vier Einheiten: einer N-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit p20 (17kDa), einer kleinen Untereinheit p10 (11kDa) und einer kurzen Verbindungsregion (Linker region), welche die große und die kleine Einheit verbindet. Die aktive Caspase ist ein Heterodimer aus der großen (p20) Untereinheit und der kleinen (p10) Untereinheit (Yamamoto *et al.*, 2010). In unseren Untersuchungen ließ sich in der Epidermis eine Expression der Caspase-14 in der gesunden Haut schon in den basalen Zellreihen feststellen. Zusätzlich zeigte sich eine Anfärbung der Zellkerne ab dem *Stratum spinosum*. Das *Stratum basale* zeigte eine Anfärbung, die der Hintergrundfärbung entspricht, jedoch keine Anfärbbarkeit der Caspase-14 darstellte.

Erwähnenswert ist, dass es Yamamoto *et al.* 2010 gelang, einen Antikörper zu entwickeln, der nur die aktivierte Form der Caspase-14 anfärbt. Das Expressionsmuster dieser aktiven Caspase-14 ließ sich lediglich in den verhornenden oberen Zellschichten nachweisen. Dabei wurden 71-94% der inaktiven Procaspase in die aktive Caspase-14 im *Stratum corneum* umgewandelt (Yamamoto *et al.*, 2010). In unserer Arbeit haben wir einen Antikörper verwendet, der sowohl die proaktive als auch die aktivierte Form anfärbt, sodass dies folglich lediglich die Beurteilung der gesamten Caspase-14-Expression zuließ. Über die Konzentration der aktiven Form in den oberen Zellreihen lässt sich in dieser Arbeit daher nur spekulieren. Wie hoch der Anteil der proaktiven Form ist, welcher tatsächlich in die aktivierte Caspase-14 gespalten wird, lässt sich daraus nicht beurteilen. Ein Vorteil des verwendeten Antikörpers ist jedoch die Möglichkeit, die Caspase-14 bereits zu Beginn ihrer Expression beurteilen zu können.

In unseren Untersuchungen zeigte sich beim atopischen Ekzem ein signifikanter Unterschied im Expressionsmuster der Caspase-14 im Vergleich zur Normalhaut. In der atopischen Haut war erst ab dem mittleren *Stratum spinosum* eine deutliche Anfärbung der Zellreihen feststellbar. Dies lässt auf eine verspätete Expression der Caspase-14 im Rahmen der Erkrankung des atopischen Ekzems schließen, was ebenfalls von Hvid *et al.* beschrieben wurde (Hvid *et al.*, 2011). Somit könnte diese Beobachtung als eine mögliche Ursache der Barrierestörung bei Patienten mit atopischem Ekzem angenommen werden, da kein intakter „cornified cell envelope“ gebildet werden kann. Eine verminderte Konzentration der aktiven Form der Caspase-14 wurde bereits in Untersuchungen zum atopischen Ekzem beschrieben (Yamamoto *et al.*, 2010).

Da ein Großteil der Procaspase-14 in die aktivierte Form gespalten wird, scheint die Konzentration der aktivierten Caspase-14 ausschlaggebend für eine ausreichende Spaltung ihres Substrates Profilaggrin zu sein. Eine zu geringe Konzentration des Enzyms könnte für ungenügend prozessiertes Filaggrin verantwortlich sein. Denkbar wäre, dass die verspätete Expression der Caspase-14 nicht mehr kompensiert werden kann. Somit könnte eine verminderte Filaggrinspaltung zu einem verminderten Anteil der hygroskopischen Aminosäuren führen, die als „natural moisturizing factor“ dienen. Dieser Befund lässt sich gut mit dem phänotypischen Charakteristika von ekzematöser, trockener Haut, der gestörten Hautbarriere und der

Inflammation des atopischen Ekzems vereinbaren. (Leung *et al.*, 2003; Howell *et al.*, 2007).

Einen Einfluss auf die Modulation der Expression durch immunologische Prozesse könnte für die Caspase-14 ebenfalls wichtig sein. Hvid *et al.*, konnten durch eine Stimulation der Keratinozyten mit Th2-assoziierten Zytokinen, IL-4 und IL-13, eine Herabregulation der Caspase-14-mRNA nachweisen (Hvid *et al.*, 2011). Interessanterweise ist beschrieben, dass in Untersuchungen mittels ELISA das Caspase-14-Level und der Anteil der aktiven Form von der Gesamt-Caspase-14 bei Frauen über 50 Jahren signifikant vermindert war. Darüber hinaus war die aktive Caspase-14 herunter reguliert, sowohl in läsionärer Haut als auch in nicht läsionärer Haut dieser AE-Patienten im Vergleich zur Normalhaut in der gleichen Altersklasse. In diesem Zusammenhang wäre eine weiterführende Untersuchung auf Unterschiede der Caspase-14- und der Filaggrin-Expression bei langjährigen Atopikern im Vergleich zu denjenigen, bei denen die Erkrankung erst kurz besteht.

Veränderungen im Expressionsmuster der Caspase-14 wurden in dieser Arbeit ebenfalls in den Hautproben der Psoriasis festgestellt. In vorherigen Untersuchungen wurde eine verminderte Expression der Caspase-14 in Psoriasis-Haut mit lückenhafter, zytoplasmatischer Anfärbung und prominenten, ungefärbten Zellkernen beschrieben (Walsh *et al.*, 2005). Diese Erkenntnisse wurden unter der Verwendung des Antikörpers, der wiederum ubiquitär die Caspase-14 anfärbt, erlangt. Ergebnisse über die Aktivierung und die Konzentration der aktiven Caspase-14 in den oberen Zellreihen bei der Psoriasis vulgaris, beispielsweise unter dem von Yamamoto entwickelten Antikörper, liegen nicht vor. Es konnte jedoch durch Western blotting gezeigt werden, dass im *Stratum corneum* parakeratotischer Bereiche von Psoriasis-Patienten eine signifikante Menge an der proaktiven Form neben den Untereinheiten p17 und p11 der aktiven Caspase-14 vorlag. In der Normalhaut zeigten sich nur die Untereinheiten p17 und p11 (Fischer *et al.*, 2004). In unseren Untersuchungen war die Caspase-14-Expression in den unteren Zellreihen im Vergleich zur Normalhaut erniedrigt und stellte sich mit einer Anfärbung erst ab dem mittleren *Stratum spinosum* dar. Folglich könnte diese verspätete Expression als Hinweis auf eine ebenfalls verminderte Konzentration der aktiven Caspase-14 gedeutet werden.

Wir haben in drei von zwölf Präparaten der Psoriasis sowie in zwei von neun Präparaten des allergischen Kontaktekzems eine sehr deutliche, „sprunghafte“ Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellkerne im *Stratum granulosum* im Vergleich zu den darunter liegenden schwach angefärbten Zellen des *Stratum spinosum* aufzeigen können. Dieses Expressionsmuster war in keinem unserer Präparate des atopischen Ekzems zu erkennen. In den Präparaten der Psoriasis und des allergischen Kontaktekzems fielen jedoch neben einigen Zellkernen, die nicht angefärbt waren, auch Zellen im *Stratum granulosum* auf, deren Zytoplasma besonders ungleichmäßig stark angefärbt war. In einigen Präparaten ließ sich auch eine verspätete Expression ohne diese scheinbare „sprunghafte“ Expression feststellen. Auch Lippens *et al.* wiesen eine verminderte Caspase-14-Expression, vor allem in parakeratotischen Bereichen, nach (Lippens *et al.*, 2000). Wir konnten in unseren Untersuchungen eine ebenfalls verspätete Caspase-14-Expression feststellen. Warum es zu dieser verspäteten Expression mit teilweise fehlender Anfärbung der Zellkerne in den stärker differenzierten Zellreihen kommt, steht noch im Fokus wissenschaftlicher Diskussionen. Ein sehr interessanter Aspekt dieser Protease ist, dass es einen immunologischen Einfluss auf die Caspase-14 geben könnte. So wurde gezeigt, dass es in Hautproben des gleichen Psoriasis-Patienten Unterschiede im Expressionsmuster der läsionalen und nicht-läsionalen Haut gibt (Lippens *et al.*, 2000). Das Korrelat der Immunreaktion sind Leukozytenansammlungen bei der Psoriasis (I. Moll, 6. Auflage, 2005), die durch die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren auch einen Einfluss auf die Caspase-14-Expression haben könnten. Eine Stimulation mit IFN- γ , welches mit der Th1-Reaktion assoziiert ist, zeigte verminderte Level von Caspase-14—mRNA (Hvid *et al.*, 2011). Dies lässt eine immunmodulatorische Komponente vermuten.

In Hautproben zum allergischen Kontaktekzem konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Expression der Caspase-14 zur Normalhaut festgestellt werden. Auch hier zeigte sich eine verspätete Expression der Caspase-14 in fünf von neun Präparaten. Das allergische Kontaktekzem ist ebenfalls wie die Psoriasis eine Hauterkrankung ausgelöst durch sensibilisierte Th1-Lymphozyten. Die gleichen Zytokine, beispielsweise INF- γ , die vermutlich eine Veränderung der Caspase-14-Expression in der Psoriasis bewirken, könnten auch eine immunmodulatorische Wirkung beim allergischen Kontaktekzem ausüben. Im Vergleich der

Expressionsmuster der Hauterkrankungen atopisches Ekzem, Psoriasis und allergisches Kontaktekzem untereinander ließen sich keine signifikanten Unterschiede (p-Wert=0,448) feststellen.

Es wird vermutet, dass zusätzlich zur Aktivität der zytoplasmatischen Caspase-14 die Translokation der Caspase-14 in den Zellkern für die terminale Differenzierung wichtig sein könnte. Welche Regelmechanismen und Einflüsse an dieser Stelle eine Rolle spielen, sind noch nicht vollständig geklärt. Ein vermindertes Eintreten der Caspase-14 in den Zellkern könnte somit nicht nur bei der Psoriasis vulgaris (Walsh *et al.*, 2005), sondern auch bei anderen Hauterkrankungen mit Barrierestörung wie dem atopischen Ekzem und dem allergischen Kontaktekzem zu einer fehlerhaften terminalen Differenzierung führen. In unseren histologischen Färbungen zeigten sich ebenfalls in einigen Zellreihen Zellkerne, die nicht angefärbt waren. Die in dieser Arbeit bewerteten Präparate wurden nur von klinisch veränderten Hautbereichen entnommen. Ein Vergleich der Caspase-14-Expression von läsionaler Haut und nicht-läsionaler Haut der Dermatosen erfolgte nicht.

Bekannt ist, dass das Transkriptions-Faktor-Aktivator-Protein-1 (AP-1) und der Kernfaktor „nuclear factor“ κ B (NF κ B) als Aktivatoren der Caspase-14-Expression fungieren (Ballaun *et al.*, 2008). Die proximal gelegene Promoter-Region der Caspase-14 weist funktionelle Bindungsstellen sowohl für das AP-1 als auch den NF κ B auf. AP-1 ist ein Proteindimer-Komplex, bestehend aus Mitgliedern der Jun- und Fos-protoonkogenen Subfamilie, die in verschiedenen Kombinationen vorkommen (M. Karin *et al.*, 1997). Untersuchungen haben eine veränderte Expression des JunB und der beeinträchtigten AP-1 DNA-Bindungsaktivität in Hautläsionen schwerer Psoriasis vulgaris aufgezeigt (Johansen *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte im Tierversuch bei Mäusen nachgewiesen werden, dass das Fehlen der Jun-Proteine bei zunächst gesunder Haut zu einer Psoriasis der Haut führte (Zenz *et al.*, 2005). Zwei potente Induktoren des AP-1 sind grüner Tee-Polyphenol und Vitamin D3 (Lippens *et al.*, 2003). Das Vitamin D3 wird über die Nahrung aufgenommen oder durch UVB-Strahlung aus 7-Dehydro-Cholesterin gebildet. Eine negative Korrelation zwischen der Konzentration von Vitamin D und der Ausprägungsstärke des atopischen Ekzems konnte bereits gezeigt werden. Die Konzentrationen des Vitamins waren bei Patienten mit einem schweren Ausprägungsgrad des atopischen Ekzems geringer im Vergleich zu Patienten mit

einer leichteren Form (Peroni *et al.*, 2011). Es bestehen therapeutische Hinweise, die eine Korrelation zwischen der oralen Substitution von Vitamin D und einer Besserung des bestehenden Ekzems zeigen (Sidbury *et al.*, 2008; Review in Fölster-Holst *et al.*, Atopisches Ekzem-Grundlagen und Updates, 2011). Um jedoch weiterführende Aussagen vor allem im Hinblick auf die therapeutischen Optionen und eine Modulation der Expression der Caspase-14 machen zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Die Caspase-14 teilt sich die vermutete Abhängigkeit vom AP-1 mit vielen anderen Proteinen, welche in die terminale Differenzierung involviert sind wie beispielsweise Filaggrin (Jang *et al.*, 1996) und Involucrin (Welter *et al.*, 1995). Daraus könnte abgeleitet werden, dass ein verändertes AP-1 nicht alleinig zu einer veränderten Expression der Caspase-14 führt. Auch der Einfluss auf andere Strukturproteine, die an der Bildung der „cornified cell envelope“ beteiligt sind, wäre denkbar. Die Färbungen geben jedoch Hinweise darauf, dass der Expressionszeitpunkt sowohl beim Filaggrin und Loricrin als auch beim Involucrin vorzeitig ist, während sich im Gegensatz dazu die Caspase-14-Expression bei allen drei untersuchten Hauterkrankungen verspätet darstellt.

4.2 Filaggrin

Als Substrat der Caspase-14 konnte sowohl das Polyprotein Profilaggrin als auch das Filaggrin identifiziert werden. Die aktive Caspase-14 schneidet diese und ist für die Entstehung einer funktionsfähigen Hautbarriere verantwortlich. (Denecker *et al.*, 2007). Da Abbauprodukten des Filaggrins als „natural moisturizing factor“ eine entscheidende Rolle als natürlicher Feuchtigkeitsspender der Haut zukommt, ist neben der richtigen Prozessierung durch die Caspase-14 auch die fehlerfreie und rechtzeitige Expression des Filaggrins entscheidend. Die Filaggrin-Expression bei Kontrollpräparaten mit gesunder Haut war auf die oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* beschränkt. Die Anfärbung stellte sich als schmale Bande dar. Dies wurde bereits mehrfach in anderen Arbeiten beschrieben (Jensen *et al.*, 2004; Proksch *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich ein signifikanter Unterschied in der Expression des Filaggrins in der Normalhaut im Vergleich zum atopischen Ekzem feststellen. In der untersuchten Haut dieser Erkrankung war die Filaggrin-Expression signifikant verändert, die Anfärbbarkeit zeigte sich verbreitert auf die oberen drei bis vier Zellreihen des oberen *Stratum spinosum* und des *Stratum granulosum*. Eine verminderte und verfrühte Filaggrin-Anfärbung in der Haut von Patienten mit atopischem Ekzem im Gegensatz zur deutlich stärkeren Filaggrin-Anfärbung in Normalhaut wurde bereits beschrieben (Jensen *et al.*, 2004; Proksch *et al.*, 2006). Mittels ELISA konnte auch eine verminderte Filaggrin-Konzentration quantitativ bestätigt werden (Segucci *et al.*, 1996).

Darüber hinaus ist noch immer die Bedeutung der Mutationen im FLG-Gen zur Entstehung von Hauterkrankungen ein häufig und kontrovers diskutiertes Thema. Es ist noch nicht vollständig verstanden, welchen Einfluss Mutationen auf die Entwicklung von Hauterkrankungen nehmen. So wird einerseits vermutet, dass die FLG-Mutationen nicht für die verminderte Filaggrin-Expression verantwortlich sind. Als ein Beispiel wird der Vergleich der Proben des atopischen Ekzems mit läsionaler und nicht-läsionaler Haut des gleichen Patienten genannt. In diesem Fall ist nur eine verminderte Filaggrin-Expression in der betroffenen Hautstelle zu erkennen (Howell *et al.*, 2007). Andererseits wurde mehrfach beschrieben, dass die „loss-of-function“-Mutation im Filaggrin-Gen den herausragenden und ausschlaggebenden prädisponierenden genetischen Faktor für die Entwicklung eines atopischen Ekzems darstellt (Irvine *et McLean*, 2006; Sandilands *et al.*, 2009). Diese Null-Mutationen werden ungefähr bei einem Drittel der Patienten mit einem atopischen Ekzem beobachtet (Weidinger *et al.*, 2006). Allerdings lässt sich auch bei einem Prozentsatz von 9% der nicht betroffenen Menschen eine solche Mutation finden, während im umgekehrten Fall auch Patienten ohne eine FLG-Mutation am atopischen Ekzem leiden. 40% der Patienten mit FLG-Null-Allelen leiden nicht am atopischen Ekzem (O'Regan *et al.*, 2008). In einer familienbasierten Studie wurde gezeigt, dass die Mutationen R501X und 2282del4 mit dem atopischen Ekzem assoziiert sind. Besonders zur extrinsischen Form, charakterisiert durch hohe IgE-Spiegel und Nachweis spezifischer IgE-Antikörper (Fölster-Holst *et al.*, 2006) sowie klinisch schwere Formen, besteht die Assoziation mit Filaggrin-Mutationen (Weidinger *et al.*, 2006).

Studien von Gustafsson *et al.* und Illi *et al.* zeigten, dass viele Patienten dem atopischen Ekzem „entwachsen“ und mit zunehmendem Alter nicht mehr an diesem leiden (Gustafsson *et al.*, 2000; Illi *et al.*, 2004). Es ist von einer Prädominanz der Th2-Zellen mit den Leit-Zytokinen IL-4 und IL-13 auszugehen. Es wäre somit möglich, dass die veränderte Filaggrin-Expression auf die Immundysbalance zurückzuführen ist und weniger auf die Mutation. Das lässt sich mit der Studie von Howell *et al.* vereinbaren, der verminderte Filaggrin-Expressionen bei Patienten sowohl mit als auch ohne Null-Mutationen feststellte (Howell *et al.*, 2007). Auch experimentelle Studien bestätigten diese Ergebnisse, die eine signifikante Verminderung von Filaggrin-mRNA in den Keratinozyten in Anwesenheit von IL-4 und IL-13 zeigten (Hvid *et al.*, 2011).

Es ist vorstellbar, dass es zum Einen durch die verspätete Caspase-14-Expression zu einer Störung der Hautbarriere kommt, das Filaggrin wird in diesem Fall nicht regelhaft prozessiert. Zum Anderen stammen schätzungsweise ein Drittel der AE-Hautproben von Patienten mit einer Filaggrin-Mutation, berücksichtigt man die statistisch ermittelte Verteilung der FLG-Mutationen bei Atopikern (Weidinger *et al.*, 2006). Während homozygote Patienten einen totalen Funktionsverlust des Filaggrin-Produktes aufweisen, der mit trockener, schuppender Haut des Krankheitsbildes der Ichthyosis vulgaris einhergeht, zeigen die heterozygoten Träger eine mildere Form oder bleiben symptomfrei (Smith *et al.*, 2006).

Filaggrinmutationen sind mit schweren Formen des atopischen Ekzems assoziiert ebenso wurden Assoziationen zu Lebensmittelallergien und Asthma beschrieben. Ohne das atopische Ekzem sind die Erkrankungen jedoch nicht mit der Filaggrinmutation vergesellschaftet, sodass pathogenetisch eine Sensibilisierung gegen die Allergene über die defekte Barriere anzunehmen ist (Marenholz *et al.*, 2006). Offensichtlich hat auch das Th1-assoziierte Zytokin IFN- γ einen Einfluss auf Filaggrin, wie kürzlich am verminderten mRNA-Level für Filaggrin in Anwesenheit von IFN- γ , dem Leitenzym von Th1-Zellen, festgestellt wurde (Hvid *et al.*, 2011). Diese Beobachtung ist mit unseren Ergebnissen zu vereinbaren.

In den Präparaten der Psoriasis zeigte das Filaggrin eine signifikant verminderte Anfärbung gegenüber der Normalhaut. Die Anfärbung wies Lücken auf und war teilweise auf das obere *Stratum spinosum* ausgeweitet. Mehrfach konnte die Rolle

des Filaggrins in der Ausbildung der Psoriasis bereits bestätigt werden; es ließen sich in vorherigen Untersuchungen eine verminderte immunhistologische Färbung des Filaggrins und verminderte Keratohyalin-Granula, welche die Speicherform des Profilaggrins darstellen, feststellen. Zusätzlich konnte eine verminderte FLG-mRNA und ein vermindertes Filaggrin-Protein in der Haut betroffener Patienten mit Psoriasis vulgaris nachgewiesen werden (Nirunsuksiri *et al.*, 1995). Fraglich ist jedoch, ob es einen direkten Einfluss der veränderten Expression der Caspase-14 auf die Filaggrin-Expression gibt. In Caspase-14-knock-out-Mäusen zeigten sich vermehrte Profilaggrin-Vorräte und veränderte Verarbeitungsmuster (Denecker *et al.*, 2007). Dies könnte bedeuten, dass das Profilaggrin regelrecht in ausreichendem Maße in der Zelle gebildet, jedoch nicht regelrecht prozessiert wird. Im Zuge der Differenzierung könnte sich das Filaggrin ansammeln und kumulieren. Durch die deutlich veränderte Expression der Caspase-14 bei der Psoriasis könnte somit auch die Prozessierung des Filaggrins bei diesen Patienten oder bei Patienten mit Dermatosen, die eine Veränderung in der Caspase-14-Expression vorweisen, vermindert sein. Die Caspase-14 ist in der Lage, die FLG-Wiederholungen direkt zu schneiden, damit im weiteren Verlauf ein Abbau der Filaggrin-Fragmente in freie Aminosäuren erfolgen kann (Hoste *et al.*, 2011). Kürzlich wurde beschrieben, dass die Caspase-14 ein N-terminales Profilaggrin-Fragment, die A und B Domänen und einen Abschnitt der FLG-Wiederholung umfassend, direkt schneidet (Denecker *et al.*, 2007; Hoste *et al.*, 2011).

In den untersuchten Hautproben unserer Psoriasis-Patienten war die Expression des Filaggrins deutlich verbreitert und teilweise lückenhaft. Inwieweit die Konzentration des Filaggrins in den Hautproben gegenüber der Normalhaut verändert ist, lässt sich jedoch nicht sicher beurteilen. Ausgehend von der Intensität der Anfärbung ist hier von einer verminderten und verfrühten Expression auszugehen. Eine Analyse mittels ELISA wäre hilfreich, um die Konzentration des Filaggrins sicher bestimmen zu können. Wodurch jedoch die veränderte Expression bedingt ist, bleibt ungeklärt. In der Vergangenheit wurde in einer Studie die FLG-„loss-of-function“-Mutationen (R501X und 2282del4) von Patienten mit Psoriasis vulgaris oder Psoriasis-Arthritis ausgewertet. Es konnte eine deutlich veränderte Filaggrin-Expression, jedoch keine Assoziation zu den Mutationen festgestellt werden (Hüffmeier *et al.*, 2007).

Die Filaggrin-Expression beim Kontaktekzem war nicht signifikant erhöht oder vermindert im Vergleich zur Filaggrin-Expression in der Normalhaut (p -Wert=0,030). Jedoch zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen in sechs von neun Präparaten des allergischen Kontaktekzems eine teilweise Verbreiterung der Expression auf die oberen drei bis vier Zellreihen des oberen *Stratum spinosum* und des *Stratum granulosum*. Drei von neun Präparaten zeigten eine Expression der oberen ein bis zwei Zellreihen des *Stratum granulosum* ähnlich der Normalhautproben. Hvid *et al.* wiesen als Reaktion der Epidermis auf Zytokine, die mit einer Th1- sowie mit einer Th2-Antwort assoziiert sind, eine verminderte Synthese von Filaggrin-mRNA in den Keratinozyten nach (Hvid *et al.*, 2011). Die Psoriasis und das allergische Kontaktekzem sind klassischerweise Th1-Reaktionen. Die veränderte Färbung des Filaggrins sowohl bei der Psoriasis als auch beim allergischen Kontaktekzem könnte somit einem ähnlichen immunmodulatorischen Mechanismus unterstehen. Beim Vergleich der drei Hauterkrankungen bezogen auf die Anfärbbarkeit ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Anfärbbarkeit von Filaggrin nachweisen (p -Wert=0,057).

Darüber hinaus sollte auch der mögliche Einfluss einer Filaggrin-Mutation bei der Entwicklung eines allergischen Kontaktekzems weiterhin untersucht werden. Eine Assoziation zwischen Filaggrin-Null-Allelen und einer Kontaktsensibilisierung gegenüber Nickel konnte bereits nachgewiesen werden (Novak *et al.*, 2007). Zu vermuten ist, dass diese Assoziation auf die Filaggrin-Mutation induzierte Barrierestörung zurückzuführen ist. In einer Studie von Carlsen *et al.* wurde die Frequenz von Filaggrin-Null-Mutationen bei Patienten mit einem atopischen Ekzem und einer Kontaktallergie auf mindestens ein Kontaktallergen verglichen mit Patienten mit einer Kontaktallergie ohne atopisches Ekzem sowie Patienten der Normalbevölkerung mit einem atopischen Ekzem ohne Kontaktallergie. Interessanterweise zeigte sich eine verminderte Mutationsfrequenz bei Patienten, die beide Hauterkrankungen aufweisen, im Vergleich zu Patienten mit isoliertem atopischen Ekzem. Carlsen *et al.* vermuten, dass Patienten mit atopischem Ekzem und Kontaktallergie einen besonderen Phänotyp des atopischen Ekzems aufweisen, der nicht mit FLG-Mutationen assoziiert ist (Carlsen *et al.*, 2011). Jedoch widersprechen sich die Ergebnisse von Carlsen und die von Novak, die oben genannt sind.

Festzuhalten ist, dass die regelrechte Differenzierung der Keratinozyten für die Ausbildung einer intakten Hautbarriere essentiell ist. Durch die verminderte Caspase-14-Expression kommt es vermutlich zu einer verminderten Prozessierung des Filaggrins. Die Ausbildung der „cornified cell envelope“ ist folglich fehlerhaft. Als Reparaturversuch könnte die verfrühte Expression der übrigen Strukturproteine wie Loricrin und Involucrin angesehen werden.

4.3 Loricrin

Die Anfärbung des Loricrins zeigte sich in der Normalhaut als schmale Bande von ein bis zwei Zellreihen im oberen *Stratum granulosum*. Die Loricrin-Expression im atopischen Ekzem war mit einem p-Wert=0,019 zwar nicht signifikant verändert, jedoch zeigte sich in acht von zwölf Präparaten eine verbreiterte Loricrin-Anfärbung auf drei bis vier Zellreihen bis in das obere *Stratum spinosum* im Vergleich zur Normalhaut. Es wurde bereits eine veränderte Loricrin-Expression im atopischen Ekzem beschrieben (Jensen *et al.*, 2004; Sugiura *et al.*, 2005). Diese konnte mittels Western-Blotting nachgewiesen werden und auch immunhistologisch zeigte sich in vorherigen Untersuchungen eine Verbreiterung in der oberen Epidermis (Jensen *et al.*, 2004).

Vermutlich als ein Kompensationsversuch der Epidermis stellte sich die verfrühte Expression des Loricrins dar. Sie könnte an Stelle des Filaggrins für einen robusten „cornified cell envelope“ sorgen. Die durch den normalerweise stattfindenden weiteren Abbau des Filaggrins entstehenden hygroskopischen Aminosäuren können jedoch nicht durch Loricrin ersetzt werden. Die Folge ist eine geschwächte Hautbarriere und ein Mangel an „natural moisturizing factor“ mit der Konsequenz einer gestörten Permeabilitätsbarriere gegen äußere Einflüsse wie Allergene und mechanische Reize sowie einem erhöhten Wasserverlust über die Haut (Candi *et al.*, 2005).

Es sind genetische Veränderungen bekannt, die mit der Psoriasis vulgaris assoziiert sind. Neben dem wichtigsten Genort, dem Chromosom 6p21(PSORS1) werden auch andere Orte vermutet, die einen Einfluss auf die Ausbildung einer Psoriasis haben könnten (Bowcock, 2004). Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der

Psoriasis-Erkrankung und dem Chromosom 1q21 (PSORS4) wurde in der italienischen Bevölkerung gefunden. Zielgerichtete Untersuchungen des PSORS4-Locus in italienischen Familien deuten auf die Region des Loricrin-Gens hin. Die Loricrin-Expression war in der Epidermis der betroffenen Patienten vermindert (Giardina *et al.*, 2004). Es konnte jedoch nicht ursächlich für die Pathogenese der Psoriasis vulgaris nachgewiesen werden (Giardina *et Sinibaldi*, 2004).

In den untersuchten Hautproben unserer Arbeit stellte sich ein signifikanter Unterschied in der Loricrin-Expression mit einer deutlichen Verbreiterung im Vergleich zur Normalhaut dar. Vermutlich kann die verfrühte Expression auch an dieser Stelle als Kompensationsversuch angesehen werden, eine schützende Hautbarriere mit einem intakten „cornified cell envelope“ aufzubauen. Inwieweit genetische Veränderungen im Loricrin-Gen in den Expressionsunterschied mit eingewirkt haben, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Es scheint ein Zusammenspiel aus genetischen Komponenten zu sein, die sich gegenseitig verstärken und letztendlich zum Krankheitsbild der Psoriasis führen. Dabei ist die Intensität der immunologischen Wirkung auf die Proteinexpression und der Modulation des „cornified cell envelopes“ noch ungewiss. Erwähnenswert ist, dass sich auch beim Vergleich der Expressionsmuster von Loricrin kein signifikanter Unterschied zwischen den drei untersuchten Hauterkrankungen zeigte. Vieles deutet auf ähnliche Reparaturversuche der Haut hin, die gestörte Hautbarriere wieder aufzubauen, da es keine signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster der vier Antikörper bei den untersuchten Hauterkrankungen gab.

Die Gene für Filaggrin, Involucrin und Loricrin sind auf der gleichen Region des Chromosoms 1q21 lokalisiert, der auch als „epidermal differentiation complex“ bezeichnet wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich das Loricrin-Gen nicht notwendigerweise die gleichen genregulatorischen Elemente mit den Filaggrin- und Involucrin-Genen teilt (Yoneda *et al.*, 1992). Dieses Wissen könnte die Hochregulierung des einen Proteins bei gleichzeitiger Herabregulation eines anderen Proteins erklären.

4.4 Involucrin

Zusätzlich zur veränderten Expression der Caspase-14, des Filaggrins sowie des Loricrins zeigte sich auch eine veränderte Involucrin-Expression. Während sie in der Normalhaut im oberen *Stratum spinosum* begann, zeigte sich sowohl beim atopischen Ekzem als auch bei der Psoriasis und bei dem allergischen Kontaktekzem eine Verbreiterung der Anfärbung bereits ab dem mittleren *Stratum spinosum*. Jensen *et al.* beschrieben eine verfrühte und gleichzeitig verminderte Anfärbung sowohl in läsionaler als auch in nicht läsionaler Haut bei Patienten mit atopischem Ekzem. Da Involucrin eine wichtige Rolle für die kovalente Bindung der Ceramide am „cornified cell envelope“ spielt, wurde vermutet, dass die verminderte Expression mit einer verminderten Anzahl der Hydroxyceramide einhergeht (Proksch *et al.*, 2006).

Diese verfrühten Expressionen innerhalb der Hauterkrankungen lassen sich als Versuch deuten, einen intakten „cornified cell envelope“ zu bilden, einen erhöhten Wasserverlust zu verhindern und somit die Stabilität der Hautbarriere aufrechtzuerhalten. Eine verminderte Intensität der Färbung des Involucrins und des Filaggrins wurde bereits in nicht betroffenen Hautarealen von Patienten mit atopischem Ekzem beschrieben (Jensen *et al.*, 2004). Zudem stellte sich die Anfärbbarkeit des Involucrins als verbreitert im atopischen Ekzem dar. Bei der Psoriasis vulgaris ließ sich das Involucrin auch in den unteren Schichten des *Stratum spinosum* nachweisen (McKay *et Leigh*, 1995). Dieses zeigte sich ebenfalls in unseren Präparaten.

5 Zusammenfassung

Die Haut ist permanent der Umwelt mit ihren teilweise schädigenden Einflüssen ausgesetzt. Sie muss sowohl Allergenen und Infektionserregern als auch einer Dehydratation entgegenwirken. Dabei kommt der Ausbildung einer intakten Hautbarriere mit regelrechter Differenzierung der Keratinozyten eine wichtige Aufgabe zu.

Im Zuge der terminalen Differenzierung verformen sich die Zellen ab dem oberen *Stratum granulosum* zu kernlosen Korneozyten mit dem hoch belastbaren „cornified cell envelope“ und den cornified envelope Proteinen Loricrin und Involucrin. Zudem kommt es zur Umwandlung und Aggregation der Keratine. Dieser Prozess ist durch die Expression spezifischer Proteine charakterisiert. Eine Veränderung in der Prozessierung dieser Strukturproteine ist mit entzündlichen Hauterkrankungen wie beispielsweise dem atopischen Ekzem und der Psoriasis assoziiert.

Caspase-14, ein Mitglied der Cystein-Aspartat-spezifischen Proteasen, nimmt eine bedeutsame Rolle bei der Formation des *Stratum corneum* ein. Das Polyprotein Profilaggrin wird zu Filaggrin und letzteres weiter zu Filaggrin-Monomeren und Aminosäuren mittels Caspase-14 abgebaut. Dabei ist Caspase 14 jedoch nur eines von mehreren Enzymen, die an der Prozessierung von Filaggrin beteiligt sind. Die wichtigste Funktion des Filaggrins (filament aggregating Protein) ist die Aggregation der Keratine während der Umwandlung der Keratinozyten in der lebenden Epidermis zu den Korneozyten im *Stratum corneum*. Filaggrin-Abbauprodukte, Aminosäuren wie Urocaninsäure, Pyrrolidincarbonsäure und Alanin, dienen wiederum als wichtiger Feuchtigkeitsspender („natural moisturizing factor“). Bei Patienten mit einem atopischen Ekzem weist die Haut eine Barrierestörung mit Rötung und Trockenheit auf, die mit Filaggrin-Mutationen assoziiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die drei entzündlichen Hauterkrankungen des atopischen Ekzems, der Psoriasis und des allergischen Kontaktekzems auf die Expression von Caspase-14 sowie die Expression der epidermalen Strukturproteine Filaggrin, Loricrin und Involucrin untersucht. Als Vergleich dienten Normalhautproben. Ziel war es, die Expression dieser Proteine der Hauterkrankungen untereinander und zur Normalhaut zu vergleichen, um zu

pathogenetischen Krankheitsprozessen vermehrte Erkenntnisse zu erlangen. Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen ließen sich die Proteine im Verlauf der Differenzierung darstellen.

Die Ergebnisse der Dissertation zeigen eine Veränderung der Expression der Caspase-14 innerhalb aller entzündlichen Hauterkrankungen im Sinne eines verspäteten Auftretens. Die immunhistologische Anfärbung bei entzündlichen Hauterkrankungen ist erst im mittleren *Stratum spinosum* feststellbar, während diese bei Normalhaut bereits im unteren *Stratum spinosum* erfolgt. Das hat eine verminderte Profilaggrin-Spaltung mit einer verminderten Hydratation der Haut zur Folge. Die Filaggrin-Expression zeigte sich beim atopischen Ekzem und bei der Psoriasis immunhistologisch zwar in einem gering verbreitertem Band entsprechend der Verbreiterung der Epidermis, insgesamt jedoch zeigte sich eine lückenhaft und in der Intensität verringerte Anfärbung. Eine Verbreiterung des Anfärbemusters und eine verfrühte Expressionen im Vergleich zur Normalhaut ließen sich auch für die Strukturproteine Loricrin und Involucrin bei allen drei entzündlichen Hauterkrankungen feststellen.

Im Vergleich zur Normalhaut zeigte die Haut für alle entzündlichen Hauterkrankungen somit ähnliche Veränderungen im Expressionsmuster der Proteine, die am Aufbau eines funktionsfähigen „cornified cell envelope“ und der Keratinaggregation beteiligt sind. Das ist erstaunlich insofern, als dass sich diese klinisch immunologisch und hinsichtlich der Triggerfaktoren unterschiedlichen Dermatosen in den untersuchten Parametern der epidermalen Barriere kaum unterscheiden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei allen Patienten um akute bis subakute Entzündungsreaktionen handelte, die offensichtlich eine gemeinsame Endstrecke der Barriestörungen aufweisen. Somit wäre interessant, ob sich die Erkrankungen subklinisch oder im Stadium einer beginnenden Entzündung hinsichtlich der untersuchten Barriereparameter unterscheiden. Diese Erkenntnisse sollten zu weiterführenden Untersuchungen führen, auch mit dem Ziel der Entwicklung neuer Medikamente.

6 Literaturverzeichnis

Akimoto K, Yoshikawa N, Higaki Y, Kawashima M, Imokawa G.

Quantitative analysis of stratum corneum lipids in xerosis and asteatotic eczema.

J Dermatol. 1993 Jan;20(1):1-6.

Alibardi L, Tschachler E, Eckhart L.

Distribution of caspase-14 in epidermis and hair follicles is evolutionarily conserved among mammals.

Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2005 Oct;286(2):962-73.

Ballaun C, Karner S, Mrass P, Mildner M, Buchberger M, Bach J, Ban J, Harant H, Tschachler E, Eckhart L.

Transcription of the caspase-14 gene in human epidermal keratinocytes requires AP-1 and NFkappaB.

Biochem Biophys Res Commun. 2008 Jun 27;371(2):261-6. Epub 2008 Apr 18.

Bowcock AM.

Psoriasis genetics: the way forward.

J Invest Dermatol. 2004 Jun;122(6):xv-xvii. Review.

Bowcock AM, Cookson WO.

The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis.

Hum Mol Genet. 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R43-55. Review.

Bryld LE, Hindsberger C, Kyvik KO, Agner T, Menné T.

Risk factors influencing the development of hand eczema in a population-based twin sample.

Br J Dermatol. 2003 Dec;149(6):1214-20.

Candi E, Schmidt R, Melino G.

The cornified envelope: a model of cell death in the skin.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Apr;6(4):328-40. Review.

Carlsen BC, Thyssen JP, Menné T, Meldgaard M, Linneberg A, Nielsen NH, Szecsi PB, Stender S, Johansen JD.

Association between filaggrin null mutations and concomitant atopic dermatitis and contact allergy.

Clin Exp Dermatol. 2011 Jul;36(5):467-72. doi: 10.1111/j.1365-2230.2010.03994.x. Epub 2011 Mar 11.

Chernosky ME.

Dry skin and its consequences.

J Am Med Womens Assoc. 1972 Mar;27(3):133 passim.

Christiano AM.

Frontiers in keratodermas: pushing the envelope.

Trends Genet. 1997 Jun;13(6):227-33. Review.

Denecker G, Hoste E, Gilbert B, Hochepeid T, Ovaere P, Lippens S, Van den Broecke C, Van Damme P, D'Herde K, Hachem JP, Borgonie G, Presland RB, Schoonjans L, Libert C, Vandekerckhove J, Gevaert K, Vandenabeele P, Declercq W.

Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss.

Nat Cell Biol. 2007 Jun;9(6):666-74. Epub 2007 May 21.

Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W.

Caspase-14 reveals its secrets.

J Cell Biol. 2008 Feb 11;180(3):451-8. Epub 2008 Feb 4. Review.

Downing DT.

Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis.

J Lipid Res. 1992 Mar;33(3):301-13. Review.

Eckert RL.

Structure, function, and differentiation of the keratinocyte.

Physiol Rev. 1989 Oct;69(4):1316-46. Review.

Eckhart L, Declercq W, Ban J, Rendl M, Lengauer B, Mayer C, Lippens S, Vandenabeele P, Tschachler E.

Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation.

J Invest Dermatol. 2000 Dec;115(6):1148-51.

Eckhart L, Ban J, Fischer H, Tschachler E.

Caspase-14: analysis of gene structure and mRNA expression during keratinocyte differentiation.

Biochem Biophys Res Commun. 2000 Nov 2;277(3):655-9.

Ekanayake-Mudiyanselage S, Aschauer H, Schmook FP, Jensen JM, Meingassner JG, Proksch E.

Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption.

J Invest Dermatol. 1998 Sep;111(3):517-23.

Elias PM.

Epidermal lipids, barrier function, and desquamation.

J Invest Dermatol. 1983 Jun;80(1 Suppl):44s-9s.

Elias PM, Menon GK.

Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier.

Adv Lipid Res. 1991;24:1-26. Review.

Elias PM, Feingold KR.

Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology.

Semin Dermatol. 1992 Jun;11(2):176-82. Review.

Elias PM.

The stratum corneum revisited.

J Dermatol. 1996 Nov;23(11):756-8. Review.

Fischer H, Stichenwirth M, Dockal M, Ghannadan M.

Stratum corneum-derived caspase-14 is catalytically active.

FEBS Letters 577 2004: 446-450.

Fleckman P, Brumbaugh S.

Absence of the granular layer and keratohyalin define a morphologically distinct subset of individuals with ichthyosis vulgaris.

Exp Dermatol. 2002 Aug;11(4):327-36.

Fölster-Holst R, Pape M, Buss YL, Christophers E, Weichenthal M.

Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients.

Allergy. 2006 May;61(5):629-32.

Fölster-Holst, R.; Schwarz, T.

Atopisches Ekzem- Grundlagen und Updates, Uni-Med 2011.

Frosch P.J., 2004

Contact Dermatitis, 4th edition, Springer Verlag, Berlin.

Giardina E, Capon F, De Rosa MC, Mango R, Zambruno G, Orecchia A, Chimenti S, Giardina B, Novelli G.

Characterization of the loricrin (LOR) gene as a positional candidate for the PSORS4 psoriasis susceptibility locus.

Ann Hum Genet. 2004 Nov;68(Pt 6):639-45.

Giardina E, Sinibaldi C, Novelli G.

The psoriasis genetics as a model of complex disease.

Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2004 Jun;3(2):129-36. Review.

Grubauer G, Feingold KR, Harris RM, Elias PM.

Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier.

J Lipid Res. 1989 Jan;30(1):89-96.

Grubauer G, Elias P., Feingold K.

Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function.

J Lipid Res. 1989 Mar;30(3):323-33.

Gustafsson D, Sjöberg O, Foucard T.

Development of allergies and asthma in infants and young children with atopic dermatitis-a prospective follow-up to 7 years of age.

Allergy. 2000 Mar;55(3):240-5.

Harder J, Schröder JM.

Antimicrobial peptides in human skin.

Chem Immunol Allergy. 2005;86:22-41. Review.

Hoffjan S, Stemmler S.

On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis.

Br J Dermatol. 2007 Sep;157(3):441-9. Epub 2007 Jun 15. Review.

Hohl D, Mehrel T, Lichti U, Turner ML, Roop DR, Steinert PM.

Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins.

J Biol Chem. 1991 Apr 5;266(10):6626-36.

Hohl D.

Expression patterns of loricrin in dermatological disorders.

Am J Dermatopathol. 1993 Feb;15(1):20-7.

Hohl D, Ruf Olano B, de Viragh PA, Huber M, Detrisac CJ, Schnyder UW, Roop DR.

Expression patterns of loricrin in various species and tissues.

Differentiation. 1993 Aug;54(1):25-34.

Hoste E, Kemperman P, Devos M, Denecker G, Kezic S, Yau N, Gilbert B, Lippens S, De Groote P, Roelandt R, Van Damme P, Gevaert K, Presland RB, Takahara H, Puppels G, Caspers P, Vandenabeele P, Declercq W.

Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin.

J Invest Dermatol. 2011 Nov;131(11):2233-41. doi: 10.1038/jid.2011.153. Epub 2011 Jun 9.

Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, Debenedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DY.

Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression.

J Allergy Clin Immunol. 2007 Jul;120(1):150-5. Epub 2007 May 23.

Hüffmeier U, Traupe H, Oji V, Lascorz J, Ständer M, Lohmann J, Wendler J, Burkhardt H, Reis A.

Loss-of-function variants of the filaggrin gene are not major susceptibility factors for psoriasis vulgaris or psoriatic arthritis in German patients.

J Invest Dermatol. 2007 Jun;127(6):1367-70. Epub 2007 Jan 25.

Hvid M, Johansen C, Deleuran B, Kemp K, Deleuran M, Vestergaard C.

Regulation of caspase 14 expression in keratinocytes by inflammatory cytokines--a possible link between reduced skin barrier function and inflammation?

Exp Dermatol. 2011 Aug;20(8):633-6. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01280.x. Epub 2011 May 4.

Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Grüber C, Niggemann B, Wahn U; Multicenter Allergy Study Group.

The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma.

J Allergy Clin Immunol. 2004 May;113(5):925-31.

Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A.

Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?

J Invest Dermatol. 1991 Apr;96(4):523-6.

Irvine AD, McLean WH.

Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis.

J Invest Dermatol. 2006 Jun;126(6):1200-2.

Ishida-Yamamoto A, Iizuka H.

Differences in involucrin immunolabeling within cornified cell envelopes in normal and psoriatic epidermis.

J Invest Dermatol. 1995 Mar;104(3):391-5.

Jacobson TM, Yüksel KU, Geesin JC, Gordon JS, Lane AT, Gracy RW.

Effects of aging and xerosis on the amino acid composition of human skin.

J Invest Dermatol. 1990 Sep;95(3):296-300.

Jang SI, Steinert PM, Markova NG.

Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene.

J Biol Chem. 1996 Sep 27;271(39):24105-14.

Jensen JM, Fölster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, Schütze S, Proksch E.

Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis.

J Invest Dermatol. 2004 Jun;122(6):1423-31.

Johansen C, Kragballe K, Rasmussen M, Dam TN, Iversen L.

Activator protein 1 DNA binding activity is decreased in lesional psoriatic skin compared with nonlesional psoriatic skin.

Br J Dermatol. 2004 Sep;151(3):600-7.

Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM.

Assembly of the epidermal cornified cell envelope.

J Cell Sci. 2001 Sep;114(Pt 17):3069-70.

Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM.

Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope.

Bioessays. 2002 Sep;24(9):789-800. Review.

Karin M, Liu Z, Zandi E.

AP-1 function and regulation.

Curr Opin Cell Biol. 1997 Apr;9(2):240-6. Review.

Kezic S, Kemperman PM, Koster ES, de Jongh CM, Thio HB, Campbell LE, Irvine AD, McLean WH, Puppels GJ, Caspers PJ.

Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum.

J Invest Dermatol. 2008 Aug;128(8):2117-9. Epub 2008 Feb 28. No abstract available. Erratum in: J Invest Dermatol. 2008 Jun;128(6):1604. McLean, Irwin W H [corrected to McLean, W H Irwin].

Koch PJ, de Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M, Hohl D, Kartasova T, Jarnik M, Steven AC, Roop DR.

Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein.

J Cell Biol. 2000 Oct 16;151(2):389-400.

Kupper TS, Fuhlbrigge RC.

Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences.

Nat Rev Immunol. 2004 Mar;4(3):211-22. Review.

Leung DY, Bieber T.

Atopic dermatitis.

Lancet. 2003 Jan 11;361(9352):151-60. Review.

Lippens S, Kockx M, Knaapen M, Mortier L, Polakowska R, Verheyen A, Garmyn M, Zwijsen A, Formstecher P, Huylebroeck D, Vandenabeele P, Declercq W.

Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing.

Cell Death Differ. 2000 Dec;7(12):1218-24.

Lippens S, Kockx M, Denecker G, Knaepen M, Verheyen A, Christiaen R, Tschachler E, Vandenabeele P, Declercq W.

Vitamin D3 induces caspase-14 expression in psoriatic lesions and enhances caspase-14 processing in organotypic skin cultures.

Am J Pathol. 2004 Sep;165(3):833-41.

Louden BA, Pearce DJ, Lang W, Feldman SR.

A Simplified Psoriasis Area Severity Index (SPASI) for rating psoriasis severity in clinic patients.

Dermatol Online J. 2004 Oct 15;10(2):7.

Lüllmann-Rauch, R., 2002

Histologie, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart.

McKay IA, Leigh IM.

Altered keratinocyte growth and differentiation in psoriasis.

Clin Dermatol. 1995 Mar-Apr;13(2):105-14. Review.

Marekov LN, Steinert PM.

Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope.

J Biol Chem. 1998 Jul 10;273(28):17763-70.

Marenholz I, Nickel R, Rüschenhoff F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, Grüber C, Lau S, Worm M, Keil T, Kurek M, Zaluga E, Wahn U, Lee YA.

Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march.

J Allergy Clin Immunol. 2006 Oct;118(4):866-71. Epub 2006 Sep 1.

Melnik B, Hollmann J, Plewig G.

Decreased stratum corneum ceramides in atopic individuals-a pathobiochemical factor in xerosis?

Br J Dermatol. 1988 Oct;119(4):547-9.

Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A.

Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21.

J Invest Dermatol. 1996 May;106(5):989-92.

I. Moll., 6. Auflage, 2005

Dermatologie, 6. Auflage, Duale Reihe, Thieme.

Morar N, Bowcock AM, Harper JI, Cookson WO, Moffatt MF.

Investigation of the chromosome 17q25 PSORS2 locus in atopic dermatitis.

J Invest Dermatol. 2006 Mar;126(3):603-6.

Nirunskisiri W, Presland RB, Brumbaugh SG, Dale BA, Fleckman P.

Decreased profilaggrin expression in ichthyosis vulgaris is a result of selectively impaired posttranscriptional control.

J Biol Chem. 1995 Jan 13;270(2):871-6.

Novak N, Baurecht H, Schäfer T, Rodriguez E, Wagenpfeil S, Klopp N, Heinrich J, Behrendt H, Ring J, Wichmann E, Illig T, Weidinger S.

Loss-of-function mutations in the filaggrin gene and allergic contact sensitization to nickel.

J Invest Dermatol. 2008 Jun;128(6):1430-5. Epub 2007 Nov 29.

O'Regan GM, Sandilands A, McLean WH, Irvine AD.

Filaggrin in atopic dermatitis.

J Allergy Clin Immunol. 2008 Oct;122(4):689-93. Epub 2008 Sep 5. Review.

Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH.

Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis.

Nat Genet. 2006 Apr;38(4):441-6. Epub 2006 Mar 19.

Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH.

Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis.

Nat Genet. 2006 Apr;38(4):441-6. Epub 2006 Mar 19.

Peroni DG, Piacentini GL, Cametti E, Chinellato I, Boner AL.

Correlation between serum 25-hydroxyvitamin D levels and severity of atopic dermatitis in children.

Br J Dermatol. 2011 May;164(5):1078-82. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10147.x. Epub 2011 Apr 11.

Presland RB, Dale BA.

Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease.

Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(4):383-408. Review.

Presland RB, Boggess D, Lewis SP, Hull C, Fleckman P, Sundberg JP.

Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris.

J Invest Dermatol. 2000 Dec;115(6):1072-81.

Proksch E, Holleran WM, Menon GK, Elias PM, Feingold KR.

Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis.

Br J Dermatol. 1993 May;128(5):473-82. Review.

Proksch E, Fölster-Holst R, Jensen JM.

Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema.

J Dermatol Sci. 2006 Sep;43(3):159-69. Epub 2006 Aug 2. Review.

Rawlings AV, Harding CR.

Moisturization and skin barrier function.

Dermatol Ther. 2004;17 Suppl 1:43-8. Review.

Rawlings AV, Matts PJ.

Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle.

J Invest Dermatol. 2005 Jun;124(6):1099-110. Review.

Rendl M, Ban J, Mrass P, Mayer C, Lengauer B, Eckhart L, Declerq W, Tschachler E.

Caspase-14 expression by epidermal keratinocytes is regulated by retinoids in a differentiation-associated manner.

J Invest Dermatol. 2002 Nov;119(5):1150-5.

Resing KA, Johnson RS, Walsh KA.

Mass spectrometric analysis of 21 phosphorylation sites in the internal repeat of rat profilaggrin, precursor of an intermediate filament associated protein.

Biochemistry. 1995 Jul 25;34(29):9477-87.

Rogers J, Harding C, Mayo A, Banks J, Rawlings A.

Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons.

Arch Dermatol Res. 1996 Nov;288(12):765-70.

Roop D.

Defects in the barrier.

Science. 1995 Jan 27;267(5197):474-5. Review.

Rothnagel JA, Dominey AM, Dempsey LD, Longley MA, Greenhalgh DA, Gagne TA, Huber M, Frenk E, Hohl D, Roop DR.

Mutations in the rod domains of keratins 1 and 10 in epidermolytic hyperkeratosis.

Science. 1992 Aug 21;257(5073):1128-30.

Saint-Mezard P, Rosieres A, Krasteva M, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF.

Allergic contact dermatitis.

Eur J Dermatol. 2004 Sep-Oct;14(5):284-95. Review.

Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH.

Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease.

J Cell Sci. 2009 May 1;122(Pt 9):1285-94.

Schürer NY, Plewig G, Elias PM.

Stratum corneum lipid function.

Dermatologica. 1991;183(2):77-94. Review.

Schnuch A, Lessmann H, Geier J, Frosch PJ, Uter W; IVDK.

Contact allergy to fragrances: frequencies of sensitization from 1996 to 2002. Results of the IVDK*.

Contact Dermatitis. 2004 Feb;50(2):65-76.

Schnuch A, Uter W, Geier J, Gefeller O; IVDK study group.

Epidemiology of contact allergy: an estimation of morbidity employing the clinical epidemiology and drug-utilization research (CE-DUR) approach.

Contact Dermatitis. 2002 Jul;47(1):32-9.

Scott IR, Harding CR.

Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment.

Dev Biol. 1986 May;115(1):84-92.

Segre JA.

Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders.

J Clin Invest. 2006 May;116(5):1150-8. Review.

Seguchi T, Cui CY, Kusuda S, Takahashi M, Aisu K, Tezuka T.

Decreased expression of filaggrin in atopic skin.

Arch Dermatol Res. 1996 Jul;288(8):442-6.

Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O'Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB, Fleckman P, McLean WH.

Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris.

Nat Genet. 2006 Mar;38(3):337-42. Epub 2006 Jan 29.

Steinert PM, Marekov LN.

The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope.

J Biol Chem. 1995 Jul 28;270(30):17702-11.

Steinert PM, Marekov LN.

Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope.

J Biol Chem. 1997 Jan 17;272(3):2021-30.

Steven AC, Bisher ME, Roop DR, Steinert PM.

Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes.

J Struct Biol. 1990 Jul-Sep;104(1-3):150-62.

Sugiura H, Ebise H, Tazawa T, Tanaka K, Sugiura Y, Uehara M, Kikuchi K, Kimura T.

Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope.

Br J Dermatol. 2005 Jan;152(1):146-9.

Volz A, Korge BP, Compton JG, Ziegler A, Steinert PM, Mischke D.

Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21.

Genomics. 1993 Oct;18(1):92-9.

Walsh DS, Borke JL, Singh BB, Do NN, Hsu SD, Balagon MV, Abalos RM.

Psoriasis is characterized by altered epidermal expression of caspase 14, a novel regulator of keratinocyte terminal differentiation and barrier formation.

J Dermatol Sci. 2005 Jan;37(1):61-3. Epub 2004 Nov 18.

Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Palmer CN, Jenneck C, Maintz L, Hagemann T, Behrendt H, Ring J, Nothen MM, McLean WH, Novak N.

Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations.

J Allergy Clin Immunol. 2006 Jul;118(1):214-9. Epub 2006 Jun 9. Erratum in: J Allergy Clin Immunol. 2006 Sep;118(3):724. J Allergy Clin Immunol. 2006 Oct;118(4):922.

Welter JF, Crish JF, Agarwal C, Eckert RL.

Fos-related antigen (Fra-1), junB, and junD activate human involucrin promoter transcription by binding to proximal and distal AP1 sites to mediate phorbol ester effects on promoter activity.

J Biol Chem. 1995 May 26;270(21):12614-22. Erratum in: J Biol Chem 1996 May 3;271(18):11034.

Yamamoto M, Kamata Y, Iida T, Fukushima H, Nomura J, Saito M, Tajima M, Okubo Y, Momoi T, Tsuboi R, Hibino T.

Quantification of activated and total caspase-14 with newly developed ELISA systems in normal and atopic skin.

J Dermatol Sci. 2011 Feb;61(2):110-7. Epub 2010 Dec 7.

Yoneda K, McBride OW, Korge BP, Kim IG, Steinert PM.

The cornified cell envelope: loricrin and transglutaminases.

J Dermatol. 1992 Nov;19(11):761-4.

Yoneda K, Hohl D, McBride OW, Wang M, Cehrs KU, Idler WW, Steinert PM.

The human loricrin gene.

J Biol Chem. 1992 Sep 5;267(25):18060-6.

Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, Scheuch H, Angel P, Tschachler E, Wagner EF.

Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins.

Nature. 2005 Sep 15;437(7057):369-75. Erratum in: Nature. 2006 Mar 30;440(7084):708.

von Zglinicki T, Lindberg M, Roomans GM, Forslind B.

Water and ion distribution profiles in human skin.

Acta Derm Venereol. 1993 Oct;73(5):340-3.

7 Danksagung

Sehr herzlich danken möchte ich Frau Prof. Dr. med. R. Fölster-Holst für die Überlassung des Themas und hervorragende Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. E. Proksch danke ich herzlich für die Hilfe bei der histologischen Begutachtung der Präparate.

Weiterhin möchte ich Frau C. Neumann für ihre Unterstützung bei der Aufbereitung der Hautproben, Herrn Dr. R. Panzer für seine wertvollen Ratschläge, Herrn O. Vollrath für die Hilfe bei der Erstellung der Statistik, Marco, Graziella und Kerstin für die vielen Tipps und den Mitarbeitern des Labors herzlich danken.

Mein großer Dank gilt meiner Freundin Sarah Babian für ihre ermutigenden Worte und großen Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Meiner Familie gilt mein ganz besonderer Dank für die stetige Unterstützung nicht nur bei der Entstehung dieser Dissertation sowie während meines gesamten Studiums, sondern darüber hinaus in allen Lebenslagen.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marie-Louise Grünig
Geburtsdatum: 28.06.1984
Geburtsort: Brunsbüttel
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1991-1995 Grundschule Nord, Brunsbüttel
1995-2004 Gymnasium Brunsbüttel
Abschluss: Abitur

Weiterer Bildungsweg

2004 Beginn Studium der Humanmedizin an der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2006 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2008 Beginn der Doktorarbeit an der Klinik für
Dermatologie des Universitätsklinikums
Schleswig Holstein, Campus Kiel unter der
Leitung von Frau Prof. Dr. R. Fölster-Holst
2009 Beginn Praktisches Jahr
1. Terial im Schleiklinikum Schleswig, MLK
(Chirurgie)
2. Terial im UKSH, Kiel (Augenheilkunde)
3. Terial im Städtischen Krankenhaus Itzehoe
(Innere Medizin)
2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Seit 2011 Assistenzärztin der Augenheilkunde im
Bundeswehrkrankenhaus Hamburg