

Aus der
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Lars French

**Immunhistochemische Untersuchungen zur möglichen
Pathogenese der granulären Parakeratose**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Natalie Lidia Evenschor, geb. Lapczynski

aus
München

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael J. Flaig

Mitberichterstatter: PD Dr. Hans Starz

Prof. Dr. Philipp Jurmeister

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2025

Inhaltsverzeichnis

1. GRANULÄRE PARAKERATOSE	4
1.1 Beschreibung und Einordnung der Entität	4
1.2 Zielsetzung der Arbeit	7
2. KRANKHEITSBILDER MIT ZEICHEN EINER GRANULÄREN PARAKERATOSE	7
2.1 Intertriginöses Ekzem	8
2.2 Zysten	8
2.2.1 Definition	8
2.2.2 Einteilung in echte und Pseudozysten	9
2.3 Condylom	9
2.3.1 Definition	9
2.3.2 Einteilung und Pathogenese	10
3. MÖGLICHE RELEVANTE PROTEINE BEI DER ENTSTEHUNG DER GRANULÄREN PARAKERATOSE	11
3.1 Filaggrin	11
3.1.1 Definition	11
3.1.2 Genetik des (Pro-) Filaggrins	11
3.1.3 Profilaggrin	12
3.1.4 Filaggrin und seine Funktion	15
3.1.5 Bedeutung für diese Arbeit	17
3.2 Caspase-14	18
3.2.1 Definition von Caspasen	18
3.2.2 Sonderform Caspase-14	18
3.2.3 Caspasen-Aufbau	18
3.2.4 Expression von Caspase-14	20
3.2.5 Funktion von Caspase-14	22
3.3 Voltage-gated calcium channel	23
3.3.1 Definition	23
3.3.2 Aufbau	24
3.3.3 Expression	25
3.3.4 Funktion	26
3.4 Desmocollin-1	29
3.4.1 Definition	29
3.4.2 Expression	30
3.4.3 Funktion	30

3.5 Corneodesmosin	32
3.5.1 Definition	32
3.5.2 Aufbau	32
3.5.3 Expression	32
3.5.4 Funktion	33
4. THESEN ÜBER DIE MÖGLICHE PATHOGENESE DER GRANULÄREN PARAKERATOSE	34
4.1 Vorliegen eines Mangels oder einer Funktionsstörung der Caspase-14	35
4.2 Störung des epidermalen Calcium-Haushalts durch Fehlen von voltage-gated calcium channel	36
4.3 Fehlerhafte Expression der Cadherine DSC1 oder CDSN	38
5. MATERIAL UND METHODEN	39
5.1 Material	39
5.2 Geräte	39
5.3 Verbrauchsmaterialien	40
5.4 Reagenzien und Lösungen	40
5.5 Primärantikörper	42
5.6 Behandlungen der histologischen Schnitte mit ausgewählten Antikörpern	42
5.6.1 anti-Caspase-14	43
5.6.2 anti-Voltage-gated calcium channel	43
5.6.3 anti-Desmocollin-1	43
5.6.4 anti-Corneodesmosin	44
5.7 Vorgehensweise nach Inkubation mit den Primär-Antikörpern	44
6. ERGEBNISSE	45
6.1 Caspase-14-Färbung	46
6.2 VGCC-Färbung	48
6.3 DSC1-Färbung	51
6.4 CDSN-Färbung	53
7. DISKUSSION	55
7.1 Caspase-14	55
7.2 Calcium	59

7.3 Cadherine	61
7.4 Einfluss von Schweiß	66
7.5 Möglicher Mechanismus der Entstehung von granulärer Parakeratose	67
8. ZUSAMMENFASSUNG	70
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	74
10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
11. TABELLENVERZEICHNIS	75
12. LITERATURVERZEICHNIS	75
13. DANKSAGUNG	83
14. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	84
15. LEBENSLAUF	85
16. PUBLIKATIONSLISTE	85

1. Granuläre Parakeratose

Der Begriff „Granuläre Parakeratose“ (GP) tauchte erstmals 1991 in der Literatur auf und wurde von Northcutt et al. geprägt. Dieser beschrieb die GP als eine „die Axillen betreffende Dermatose“ (Northcutt et al. 1991). Definiert wird sie heutzutage als gutartige Verhornungsstörung mit gelegentlichem Juckreiz in den Intertriginen (Jaconelli et al. 2008; Trowers et al. 2002).

Über die GP ist wenig bekannt - weder zur Ätiologie, noch zur Inzidenz oder bezüglich zielgerichteter Therapien. Im Folgenden soll ein Einblick in den aktuellen Wissensstand gegeben werden und die Entität näher beleuchtet werden.

1.1 Beschreibung und Einordnung der Entität

Diese Entität ist histologisch definiert als Retention von Keratohyalin granula ab dem Wechsel vom Stratum granulosum zum Stratum corneum, die sich granulär (körnerartig) in den avitalen Keratinozyten präsentiert. Zudem fällt eine Parakeratose, also eine Persistenz des Zellkerns oder von Zellkernresten in einem meist verbreiteten Stratum corneum auf. (Channual et al. 2013; Northcutt et al. 1991)

Es liegen bisher nur wenige wissenschaftliche Berichte über die GP vor, einige Case-Reports und kaum Studien.

Scheinfeld und Mones sowie Kollegen werteten Daten von 363.343 Hautbiopsien von Anfang 07/1999 bis Ende 12/2003 aus. Bei Biopsien mit verdicktem Stratum corneum und Retention von Keratohyalin granula wurde die Diagnose einer GP bei 18 Proben gestellt, was prozentual einem Anteil von 0,005% entsprach. Alle 18 Proben entstammten der Lokalisation Axilla, 15 davon von Frauen, 3 männlichen Geschlechts. Die Altersspanne war von 19 bis 67 Jahren, das Durchschnittsalter lag bei 45 Jahren. Es existierten verschiedene Verdachtsdiagnosen, von denen Warzen (4 Fälle), Acanthosis nigricans (3 Fälle) und M. Hailey-Hailey (3 Fälle) am häufigsten vorkamen. Lediglich bei einem Patienten wurde aufgrund der Klinik die Diagnose einer GP gestellt. Histologisch fiel eine Variabilität der GP auf; bei 16 Hautschnitten war das gesamte Stratum corneum betroffen, bei 2 nur partiell. Die Verteilung des histologischen Phänomens „Parakeratose“ war bei 11 Proben über das gesamte Präparat, während bei den restlichen 7 Proben nur manche Stellen betroffen waren. Es wurde zudem vermutet, dass ein Teil der Probenentnahmen am Rande der Läsion erfolgte.

Zusammenfassend gaben die Autoren Folgendes aus ihrer Arbeit an: Dermatologen stellen selten die Verdachtsdiagnose einer GP, wenn sie eine Läsion biopsieren. Die wenigen diagnostizierten Fälle von GP könnten für eine niedrige Inzidenz sprechen. Aufgefallen waren leichte Varianten bezüglich der Histopathologie der GP.

Wenn in der Literatur von GP als klinischem Krankheitsbild die Rede ist, wird sie klinisch als benigne verlaufende Dermatose mit roten bis braunen, manchmal schuppenden oder hyperkeratotischen Papeln, die teils auch zu Plaques konfluieren beschrieben (Scheinfeld und Mones 2005). Des Öfteren ist die Lokalisation „axillär“ aufgefallen, weshalb man früher auch von „axillary granular parakeratosis“ sprach (Northcutt et al. 1991), jedoch kann sie auch in anderen Lokalisationen auftreten, zum Beispiel genital oder intertriginös, seltener auch am restlichen Körper (Scheinfeld und Mones 2005). Sowohl Männer, als auch Frauen jeglichen Alters können die GP entwickeln, wobei das weibliche Geschlecht etwas häufiger als das männliche betroffen zu sein scheint (Scheinfeld und Mones 2005).

Die Patienten berichten gelegentlich von Juckreiz. Es wird derzeit diskutiert, ob Okklusion oder die Anwendung bestimmter Topika, zum Beispiel Deodorants, das Auftreten von Hautveränderungen im Sinne einer GP begünstigen. Die Klinik allein scheint nicht wegweisend zu sein, da die Hautveränderungen nicht spezifisch für die GP sind (siehe Abbildung 1 für ein „klassisches“ klinisches Beispiel einer axillären GP). Aus diesem Grund wird häufig eine andere Dermatose diagnostiziert und erst bei unklarer Diagnosestellung oder Therapieresistenz eine Biopsie entnommen, wobei das Phänomen der GP als histologischer Befund auffällt. Daher ist eine Aussage über die Inzidenz kaum möglich. (Scheinfeld und Mones 2005)

Ein Case-Report von Akkaya et al. berichtet von 7 pädiatrischen Fällen im Alter von 4 Monaten bis 2 Jahren mit GP, 5 davon vornehmlich in intertriginösen Bereichen beziehungsweise im Windelbereich und in zwei Fällen im Nacken. Zudem waren 6 von 7 Kindern auch am atopischen Ekzem erkrankt. Den Symptomen der GP vorausgegangen waren bei 6 Patienten die häufige Applikation von Zinkoxid-Pasten, wohingegen die anderen 2 Patienten unter exzessivem Schwitzen litten und häufig rückfettende Externa appliziert bekamen. Zu erwähnen sei hier, dass die Autoren bei den Kleinkindern keine Biopsien durchführten, sondern oberflächlich Krustenanteile/oberflächliche Zellen entnahmen und diese zytologisch untersuchten. Nach Absetzen der Zinkoxid-haltigen Externa und gemäßigeren Gebrauch von

rückfettenden Cremes bildeten sich die Hautveränderungen aller 7 Kinder nach circa 2 Wochen zurück. Die Autoren schlussfolgerten, dass atopische Haut möglicherweise anfälliger ist, GP zu entwickeln, da aufgrund der vorgeschädigten Hautbarriere die transepidermale Penetration von Topika erhöht ist. (Akkaya et al. 2015)

Der Verlauf kann selbstlimitierend oder auch chronisch-rezidivierend sein (Scheinfeld und Mones 2005). Therapeutisch ist bisher unklar, welche Topika (Chang et al. 2004) eingesetzt werden können oder ob der (übermäßige) Gebrauch von kosmetischen Produkten (Akkaya et al. 2015) sogar der Auslöser für die Erkrankung ist und eine zurückhaltende Haltung zu Topika eingenommen werden sollte.



Abbildung 1 Axilläre granuläre Parakeratose (Scheinfeld und Mones 2005)

Linke Axilla mit multiplen erythematös-bräunlichen, gruppiert stehenden Papeln mit stellenweiser Schuppung (Scheinfeld und Mones 2005)

Es existieren unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Behandlung der GP mit verschiedenen Externa, darunter auch topische Steroide, Retinoide, Antibiotika und Antimykotika (Chang et al. 2004). Daher sind weitere Untersuchungen notwendig um geeignete Therapieoptionen zu etablieren.

Zusammenfassend geht aus der Literatur nicht klar hervor, ob es sich bei der granulären Parakeratose um eine eigenständige Erkrankung handelt oder um ein dermatohistopathologisches, eventuell reaktives Phänomen, das möglicherweise assoziiert bei diversen Diagnosen auftritt.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Die GP ist ein weitestgehend unerforschtes Phänomen in der Dermatologie. Es sprechen histologische Beobachtungen, wie die Parakeratose und die Hyperkeratose dafür, dass die epitheliale Enddifferenzierung der Kerneozyten im Wandel vom Stratum granulosum (SG) zum Stratum corneum (SC) in einer bisher ungeklärten Weise gestört ist. Folglich entwickelt sich eine Barriere-Störung. Es ist unklar, warum es zu einer Retention von Keratohyalin-Granula und Persistenz des Zellkerns bis ins SC kommt.

In der histologischen Routinediagnostik war eine GP gehäuft bei bestimmten Erkrankungen nebenbefundlich aufgefallen. Die Häufung dieser Gegebenheit in den Intertrigines (Scheinfeld und Mones 2005) lässt vermuten, dass okklusives Milieu, erhöhte Feuchtigkeit oder der leicht erhöhte pH-Wert in diesen Lokalisationen eine Rolle spielen könnten. Die Tatsache, dass die GP auch an anderen Körperstellen vorkommen kann, deutet darauf hin, dass es auch alternative begünstigende Faktoren gibt. Diese Arbeit versucht an Biopsien mit histologischen Zeichen einer granulären Parakeratose durch immunhistochemische Färbungen von Proteinen, die an der epithelialen Differenzierung maßgeblich beteiligt sind, Einblicke in die Physiologie der GP zu erörtern um einerseits der Pathogenese des Phänomens granuläre Parakeratose näherzukommen, andererseits Anhaltspunkte für eine zielgerichtete Therapie zu finden.

Zur Auswahl der immunhistochemischen Antikörperfärbungen wurden Thesen zum Entstehungsmechanismus der GP entwickelt und geprüft.

Insgesamt soll ein pathogenetischer Einblick in die Entität „Granuläre Parakeratose“ gewonnen werden.

2. **Krankheitsbilder mit Zeichen einer granulären Parakeratose**

Die im Folgenden beschriebenen Erkrankungen präsentierten sich in der Routinediagnostik regelhaft mit den histologischen Merkmalen der Hyperparakeratose, gelegentlich werden damit assoziiert granuläre Ablagerungen, Keratohyalingranula, beobachtet.

2.1 Intertriginöses Ekzem

Das Intertriginöse Ekzem, auch Intertrigo genannt, ist eine die Hautfalten betreffende kumulativ-toxische Dermatitis. Dort, wo zwei Hautflächen dauerhaft Kontakt zueinander haben, kommt es zu einem okkludierenden feuchten Milieu; der Schweiß kann nicht verdunsten, sodass die Haut mazeriert. Betroffen können „natürlich vorhandene“ Intertrigines sein, zum Beispiel die Leisten oder Achselhöhlen, bei Adipositas zudem auch erworbene Falten, wie die Bauchfalte. Dort kommt es häufiger zu einer sekundären Infektion mit Bakterien oder Pilzen, die in der feuchten und warmen Umgebung einen geeigneten Nährboden haben, sowie zu Störungen der Hautbarriere. Klinisch (siehe Abbildung 2) präsentiert sich die Intertrigo mit einem scharf begrenzten Erythem, Mazeration und Exsudation. Der Patient berichtet von Juckreiz oder Schmerzen im betroffenen Bereich. Bei ausbleibender Therapie kann sich das primäre intertriginöse Ekzem chronifizieren. (Plewig und Braun-Falco 2012)



Abbildung 2 Intertrigo submammär (Plewig et al. 2018)

2.2 Zysten

2.2.1 Definition

Zysten imponieren klinisch meist als Raumforderungen variabler Größe von wenigen Millimetern bis zu mehreren Zentimetern mit oder ohne makroskopisch erkennbaren Hohlraum. Der Zysteninhalt kann von diverser Viskosität und Konsistenz sein, sodass man eine Bandbreite von verhorntem bis fluidem Material vorfinden kann. Zysten sind keine seltene Erscheinung, fast jeder Mensch entwickelt im Laufe seines Lebens eine Zyste. (Plewig und Braun-Falco 2012)

2.2.2 Einteilung in echte und Pseudozysten

Unterschieden werden echte Zysten von Pseudozysten durch das Vorhandensein einer epithelialen Zystenwand. Pseudozysten hingegen sind von komprimiertem Bindegewebe oder Granulationsgewebe umgeben.

Echte Zysten können anhand der Histologie in Untertypen eingeteilt werden; sie werden nach Art und Herkunft ihres auskleidenden Epithels weiter klassifiziert. Die häufigste unter ihnen, die Epidermalzyste (siehe Abbildung 3) zeigt eine der Epidermis ähnelnde Zystenwand mit einem SG und lamellär geschichtetem Hornmaterial. Andere epitheliale Zysten sind u.a. Trichilemmalzysten, Milien oder Riesenkomedos, deren Einordnung durch Klinik und Betrachtung des Zystenepithels und Zysteninhalts in meist typischer Lokalisation am Körper gelingt. Bei den Pseudozysten liegt anstatt eines auskleidenden Epithels häufig eine Pseudokapsel aus fibrotischen Bindegewebe vor. Zu dieser Art von „unechten“ Zysten gehören beispielsweise die Mukozele, bei der aus dem Speicheldrüsengang Sekret austritt und von speziellen ortsständigen Makrophagen, den Histozyten phagozytiert wird. (Plewig und Braun-Falco 2012)



Abbildung 3 Epidermalzyste (Plewig und Braun-Falco 2012)

2.3 Condylom

2.3.1 Definition

Condylom ist der klinische Begriff für eine Genitalwarze, auch Feigwarze genannt. Sie tritt in der Regel im intertriginösen Schleimhautbereich von Frauen und Männern auf. Genitalwarzen lassen sich in 4 Gruppen einteilen, die im Folgenden beschrieben sind. (Plewig und Braun-Falco 2012)

2.3.2 Einteilung und Pathogenese

Zu den 4 klinischen Varianten gehören die *Condylomata acuminata* (siehe Abbildung 4), die spitz zulaufend sind und als klassischer Typ gelten, die *Condylomata plana*, die am Gebärmutterhals und an der Vorhaut zu finden sind, die bowenoide Papulose im Sinne eines Carcinoma in situ und die *Condylomata gigantea*, die wie der Name schon andeutet ein ausgeprägtes Größenwachstum aufzeigen. Bei den Condylomen spielt die virale Pathogenese eine wichtige Rolle. Humane Papillomviren (HPV) infizieren die basalen Keratinozyten der Epidermis über Zell-Rezeptoren. Im Verlauf der epidermalen Differenzierung integriert das Virus sein Genom in die Wirtszelle, vermehrt dies und setzt in den obersten Epidermisschichten neu gebildete Viren frei. Bei diesem Vorgang macht es sich Strukturen und Prozesse der Wirtszelle zu Nutze und verändert damit mutmaßlich den Zellzyklus. Es ist schwer festzulegen, welche Konsequenzen auf den Zellzyklus, die Apoptose und die Zelldifferenzierung genau folgen, denn dies hängt einerseits vom HPV-Typen ab, andererseits von seiner individuellen Genexpression. (Plewig und Braun-Falco 2012)



Abbildung 4 *Condylomata acuminata* (Plewig et. al)

3. **Mögliche relevante Proteine bei der Entstehung der granulären Parakeratose**

3.1 Filaggrin

3.1.1 Definition

Das Filaggrin, etymologisch aus dem Englischen „filament-aggregating protein“, ist ein in der Epidermis vorkommendes Protein. Es bindet in den Keratinozyten Filamente des Zytoskeletts und lässt diese zu einem kompakten Aggregat werden, weswegen es eine wichtige Rolle für den strukturellen Aufbau des SC spielt. (Sandilands et al. 2009)

Ursprünglich entsteht das Filaggrin aus einem Polyprotein, dem Profilaggrin. Dieses befindet sich in den Keratohyalingranula des SG und wird durch mehrere biochemische Vorgänge zu Filaggrin-Monomeren abgebaut, welche in weiteren Schritten zu noch kleineren Fragmenten gespalten werden. (Sandilands et al. 2009)

Das Filaggrin beziehungsweise die Abbau-Produkte des Filaggrins werden zum Aufbau der äußersten Hautschicht und somit der funktionellen Hautbarriere benötigt. Es entstehen im Laufe des Abbau-Prozesses vom Profilaggrin bis zum Filaggrin-Monomer-Fragment zahlreiche Aminosäuren (siehe Abbildung 6) die für den pH-Wert der Haut zuständig sind und als natürliche Feuchtigkeitsspender (sogenannte NMF= natural moisturizing factors) im SC dienen. (Sandilands et al. 2009)

3.1.2 Genetik des (Pro-) Filaggrins

Das Profilaggrin wird vom FLG-Gen auf Chromosom 1q21 kodiert. Es besteht aus drei Exons und zwei Introns. Exon 1 ist nicht kodierend. Innerhalb des Exons 2 liegt das Startcodon für die Translation. Exon 3 kodiert den Hauptbestandteil des Profilaggrins; ein ca. 400 kDa großes, Histidin-reiches Protein, das aus 10-12 Filaggrin-Kopien besteht. Jede Filaggrin-Kopie besteht aus 324 Aminosäuren und ist mit der jeweils nächsten verbunden. Die Mechanismen der physiologischen Expression von Filaggrin sind bisher unklar. (Sandilands et al. 2009)

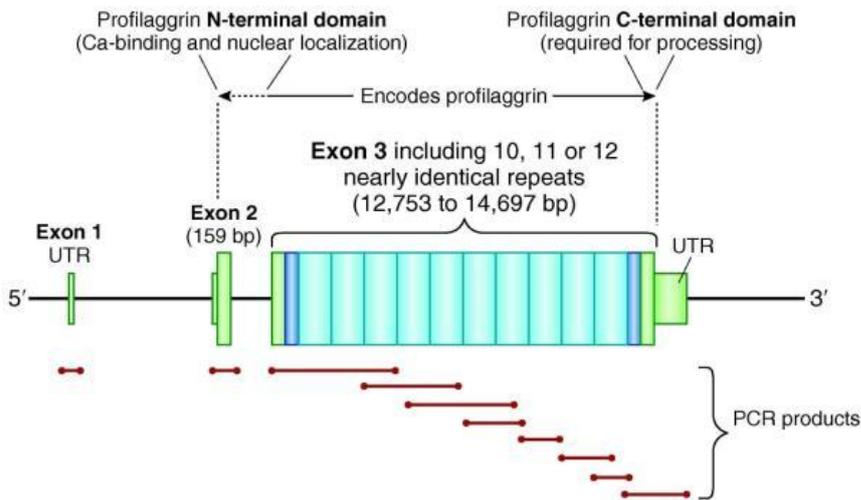


Abbildung 5 Filaggrin-Gen mit 3 Exons (Brown und McLean, W H Irwin 2012)

Abbildung 5 zeigt den DNA-Strang zur Kodierung des Profilaggrins. Zu erkennen sind die drei Exons (hellgrün), wobei Exon 1 kaum Polymerase-chain-reaction (PCR) - Produkte (braun) herstellt. Exon 2 kodiert den N-Terminus mit der Calcium-Bindestelle und der Kernlokalisierung. Exon 3 enthält die meisten Basenpaare (hellblau und türkis), sowie die Kodierung für den C-Terminus, dessen genaue Funktion unbekannt ist [Abbildungsabkürzungen: UTR= untranslated region, bp= base pairs, PCR= poly-chain-reaction]. (Brown und McLean, W H Irwin 2012).

3.1.3 Profilaggrin

Profilaggrin wird als Vorläufer-Polyprotein in einer Größe von 350-400 kDa - wahrscheinlich im Stratum spinosum (SS) - synthetisiert und besteht in dieser Form aus 10-12 Filaggrin-Einheiten. Es besitzt einen N- Terminus mit einer S100-Calcium-Bindestelle und einen C-Terminus. (Hoste et al. 2011; Denecker et al. 2007; Fallon et al. 2009)

Jeder Filaggrin-Baustein ist gleich groß, besteht aus 324 Aminosäuren und ist mit der jeweils nächsten Filaggrin-Einheit verbunden. Diese Bindestellen werden während der Prozessierung des Profilaggrins in aktive Filaggrin-Monomere proteolytisch gespalten (siehe Abbildung 6). (McKinley-Grant et al. 1989; Gan et al. 1990; Ovaere et al. 2009)

Das Profilaggrin befindet sich im SG in den Keratohyalin-Granula und ist zum Schutz vor zu früher Aktivierung phosphoryliert. Die Dephosphorylierung dieses Vorläuferproteins findet durch bisher nicht bekannte Phosphatasen am Übergang vom

SG ins SC statt. Anschließend ist auch die weitere Prozessierung in einzelne Filaggrin-Einheiten möglich. (Sandilands et al. 2009)

Der N-Terminus ist 293 Aminosäuren lang und beinhaltet eine A- und B-Domäne. In der A-Domäne befinden sich zwei Ca^{2+} -bindende Motive, die Ähnlichkeiten zu den EF-hands von S100-bindenden-Proteinen aufweisen (Fallon et al. 2009; Sandilands et al. 2009). Dies lässt vermuten, dass Calcium eine wichtige regulierende Funktion in der epidermalen Differenzierung spielt. Anzumerken sei hier, dass Calcium nur an Profilaggrin bindet, nicht aber an Filaggrin-Einheiten (Markova et al. 1993), was am ehesten aufgrund der oben beschriebenen Calcium-Bindestelle der A-Domäne im N-Terminus begründet ist. In vitro wurde beobachtet, dass die Entfernung des Calciums vom N-Terminus des Profilaggrins Konformationsänderungen verursacht (Presland et al. 1995). Womöglich ist eine Calcium-abhängige, bestimmte Konformation des Profilaggrins notwendig, damit bestimmte Bindestellen im Protein zur Bindung und/oder Spaltung für zum Beispiel Proteasen zugänglich gemacht werden können (Sandilands et al. 2009). Die B-Domäne könnte laut Ishida-Yamamoto et al. ein „Zellkern-Lokalisations-Signal“ beinhalten; dies wurde geschlossen aus der Beobachtung, dass der N-Terminus mittels Antikörper in apoptotischen Zellkernen nachgewiesen werden konnte.

Somit hat der N-Terminus mutmaßlich zwei wichtige Funktionen: er reguliert die Prozessierung des Profilaggrins zum Filaggrin und ist am Zellkernabbau von Keratinozyten beteiligt (Sandilands et al. 2009).

Die Funktion des C-Terminus ist bisher weniger erforscht. Der C-Terminus besteht aus 157 Aminosäuren und scheint auch für die Prozessierung des Profilaggrins zum Filaggrin notwendig zu sein. Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass mutierte Profilaggrin-Proteine, die keinen C-Terminus aufweisen, nicht in Filaggrin-Monomere gespalten werden können. (Sandilands et al. 2007)

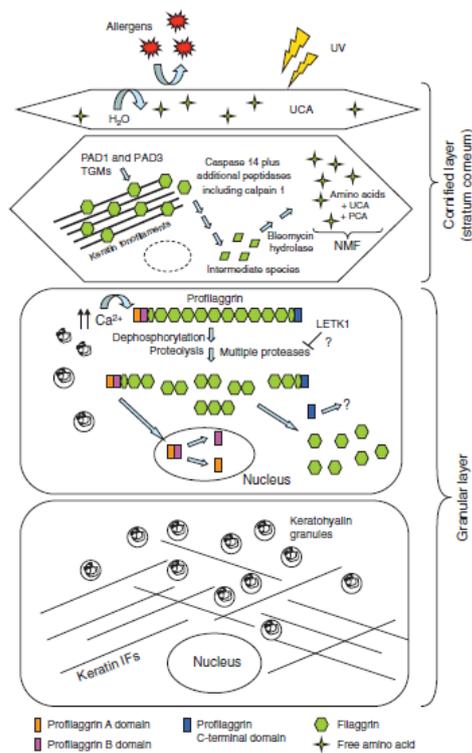


Abbildung 6 Profilaggrin-Prozessierung (Sandilands et al. 2009)

Abbildung 6 von Sandilands et al. zeigt, wie die Prozessierung vom Profilaggrin (grün) im SG über die Zwischenstufe der Filaggrin-Monomere bis hin zur Prozessierung in die natural moisturizing factors (=NMF) wahrscheinlich erfolgt. Im SG sind der vollständige Zellkern (=Nucleus) und die Keratohyalin granula, die das Profilaggrin enthalten, zu sehen. Zudem liegt (noch) ein stabiles Zellskelett vor, das durch die Keratin-Intermediärfilamente (=Keratin IFs) gekennzeichnet ist. Nach Prozessierung des Profilaggrins in einzelne Filaggrin-Einheiten erfolgt zur Bildung des SC die Kompaktierung des Zellskeletts: das Filaggrin wird mit den Keratin-Intermediärfilamenten zu einem Aggregat; daher hat dieses Protein seinen Namen: „filament-aggregating protein“. Der Zellkern ist zwischenzeitlich in der Transit-Zone vom SG zum SC abgebaut worden. Peptidylarginin-Deiminasen schaffen aus Arginin-Resten Citrullin-Reste (sogenannte „Citrullinierung“). Anschließend werden die Filaggrin-Monomere durch die Caspase-14 (direkt oder indirekt) und vermutlich andere bisher unbekannte Enzyme zu Filaggrin-Intermediär-Teilchen und letztlich zu NMF abgebaut. Der Keratinozyt des SG ist nun zum kompaktierten zellkernlosen Korneozyten mit Barriere-Funktion (s.o.) geworden. (Sandilands et al. 2009)

Der Vorgang der Prozessierung vom Profilaggrin zum Filaggrin-Monomer ist noch nicht vollständig erforscht. Bekannt ist, dass das Profilaggrin im SG in seiner inaktiven

und unlöslichen Form in den Keratohyalingranula gespeichert ist. Bei Anstieg des intrazellulären Calciums wird das Profilaggrin aus den Keratohyalingranula freigesetzt. (Sandilands et al. 2009)

Anschließend erfolgen die Dephosphorylierung des Profilaggrins und Proteolysen durch am ehesten mehrere verschiedene Proteasen bis Filaggrin-Monomere hervorgehen; der N-Terminus und C-Terminus liegen ebenso frei vor. Der N-Terminus transloziert anschließend in den Zellkern, wo er sich in die A- und B-Domäne aufteilt (Presland et al. 1997). Der C-Terminus verbleibt wahrscheinlich zytosolisch, wobei, wie bereits erwähnt, unklar ist, in welchem Funktionsmechanismus er bei der Prozessierung des Filaggrins involviert ist.

Die Filaggrin-Monomere werden nun für die nächsten Zellvorgänge im Rahmen der epidermalen Differenzierung zum Aufbau des SC aufbereitet.

3.1.4 Filaggrin und seine Funktion

Das Filaggrin befindet sich nun in der Übergangszone vom SG ins SC. Hier liegt es gebunden an Keratin-Intermediärfilamente vor und sorgt so für eine Kompaktierung der Zelle. Die Zellgröße wird kleiner. In diesem Stadium der Differenzierung findet die Citrullinierung von mehreren Schlüsselproteinen, darunter dem Filaggrin, statt. Dieser Begriff beschreibt, dass die Aminosäure Arginin in die Aminosäure Citrullin umgewandelt wird. (Tarcza et al. 1996)

Der Katalysator für diese Reaktion sind Peptidylarginin-Deiminasen (= PAD), wovon die Isoformen PAD1 und PAD3 beide im SG und SC, analog zum Filaggrin, exprimiert werden und nachweisbar sind. Aus diesem Grund wird vermutet, dass diese beiden Isoformen an der Umwandlung der Arginine des Filaggrins in Citrulline maßgeblich beteiligt sind. (Mechin et al. 2005)

Durch den Vorgang der Citrullinierung ändert sich die Gesamtladung des Proteins Filaggrin vom Positiven zum nahezu Neutralen. Dies hat einerseits zur Folge, dass ionische Wechselwirkungen zwischen dem Filaggrin und dem Keratin gestört werden, andererseits bewirken strukturelle Veränderungen eine Entfaltung des Proteins, sodass es greifbarer für Proteasen wird. (Ishida-Yamamoto et al. 2002)

Folglich ist eine Aufspaltung des Proteins (durch bisher unbekannte Proteasen) bis zu Filaggrin-Monomeren möglich. Es wurde von Denecker et al. beschrieben, dass das „deiminierte Filaggrin-Monomer ein direkter Ligand für die Spaltung durch die Aspartat-spezifische Protease Caspase-14 ist“, was bedeutet, dass eine direkte Spaltung eines so prozessierten Filaggrin-Monomers durch die Caspase-14 möglich ist. Allerdings ist bisher nicht abschließend geklärt, ob die Caspase-14 in vivo direkt Filaggrin-Monomere spaltet, oder andere Endo- oder Exopeptidasen aktiviert, die die Spaltung letztlich vollführen. (Denecker et al. 2008)

Erwähnenswert ist des Weiteren, dass in Caspase-14-Knock-Out Mäusen die Morphologie von Keratohyalin-Granula abnormal ist, die Prozessierung vom Profilaggrin zum Filaggrin-Monomer aber intakt zu sein scheint (Denecker et al. 2007). Dies lässt vermuten, dass die Caspase-14 und/oder eine davon abhängige Reaktionskette Einfluss auf die Prozessierung der Keratohyalingranula nehmen, was möglicherweise das Auftreten der intrazellulären Granula in obersten Epidermis-Schichten bei der granulären Parakeratose erklären könnte. Immunhistochemisch wurde noch eine andere Beobachtung gemacht: In Hautbiopsaten von Wildtyp-Mäusen konnte Filaggrin immunhistochemisch nur in den basalen Anteilen des SC nachgewiesen werden, während in Caspase-14-Knock-Out Mäusen in allen SC-Schichten Filaggrin, wahrscheinlich seine Monomere oder Monomerteile, nachgewiesen werden konnten. (Denecker et al. 2007; Denecker et al. 2008)

Das Endprodukt von Filaggrin-Monomeren stellen hygrokopische freie Aminosäuren und deren Derivate dar, die in erster Linie als NMF fungieren. NMF spielen eine wichtige Rolle im SC; sie bewirken eine Hydratisierung der Haut und halten bei äußerlich niedriger Luftfeuchtigkeit Wasser zurück. Somit sind sie für den zellulären Wasserhaushalt unabdingbar. (Rawlings und Harding 2004)

Zu den Derivaten von hygrokopischen Aminosäuren gehören PCA (pyrrolidone carboxylic acid) und UCA (*trans*-urocanic acid). Letzteres wird aus freiem Histidin durch das Enzym Histidase generiert. (Suchi et al. 1993)

Da Filaggrin reich an Histidin ist, können viele UCA enzymatisiert werden. Durch den Einfluss von UVB-Licht wird aus dem „Photorezeptor“ *trans*-UCA das *cis*-UCA, was eine immunsupprimierende Wirkung aufweist. UCA ist zudem in der Lage UVA-Licht zu absorbieren. Darüber hinaus leisten PCA und UCA einen Beitrag zum leicht sauren pH-Wert der Haut. (Walterscheid et al. 2006)

Ein Mangel an dem Polypeptid Filaggrin könnte also weitreichende Folgen auf die Barrierefunktion der Epidermis haben, wenn oben genannte Funktionen nicht (ausreichend) erfüllt werden. Fallon et al. zeigten in ihrer Veröffentlichung, dass bei Filaggrin-Null-Mutation-Mäusen ein hoher perkutaner Antigen-Transfer stattfinden kann, da die Haut durch ihre gestörte Struktur über das physiologische Maß hinaus permeabel für Antigene aus der Umwelt ist. Dies kann sowohl zu Irritationen als auch zur Entwicklung von Sensibilisierungen und Allergien führen und wohl auch Mikroben und chemischen Substanzen leichter perkutan in den menschlichen Organismus eindringen lassen. (Fallon et al. 2009)

Zudem sind einzelne Hauterkrankungen mit Filaggrin-Störungen vergesellschaftet; die Haut von an atopischen Ekzemen Erkrankten kann einen Filaggrin-Mangel durch eine heterozygote Deletion im Filaggrin-Gen (O'Regan et al. 2009) aufweisen, bei der Ichthyosis vulgaris kann eine homozygote Deletion vorliegen (Brown und McLean, W H Irwin 2012).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Filaggrin an sehr vielfältigen Funktionen in der Haut beteiligt ist: die Hydratation wird geregelt, eine chemische, physikalische und immunologische Hautbarriere erzeugt, Schutz vor UV-Licht bewerkstelligt und letztlich ein entsprechendes pH-Milieu herstellt.

3.1.5 Bedeutung für diese Arbeit

Bei Schnitten von Haut mit histologisch identifizierter granulärer Parakeratose zeigte sich eine Verbreiterung des SC, also eine Hyperkeratose, sowie auch eine „klumpenartige“ Anfärbbarkeit im Zytoplasma (Granula) in der obersten Epidermis-Schicht im Vergleich zur gesunden Normalhaut. Zudem persistierte der Zellkern bis zur Hornschicht („Parakeratose“), wurde also im Rahmen der epidermalen Zelldifferenzierung nicht abgebaut. Dies lässt darauf schließen, dass eine korrekte Prozessierung des Filaggrins, sowie des Zellkerns nicht erfolgt ist.

Derartige Präparate wurden im Vorfeld im Rahmen der dermatopathologischen und immunhistochemischen Diagnostik mit Filaggrin-Antikörpern gefärbt.

Proben mit diesem histologischen Merkmal wurden in die weiteren Antikörper-Färbungen eingeschlossen um sich der möglichen Pathogenese anzunähern.

3.2 Caspase-14

3.2.1 Definition von Caspasen

Caspasen sind definiert als Cystein abhängige, Aspartat-spezifische Proteasen. Das bedeutet, dass sie ein Cystein im aktiven Zentrum enthalten und Proteine spezifisch hinter Aspartat-Resten schneiden. Diese Proteine sind maßgeblich an der Apoptose und entzündlichem Geschehen beteiligt und die Hauptmediatoren der apoptotischen Kaskade. (Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R. 2008, S. 518–519)

3.2.2 Sonderform Caspase-14

Die Caspase-14 ist „herkömmlichen“ Caspasen vom strukturellen Aufbau her ähnlich, unterscheidet sich aber in einigen Merkmalen deutlich von ihnen.

In menschlicher Epidermis kann die Caspase-14 zwischen Isoleucin¹⁵² und Lysin¹⁵³ „geschnitten“ werden, nicht jedoch nach Aspartat-Resten. Zudem ist die Caspase-14, soweit bisher bekannt, nicht Teil einer Caspasen-Kaskade, wie es etwa andere Caspasen, zum Beispiel bei der Apoptose sind. (Chien et al. 2002)

Ein weiterer Unterschied zu den ubiquitär vorkommenden Caspasen ist folgender: Wie Chien et al. berichtet, wird die Caspase-14 in vivo nicht durch eine andere Caspase aktiviert. Es ist allerdings unklar, ob die oben genannte potentielle Schnittstelle zur Aktivierung (durch einen bisher unbekanntem Aktivator) der Caspase-14 benötigt wird, oder die Aktivierung auf einem anderen Wege stattfindet. Möglicherweise aktiviert sich die Caspase-14 selbst, wobei die Untersuchungsergebnisse von Eckhart et al. eine Aktivierung durch externe, an der epidermalen Differenzierung beteiligte Faktoren nahelegen. (Chien et al. 2002; Eckhart et al. 2000)

3.2.3 Caspasen-Aufbau

Alle Caspasen liegen in gesunden Zellen ständig in Form von inaktiven Vorstufen, den Pro-Caspasen vor. Sie bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne, einer großen (p20-) und einer kleinen (p10-) Untereinheit, und werden im Verlauf der Apoptose kaskadenartig durch proteolytische Schnitte aktiviert. Dabei werden die große und die kleine Untereinheit freigesetzt. Diese lagern sich mit einer weiteren großen und kleinen Untereinheit zu einem Heterotetramer, der aktiven Caspase zusammen. (Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R. 2008)

Auch die aktive Caspase-14 entsteht aus einem Heterotetramer zweier p10- und p20-Einheiten. Hierbei ist aber unbekannt, wie die Prozessierung initiiert wird (Eckhart und Tschachler 2011).

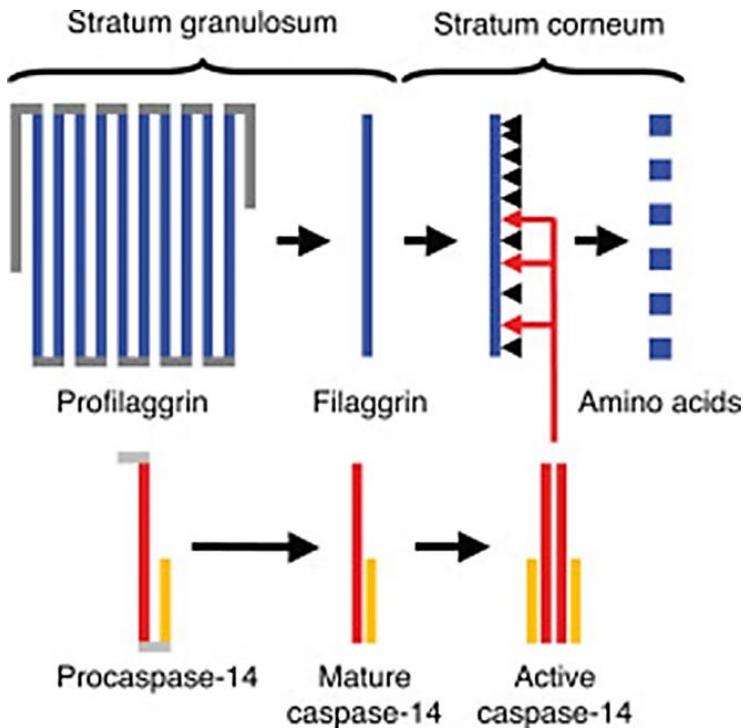


Abbildung 7 Zusammenspiel von Pro-Filaggrin und Procaspase-14 (Eckhart und Tschachler 2011)

Abbildung 7 zeigt das Vorkommen und die Prozessierung des (Pro-) Filaggrins, sowie der (Pro-) Caspase-14 im Verlauf vom SG bis zum SC. Die Procaspase-14 ist aus einer kleinen (gelb) und einer großen (rot) Untereinheit, sowie der oben genannten N-terminalen Prodomäne zusammengesetzt. Durch Prozessierung und Dimerisierung entsteht die aktive Caspase-14, die aus jeweils 2 großen und 2 kleinen Untereinheiten besteht; in dieser Form ist die Caspase-14 funktionsfähig. Dieser Vorgang geschieht laut Eckhart und Tschachler am Übergang vom SG zum SC. Das Bild zeigt auch, welchen Prozess das Filaggrin in diesen Epidermis-Schichten durchmacht: bis zum SG liegt es als Profilaggrin vor. Hier erfolgt die Degradierung in Filaggrin-Monomere und wird mutmaßlich durch Caspase-14, aber auch andere unbekannte Enzyme weiter in Aminosäuren prozessiert, die im SC die Funktion der NMF übernehmen und somit die Feuchtigkeit der Epidermis gewährleisten. (Eckhart und Tschachler 2011)

3.2.4 Expression von Caspase-14

Die Caspase-14 ist nicht ubiquitär vorhanden, sondern kommt fast ausschließlich in verhornenden Epithelien, wie der Haut, den Haarfollikeln und Talgdrüsen vor.

Außerhalb der Epidermis kann man sie zudem in Gehirngewebe und dem Thymus nachweisen. (Eckhart und Tschachler 2011)

Anzumerken sei, dass sie in nicht-verhornenden Keratinozyten der Schweißdrüse oder des Mundepithels nicht vorkommt (Alibardi et al. 2005).

Die Zellkompartimente, in denen Caspase-14 vorkommt sind im SG die Keratohyalin granula, an den Desmosomen, sowie in Assoziation zum Zellkern. Im SC hingegen kommt dieses Enzym zytoplasmatisch, an Corneodesmosomen, als auch an Zellkernfragmenten gebunden vor. (Denecker et al. 2008)

Die von Eckhart et al. durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die Stärke der Caspase-14-Expression abhängig von der Epidermisschicht ist: ab der ersten suprabasalen Epidermisschicht steigt der Gehalt von Caspase-14 bis zum SG an, wo es physiologisch am stärksten exprimiert wird. Im SC wird ebenfalls ein positiver Nachweis beobachtet, der quantitativ schwächer als im SG ist. (Eckhart et al. 2000)

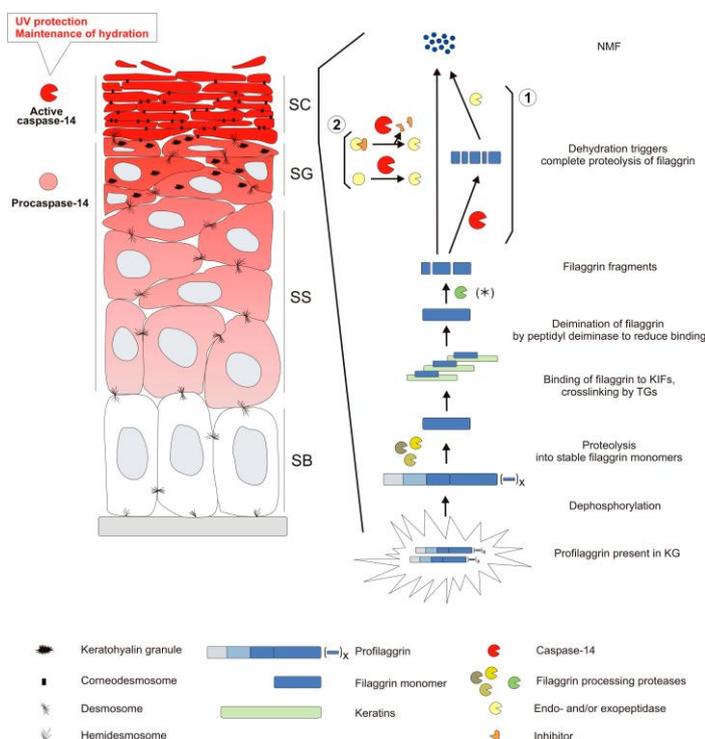


Abbildung 8 Caspase-14 Expression (Denecker et al. 2008)

Die Abbildung 8 aus Denecker et al. 2008 zeigt in der linken Bildhälfte die Expression der Caspase-14 in der Epidermis: im Stratum basale (SB) keine, ab dem SS zunehmende Expression der Pro-Caspase-14 bis nach apikal als aktive Caspase-14. (Die Rotnuancen stehen dafür, wie stark die Expression der Caspase-14 in der entsprechenden Schicht ist. Anmerkung: die Abbildung erweckt den Eindruck, dass im SC quantitativ am meisten Caspase-14 vorliegt; Eckhart et al. konnten zeigen, dass das höchste Vorkommen im SG vorliegt und ein Abfall zum SC erfolgt. Rechts im Bild (zeitlich ab dem Übergang vom SG zum SC) sieht man den Abbau von Profilaggrin über Filaggrin in seine kleinsten Bestandteile, die NMF. Das Profilaggrin ist zu Beginn in Keratohyalin granula kompakt organisiert dargestellt. Anschließend erfolgt eine Dephosphorylierung, sodass Proteasen wirken können und das Profilaggrin in Filaggrin-Monomere spalten. Diese binden durch Transglutaminasen (TG) an Keratinintermediärfilamente (KIF). Anschließend erfolgt die Deimination (siehe oben) der Filaggrin-Monomere, wahrscheinlich um Bindungen zu lösen. Daraufhin können Proteasen die Filaggrin-Monomere in Fragmente spalten. (Denecker et al. 2008)

Was die folgenden Schritte angeht, bietet Denecker et al. mehrere Möglichkeiten an; es könnte sein, dass

(1) die Caspase-14 die Filaggrin-Fragmente spaltet und dafür aufbereitet, dass andere Proteasen die weiteren Spaltungsschritte in Aminosäuren/NMF fortführen.

Möglicherweise jedoch

(2), aktiviert Caspase-14 direkt oder indirekt (durch Inaktivierung eines Inhibitors) Proteasen, die die weiteren Schritte vollführen.

Es wurde angenommen, dass Caspase-14 maßgeblich am Zellkern-Abbau während des Verhornungsprozesses beteiligt sei, allerdings ist dies bisher unklar. Laut Denecker et al. zeigte sich bei Caspase-14-Knock-Out Mäusen keine Störung des Zellkern-Abbaus, wohingegen laut Hoste et al. Caspase-14-Knock-Out Mäuse anfälliger für die Ausbildung von Parakeratosen waren, was dafür sprechen könnte, dass Caspase-14 einen Einfluss auf den Zellkern-Abbau habe.

3.2.5 Funktion von Caspase-14

Die Funktion der Caspase-14 ist noch nicht hinreichend geklärt. In der Literatur gibt es Hinweise, dass diese Protease an der Prozessierung von Filaggrin maßgeblich beteiligt ist, sowie am Abbau des Zellkerns und der DNA.

Denecker et al. untersuchten in Caspase-14-Knock-Out-, sowie Wildtyp-Mäusen Unterschiede in der Epidermis hinsichtlich der Filaggrin-Degradierung. Es konnte festgestellt werden, dass die Caspase-14 Filaggrin-Fragmente direkt spalten konnte, möglicherweise vorbereitend für die vollständige Aufarbeitung durch andere bisher unbekannte Proteasen, sowie, dass in Abwesenheit von Caspase-14 eine Akkumulation von Filaggrin-Fragmenten im SC vorlag.

Das Profilaggrin wird somit physiologisch durch andere proteolytische Enzyme zu einem gewissen Grad prozessiert, aber erreicht bei Mangel von Caspase-14 nicht den vollständigen Abbau in NMF und die NMF-Komponenten. Daher zeigten die Caspase-14-Knock-Out Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen des Wildtyps einen nahezu drei Mal niedrigeren Gehalt an NMF und ein deutlich gemindertes Vorkommen von UCA und PCA im SC. (Hoste et al. 2011)

Erwähnenswert ist, dass abgesehen von der Degradierung des Filaggrins zur Herstellung von hygroscopischen Aminosäuren und NMF im SC, auch andere bisher nicht bekannte Prozesse zu einem quantitativ niedrigeren Auftreten von NMF führen können (Kezic et al. 2012).

Diese Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Caspase-14 in einem gewissen Stadium der Filaggrin-Degradierung maßgeblich beteiligt ist und ein Mangel zu negativen Folgen für die Barriere-Funktion und den Feuchtigkeitsgehalt des SC führt, nachdem durch bisher unbekannte alternative Wege nur unzureichende Mengen an NMF hergestellt werden können.

Hoste et al. untersuchten ebenfalls in Caspase-14-Knock-Out-Mäusen das SC unter repetitiver topischer Anwendung von Aceton, das als chemischer Störfaktor der epidermalen Barriere diente, sowie nach mechanischer Verletzung der Epidermis durch Abreißen eines zuvor angebrachten Klebestreifens. Es zeigte sich im Aceton-Versuch, dass diese Mäuse im Vergleich zum Wildtyp einen signifikanten Anstieg parakeratotischer Haut zeigten. Im zweiten Versuch konnte festgestellt werden, dass die

Haut der Caspase-14-Knock-Out-Mäuse eine hochgradig gestörte Korneozyten-Differenzierung aufwies. (Hoste et al. 2013)

Parakeratose ist definiert als unvollständige Verhornung der Haut mit Persistenz von Zellkernen und Desoxyribonukleinsäure (DNA) im SC (Altmeyer). Es lässt nach oben genannten Versuchen an Caspase-14-Knock-Out-Mäusen vermuten, dass die Caspase-14 möglicherweise am Abbau des Zellkerns und der DNA beteiligt sein könnte.

Anzumerken ist, dass diese Beobachtung streng genommen nur für entzündete Haut gilt, da sowohl das Aceton, als auch die mechanische Irritation für eine

Inflamationsreaktion sorgen. Allerdings ist die menschliche Haut durchgehend äußeren Einflüssen ausgesetzt, sodass die vermutete Funktion der Caspase-14 in nicht-strapazierter Haut womöglich dieselbe ist, jedoch in geringerem Ausmaß ausgeprägt sein könnte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Caspase-14 wahrscheinlich eine wichtige Rolle im Zyklus der Korneozyten-Differenzierung spielt hinsichtlich der Ausbildung eines physiologischen SC mit regelrechtem Zellkernabbau und Kompaktierung der Zellen, sowie im Zusammenspiel mit Filaggrin notwendig für die Herstellung eines hydratisierten Milieus ist und bei der Herstellung von NMF mitwirkt.

3.3 Voltage-gated calcium channel

3.3.1 Definition

Der Voltage-gated calcium channel (VGCC) ist - ins Deutsche übersetzt – ein spannungs-abhängiger Calcium-Kanal. Diese Art von Kanälen reagiert auf Änderungen im Membran-Potential einer Zelle und kann so durch Öffnung oder Schließen den intrazellulären Calcium-Gehalt steuern. Die Menge von Calcium-Ionen in einer Zelle reguliert wiederum weitere physiologische intrazelluläre Prozesse, sodass der VGCC eine wichtige Rolle für eine korrekte Funktion nachgeschalteter Vorgänge spielen könnte. (Denda et al. 2006)

Spannungs-abhängige Calcium-Kanäle lassen sich in Abhängigkeit ihrer Art in unterschiedlichen Zellarten finden; darunter in Nervenzellen, (Herz-)Muskelzellen, sowie Keratinozyten, wo sie unterschiedliche Funktionen erfüllen (Catterall 2011). In Nervenzellen bewirken sie eine synaptische Reizweiterleitung, in Muskelzellen die

Kontraktion (Catterall 2011) und in Keratinozyten sind sie wahrscheinlich nicht unerheblich an der Homöostase der Hautbarriere beteiligt (Denda et al. 2006).

Jede VGCC-exprimierende Zellart besitzt eine bestimmte Unterform des Kanals, die durch die sogenannten „subunits“, also Untereinheiten, bestimmt wird, sodass der VGCC einer Muskelzelle nicht der eines Keratinozyten gleicht (Striessnig 2016). Somit können ein Fehlen, eine Mutation oder Fehlfunktion dieses Kanals weitreichende Folgen für die entsprechenden Zellfunktionen haben und je nach Subtyp organspezifische Krankheiten entstehen.

3.3.2 Aufbau

Ein spannungs-abhängiger Calcium-Kanal besteht aus 5 Bau-Elementen. Die $\alpha 1$ -Untereinheit bildet den eigentlichen Kanal, der den Extra- mit dem Intrazellulär-Raum verbindet. Mittels einer Disulfid-Brücke ist daran ein Glykoprotein, bestehend aus dem Dimer der $\alpha 2$ -Untereinheit und δ -Untereinheit gebunden. Ebenfalls mit der zentralen $\alpha 1$ -Untereinheit verbunden sind die intrazelluläre β -Untereinheit, sowie die transmembranöse γ -Untereinheit. Zusammen bilden sie den VGCC (siehe Abbildung 9). (Takahashi et al. 1987; Catterall 2011)

Abhängig von der $\alpha 1$ -Untereinheit, lassen sich verschiedene Typen dieses Kanals unterscheiden: L-Typ-, N-Typ-, P/Q-Typ-, R- und T-Typ-VGCC (Catterall 2011).

Dies führt zu Unterschieden in der Kanal-Funktion; zum Beispiel werden Kanäle vom L-Typ durch eine Membrandepolarisation aktiviert. Namensgebend war folgende Beobachtung: bis es zur Inaktivierung kommt, bedarf es im Vergleich zu anderen Kanälen mehr Zeit, weswegen man ihn „long-lasting“, somit als L-Typ-Kanal bezeichnet. (Tsien et al. 1988)

Physiologische Funktionen von L-Typ-Kanälen sind u.a. die Kontraktion von Skelettmuskeln, endokrine Sekretion, Regulation der Transkription, visuelle, sowie akustische Reizweiterleitung. Die genaue Funktion dieses Kanals in der Epidermis ist bisher nicht weitreichend erforscht. (Catterall 2011)

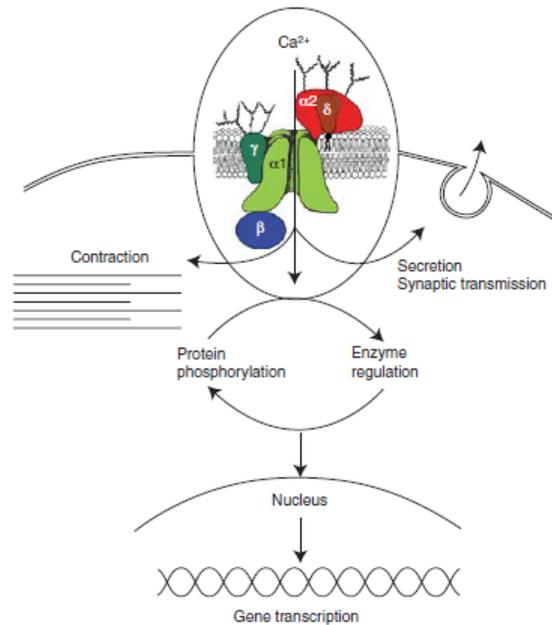


Abbildung 9 VGCC schematisch dargestellt (Takahashi et al. 1987)

Der in Abbildung 9 dargestellte Teil einer Zelle zeigt einen sich in der Zellwand befindenden VGCC. Man erkennt die 5 Teile des Calcium-Kanals, farblich hervorgehoben (hellgrün= $\alpha 1$ -Untereinheit, rot= $\alpha 2$ -Untereinheit, braun= δ -Untereinheit, blau= β -Untereinheit, dunkelgrün= γ -Untereinheit). Durch Öffnung des Kanals kommt es zu einem Calcium-Influx. Der erhöhte intrazelluläre Calcium-Gehalt kann – je nach Zellart – verschiedene Effekte haben; es kann eine Kontraktion provoziert werden, Enzymmodifikationen vorgenommen werden, die unter Umständen auch auf die Transkription Einfluss nehmen können, oder eine Sekretion (zum Beispiel von Hormonen) in die Wege geleitet werden. (Catterall 2011)

Anzumerken sei, dass die mögliche Funktion in der Epidermis hier nicht dargestellt wurde.

3.3.3 Expression

In der Literatur wurde die Existenz des VGCC in epidermalen Keratinozyten nachgewiesen (Denda et al. 2006; Ovaere et al. 2009). Denda et al. untersuchten hierzu an menschlicher Haut immunhistochemisch das $\alpha 1\text{C}$ -Subunit, den Teil des VGCC, der die Kanalfunktion enthält und berichten von einer Expression vom SB bis zum SC, mit einem Peak im SG.

3.3.4 Funktion

Calcium gilt zellphysiologisch als zentraler Signal-Transmitter in allen Zellen des Körpers. In Neuronen, aber auch in nicht erregbaren Zellen herrscht stets ein Calcium-Fluss zwischen den intra- und extrazellulären Kompartimenten. Es hat Einfluss auf intra-, sowie extrazelluläre Strukturen, die durch Bindung des Calciums reguliert werden; zu diesen Calcium-abhängigen Zell-Organellen zählen unter anderem Kanäle, Ionen-Pumpen, Rezeptoren und Bindeproteine. (Mascia et al. 2012)

Die intakte Haut weist einen Gradienten auf, was den Calcium-Gehalt in den einzelnen Schichten der Epidermis angeht. Der Calcium-Gehalt in der basalen und den spinozellulären Schichten ist niedrig, steigt im Stratum granulosum an und erreicht seinen höchsten Wert in den äußersten Schichten des Stratum granulosum. Im Stratum corneum fällt der Gehalt an Calcium steil ab. (Menon et al. 1985)

Er spielt wahrscheinlich eine maßgebliche Rolle für die Homöostase der Permeabilitäts-Barriere der Haut, sowie die epidermale Differenzierung.

In Studien (Elias et al. 2002a) konnte nachgewiesen werden, dass bei exogen hinzugefügten Schädigungen der Hautbarriere oben genannter Calcium-Gradient nicht aufrechterhalten wird. In Abhängigkeit von der Art der Hautbarriere-Störung (zum Beispiel Störung der Lipidsynthese durch topisches Lovastatin) wird der Calcium-Gradient zeitlich parallel zur Wiederherstellung der Hautbarriere wiederaufgebaut. Dies legt nahe, dass eine gesunde Hautbarriere physiologisch mit oben genannten bestimmten Calcium-Gradienten einhergeht. Zudem zeigen die Ergebnisse von Versuchen, die eine Hautbarriere-Störung provozieren auch, dass bestimmte äußere Einflüsse einen raschen Wiederaufbau des regelrechten Calcium-Gradienten veranlassen können; beispielsweise, wenn die gestörte Hautbarriere mit einem Wasserdampf-durchlässigen Stoff wie Gore-Tex bedeckt wurde. Wohingegen eine Okklusion mit einem Wasserdampf-undurchlässigen Stoff wie Latex eine verzögerte Wiederherstellung des Calcium-Gradienten ergab. (Elias et al. 2002b)

Denda et al. machten zudem eine weitere interessante Beobachtung indem nach einer vorausgegangenen induzierten Störung der Hautbarriere mittels Aufklebens und Abreißen eines Tesafilms, häufig als „Tape-Stripping“ benannt, ein Calcium-Kanalblocker wie Verapamil appliziert wurde; der Antagonist am Kanal erreichte, dass es zu einem schnelleren Wiederaufbau der Hautbarriere kam. Ebenso wurde ein VGCC-

„Opener“, also ein Agonist am Kanal, angewandt und zeigte eine verzögerte Reparatur der Hautbarriere. (Denda et al. 2006)

Dies beweist nicht nur die Existenz des VGCC, sondern offenbart vielmehr auch seinen Stellenwert innerhalb der Epidermis.

Als weitere Eigenschaft des VGCC wird von Denda et al. zudem die Reaktion auf elektrische Ladungen diskutiert. Lee et al. applizierten topisch eine Lösung mit Kaliumchlorid auf eine vorher geschädigte Hautbarriere. Es resultierte ein verzögerter Wiederaufbau dieser. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein Anstieg von extrazellulärem Kalium durch Depolarisation den VGCC öffnet. Übertragen auf das oben genannte Experiment könnte dies bedeuten, dass durch eine mechanische Reizung mittels Tape-Stripping eine Zellschädigung mit Extravasation von Kalium entsteht, die eine Depolarisation (und damit Öffnung des VGCC) verursacht. Anzumerken sei hier, dass Kalium ebenfalls einen Gradienten in der Epidermis hat; die Konzentration von Kalium ist im SG niedriger als in anderen Epidermisschichten. Nach dem Tape-Stripping wurde der Kaliumgradient aus dem Gleichgewicht gebracht, sodass relativ gesehen, nun mehr Kalium im SG nachweisbar war. (Lee et al. 1992)

In diesem komplexen Zusammenspiel scheinen Elektrolyte Vorgänge auszulösen, die eminent wichtig für einen geregelten Wiederaufbau der epidermalen Zellphysiologie sein könnten (Elias et al. 2002a).

Eine angeborene Mutation des VGCC in der Haut ist im Übrigen bisher nicht bekannt. Eine „erworbene“ Dysfunktion kann jedoch diskutiert werden, nachdem die Verteilung von Calcium mit dem Alter abweicht und nicht mehr der Norm entspricht (Forslind et al. 1999).

Ovaere et al. stellten ein hypothetisches Modell (siehe Abbildung 10) vor, das eine Signalkaskade zeigt, die zur Bildung der epidermalen Barrierefunktion führen kann. In diesem Prozess hat der VGCC eine sehr wichtige Aufgabe: er initiiert die Profilaggrin-Prozessierung und damit notwendige Schritte zur Herstellung einer adäquaten Hautbarriere.

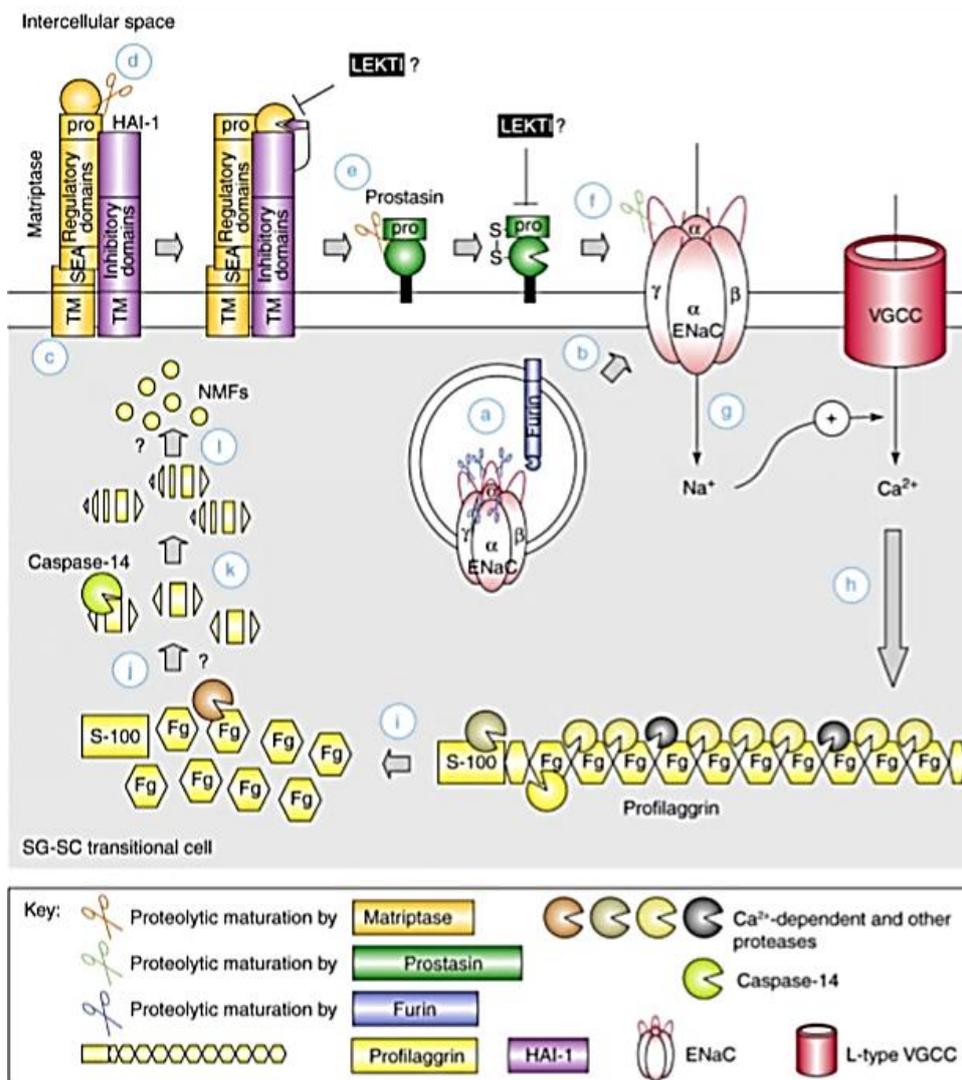


Abbildung 10 ENaC-VGCC-Signalkaskade (Ovaere et al. 2009)

Im Detail könnte die Signalkaskade (Abbildung 10) in folgender Weise ablaufen: (a) beim Transport zum trans-Golgi-Netzwerk aktiviert sich Furin (ein spaltendes Enzym) selbst und führt voraktivierende Veränderungen am epithelialen Natrium-Kanal (ENaC) durch. (b) Der ENaC gelangt in die Zellmembran. (c) Zwischenzeitlich hat HAI-1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor; ein sehr effektiver Inhibitor der vorzeitigen Matriptase-Aktivierung) an Matriptase gebunden. Sobald Matriptase in der zytoplasmatischen Membran verankert ist, kann sie ungeachtet der vorherigen Inhibition (d) sich selbst und (e) Proastasin (ein Enzym) aktivieren. (f) Das aktivierte Proastasin spaltet extrazelluläre Proteine („loops“) der γ -Untereinheit von ENaC und aktiviert den Natrium-Kanal damit. (g) Ein Natrium-Influx folgt, der eine Depolarisation der Membran verursacht und damit den VGCC aktiviert, sodass sich der Calcium-Einstrom nach intrazellulär erhöht. (h) Die erhöhte Calcium-Konzentration aktiviert wiederum Calcium-abhängige Proteasen (i), die Profilaggrin in Filaggrin-Monomere spalten. (j)

Im SC werden die Filaggrin-Monomere weiter von bisher unbekannt Proteasen (k) zu Filaggrin-Monomer-Teilchen gespalten, die von der Caspase-14 weiterbearbeitet werden. (l) Letztlich kommt es zur Herstellung hygroscopischer Aminosäuren, freier Aminosäuren und NMF. (Ovaere et al. 2009)

In diesem hypothetischen Modell kommt dem VGCC eine Schlüsselfunktion zu. Der dadurch entstehende Calcium-Influx ist notwendig um Calcium-abhängige Proteasen zu aktivieren, die das Profilaggrin spalten können und im Folgendem anderen Enzymen zugänglich machen zu können. Es ist bisher nicht geklärt, ob dieses Modell wirklich vorliegt und ob es alternative Möglichkeiten der Zelle gibt, den Calcium-Gehalt intrazellulär zu erhöhen um diesen Prozess zu initiieren.

Der Stellenwert dieses Kanals ist zwar bisher nicht geklärt. Ein Mangel an intrazellulärem Calcium könnte diese Signalkaskade jedoch behindern: das Profilaggrin könnte nicht weiter prozessiert werden, sodass ein Großteil der epidermalen Differenzierung zum Stocken käme: (Pro-) Filaggrin könnte also in seiner ursprünglichen Form bis zum SC nachweisbar sein, NMF und andere hydratisierende Aminosäuren in der obersten Epidermis würden fehlen und falls die Annahme stimmt, dass ein Bestandteil des Profilaggrins eine Kernlokalisierungssequenz hat und damit am Zellkernabbau beteiligt ist, könnte dies zu einem Verbleib des Nukleus, also histologisch zu einer Parakeratose führen. Letztlich könnten Störungen dieses hypothetischen Modells zu einem Bild der granulären Parakeratose führen.

3.4 Desmocollin-1

3.4.1 Definition

Das Desmocollin-1 (DSC1) ist ein Calcium-abhängiges Glykoprotein und gehört zu der Untergruppe der Desmocolline, zu denen auch die Desmocolline 2 (DSC2) und 3 (DSC3) gehören. Desmocolline werden aufgrund ihrer Eigenschaften zu den sogenannten (desmosomalen) Cadherinen gezählt. (DSC1 desmocollin 1 [Homo sapiens (human)] 2024)

Unter Cadherinen versteht man transmembrane Glykoproteine, die von Calcium-Ionen abhängig sind („Calcium adhering“). Diese Glykoproteine sind Adhäsionsproteine, da sie, wie der Name schon andeutet, eine Adhärenz zwischen zwei Zellen bewirken. In der Haut kommen solche Adhäsionsproteine in den Desmosomen vor, die Zell-Zell-

Verbindungen herstellen um in der Epidermis eine mechanische Stabilität zu gewährleisten. (DSC1 desmocollin 1 [Homo sapiens (human)] 2024; Chidgey et al. 2001; Brandner et al. 2010)

3.4.2 Expression

Die Expression von DSC1 kann in allen zellkernhaltigen Zellen des verhornten Epithels der Epidermis ab der 1. Schicht der suprabasalen Zellen nachgewiesen werden. Jedoch scheint es, dass an Stellen mit tieferen Reteleisten in den ersten 5-10 Zellschichten kein DSC1 vorkommt. (North et al. 1996)

Interessanterweise konnten Donetti et al. zeigen, dass es sowohl auf morphologischer, als auch molekularer Ebene in nicht-verhornender Mundschleimhaut zu keiner Expression von DSC1 kommt. Daraus resultiert eine unterschiedliche Zusammensetzung der Desmosomen beim Menschen: die Desmosomen der Epidermis des Körpers gleichen nicht denen der Mundschleimhaut. Diese Gegebenheit könnte durch die unterschiedlichen Anforderungen an die Umwelteinflüsse erklärt werden: während sich die Epidermis in einem trockenen Umfeld mit wechselnder Feuchtigkeit und schwankenden Temperaturen befindet, wird die Mundschleimhaut durchgehend maximaler Feuchtigkeit, einer konstanten Temperatur und regelmäßig Scherbelastungen ausgesetzt. Im Hinblick auf die hohe mechanische Belastung enoral ist ein rascher epidermaler Differenzierungszyklus zur Erneuerung des Epithels unabdingbar. Da das DSC1 ein starker Bestandteil für die Zell-Zell-Adhäsion ist, könnte das Fehlen in der verhornten Mukosa so verstanden werden, dass durch die schwächeren interzellulären Bindungen ein rascherer Turn-Over stattfinden kann. (Donetti et al. 2005)

Obwohl epidermale Desmosomen bis ins SC gesehen werden können, sinkt die Immunreaktivität des DSC1 rasch und abrupt, sobald die epidermale Differenzierung in Korneozyten erfolgt ist. In gesundem SC können nur noch Fragmente des DSC1 sichtbar gemacht werden. (North et al. 1996; Arnemann et al. 1993)

3.4.3 Funktion

In der Epidermis kommen an Zell-Zell-Verbindungen mehrere Adhäsions-Proteine vor, sodass sich die Funktion eines einzelnen dieser Proteine nicht ohne Weiteres ableiten lässt. Zu diesem Zweck wird zum Beispiel bei Mäusen ein sogenanntes „Knock-Out“

des kodierenden Gens hervorgerufen um die Folgen des Mangels an diesem Protein zu beobachten. Chidgey et al. präsentieren in ihrem Artikel die Folgen einer DSC1-Defizienz bei Mäusen und versuchen anhand dessen die möglichen Funktionen dieses Proteins abzuleiten. Histologisch zeigte sich bei diesen Mäusen neonatal eine verdickte Epidermis im Vergleich zu gesunden Geschwistern. In der „normalen“ Epidermis der gesunden Vergleichstiere sah man 2 bis 3 Zelllagen unter der verhornten Zellschicht, bei den DSC1-Nullmutierten bis zu 3 zusätzliche Lagen und dies an der Haut des gesamten Körpers. Am 2. Lebenstag betraf die Verdickung der Epidermis hauptsächlich das SS, man konnte jedoch auch lokalisiert Hyperkeratosen und Parakeratosen sehen. Um die Verdickung der Epidermis besser einordnen zu können, wurde eine immunhistochemische Färbung mit Ki67, einem Proliferationsmarker, durchgeführt. In den gesunden Mäusen wurden lediglich wenige proliferierende Zellen im SB gefunden, während bei den DSC1-Nullmutierten eine erhöhte Mitoserate, vor allem in suprabasalen Schichten auftrat. Frühe epidermale Differenzierungsmarker, wie Involucrin, und der späte Differenzierungsmarker Filaggrin zeigten sich bei beiden Mäuse-Gruppen normal. Die Keratine 6 und 16, Hyperproliferationsmarker, die bei der Wundheilung eine maßgebliche Rolle spielen, zeigten sich jedoch stark hochreguliert und konnten in der gesamten Epidermis der DSC1-Nullmutierten nachgewiesen werden. (Chidgey et al. 2001)

Eine weitere histologische Auffälligkeit bei den DSC1-defizienten Mäusen waren „Risse“ in der Epidermis, genauer beschrieben als Akantholysen. Diese Defekte wurden innerhalb des SG, zwischen SG und SS, und zwischen SG und SC gesehen. Bei der Probenentnahme der 2 Tage alten Mäuse zeigte sich diese Fragilität der Epidermis auch klinisch. Diese Umstände untersuchten Chidgey et al. weitgehender; in den Desmosomen – vor allem im SS und SG, wo die Expression des DSC1 am höchsten ist - wurden keine strukturellen Abweichungen von den Desmosomen in gesunder Haut gesehen, auch die Anzahl war normwertig. Die oben genannten. Akantholysen ließen sich elektronenmikroskopisch nicht durch Zelllyse oder Desmosomenmangel erklären. Vermutet wird daher eine funktionell geschwächte Zell-Zell-Adhäsion. (Chidgey et al. 2001)

Des Weiteren wurde getestet, inwiefern ein DSC1-Mangel eine Auswirkung auf die Hautbarriere haben könnte. Es zeigte sich, dass die Permeabilität für Wasser 1,6 Mal erhöht war und die für Mannitol doppelt so hoch war, als bei den Mäusen mit gesunder Haut. Auch der transepidermale Wasserverlust (TEWL: transepidermal water loss)

wurde hierbei gemessen und war bei den DSC1-defizienten Mäusen ungefähr 1,2 so hoch wie bei den Wildtyp-Mäusen. (Chidgey et al. 2001)

Zusammenfassend lässt sich aus den Untersuchungen von Chidgey et al. schließen, dass aus einem DSC1-Mangel eine geschwächte interzelluläre Adhärenz, eine damit verbundene Akantholyse, sowie epidermale Fragilität resultieren, zudem eine epidermale Hyperproliferation mit Verdickung der Haut mit lokalisierten Hyper- und Parakeratosen als Ausdruck einer gestörten Differenzierung zu beobachten sind.

3.5 Corneodesmosin

3.5.1 Definition

Das humane Corneodesmosin (CDSN) ist ein basisches Glykoprotein, das in verhornenden Epithelien und der inneren Haarwurzelscheide vorkommt. Es hat eine Größe von 52 bis 56 kDa und enthält hohe Anteile Serin und Glycin. (Steinert et al. 1991; Serre et al. 1991)

3.5.2 Aufbau

Die Hypothese von Steinert et al. über die Besonderheit des strukturellen Aufbaus dieses Proteins besagt, dass der Reichtum an Glycin sogenannte „Glycin-Schleifen“ entstehen lassen könnte. Diese Formationen könnten dazu dienen, adhäsive Eigenschaften darzustellen oder zu verstärken. Bemerkenswerterweise sind auch Filaggrin, Loricin, sowie beide Enden von Intermediärfilamenten von einer ähnlichen Primärstruktur, besitzen also ebenfalls viel Serin und Glycin zur Formung solcher „Glycin-Schleifen“, die untereinander verzahnt wie ein Klettverschluss fungieren könnten. (Steinert et al. 1991)

In Untersuchungen wurden in Intermediärfilament-Genen Mutationen der Glycin-Schleifen generiert und es konnte gezeigt werden, dass dies zu Hauterkrankungen führte (Terrinoni et al. 2000; Sprecher et al. 2001).

3.5.3 Expression

In der Epidermis lässt sich CDSN in höheren Lagen des SS und im SG intrazellulär in Sekretionsvesikeln, den lamellar bodies (LB), nachweisen. Untersuchungen von Allen

et al. zeigten, dass das Maximum an CDSN-Epitopen in gesunder Haut in 2 Zellschichten des oberen SG nachweisbar ist. Im Verlauf des Weiteren epidermalen Differenzierungsprozesses findet man das CDSN am Übergang vom SG zum SC interzellulär, wo es die Desmosomen zu Corneodesmosomen modifiziert. (Allen et al. 2001)

Ab dem unteren SC lässt es sich zunehmend nicht mehr nachweisen. Die Größe des CDSN beträgt anfangs im SG 52 bis 56 kDa, im SC scheint bereits ein Abbauprozess stattgefunden zu haben, sodass dort kleinere Moleküle einer Größe von 30 bis 45 kDa gemessen werden können. (Simon et al. 1997)

In der Epidermis ist das CDSN kovalent in der cornified envelope, also der verhornten Schutzmembran der Epidermis gebunden (Serre et al. 1991; Simon et al. 1997).

3.5.4 Funktion

Das CDSN entfaltet nach Sekretion aus den LB am Übergang vom SG zum SC seine Wirkung. Es lagert sich an das Desmoglea (in den Interzellulärspalt ragende DSC1 und Desmoglein-1-Teile) der Desmosomen an und sorgt für mehr Stabilität. Diese Art von Zellverbindung im SC wird nun Corneodesmosom genannt. Die Abbildung 11 zeigt Zell-Zellverbindungen im SG (mintgrün) und SC (grau). Im SG bestehen diese aus Desmoglein-1 (DSG1) (grün) und DSC1 (blau), im SC werden sie durch Anlagerung von CDSN (pink) zur Corneodesmosomen. Parallel zu diesem Prozess entwickelt sich die Zellwand des Keratinozyten zur Cornified Envelope des Korneozyten. (Ishida-Yamamoto und Igawa 2015)

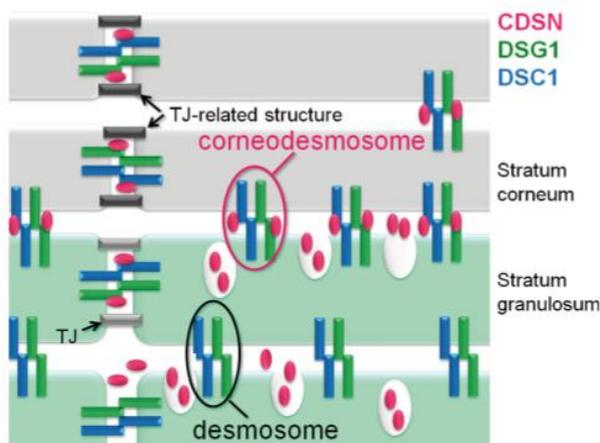


Abbildung 11 Desmosomen und Corneodesmosomen (Ishida-Yamamoto und Igawa 2015)

Der funktionale Stellenwert des CDSN lässt sich am besten anhand von Erkrankungen zeigen, die keine physiologische CDSN-Expression zeigen. Das Peeling-Skin Syndrom, eine seltene Form der Ichthyose, zeigt loss-of-function-Mutationen im CDSN beziehungsweise Null-Mutationen, also ein komplettes Fehlen des Proteins. Bei dieser Erkrankung schält sich das SC durch das Fehlen des CDSN in den Desmoglea der Corneodesmosomen ab. (Oji et al. 2010)

Histologisch ist eine Akanthose, also eine Verdickung des SS, eine Hyperkeratose und Parakeratose sichtbar (Ishida-Yamamoto und Igawa 2015).

Auch der verfrühte Abbau des CDSN durch Kallikreine, wie dies beim Netherton-Syndrom durch eine Mutation im SPINK5-Gen (Serin-Protease-Inhibitor) erfolgt, führt zu gravierenden Folgen bezüglich der Intaktheit der Epidermis; durch den Mangel an Serin-Protease-Inhibitoren, die eine verfrühte Aktivierung von Kallikreinen vermeiden sollen, werden diese überaktiviert, was zu einer erhöhten Proteolyse von corneodesmosomalen Proteinen und damit zur Desquamation führt. (Ishida-Yamamoto et al. 2005)

Beide Erkrankungen ziehen eine erhebliche Hautbarrierestörung nach sich, welche das Eindringen von Mikroben und Allergenen fördert. Dies führt zu häufigen infektiösen Dermatosen und dem Erwerb von multiplen Allergien. (Ishida-Yamamoto et al. 2018) Zudem ist der Wasserverlust über die Haut erhöht und eine Dehydratation schneller erreicht, wie Furio et al. im Maus-Modell bei LEKTI-Mangel nachweisen konnten.

Kurzgefasst handelt es sich beim CDSN um ein wichtiges Adhäsionsprotein, dessen Hauptaufgabe darin besteht, die Corneodesmosomen im Bereich des beginnenden SC strukturell zu verstärken und im Zusammenspiel mit Kallikreinen und deren Serin-Proteasen-Inhibitoren ein adäquates Gleichgewicht zwischen Stabilität des SC und Desquamation zu gewährleisten.

4. Thesen über die mögliche Pathogenese der granulären Parakeratose

Aus den dargestellten funktionalen und anatomischen Zusammenhängen werden folgende Thesen zur Pathogenese der granulären Parakeratose abgeleitet.

4.1 Vorliegen eines Mangels oder einer Funktionsstörung der Caspase-14

Die Caspase-14 ist eine Epidermis-spezifische Serin-Protease, die in der Haut nur in sich differenzierenden Schichten vorkommt und dort mutmaßlich am Zellkernabbau, sowie in der Prozessierung von Filaggrin-Monomeren zu Vorstufen der NMF beteiligt ist. Die Expression erfolgt wie im Kapitel 4.2.4 beschrieben ab dem SS, wo am ehesten als Procaspase-14, noch keine Aktivität vorliegt. In der Zone zwischen dem SG, wo die Caspase-14 an Keratohyalingranula gebunden ist, und dem SC, in dem man sie zytoplasmatisch nachweisen kann, findet ein entscheidender Prozess statt: es erfolgt die Spaltung in p10- und p20-Untereinheiten, die nach Dimerisierung zu einer aktiven Form der Caspase-14 führt. Es ist bisher nicht bekannt, was diesen Vorgang auslöst. Möglicherweise geschieht dies durch die Änderung der Dehydrierung im Verlauf vom SS zum SC. (Denecker et al. 2008)

Hieraus ergibt sich die Überlegung, dass bei der granulären Parakeratose die Persistenz des Zellkerns und der (Keratohyalin-)Granula auf einem Mangel oder Defekt der Caspase-14 beruhen könnte. Im Falle eines Fehlens, also wenn die Caspase-14 nicht exprimiert werden würde, wäre ein Abbau der Filaggrin-Monomer-Fragmente in Vorstufen zu NMF nicht (in physiologischer Menge) möglich und es käme aufgrund der mangelnden Hydratisierung durch NMF und weitere freie Aminosäuren zu einer Störung der epidermalen Hautbarriere, wie man dies von Ekzem-Erkrankungen kennt. Selbiges Szenario könnte jedoch auch aus einer ausbleibenden Freisetzung aus Keratohyalingranula (und weiteren Speicherorten, siehe Kapitel 3.2) oder einer fehlenden Aktivierung der Caspase-14 resultieren. Somit würde zwar das Enzym vorhanden und nachweisbar sein, die enzymatische Wirkung aber ausbleiben, was funktionell idente Folgen hätte. Überdies hat die umgebende äußere Feuchtigkeit wohl einen maßgeblichen Einfluss auf die Prozessierung von Filaggrin. Bei trockenem Milieu erfolgt ein gezielter Filaggrin-Abbau in NMF um die Epidermis beziehungsweise das an die Umwelt grenzende SC ausreichend zu hydratisieren; die Arbeit von Scott und Harding machte diese Beobachtung durch Untersuchung von Rattenhaut bei Änderung des Feuchtigkeitsmilieus. In einem Experiment wurde dazu unter anderem eine Okklusion der Haut durchgeführt, wodurch es zu einem geringeren Abbau von Filaggrin kam. Des Weiteren wurde SC in vitro isoliert und einer höheren, sowie niedrigeren relativen Umgebungsfeuchtigkeit ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine „regelrechte“ Filaggrinprozessierung lediglich zwischen einer umgebenden 80% und

95% Feuchtigkeit stattfand und bei sowohl höheren, als auch niedrigeren Werten den Abbau zu NMF blockierte. (Scott und Harding 1986)

Anzumerken sei hier, dass es sich dabei um eine komplexe Regulationstechnik der Epidermis handeln könnte um sich der Umgebungsfeuchtigkeit entsprechend anzupassen, sodass der Ausdruck einer *regelrechten* Filaggrinprozessierung je nach Feuchtigkeitsmilieu zu interpretieren ist und eine ausbleibende Prozessierung nicht zwangsläufig einer Pathologie entsprechen muss, sondern viel mehr einer Adaptation. Wenn nun bei unüblicher hoher oder niedriger Außenfeuchtigkeit eine Störung im Filaggrin-Abbau vorliegt, könnte die Ursache an einer reduzierten Caspase-14-Expression oder Caspase-14-Aktivität liegen. Somit würde daraus resultieren, dass eine abnorme äußere Feuchtigkeit in einer bisher unbekanntem Weise die Expression oder die Aktivität der Caspase-14 senkt und es folglich zu einer unzureichenden Filaggrinprozessierung mit funktionellen Folgen kommt.

4.2 Störung des epidermalen Calcium-Haushalts durch Fehlen von voltage-gated calcium channel

Calcium-Ionen, sowie deren Konzentrationsgradient in der Epidermis spielen eine wichtige Rolle in der Regulation vieler Prozesse, zum Beispiel der Differenzierung vom Keratinozyten zum Korneozyten, der Ausbildung einer funktionierenden Hautbarriere, sowie der Herstellung einer geeigneten Permeabilitätshomöostase. Es erfolgt eine feine Justierung des intra- und extrazellulären Calciumgehalts durch das endoplasmatische Retikulum und einer Vielfalt an Calcium-Kanälen. (Lee und Lee 2018)

Der Calcium-Gehalt in der Haut von Säugetieren weist niedrige Werte im SB auf, eine stetige Zunahme innerhalb des SS, mit höchsten Calcium-Werten im SG, wobei das meiste Calcium sich hier in intrazellulären Speichern, wie dem Golgiapparat und dem endoplasmatischen Retikulum befindet (Celli et al. 2010). Im SC fällt der Calcium-Spiegel deutlich ab (Lee und Lee 2018). Studien von Lee et al. und Menon et al. konnten nachweisen, dass das Calcium nach einer zugefügten Störung der Permeabilitätsbarriere, beispielsweise durch Ankleben und Abziehen eines Tesafilms von der Haut einen Einfluss auf die Wiederherstellung einer intakten Hautbarriere hat. Es erfolgt ein unverzügliches Absinken von extrazellulären Calcium-Ionen, vor allem im apikalen SG mit Verlust des normalen epidermalen Calcium-Gradienten. Parallel zum Wiederaufbau der Hautbarriere normalisiert sich der Calcium-Gehalt über 6-24 h

wieder. Wenn man jedoch denselben Versuch in einer mit Calcium hochkonzentrierten Lösung durchführt, beeinträchtigt das die Heilung. (Menon et al. 1992b; Grubauer et al. 1989)

Diese Beobachtung würde implizieren, dass ein akuter Calcium-Mangel im SG folgenden Regulationsmechanismus einleitet: ein niedriger extrazellulärer Calciumgehalt bewirkt die Ausschüttung des Inhalts von Lamellar Bodies (LB) in das Interstitium des SC und die Synthese neuer LB. Als spezialisierte Zellorganellen enthalten LB Lipide, Enzyme, CDSN und antimikrobielle Peptide, die eine intakte Hautbarriere benötigt (Feingold 2012). Aber auch der Fluss von Calcium nach intrazellulär scheint an der Reparatur der Hautbarriere eine Rolle zu spielen; Lee et al. 1992 und Lee et al. 1994 konnten zeigen, dass bei Zugabe von Verapamil, einem Kanalblocker für L-Typ-Calcium-Kanäle, kein intrazellulärer Calcium-Influx möglich ist, was sich in einem hohem extrazellulären Calcium widerspiegelt, sodass es wie bei oben genanntem Experiment durch die Calcium-reiche extrazelluläre Umgebung zu einer Störung des Wiederaufbaus der Hautbarriere kommt. Somit beeinflusst der extrazelluläre Calcium-Gehalt sowie der Calcium-Influx über spannungsabhängige Calcium-Kanäle die Herstellung beziehungsweise Reparatur einer intakten epidermalen Permeabilitätsbarriere.

Der VGCC der Epidermis ist ein L-Typ Calcium-Kanal, der bisher wenig erforscht ist, da dessen Existenz durch Denda et al. erst im Jahr 2006 nachgewiesen werden konnte: die Forschungsgruppe konnte sowohl mittels PCR-Analyse, als auch immunhistochemisch das Vorhandensein der $\alpha 1$ -Untereinheit des VGCC aufzeigen. Die $\alpha 1$ -Untereinheit dieses Kanals fungiert als der eigentlich funktionelle Teil des VGCC, der Calcium in die Zelle lässt. (Denda et al. 1998)

Es ist bisher nicht geklärt, ob und bei welchen Krankheitsbildern eine verminderte oder fehlende VGCC-Expression vorliegt. Ebenso wenig ist erforscht, welche Menge an intrazellulärem Calcium durch den VGCC bereitgestellt wird und welchen Beitrag zum Beispiel andere (möglicherweise unbekannt) Calcium-Kanäle dazu haben. Es soll untersucht werden, ob bei den vorliegenden Gewebeproben eine Auffälligkeit der Expression des VGCC vorliegt.

4.3 Fehlerhafte Expression der Cadherine DSC1 oder CDSN

Wie bereits in den Kapiteln 3.4 und 3.5 beschrieben sind Cadherine Calcium-abhängige transmembrane Glykoproteine, die als Adhäsionsproteine in Desmosomen eine Verbindung zwischen epidermalen Zellen bewirken. Zu den wichtigsten Cadherinen gehören das DSC1, CDSN und DSG1. Im SC erfolgt eine Spaltung dieser Verbindungen um eine Desquamation zu ermöglichen. Ein Fehlen beziehungsweise ein Mangel von DSC1 hat wohl keinen wesentlichen Einfluss auf die Struktur der Desmosomen, oder deren Anzahl, kann jedoch zu einer Schwächung der interzellulären Kontakte und einer Fragilität der Haut führen. (Chidgey et al. 2001)

Der Einfluss auf die epidermale Hautbarriere ist unbekannt.

In diesem Kontext ist die Beobachtung von Donetti et al., dass Desmosomen abhängig von ihrer Lokalisation unterschiedlich sind von besonderem Interesse. Die Desmosomen in der menschlichen Mundschleimhaut beinhalten keinerlei DSC1 im Gegensatz zur äußeren Haut. Man geht davon aus, dass dies eine leichtere Abschilferung des Epithels ermöglicht, sodass sich das Gewebe, zum Beispiel in Folge eines Traumas schneller regenerieren kann. (Donetti et al. 2005)

In intertriginösen Bereichen herrschen mitunter ähnliche Konditionen wie in der Mundschleimhaut, eine nahezu stetig warme Temperatur, eine konstante mechanische Belastung und hohe Feuchtigkeit. Möglicherweise erklärt sich das Fehlen von DSC1 in der Mundschleimhaut durch eine Steuerung über diese Umweltfaktoren.

Da die GP gehäuft in intertriginösen Bereichen vorkommt, drängt sich die Frage auf, ob ein entsprechendes externes Milieu intertriginös ein Fehlen beziehungsweise eine Downregulation des DSC1 vermittelt.

Auch das CDSN gehört zu den Cadherinen. Nach Ausschüttung aus den LB am Übergang vom SG zum SC entfaltet es im Interzellulärspalt seine Wirkung an den Desmosomen. Durch Bindung des Corneodesmosins an die Desmoglea werden die Desmosomen zu Corneodesmosomen mit verstärkter Zell-Zell-Bindung. (Ishida-Yamamoto und Igawa 2015; Allen et al. 2001)

Wenn die Ausschüttung der LB abhängig von der Prozessierung des Zellkerns oder der Ausschüttung der Keratohyalin granula wäre, könnte eine Abnormalität in der Expression oder Verteilung des CDNS auch bei der GP möglich sein, da diese durch persistierende Keratohyalin granula und eine parakeratotische Verhornung

charakterisiert ist. Bisher ist unklar, welches Signal bewirkt, dass die LB ihren Inhalt am Übergang zum SC freisetzen.

5. Material und Methoden

5.1 Material

Im Rahmen der routinemäßigen histopathologischen Diagnostik der Klinik wurde im Vorfeld dieser Arbeit über mehrere Jahre Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe mit Zeichen einer GP gesammelt.

Hierbei handelte es sich um Präparate von Haut, die nebenbefundlich histologisch eine granuläre Parakeratose aufwiesen. Aus diesen Paraffinblöcken wurden 7 Präparate zur weiteren immunhistochemischen Aufarbeitung gewählt mit folgenden Diagnosen: Zyste (2 Präparate), Kondylom (2 Präparate) und genitales Ekzem (3 Präparate). Zur internen Kontrolle der Färbetechnik beziehungsweise des Erfolges wurden anonymisierte Normalhautschnitte ohne jegliche weitere klinische Zusatzinformationen mitgefärbt. Die Proben wurden für die Untersuchung anonymisiert. Für die Analyse standen die histologische Diagnose und die Lokalisation der Gewebeprobe zur Verfügung. Eine Beratung bei der Ethikkommission erfolgte im Vorfeld; da eine Zuordnung der Präparate zu den jeweiligen Patienten oder Rückschlüsse auf Patientendaten nicht möglich waren, war ein Ethikvotum nicht notwendig.

5.2 Geräte

Tabelle 1	Geräte
Dampfdruckkochtopf Electric Pressure Cooker EPC 450	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Jena
Färbekammern, Färbekasten und Gestell Stain Tray	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Mikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Pipetten, 0,5 µl-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenhalter	Eppendorf AG, Hamburg
Pasteurpipetten, 3ml	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe

Vortex-Gerät	IKA-Werke GmbH und Co. KG, Staufen
--------------	------------------------------------

5.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien

Menzel-Gläser Super Frost plus, 1 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen 200 µl und 1000 µl	Sarstedt Aktiengesellschaft und Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 50 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg

5.4 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 3 Reagenzien

Antibody Diluent 500 ml (ready to use)	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Alkaline Phosphatase Substrat Puffer 250 ml	Dako Real, Glostrup, Dänemark
Aqua dest. 1000 ml	B. Braun Melsungen, Hessen
Biotinylated Secondary Antibodies 100 ml	Dako Real, Glostrup, Dänemark
Chromogen Red 1-3 8 ml	Dako Real, Glostrup, Dänemark
EZ-DeWax	Bio Genex, Fremont, CA, USA
Hämalaun nach Mayer (Fertiglösung)	Merck KGaA, Darmstadt
Levamisole Lösung 1ml	Dako Real, Glostrup, Dänemark
Streptavidin Alkaline Phosphatase 100 ml	Dako Real, Glostrup, Dänemark
Tri-Sodium Citrate dihydrate	Merck KGaA, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt

Proteinase, bakterielle	Sigma Life Science, St. Louis, Missouri, USA
Target Retrieval Solution (TRS) pH 9	Dako Real, Glostrup, Dänemark
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Milchpulver Blotto, non fat dry milk	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
ChemMate Detektionskit	Dako Real, Glostrup, Dänemark
Wässriges Eindeckmedium	DAKO Glycergel Mounting Medium, DAKO Deutschland GmbH

Tabelle 4 Lösungen

Lösung	Herstellung
Citrat-Puffer pH 6,0	<p>Stammlösung A: 5,25 g Zitronensäure ad 250 ml Aqua dest.</p> <p>Stammlösung B: 14,7 g Tri-Natrium-Citrat Dihydrat ad 500 ml Aqua dest.</p> <p>Gebrauchslösung: 18 ml Stammlösung A ad 84 ml Stammlösung B ad Aqua dest. 1000 ml. 10 Minuten kochen und anschließend bei Raumtemperatur abkühlen lassen.</p>
Tris-HCl-Tween-Puffer pH 7,6	<p>Stammlösung:</p> <p>6,55 g Tris-Base und 87,66 g NaCl ad 900 ml Aqua dest. Dies mit 25%iger Salzsäure auf pH-Wert 7,6 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.</p> <p>Gebrauchslösung:</p> <p>100 ml der Stammlösung ad 900 ml Aqua dest. ad 500 µg Tween 20</p>

Milch-Tris-HCl-Tween-Puffer 0,1%	0,3 g 0,1% Milchpulver mit 300 ml Tris-Puffer
Entparaffinierungslösung	100 ml DeWax Konzentrat ad 90 ml 96%-Ethanol
Chromogen-Substrat	Kit mit Chromogen Red-Konzentrat (1,2 und 3) und AP-Substrat Puffer. Mischung nach im Kit vom Hersteller empfohlener Konzentrationen abhängig vom Endvolumen
Protease-Lösung	5 mg Protease (Firma: Sigma) mit 10 ml Trispuffer gemischt

5.5 Primärantikörper

Tabelle 5 Primärantikörper

Caspase-14-Antikörper	CASP14, Catalog ID / Lot ID: LS-B474 / 31165, LifeSpan BioSciences, Inc.
VGCC-Antikörper	Calcium Channel, Voltage-Dependent, beta 3 Subunit (CACNB3) Antikörper (Biotin), Produktnummer: ABIN1394467
DSC-1-Antikörper	Dsc1-U100, Cat. No. 61092, PROGEN Biotechnik
CDSN-Antikörper	antibody ab118835, abcam, UK

5.6 Behandlungen der histologischen Schnitte mit ausgewählten Antikörpern

Die Formalin-fixierten Paraffinschnitte wurden zu Beginn einer Entparaffinierung mittels EZ-DeWax-Lösung unterzogen. Die Schnitte wurden jeweils 2 Mal sequentiell für je 5 Minuten in die oben genannte Substanz getaucht, nach Lösung des Paraffins wurden sie mit Leitungswasser mindestens 6 Mal gespült. Anschließend erfolgte je nach Antikörper die entsprechende Vorbehandlung, die das Demaskieren der Antigene bewirken soll.

Die angewandten Antikörper waren zuvor bezüglich der Vorbehandlungen nicht etabliert, sodass für jeden einzelnen eine Austestung verschiedener Vorbehandlungen mit EDTA, Citrat oder Protease stattfand. Im Folgenden ist die Vorgehensweise mit der jeweils als geeignet bewerteten Vorbehandlung des entsprechenden Antikörpers beschrieben.

5.6.1 anti-Caspase-14

Die entparaffinierten Schnitte wurden in Citratpuffer 15 Minuten im Dampfdrucktopf bei 40 kPa gekocht und im Anschluss bei Raumtemperatur zum Abkühlen belassen. Anschließend wurde dreimalig mit Tris-HCl-Tween-Puffer gespült und mit der Blockungsreagenz mit 0,1% Milch-Tris-HCl-Tween-Puffer für 10 Minuten benetzt. Nach „Abtropfung“ des Blockungsreagenz wurde der Primär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

5.6.2 anti-Voltage-gated calcium channel

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte mit TRS behandelt und 15 Minuten im Dampfdrucktopf bei 40 kPa gekocht. Danach erfolgte die Spülung mit Tris-HCl-Tween-Puffer drei Mal, sowie das Auftragen des Blockungsreagenz mit 0,1% Milch-Tris-HCl-Tween-Puffer für 10 Minuten. Nach Abkippen des Blockungsreagenz wurde der Primär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 aufpipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

5.6.3 anti-Desmocollin-1

Nach zuvor erfolgter Entparaffinierung der Schnitte wurden diese mit Citratpuffer benetzt und 15 Minuten lang in einem Dampfdrucktopf bei 40 kPa gekocht. Nach dieser Vorbehandlung erfolgte drei Mal die Spülung mit Tris-HCl-Tween-Puffer und Benetzung mit dem Blockungsreagenz mit 0,1% Milch-Tris-HCl-Tween-Puffer für 10 Minuten. Nach „Abtropfung“ der Blockungsreagenz wurde der Primär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 bei Raumtemperatur 1 Stunde lang inkubiert.

5.6.4 anti-Corneodesmosin

Die zu behandelnden Präparate wurden nach der Entparaffinierung mit Protease benetzt und nach 10 Minuten dreimalig mit Trispuffer gespült. Anschließend wurde 10 Minuten lang eine Blockungsreagenz mit 0,1% Milch-Tris-HCl-Tween-Puffer angewandt und danach abgekippt. Aus der Verdünnung von 1:200 resultierte später ein geeignetes Färbeverhalten, sodass 30 Minuten mit dem Primär-Antikörper anti-CDSN mit zuvor genannter Verdünnung bei Raumtemperatur benetzt wurde.

5.7 Vorgehensweise nach Inkubation mit den Primär-Antikörpern

Nach oben genannter Inkubation der Schnitte mit dem Primär-Antikörper wurden diese mit Tris-HCl-Tween-Puffer gut gespült. Als nächstes erfolgte die Detektion der gebundenen Primär-Antikörper mit dem Detektionskit. Der in dem Kit enthaltene Link-Antikörper, der mit Maus- oder Kaninchen-Antigenen reagiert, wurde auf das Präparat pipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend erfolgte ein erneuter manueller Spülvorgang mit Tris-HCl-Tween-Puffer, danach die Inkubation des Schnitts mit einem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat bei Zimmertemperatur für 5 Minuten. Auch hiernach erfolgte eine Spülung mit Tris-HCl-Tween-Puffer. Als letzter Schritt der immunhistochemischen Antikörper-Färbung wurde das Chromogen-Substrat-Gemisch für 10 Minuten aufgetragen, das in einer roten Färbung des jeweiligen Epitops resultierte, und anschließend mit Aqua dest. gespült. Letztlich wurde eine einminütige Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalaun nach Mayer durchgeführt. Die Präparate wurden nun vorsichtig in Leitungswasser geschwenkt um Reste der Gegenfärbung zu lösen. Durch die Gegenfärbung erscheinen unter anderem Zellkerne und Gewebestrukturen blau.

Zum Schluss wurde das immunhistochemisch gefärbte Präparat mittels wässrigen Eindeckmediums mit Glasdeckgläsern bedeckt um nach Trocknung mikroskopisch begutachtet werden zu können.

6. Ergebnisse

Es wurden 7 histologische Schnitte untersucht. Darunter 2 Schnitte von Zysten, mit der Lokalisation infraaurikulär und Unterarm, 3 Schnitte von genitalen Ekzemen und 2 Schnitte von Kondylomen. Zur internen Kontrolle erfolgte das Mitfärben von Normalhaut-Schnitten. Alle Präparate wurden jeweils mit dem Caspase-14-Antikörper, anti-VGCC, anti-DSC1, und anti-CDSN nach oben genannten Protokollen behandelt. Es erfolgte demnach eine Bewertung der Anfärbbarkeit des Epitops. Das Fehlen des Epitops entspricht keinem Nachweis dessen; des Weiteren wurden im Sinne einer semiquantitativen Beurteilung eine optische Abstufungsskala von „stark positiv“ bis „schwach positiv“ angewandt. Es wurde kein allgemein bekannter Score zur Einordnung des Färbeverhaltens genutzt. Alle Ergebnisse (durch Symbole dargestellt, wie folgt) der Farbintensität der Epidermis wurden für jede Antikörper-Färbung in Tabelle 6 zusammengefasst.

Die Symbole sind wie folgt zu verstehen.

Tabelle 6 Symbol-Bezeichnungen für das Färbeverhalten

Symbol	Bedeutung
-	Negativ, kein Nachweis
(+)	Schwach positiv, dezentler Nachweis
+	Positiv
++	Stark positiv

Es gibt Fälle, in denen zwei (oder mehr) Symbole mit „/“ getrennt, die Färbung beschreiben; das bedeutet, dass in einer Zellschicht stellenweise unterschiedliches Färbeverhalten gesehen werden kann.

6.1 Caspase-14-Färbung

Bei allen untersuchten histologischen Präparaten ist nach Färbung mit dem Caspase-14-Antikörper ein farblich sichtbarer magenta-roter Nachweis im Bereich der Epidermis zu sehen. Darüber hinaus sind farbliche Intensitäts-Unterschiede des Rotttons sowohl innerhalb der Präparate, als auch zwischen den Präparaten erkennbar. In einer semiquantitativen Betrachtungsweise ist der Farbton zart hell-rosa bis rosa bei Vorhandensein weniger Epitope im Vergleich zu einer kräftig pink-roten Farbe durch eine größere Anzahl an Epitopen angenommen worden. Es kann so eine ungefähre Aussage über die Menge des vorhandenen Epitops getroffen werden.

In keinem der Schnitte kann ein Fehlen der Caspase-14 verzeichnet werden. Der quantitative Anstieg der Protease im Verlauf der Epidermis vom SS bis zum apikalen SG (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13) ist in nahezu allen histologischen Präparaten sichtbar. Zwei Besonderheiten werden beobachtet: der Beginn eines positiven Nachweises wird in den meisten Schnitten nicht ab der 1. suprabasalen Schicht, sondern teilweise verspätet im SS gesehen (siehe Tabelle 7). Des Weiteren ist bemerkenswert, dass in allen Präparaten eine Besonderheit im SC auffällt: eine Abnahme der Epitope im SC zum Vergleich mit dem SG ist nicht zu verzeichnen, stattdessen legt eine Zunahme der Farbtintensität im SC einen weiteren Epitopanstieg nahe (siehe Abbildung 12). In parakeratotischen Anteilen kann man zudem Zellkern-assoziiert (siehe Abbildung 13) eine starke Anfärbbarkeit sehen. Zum Vergleich ist in Abbildung 14 ein Normalhautpräparat gezeigt, das den Epitopanstieg (Zunahme der Rotfärbung) über die Epidermis bis zum Übergang SG/SC (hier wird die maximale Anfärbbarkeit erreicht) und einer Abnahme der Epitope im SC zeigt. Es imponiert ein durchgängiger stark rot gefärbter Streifen am Übergang vom SG zum SC; im Vergleich dazu liegt dieser Streifen in Abbildung 12 deutlich höher im SC.

Eine semiquantitative Aussage über die Epitopanzahl kann im Präparat 1 nicht erfolgen, da das gesamte Präparat ein starkes Färbeverhalten aufweist, sodass farbliche Unterschiede nicht zu erkennen sind. Des Weiteren zeigt Präparat 2 eine weitere Besonderheit auf: in parakeratotischen Arealen ist nicht an jeder Stelle im Präparat ein positiver Nachweis möglich.

Tabelle 7 gibt das Färbeverhalten für jeden histologischen Schnitt wieder.

Caspase-14-Antikörper-Färbung						
Nummer	Diagnose, Lokalisation	SB	SS	SG	SC	Besonderheit
1	Zyste, infraaurikulär	+	+	++	+	+ im SB, Hintergrundfärbung/starkes Färbeverhalten, SC: zellkernassoziiert ++
2	Zyste, Unterarm	-	-/+	++	+	im parakeratotischem SC sowohl ++, als auch -
3	Ekzem, genital	-	-/+	++	(+)/+	+ im parakeratotischem SC
4	Ekzem, genital	-	-(+)	+	++	Epitope im SC>SG
5	Ekzem, genital	-	-(+) +	++	(+)/+	teils keine Abnahme im SC
6	Kondylom, genital	-	-/+	+/>++	+/>++	++ im parakeratotischem SC
7	Kondylom, genital	-	-/+	++	+	teils Abnahme im SC, aber ++ im parakeratotischem SC

Zusammenfassend sind folgende Beobachtungen im Kontext einer granulären Parakeratose zu diskutieren: vermutlich leicht verzögerte Expression von Caspase-14 und der semiquantitativ gewertet stärkere Nachweis im SC im Vergleich zum SG, ersichtlich am Anstieg des Rottons, insbesondere in parakeratotischen Bereichen des SC.

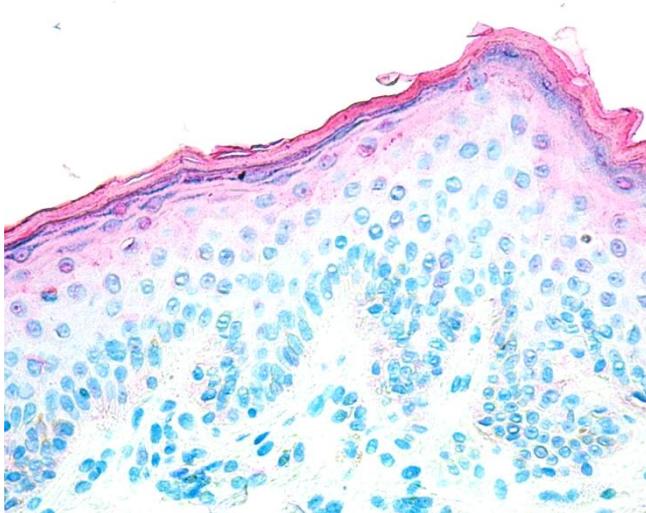


Abbildung 12 Caspase-14, Präparat 4, Originalaufnahme: 1:400, Ausschnitt

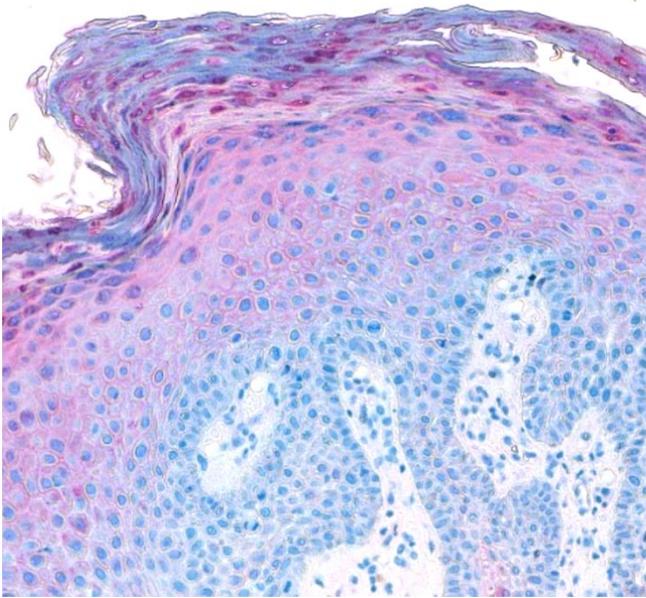


Abbildung 13 Caspase-14, Präparat 6, Originalaufnahme 1:200, Ausschnitt

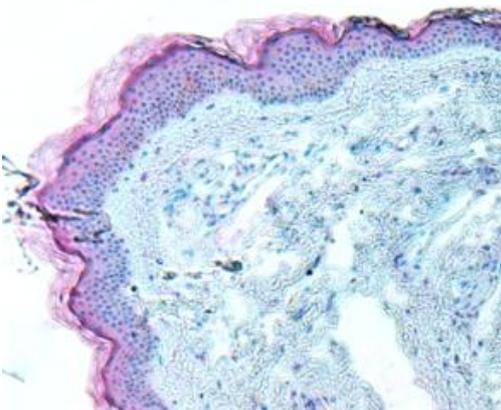


Abbildung 14 Caspase-14, Normalhaut, Originalaufnahme 1:100, Ausschnitt

6.2 VGCC-Färbung

Gemäß den Literaturangaben (siehe Kapitel 3.3.3) ist eine Expression vom SB bis zum SC physiologisch. Das Expressionsmuster der hier untersuchten histologischen Präparate weicht davon ab und zeigt sich auch in Normalhautpräparaten vom SB bis zum SG positiv, wohingegen im SC kein Nachweis gelingt. Dieses Ergebnis ist in mehreren Präparaten von Normalhaut reproduzierbar (beispielhaft siehe Abbildung 16). Womöglich ist eine Diskrepanz bezüglich des Expressionsmusters zwischen den Literaturangaben von Denda et al. und diesen Ergebnissen darauf zurückzuführen, dass verschiedene Epitope des VGCC durch Verwendung eines anderen Antikörpers angefärbt wurden: Denda et al. verwendeten Antikörper gegen das $\alpha 1C$ -Subunit,

während hier das $\beta 3$ -Subunit sichtbar gemacht wird. Aufgrund der erfolgten Austestung des Antikörpers an Normalhaut wird in den folgenden Präparaten ein fehlender Nachweis im SC als physiologisch gewertet. Ein positiver Nachweis im SS und SG ist in allen Präparaten zu sehen. Die Ergebnisse im SB und SC zeigen sich uneinheitlich, wie man Tabelle 8 entnehmen kann.

Tabelle 8 VGCC-Antikörper-Färbung

Nummer	Diagnose, Lokalisation	SB	SS	SG	SC
1	Zyste, infraaurikulär	+	+	+	-
2	Zyste, Unterarm	(+)	+	+	-
3	Ekzem, genital	-/(+)	(+)	(+)	-/(+)
4	Ekzem, genital	(+)	(+)	(+)	-
5	Ekzem, genital	(+)	(+)	(+)	-
6	Kondylom, genital	-/(+)	-/(+)	-/(+)	-/(+)
7	Kondylom, genital	-	-/(+)	(+)	-

Aufgefallen ist, dass die Präparate untereinander bezüglich des Rottons eine unterschiedlich starke Anfärbbarkeit aufweisen. Normalhautpräparate von verschiedenen Lokalisationen im Vergleich zueinander zeigen indes ein ähnliches Färbeverhalten, sowie eine deutlich sichtbare rote Anfärbbarkeit. Im Vergleich zum Normalhautpräparat (Abbildung 16) ließen sich Präparat 1 und Präparat 2 (Abbildung 15) etwas kräftiger und die restlichen Präparate, hier exemplarisch Präparat 3 dargestellt (Abbildung 17) etwas schwächer anfärben. Am schwächsten zeigten sich die Präparate 6 und 7 anfärbbar, sodass sich hier nur eine diskrete zart-rosa Färbung erkennen ließ.

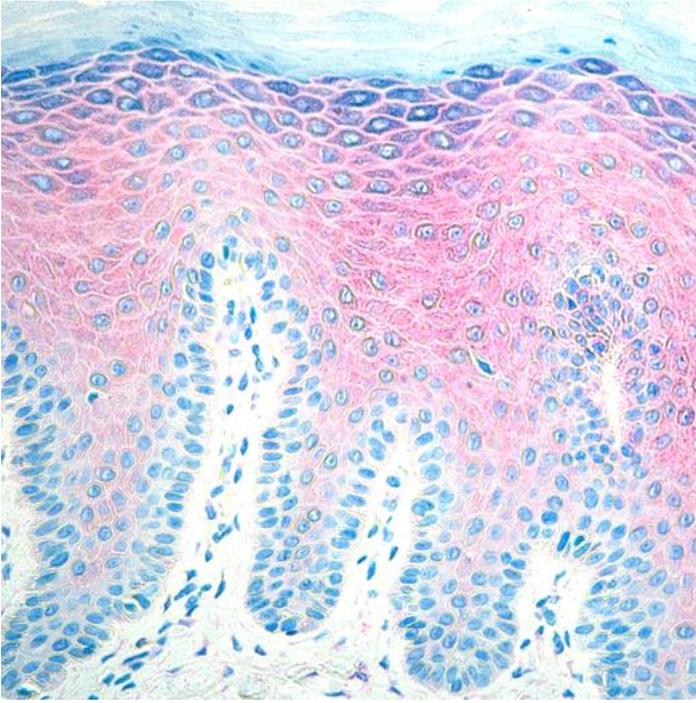


Abbildung 15 VGCC, Präparat 2, Originalaufnahme 1:400, Ausschnitt

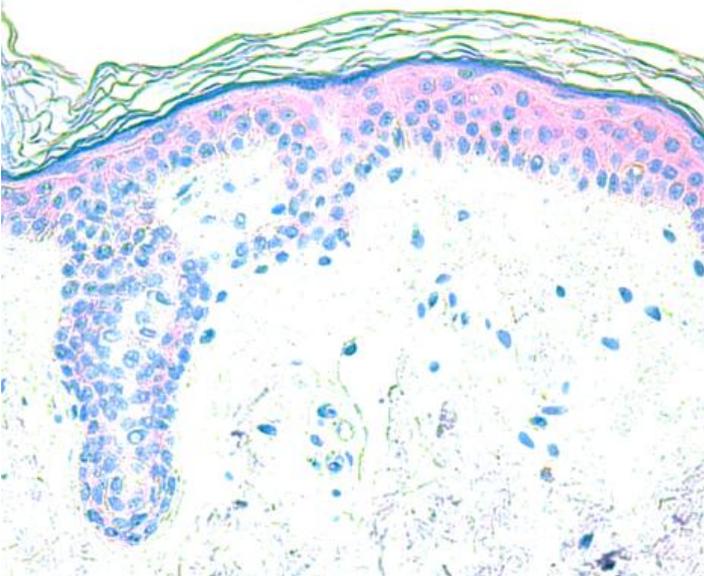


Abbildung 16 VGCC, Normalhaut, Originalaufnahme 1:200, Ausschnitt

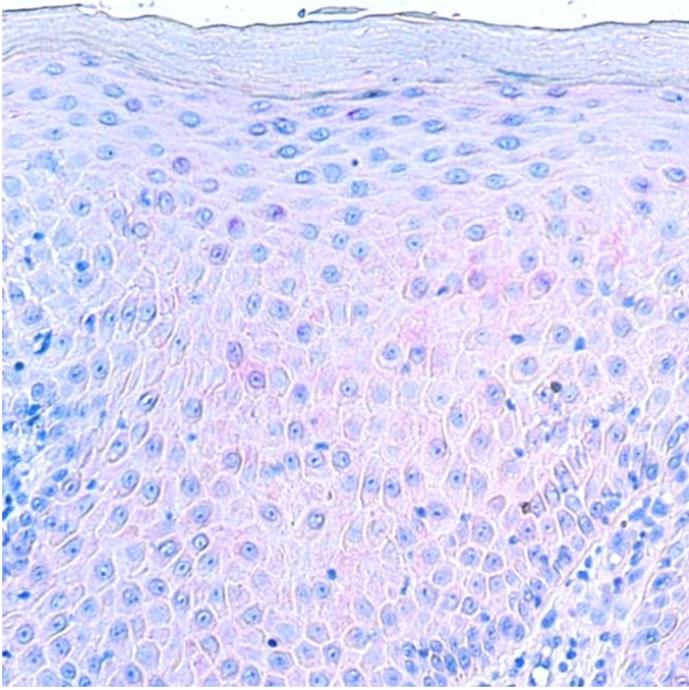


Abbildung 17 VGCC, Präparat 3, Originalaufnahme 1:400, Ausschnitt

6.3 DSC1-Färbung

Es wurde ein Antikörper (U100-Klon) verwendet, der die ursprüngliche, also nicht prozessierte Form des DSC1 nachweist. Residuen im SC können folglich nach physiologischer Proteolyse **nicht** mehr mit diesem Antikörper detektiert werden (Donetti et al. 2005). Eine positive Anfärbbarkeit im SC zeigt demzufolge ein nicht proteolysiertes DSC1 an und ist Zeichen einer nicht erfolgten Aufspaltung der Desmosomen.

Die Auswertung ist der folgenden Tabelle zu entnehmen. Die Ergebnisse der Zysten zeigen sich, wie schon bei anderen Antikörper-Färbungen, nicht einheitlich. Während Präparat 1 eine eher physiologische Expression von DSC1 aufzeigt, ist im Präparat 2 eine Expression ab dem SB zu sehen und ein deutlich positiver Nachweis im SC, ähnlich den Präparaten aus den intertriginösen Bereichen. Wie in Kapitel 3.4.2 bereits berichtet, ist eine physiologische Expression des DSC1 ab der 1. suprabasalen Schicht zu erwarten. Jedoch zeigen die Färbungen unserer Normalhautpräparate bereits ab dem SB einen schwach-positiven Nachweis. Zur Sicherheit erfolgten mehrere Anfärbungen von Normalhaut mit reproduzierbarem Ergebnis. Die Präparate 3-6 zeigen eine schwache Anfärbbarkeit ab dem apikalen SS beziehungsweise dem SG. Im Präparat 7 ist lediglich im SC ein Nachweis erfolgt. Abbildung 18 zeigt im Präparat 3 den stellenweise positiven Nachweis im SC während in der restlichen Epidermis (hier

aufgrund der Präparatgröße nur teilweise einzusehen) nahezu kein Nachweis möglich war. In Abbildung 19, einem Normalhautpräparat, erkennt man, dass das Epitop bis zum Übergang vom SG zum SC nachweisbar ist und sich im SC keine Anfärbbarkeit mehr zeigt.

Tabelle 9 DSC1-Antikörper-Färbung

Nummer	Diagnose, Lokalisation	SB	SS	SG	SC
1	Zyste, infraaurikulär	-	-(+)	-(+)	-
2	Zyste, Unterarm	-(+)	(+)	(+)	+
3	Ekzem, genital	-	-	-/+	+
4	Ekzem, genital	-	-	-(+)	(+)
5	Ekzem, genital	-	-(+)	-(+)	-(+)
6	Kondylom, genital	-	-(+)	(+)/+	-(+)
7	Kondylom, genital	-	-	-	-(+)

Zusammenfassend ist eine Epitop-Zunahme am Übergang SG/SC aufgefallen, und der Nachweis des DSC1 (in seiner ursprünglichen Form) im SC in den von GP betroffenen Präparaten. Damit weicht das Färbeverhalten von der physiologischen Expression ab.

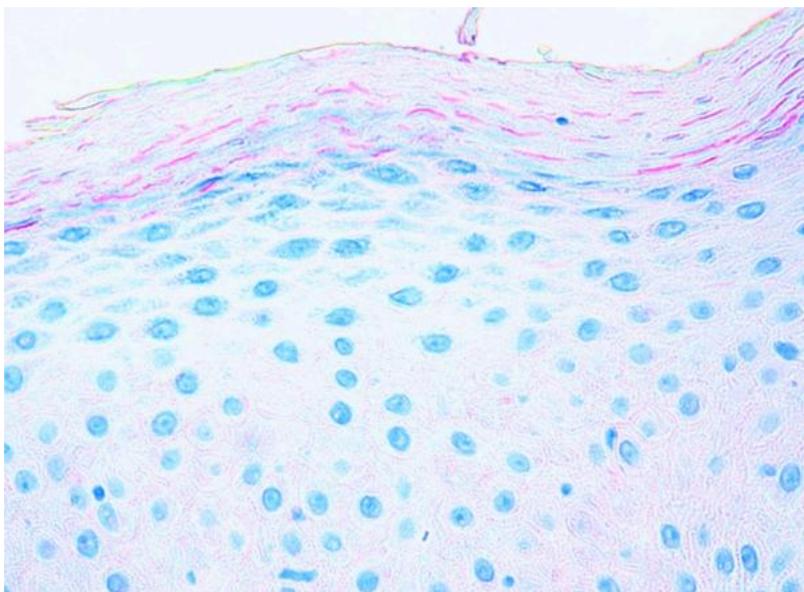


Abbildung 18 DSC1, Präparat 3, Originalaufnahme 1:400, Ausschnitt

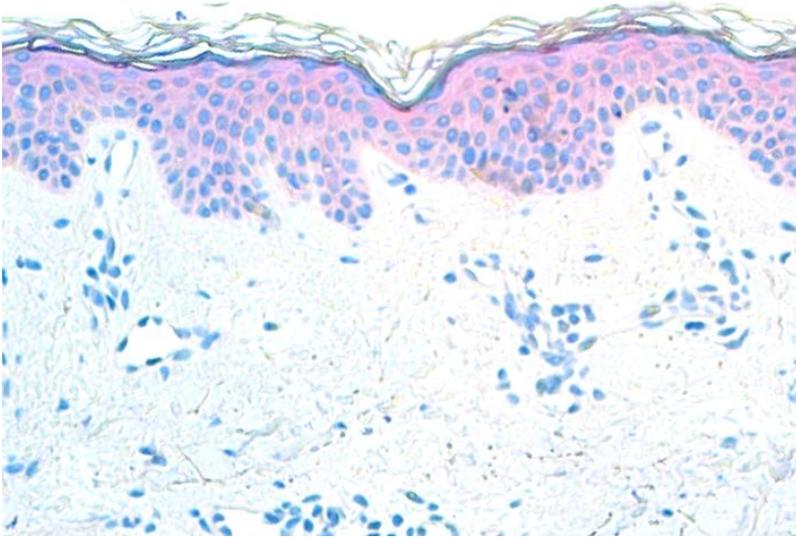


Abbildung 19 DSC1, Normalhaut, Originalaufnahme 1:200, Ausschnitt

6.4 CDSN-Färbung

Die CDSN-Antikörper-Färbung zeigt bei allen histologischen Schnitten einen positiven Nachweis, sodass nicht von einer fehlenden Expression ausgegangen werden kann (siehe Tabelle 10). Wie bereits in Kapitel 3.5.3 beschrieben, ist die physiologische Expression des CDSN im SB -, im Verlauf des SS +, im SG ++, und im SC - (hierzu siehe Abbildung 21). Der positive Nachweis im SC fällt in allen Präparaten auf, wobei dies in den Präparaten 1 und 7 nur stellenweise sichtbar ist. Zudem liegt die Expression des CDSN bereits ab dem basalen SS vor.

Anzumerken ist, dass die Färbung bei den Präparaten 1 und 2 stark ausfällt und das Präparat 2 auf Grund einer Hintergrundfärbung nicht repräsentativ ist. Im Präparat 6 (siehe Abbildung 20) stellt sich sehr gut das negative SB und die allmähliche Zunahme der Epitope im Verlauf des SS dar. Zudem ist deutlich zu sehen, dass das parakeratotische SC eine stärkere Anfärbbarkeit aufweist als das SG.

Tabelle 10 CDSN-Antikörper-Färbung

Nummer	Diagnose, Lokalisation	SB	SS	SG	SC
1	Zyste, infraaurikulär	-	-/+	++	+/-
2	Zyste, Unterarm	-/+	+	++	+
3	Ekzem, genital	-	-/+	+	+
4	Ekzem, genital	-	-/+	+	+
5	Ekzem, genital	-	-/+	+	+
6	Kondylom, genital	-	-/+	+	+
7	Kondylom, genital	-	-/+	+	+

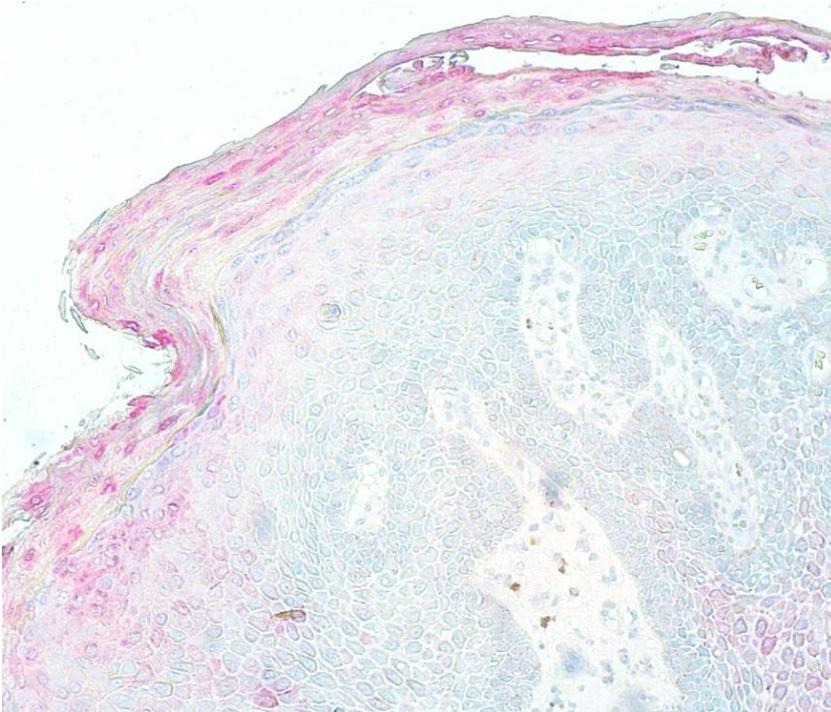


Abbildung 20 CDSN, Präparat 6, Originalaufnahme 1:400, Ausschnitt

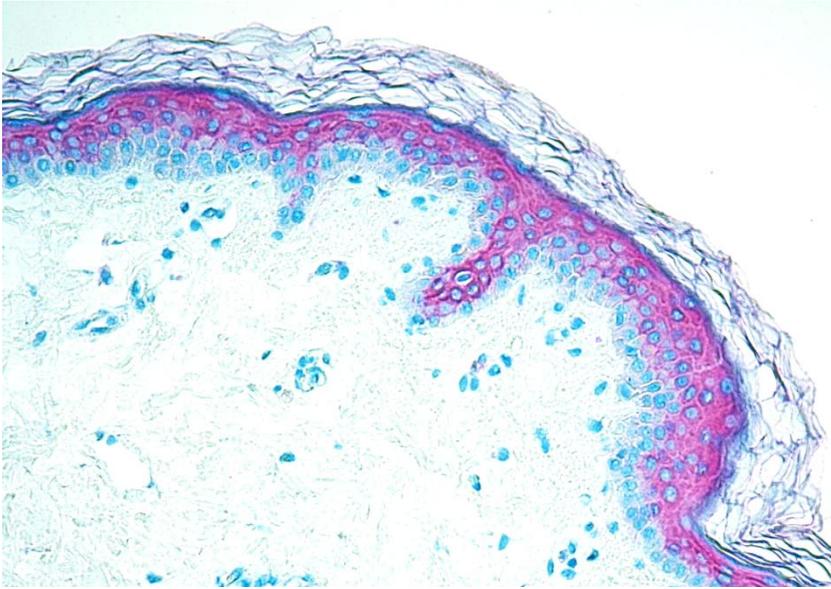


Abbildung 21 CDSN, Normalhaut, Originalaufnahme 1:100, Ausschnitt

Zusammengefasst lässt sich in den hier untersuchten Präparaten CDSN ab dem basalen SS bis in das (teils apikale) SC nachweisen. Die Präparate aus Intertrigines weisen ein schwächeres Färbeverhalten auf.

7. Diskussion

Es erfolgten unterschiedliche Antikörper-Färbungen um oben genannte Thesen zu prüfen. Jede These wird gesondert anhand der Ergebnisse und der vorhandenen Literatur diskutiert.

7.1 Caspase-14

Zunächst soll die These, der GP läge ein Fehlen, ein Mangel oder eine Funktionsstörung der Caspase-14 zugrunde, geprüft werden. Die vorliegenden Ergebnisse können ein gänzlich Fehlen von Caspase-14 ausschließen; in allen Schnitten kann dieses Enzym nachgewiesen werden.

Berücksichtigt werden muss, dass der verwendete Primärantikörper nicht den Zustand des Enzyms erkennt. Sowohl die aktive, als auch inaktive Form des Enzyms werden nachgewiesen. In Normalhaut ist somit ein positiver Nachweis ab dem SB bis zum SC möglich, wobei bekannt ist, dass unter physiologischen Bedingungen, eine inaktive Form des Enzyms - in Keratohyalin granula gespeichert, an den Zellkern oder die

Desmosomen assoziiert - bis zum SG vorliegt und erst nach Freisetzung ins das Zytosol eine Aktivierung erfolgt (siehe Kapitel 3.2).

Im Vergleich zum in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster von Caspase-14 zeigt sich bei den vorliegenden Untersuchungen das frühe SS (Anmerkung: ausgenommen Präparat 1) nicht ab der 1. suprabasalen Schicht, sondern erst in höheren Lagen des SS durchgängig positiv gefärbt. Nun kann diese Beobachtung bedeuten, dass entweder eine leicht verspätete Expression vorliegt oder dass es sich um eine Normvariante handelt oder der Antikörper ein leicht unterschiedliches Affinitätsverhalten aufweist, somit unterschiedlich sensitiv ist.

Fraglich wäre hierbei, inwiefern eine Expression, die lediglich eine oder wenige Zelllagen verspätet, jedoch in der physiologisch korrekten Zellschicht auftritt, eine Konsequenz für den epidermalen Zellzyklus hätte. Zudem liegt Caspase-14 im SS in Speicherkomponenten vor, sodass erst nach der Freisetzung aus diesem am Übergang vom SG zum SC (Alibardi et al. 2005; Eckhart und Tschachler 2011) eine Wirkung zu erwarten ist.

Des Weiteren sind die Auffälligkeiten im (parakeratotischen) SC zu diskutieren; in Abbildung 22 erkennt man eine spezifische Färbung ab dem mittleren SS und eine deutliche Epitop-Anreicherung im parakeratotischen SC (mit Pfeilen hervorgehoben): hohe Expression zellkern-nah und/oder in Form vieler kleiner Punkte, die als verbliebene Keratohyalin-Granula interpretiert werden können.

Da die (Pro-) Caspase-14 im SG assoziiert zum Zellkern, als auch in den Keratohyalin-Granula vorkommt (Denecker et al. 2008), im SC aber eine Abnahme im Vergleich zum SG zu erwarten wäre, könnte man daraus schließen, dass keine Freisetzung des Enzyms aus den Keratohyalin-Granula und keine Loslösung vom Zellkern erfolgt und dadurch auch keine Aktivierung stattfindet, zumal beide Zellkompartimente unüblicherweise in den hier gezeigten Präparaten bis ins späte SC nachweisbar sind.

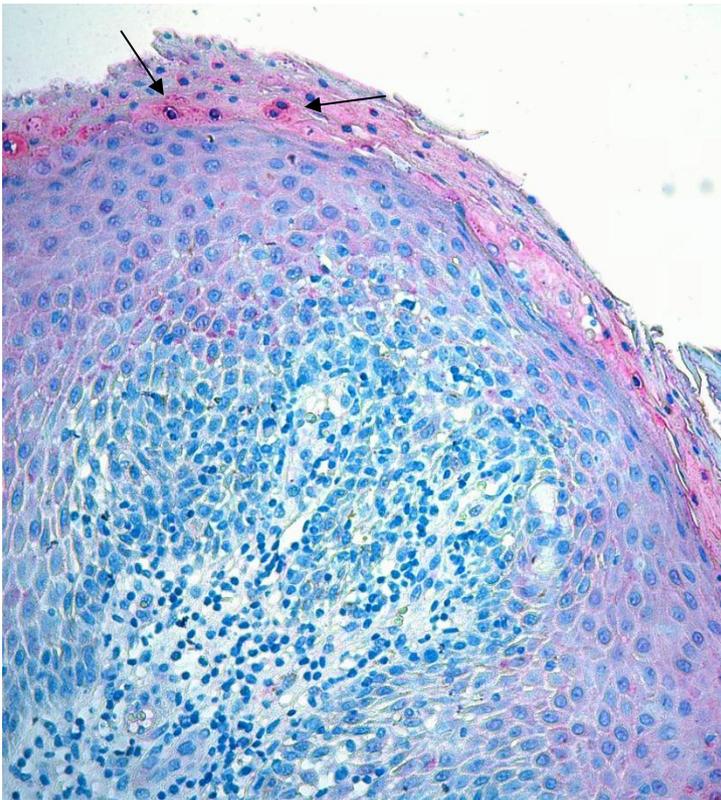


Abbildung 22 Caspase-14, Präparat 6, Originalaufnahme 1:400, Ausschnitt

Beim histologischen Phänomen der GP persistieren sowohl der Zellkern, als auch die Keratohyalingranula bis ins SC. Nun gibt es also mehrere Möglichkeiten, wie dieses Phänomen zustande kommen könnte: durch das Fortbestehen der Procaspase-14 in den Keratohyalingranula könnte es zu einer unzureichenden Filaggrin-Prozessierung kommen. Da das Filaggrin jedoch auch in den Keratohyalingranula gespeichert vorliegt, wird es am wahrscheinlichsten ebenso wenig wie die Procaspase-14 freigesetzt. Da der N-Terminus des Filaggrins eine Kernlokalisierungssequenz beinhaltet, die im Verdacht steht maßgeblich am Zellkernabbau beteiligt zu sein (siehe Kapitel 3.1) und auch die Caspase-14 möglicherweise auf diesen Prozess Einfluss hat (siehe Kapitel 3.3), könnte eine fehlende Freisetzung dieser Proteine aus den Keratohyalingranula eine Erklärung für den Verbleib der Zellkerne bis ins SC sein.

Obwohl in den untersuchten Schnitten mit GP unterschiedliche („Grund“-) Erkrankungen vorliegen, haben 5 von 7 Präparaten den Umwelt-Faktor des okklusiven feuchten Milieus durch ihre intertriginöse Lokalisation gemein. Es ist in der Literatur bisher unklar, inwiefern die Expression oder Ausschüttung der Caspase-14 bei feuchtem Außenmilieu reguliert wird, jedoch impliziert dies die Arbeit von Scott und Harding: es konnte gezeigt werden, dass eine Okklusion von Rattenhaut zu einem geringeren Filaggrin-Abbau führte. Auch in den hier untersuchten Hautschnitten zeigt sich (Pro-)

Filaggrin bis ins SC persistierend: eine Beobachtung, die in der vorherigen klinischen Diagnostik bereits erfolgte. Nachdem die Keratohyalin granula sowohl das (Pro-) Filaggrin, als auch die (Pro-) Caspase-14 beinhalten, wäre hier eine Retention denkbar, bedingt durch die erhöhte Umgebungs-Feuchtigkeit. Dem könnte man in weiteren Forschungsarbeiten nachgehen und nachweisen, wieviel der im SC nachgewiesenen Caspase-14 als Pro-Caspase-14 und diese in welchem Zellkompartiment vorliegt. Anzumerken sei hier, dass die 2 Präparate, die nicht aus einer intertriginösen Lokalisation entnommen wurden, dennoch einer okklusiven Umgebung, zum Beispiel durch die Applikation eines Pflasters, ausgesetzt sein konnten.

Bei den Kondylomen ist der mögliche Einfluss einer HPV-Infektion auf die Expression von Caspase-14 erwähnenswert. Untersuchungen von Kazem et al. konnten anhand von menschlichen Zellkulturen zeigen, dass bei Expression des HPV-Gens E6 sowohl die Apoptose, als auch die Differenzierung der Keratinozyten gestört werden können. Insbesondere eine Zellkultur mit HPV-Typ 8 E6 wies eine Akkumulation von Filaggrin und Pro-Caspase-14 positiven Zellen in obersten Epidermisschichten bei gleichzeitig gestörter Verhornung auf. Diese Differenzierungsstörung wurde darauf zurückgeführt, dass es zu einer fehlenden Expression von Caspase-14-Untereinheiten gekommen sein könnte, sowie vermutlich einer fehlenden Aktivierung von Caspase-14 mit folglich ausbleibender Prozessierung von Filaggrin. Diese Ergebnisse würden sich mit den hier gezeigten Beobachtungen im histologischen Präparat gut decken; dennoch handelt es sich bei der Arbeit von Kazem et al. um eine spezielle Konstellation eines humanen Papillomavirus-Typen mit Expression eines bestimmten Gens, das nicht bei jedem Kondylom nachweisbar ist. Jedoch wurde in einer Arbeit von Jelen et al. versucht, die genomische Vielfalt von HPV-6 näher zu untersuchen; hier konnte unter anderem auch das Vorkommen des Gens E6 nachgewiesen werden. Demnach wäre einerseits relevant zu untersuchen, wie häufig das Gen E6 in den Kondylom-verursachenden HPV-Typen exprimiert wird und andererseits zu erforschen, ob weitere andere HPV-Gene selbigen Effekt auf die Caspase-14 haben. Somit könnten in den Fällen von Kondylomen multiple Faktoren Einfluss auf das Wirken der Caspase-14 nehmen.

Zusammenfassend ist die Caspase-14-Antikörperfärbung besonders in intertriginösen Arealen aufschlussreich und zeigt vermutlich eine leicht verzögerte Expression im SS an. Im SC, vor allen im Bereich der granulären Parakeratosen bei allen Präparaten, ist sie stärker nachweisbar als im SG, was auf eine ausbleibende Freisetzung beziehungsweise Prozessierung deuten könnte.

7.2 Calcium

Der hier verwendete Antikörper richtet sich gegen die beta3-Subunit und ist bisher nicht an dermalen, sondern vorrangig an neuronalem Gewebe erprobt. Unsere Untersuchungen zeigen jedoch, dass dieser Antikörper auch in der Epidermis zu einem positiven Färbeergebnis führt und das Epitop nachweist. Im SC ist auch im Normalhautpräparat kein Nachweis möglich im Gegensatz zum Antikörper gegen die $\alpha 1C$ -Subunit, das von Denda et al. zum Nachweis vom VGCC verwendet wurde. Erklären ließe sich diese Beobachtung, dass Bestandteile des VGCC im SC abgebaut werden und daher nicht alle mehr sichtbar gemacht werden können.

Oben gezeigte Ergebnisse weisen das Vorhandensein des Calcium-Kanals in allen Präparaten nach. Die Stärke der Färbung zeigt sich in den Präparaten aus Intertriginen im Vergleich zu Normalhaut über die komplette Epidermis reduziert. Semiquantitativ betrachtet spricht dies für eine geringere Anzahl von Epitopen und könnte zum Beispiel auf eine Downregulation hindeuten. Wodurch die Expression des VGCC beeinflusst wird und ob externe Faktoren dabei eine Rolle spielen, ist bisher nicht erforscht. Auch ist unklar, ob die Ausprägung der Expression von der Lokalisation abhängt.

Die Präparate 1 und 2 stellen daher eine Besonderheit dar, denn sie zeigen zwar GP-Phänomene, entstammen aber keiner intertriginösen Lokalisation. Das Färbeverhalten unterscheidet sich von dem der Präparate aus Intertriginen indem es im SC negativ ist und über die restliche Epidermis positiv ist, also am ehesten einem physiologischen Expressionsmuster entspricht.

Daraus ergibt sich die Fragestellung, welchen Einfluss Änderungen im Expressionsmuster des VGCC auf die Entstehung einer GP haben oder ob eine Downregulation durch eine hohe Umgebungsfeuchtigkeit, andere unbekannte externe Faktoren oder durch eine vorliegende Primärerkrankungen bedingt wird. Denkbar ist auch eine multifaktorielle Genese der Entstehung einer GP; unterschiedliche Faktoren tragen zu einer gemeinsamen Endstrecke bei und resultieren in dem hier beschriebenen histologischen Phänomen.

Die Untersuchungen von Lee et al.; Feingold 2012; Lee et al. 1994 betonen den Stellenwert des Calciums als Regulator für die epidermale Enddifferenzierung und dass der VGCC eine größere Rolle spielt als bisher angenommen (siehe Kapitel 4.2): nach einer Störung der epidermalen Hautbarriere sinkt im SG der extrazelluläre Calcium-Gehalt rapide ab. Dies scheint die Ausschüttung der LBs, sowie die Herstellung neuer

LBs auszulösen. Hohes extrazelluläres Calcium hingegen verursacht laut Lee et al. eine verzögerte Erholung der epidermalen Hautbarriere. Es könnte also der Umkehrschluss gelten, dass ein sehr hoher extrazellulärer Calcium-Gehalt Auswirkungen auf die intrazelluläre Homöostase im SG hat und direkt oder indirekt die LB-Ausschüttung hemmt. In LBs gespeicherte Proteine, wie das CDSN oder Enzyme, wie Lipasen und Proteasen, die an wichtigen Vorgängen der epidermalen Differenzierung beteiligt sind (Feingold 2012), würden ihre Funktion dann nicht ausüben können.

Ausgehend von einer im Vergleich zu gesunder Normalhaut niedrigerer Anzahl von VGCC in oben gezeigten Präparaten aus Intertrigines, könnte eine wie in Kapitel 3.3.4 gezeigte ENaC-VGCC-Kaskade nicht regelrecht ablaufen. Durch eine reduzierte Zahl an VGCC würde möglicherweise der Calciumfluss von extra- nach intrazellulär verzögert stattfinden.

Einerseits könnte dies die Ausschüttung der LBs stören können, sodass nicht ausreichende Mengen an CDSN freigesetzt werden und somit Corneodesmosomen in reduzierter Anzahl ausgebildet würden. Gleichzeitig würden aber auch Kallikreine, Lipasen und Proteasen vermindert sezerniert werden, die am Umbau vom SG zum SC beteiligt sind. Letztlich würde dies die Ausbildung eines gesunden SC mit einer regelrechten Desquamation behindern.

Andererseits könnte eine reduzierte Anzahl an VGCC auch einen Einfluss auf andere Vorgänge in den Keratinozyten haben; weniger spannungsabhängige Calcium-Kanäle würden länger brauchen um durch Influx ausreichende Mengen Calcium für Calcium-abhängige Proteasen, die zum Beispiel Filaggrin abbauen, bereitzustellen (siehe Abbildung 10 ENaC-VGCC-Signalkaskade). Somit wäre die Prozessierung des Filaggrins, sowie davon abhängige Prozesse, wie zum Beispiel die Zellkompaktierung, der Zellkernabbau oder Herstellung von NMFs (siehe Kapitel 3.1.4 und 3.1.5) gestört.

Interessant wäre darüber hinaus, ob ein niedriger intrazellulärer Calcium-Gehalt Einfluss auf die Ausschüttung von Keratohyalin granula hätte. Bisher ist unklar, welcher Mechanismus eine Degranulation von Keratohyalin granula verursacht und ob dieser Prozess Calcium-abhängig ist.

Somit wäre es also sinnvoll, Messungen des intra- und extrazellulären Calciums vorzunehmen um bei der GP den tatsächlichen Gehalt im SG und SC zu bestimmen und zeitgleich eine quantitative Messung des VGCC durchzuführen. Darüber hinaus ist noch

unbekannt, ob es lokalisationsabhängige Unterschiede in der VGCC-Expression gibt. Dies würde auch klären, warum Präparate aus nicht intertriginösen Bereich mit einer GP eine ähnliche VGCC-Expression wie Normalhaut aufweisen.

7.3 Cadherine

Eine weitere zu diskutierende These, betrifft die Expression der Cadherine CDSN und DSC1.

Eine fehlende Expression des CDSN konnte in keinem der Präparate nachgewiesen werden. Bezüglich des Expressionsmusters ist aufgefallen, dass das CDSN teilweise etwas früher (bereits ab basalen Anteilen des SS) exprimiert wurde, als in der Literatur als physiologisch - im Verlauf des SS - angegeben (Allen et al. 2001). Anzumerken ist jedoch, dass bisher keine Vergleichsfärbungen unterschiedlicher Lokalisationen am Menschen in der Literatur vorliegen. Fraglich ist, ob es sich hierbei also tatsächlich um eine leicht verfrühte Expression handelt und welche Folgen dies gegebenenfalls haben könnte. Festzuhalten ist jedoch, dass die Expression (bis auf im Präparat 1) im SS beginnt, also in der als physiologisch erachteten Epidermis-Schicht. Da CDSN in LB gespeichert vorliegt, ist ein Wirken des Proteins nur nach Ausschüttung aus den LB möglich. Somit wäre eine „verfrühte“ Expression bei jedoch regelrechter Ausschüttung am Übergang vom SG zum SC am ehesten folgenlos.

Zudem zeigen sich die Färbungen der Präparate aus genitaler Lokalisation schwächer. Unterschiede in der Stärke der Färbung können einerseits dem manuellen Färbevorgang geschuldet sein, andererseits Hinweise auf die Anzahl der Epitope geben. Da bei den Präparaten 1 und 2 (Zysten) eine Färbung in kräftigeren Rot-Nuancen auffällt, könnte es sein, dass Gewebe aus Intertriginen lokalisations-bedingte Unterschiede aufweisen und damit ein anderes Färbeverhalten haben. Möglich wäre, dass eine stetig hohe umgebende Feuchtigkeit zu einer niedrigeren Expression von CDSN führt. Denda et al. untersuchten die längerfristige Auswirkung von feuchtem Milieu auf die Epidermis von Mäusen. Es konnte festgestellt werden, dass unter Bedingungen von >80% Luftfeuchtigkeit sowohl quantitativ weniger LB produziert wurden, als auch weniger Inhalt sezerniert wurde; außerdem war der TEWL erhöht. Dies könnte im Einklang mit den hier gezeigten Resultaten stehen. Das in LB-gespeichert vorliegende CDSN scheint semiquantitativ etwas geringer vorhanden zu sein als in Haut anderer Lokalisationen. Falls es zu einer Freisetzung des CDSN aus den LB am Übergang von SG zum SC

kommt, könnte der geringere Inhalt an CDSN bedeuten, dass weniger Desmoglea (Oji et al. 2010) gestärkt würden, und es vermutlich zu einer geringeren Anzahl von Corneodesmosomen kommen würde. Die kornealen Zell-Zell-Verbindungen wären also etwas schwächer. Die Sinnhaftigkeit einer solchen Regulation könnte darin liegen, dass eine Epidermis, die stetig von einer hohen Luftfeuchtigkeit umgeben ist, keiner hohen Gefahr ausgesetzt ist, auszutrocknen und damit weniger Prozesse zur Protektion der Hautbarriere initiiert werden müssen. Auch der erhöhte TEWL könnte eine Funktion haben: an intertriginösen Lokalisationen könnte dies Reibungskräfte mindern.

Letztlich fällt bei allen Präparaten auf, dass im SC keine Abnahme zu beobachten ist. Dies könnte auf zweierlei hindeuten; einerseits könnte es sein, dass sich das CDSN noch in den LB befindet, also nicht sezerniert wurde. Eine Proteolyse kann daher nicht stattfinden und führt so zu einem Nachweis im SC. Andererseits könnte dieser Umstand auch auf ein Fehlen von Proteasen im SC hindeuten, die das CDSN nach Freisetzung aus den LB abbauen.

Die Untersuchungen von Denda et al. implizieren, dass es in feuchter Umgebung zu einer geringeren LB-Sekretion kommt. Das spricht somit dafür, dass das im SC vorkommende CDSN in den gezeigten Hautschnitten aus den LB nicht sezerniert wurde.

Abschließend lässt sich aber aufgrund der gewählten Methodik nicht mit Sicherheit sagen, ob der positive Nachweis im SC durch eine fehlende Ausschüttung aus den LB oder durch einen ausbleibenden enzymatischen Abbau zu erklären ist.

Hierzu ist ein weiterer Aspekt erwähnenswert; Ishida-Yamamoto et al. untersuchten LB genauer und gehen davon aus, dass der vielfältige Inhalt der LB (unter anderem die Kallikreine 7 und 8 und deren Substrat CDSN) sequentiell synthetisiert und unabhängig voneinander im apikalen SG sezerniert wird. In-Vitro-Versuche konnten zeigen, dass das Kallikrein 7 bei einem pH-Wert von 5,6 sowohl CDSN, als auch DSC1 spalten kann (Anmerkung: das Kallikrein 7 kann seine Wirkung im Bereich von einem pH-Wert 5,5-8 entfalten (Lundström und Egelrud 1991)). In der Annahme, dass dieser Prozess auch in vivo geschieht, führt dies zu einem interessanten Szenario. Wie oben bereits diskutiert, ist unklar, ob das im SC nachgewiesene CDSN nun zytoplasmatisch vorliegt und nicht abgebaut werden konnte oder in LB gespeichert ist. Ausgehend davon, dass die hohe Umgebungsfeuchtigkeit eine Sekretion der LB zurückgehalten hat, würden

sowohl das CDSN, als auch das Kallikrein 7 nicht ausgeschüttet werden und es würde zu selbigen immunhistochemischen Ergebnissen führen.

Da die Sekretion jedoch sequentiell geschieht (Ovaere et al. 2009, 2009), wäre es auch möglich, dass lediglich das Kallikrein 7 nicht von den LB ausgeschüttet wird oder aufgrund von pH-Wert-Veränderungen nicht wirken kann und daher ein positiver Nachweis des CDSN im SC vorliegt. Auch hierbei würde die Immunhistochemie dasselbe Ergebnis zeigen.

Der Vollständigkeit halber muss hier erwähnt werden, dass von LB auch Inhibitoren von Kallikreinen, Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitors (LEKTI) ausgeschüttet werden. Diese werden zeitlich vor den Kallikreinen freigesetzt um ein vorzeitiges Wirken von Kallikreinen zu vermeiden. (Ishida-Yamamoto et al. 2005)

Im beginnendem SC herrschen neutrale pH-Werte von 6,8-7,5 (siehe Abbildung 23), bei denen LEKTI an den Kallikreinen gebunden vorliegen, sodass es noch zu keiner Corneodesmosomen-Spaltung kommt (Deraison et al. 2007). Im saurer werdendem SC mit pH-Werten von 4,5-5,3 (Deraison et al. 2007) das durch Filaggrin-Degradierung in NMF und Aminosäuren geschieht (Kezic et al. 2012) dissoziieren LEKTI und Kallikreine auseinander, sodass die Cadherine DSC1, DSG1 und CDSN gespalten werden können (Deraison et al. 2007).

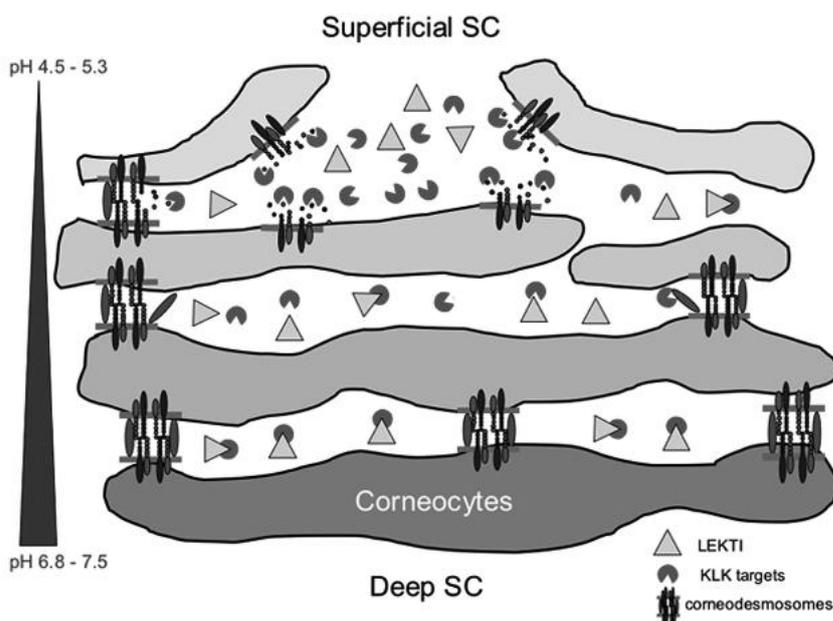


Abbildung 23 Schematische Darstellung des SC (Deraison et al. 2007)

Es scheint daher bei der Entwicklung einer GP bedeutsam, dass die Filaggrine in den Keratohyalingranula verbleiben und eine Ansäuerung des SC nicht stattfindet; daraus würde resultieren, dass es einerseits zu keiner Spaltung der Corneodesmosomen kommt, andererseits keine Kompaktierung der Korneozyten erfolgt, was eine Hyperkeratose provozieren würde.

Dieser Prozess hätte somit auch Einfluss auf das Cadherin DSC1.

Die Färbung des DSC1 zeigte in den genitalen Lokalisationen eine deutlich reduzierte oder nahezu gänzlich fehlende Nachweisbarkeit in der Epidermis, bis auf eine meist schmale, aber deutlich positive Anfärbbarkeit im SC. Anhand des angewandten Primärantikörpers (U100-Klon, siehe oben) lässt sich daraus schließen, dass es sich bei dem hier nachgewiesenen DSC1 im SC um eine nicht-prozessierte Form, also um das ursprüngliche Protein handelt. Dies lässt sich wie folgt interpretieren: die Expression bis zum SG scheint nicht oder kaum ausgeprägt zu sein, findet zudem wahrscheinlich verspätet statt und ein regelrechter Abbau des DSC1 im SC bleibt am ehesten aus.

Es ist bisher nicht bekannt, wie die Expression von DSC1 reguliert wird; denkbar wäre aber eine Steuerung durch externe Faktoren. Das Milieu der Intertrigines ist feuchter und einer größeren mechanischen Belastung durch kontinuierliche Reibung ausgesetzt als die Haut anderer Lokalisationen. Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass das äußere Milieu einen Einfluss auf die Expression haben könnte; beispielsweise in der verhornenden Mundschleimhaut, einer ähnlich feuchten und mechanisch beanspruchten Umgebung, wird kein DSC1 exprimiert (Donetti et al. 2005). Dies könnte einerseits den Hintergrund haben, dass die gelockerten Desmosomen im SC schneller abgebaut werden können und sich das Epithel so rascher erneuern kann. Gerade in mechanisch beanspruchten Arealen könnte ein hoher und schneller Turn-Over von Vorteil sein. Andererseits könnte die Epidermis mit schwächeren Desmosomen auch fragiler sein.

Die Epidermis von DSC1-Knock-out-Mäusen zeigte Akantholyse, Ausdruck der geschwächten Zell-Zell-Verbindung und Parakeratosen (Chidgey et al. 2001). Auch die hier untersuchten Präparate imponieren durch ähnliche Merkmale: parakeratotische Areale sowie fehlende Expression des DSC1 (zumindest bis zum Übergang ins SC). Das parallele Auftreten dieser Phänomene könnte bedeuten, dass ein Zusammenhang zwischen Zellkernabbau und der Expression von DSC1 besteht.

Beobachtungen an verhornter Mundschleimhaut könnten diese These stützen; es ist bekannt, dass dort kein DSC1 exprimiert wird und das Epithel an der Gingiva parakeratinisiert ist. Es ist jedoch unklar, wie der Zellkernabbau in der sich differenzierenden Epidermis eingeleitet wird und ob Abbauprodukte des DSC1 oder darin involvierte Vorgänge in Zusammenhang damit stehen.

Es wäre denkbar, dass bestimmte Faktoren, wie die Umgebungsfeuchtigkeit mehrere unterschiedliche Vorgänge beeinträchtigt: die Ausschüttung von LB und Degranulierung von Keratohyalin granula bleiben aus und leiten die abschließenden Prozesse einer sich enddifferenzierenden Epidermis nicht ein. Dadurch könnte eine Parakeratose in Assoziation mit einem nicht vorhandenen oder nicht ausgeschüttetem DSC1 auffallen.

Letztlich sind die Ergebnisse auch im Hinblick auf das Zusammenspiel von CDSN und DSC1 zu diskutieren. Wie bereits erwähnt, bindet das CDSN an die Desmoglea, extrazelluläre DSG1 und DSC1-Anteile (siehe Abbildung 24).

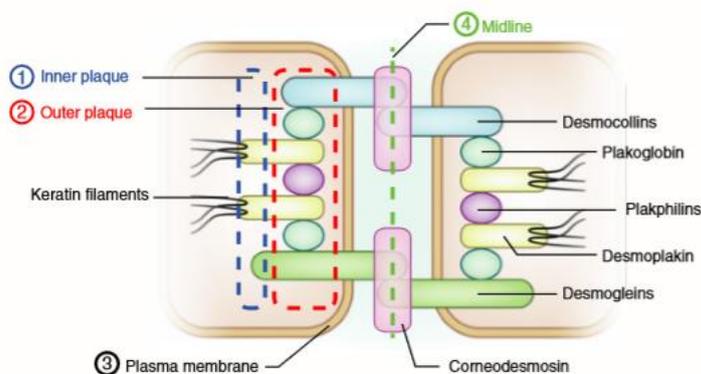


Abbildung 24 Corneodesmosom (Ishida-Yamamoto et al. 2018)

Im Inneren des Korneozyten (braun) findet man die Verbindung des Verankerungsproteins Plakoglobin mit den Keratin-Filamenten, wodurch die Zelle kompakter und starrer wird (1, blaue Umrandung). Über weitere Proteine werden Zell-Zell-Verbindungen zu den Desmocollinen und Desmogleinen nach außen geschaffen (2, rote Umrandung), die durch die Plasmamembran (3, schwarz) in die Mitte (4, grün) ragen. An die Desmocolline und Desmogleine binden am Übergang ins frühe SC Corneodesmosine und erhöhen so die Stabilität des Zellzusammenhalts (Ishida-Yamamoto et al. 2018)

Die oben genannten Ergebnisse zeigen in einem Großteil der Präparate eine deutlich reduzierte und verspätete Expression von DSC1. Es stellt sich also die Frage, inwiefern exprimiertes CDSN seine Funktion erfüllen kann, wenn es bei fehlendem DSC1 lediglich an das DSG1 binden kann. Unbekannt ist zudem, ob das Verhältnis von DSG1 zu DSC1, wie mehrere Graphiken suggerieren, auch in vivo 1:1 ist. Mit dieser Annahme

könnte rund die Hälfte des exprimierten CDSN - vorausgesetzt eine Ausschüttung aus den LB findet überhaupt statt - die Funktion zur Stabilisierung der Corneodesmosomen nicht erfüllen, da der „Bindungspartner“ fehlt.

Hervorzuheben ist darüber hinaus die Beobachtung, dass sich die größten Auffälligkeiten bezüglich der Expression der Cadherine CDSN und DSC1 bei den genitalen Lokalisationen zeigen. Während DSC1 bis zum basalen SC nicht oder kaum exprimiert wird, scheint auch die Expression des CDSN über die gesamte Epidermis herunterreguliert zu sein. Es entsteht der Eindruck, dass die Epidermis durch eine möglicherweise gezielte Regulation schwächere Zell-Zell-Verbindungen forciert. Die Desmosomen sind wahrscheinlich durch reduzierte Mengen an DSC1 bereits subkorneal geschwächt. Korneal ist jedoch unklar und anhand der hier erfolgten Untersuchungen nicht ersichtlich, ob das CDSN aus den LB ausgeschüttet wird und damit die Zell-Zell-Verbindungen stärkt, oder in den LB verbleibt und keine Corneodesmosomen entstehen. Letzteres könnte den Sinn haben, eine schnellere Desquamation zu ermöglichen und einen schnelleren Turn-Over zu erreichen.

Abschließend ist zu diskutieren, ob die Ergebnisse bezüglich der Cadherine CDSN und DSC1 eine Reaktion oder Anpassung an die intertriginöse Umgebung sind. Da die GP vorrangig intertriginös vorkommt, scheint dieses histologische Phänomen eher abhängig von der Lokalisation, als von der zugrunde liegenden „Erkrankung“ (Ekzem, Condylome etc.) zu sein. Interessant ist die daraus folgende Fragestellung, ob durch die externen Gegebenheiten eine GP entsteht, die dann ein Trigger für die Entwicklung von beispielsweise Ekzemen interpretiert werden muss oder die GP auf dem Boden vorbestehender Erkrankungen (mit) entsteht.

7.4 Einfluss von Schweiß

Schweiß könnte durch die Anhebung der Feuchtigkeit, als auch seinen sauren pH-Wert (Emrich und Oelert 1966) die Gegebenheiten für epidermale Prozesse im SC verändern.

Eine erhöhte Umgebungsfeuchtigkeit als möglicher Provokationsfaktor der Entstehung einer GP könnte einen entscheidenden Einfluss auf den epidermalen Zellzyklus haben. Ein feuchtes Milieu, wie es in den Intertriginen vorliegt, entsteht einerseits durch Okklusion, andererseits durch Schweiß. Diese Umgebung bedingt eine erhöhte Permeabilität des SC für Ionen, sodass es zu einer Veränderung des sauren pH-Werts zu

neutraleren Werten kommt (Elsner und Maibach 1990). Vermutlich ist diese Beobachtung erklärend, warum Intertrigines einen höheren pH-Wert als freie Haut aufweisen (Schmid-Wendtner und Korting 2006).

Des Weiteren gibt es in der Literatur Hinweise dafür, dass es zu einer geringeren Formation und Ausschüttung von LB bei hoher umgebender Feuchtigkeit kommt (Denda et al. 1998). Den größten Beitrag zur Herstellung eines sauren Milieus leisten die aus den LB stammenden sekretorischen Phospholipasen, die die Entstehung freier Fettsäuren enzymatisieren. Diese liegen in den LB gespeichert und werden physiologischerweise am Übergang zum SC ausgeschüttet. Auch die Filaggrin-Prozessierung in saure Aminosäuren trägt zum sauren pH-Wert des SC bei. (Freinkel und Traczyk 1983; Menon et al. 1985)

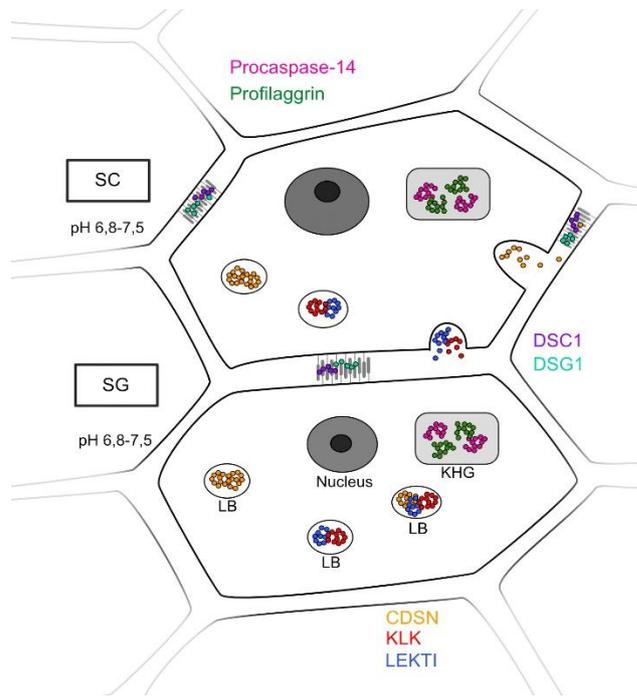
Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass Schweiß wahrscheinlich nicht etwa durch seinen sauren pH-Wert auf die Azidität des SC Einfluss nimmt, sondern durch die Kombination mit der Okklusion in Intertrigines und die konsekutive erhöhte Ionen-Permeabilität zu einer Verschiebung des pH-Werts zu neutraleren Werten im SC beiträgt. Dies kann letztlich auf pH-Wert-abhängige Prozesse (Kallikreine, LEKTI) der epidermalen Enddifferenzierung Einfluss nehmen.

7.5 Möglicher Mechanismus der Entstehung von granulärer Parakeratose

Alle bisher diskutierten Teil-Aspekte der möglichen GP-Entstehung lassen sich in einen gemeinsamen Kontext bringen; die erste Auffälligkeit der untersuchten Präparate in der klinischen Routine zeigen eine granuläre Akkumulation von (Pro-) Filaggrin im SC [in dieser Arbeit nicht gezeigt]. Es war bisher unklar, wie diese Beobachtung zu interpretieren sein könnte. Bei Ansicht der Caspase-14-Antikörperfärbung konnte in einigen Präparaten ebenfalls ein granulärer Aspekt der Akkumulation von (Pro-) Caspase-14 beobachtet werden. Dies legt nahe, dass sowohl das „granuläre (Pro-) Filaggrin“, als auch die „granuläre (Pro-) Caspase-14“ im SC im selben Zellkompartiment, den Keratohyalin granula, verbleiben. Dafür spricht auch der positive Nachweis beider Proteine bis in das höhere SC. Ein bisher unbekannter Mechanismus leitet physiologisch eine Ausschüttung der Keratohyalin granula am Übergang von SG zum SC ein, sodass im SC ein Abfall der nachweisbaren Epitope zu erwarten wäre, was jedoch in den untersuchten Präparaten nicht durchwegs zu verzeichnen ist. Diese Beobachtungen zusammen deuten darauf hin, dass die beiden Vorläufer-Proteine

Profilaggrin und Procaspa-14 in parakeratotischen Arealen nicht aus den Keratohyalingranula ausgeschüttet werden, was die Morphologie der GP erklären würde: die persistierenden Keratohyalingranula können mittels Filaggrin- oder Caspase-14-Antikörperfärbung durch ihren klumpigen oder *granulären* Aspekt im SC sichtbar gemacht werden. Die *Parakeratose*, also der Verbleib des Zellkerns, ließe sich auf die ausbleibende Profilaggrin-Prozessierung mit fehlender Freisetzung des N-Terminus mit Zellkernlokalisierungssignal zurückführen. Zwar ist in der Literatur nach wie vor unklar, welcher Vorgang zum Abbau des Nukleus führt, jedoch sprechen auch die hier gezeigten Ergebnisse dafür, dass es wahrscheinlich ist, dass die Prozessierung des Profilaggrins (und damit die Freisetzung der Kernlokalisierungssequenz im N-Terminus) den Zellkernabbau bewirkt. Die fehlende Filaggrin-Prozessierung könnte zudem zur Folge haben, dass durch die nicht entstehenden NMF und sauren Aminosäuren (siehe Kapitel 3.1) keine pH-Wert-Verschiebung vom basischem zum sauren Milieu im höherem SC erfolgt. Auch die intertriginöse Lokalisation kann durch Schweiß und Okklusion zu weniger sauren pH-Werten im SC beitragen (siehe Kapitel 7.4). Dieser Synergismus verursacht, dass zahlreiche Enzyme aus den LB nicht wirken können: gesetzt dem Fall, dass die LB ihren Inhalt ausschütten, würde durch wahrscheinlich basische pH-Werte im SC keine Dissoziation von Kallikreinen und LEKTI erfolgen können und folglich keine Degradierung von (Corneo-)Desmosomen. Dafür spräche die in den Präparaten nachgewiesene nicht-prozessierte ursprüngliche Form des DSC1 im SC.

Denkbar wäre jedoch ebenso, dass es durch die erhöhte Feuchtigkeit in intertriginösen Lokalisationen gar nicht erst zu einer LB-Ausschüttung kommt, sodass Corneodesmosomen aufgrund des fehlenden CDSN nicht entstehen würden. DSC1 könnte so durch die in LB retinierten Kallikreine nicht abgebaut werden und daher im SC in seiner Ursprungsform nachweisbar sein. Diese beiden Möglichkeiten werden in Abbildung 25 dargestellt.



Möglichkeit 1

LB werden ausgeschüttet

CDSN wird am Übergang SG/SC ausgeschüttet

- KLK und LEKTI sequenziell ebenso
- durch basischen pH im SC Inhibition der KLK durch LEKTI
- CDSN wird nicht abgebaut (= CDSN + im SC)
- DSC1 wird nicht abgebaut (= ursprüngliches DSC1 + im SC)

Möglichkeit 2

Hohe Umgebungsfeuchtigkeit

- LB-Produktion ↓
- DSC1-Expression ↓
- LB-Ausschüttung ↓ (= CDSN, KLK, LEKTI verbleiben in LB bis im SC)
- CDSN wird nicht ausgeschüttet und nicht abgebaut (= CDSN + im SC)
- DSC1 wird von KLK nicht abgebaut im SC (= ursprüngliches DSC1 + im SC)

Für beide Möglichkeiten geltend

Retention von Profilaggrin und Procaspase-14 in granulären KHG

(= Caspase-14 + im SC und SC > SG)

- Filaggrinprozessierung bleibt aus (= Filaggrin + im SC)
- Fehlende Freisetzung N-Terminus, kein Zellkernabbau (= Parakeratose)
- NMF-Produktion ↓ und saure Aminosäuren ↓
- pH-Wert basisch
- bei theoretisch vorheriger LB-Ausschüttung keine Dissoziation von LEKTI und KLK möglich
- kein Abbau von CDSN, DSC1 und DSG1 (= Verbleib von (Corneo-)Desmosomen = Hyperkeratose)

Abbildung 25 Mögliche Pathogenese der GP

Eine ausbleibende LB-Ausschüttung könnte auch auf einen erhöhten Calcium-Gehalt im Extrazellulärraum aufgrund einer verminderten Expression des VGCC, der das Calcium von extra- nach intrazellulär fließen lässt, zurückzuführen sein (siehe Kapitel 7.2).

Somit könnten theoretisch zwei Faktoren existieren, die eine LB-Ausschüttung beeinflussen: die Umgebungsfeuchtigkeit und die Calcium-Homöostase.

Möglicherweise ist aber auch die Expression von VGCC vom äußeren Milieu oder der Lokalisation abhängig und somit Teil eines zusammenhängenden Prozesses.

Letztlich sprechen die Ergebnisse und deren Interpretation dafür, dass die granuläre Parakeratose - in der Literatur häufig als axilläre granuläre Parakeratose betitelt - keineswegs nur als eigenständige Erkrankung zu sehen ist. Vielmehr scheint es, dass es sich hierbei um Veränderungen (meist) intertriginöser Haut handelt, die durch die äußerlichen Faktoren Okklusion und Feuchtigkeit entstehen und offensichtlich assoziiert zu anderen Erkrankungen, auftreten können. Dies deckt sich mit der klinischen Erfahrung, dass in diesen Körperregionen immer wieder unklare Erytheme

entstehen, die keiner Krankheit zugeordnet werden können, aber histologisch eine GP aufzeigen. Diesem Umstand könnte mit einer modifizierten Nomenklatur Rechnung getragen werden.

Granuläre Parakeratosen, die histologisch keiner weiteren anderen Erkrankung zuzuordnen sind, sollten als „primäre granuläre Parakeratose“ bezeichnet werden, histologische Krankheitsbilder hingegen, mit denen die granuläre Parakeratose assoziiert ist, könnten den Zusatz „sekundäre granuläre Parakeratose“ erhalten.

8. Zusammenfassung

Bisher sind in der Literatur vor allem Fälle von granulären Parakeratosen bekannt, die bei uneindeutiger Klinik durch eine Probebiopsie histologisch erkannt wurden. Häufig wurde die Diagnose einer - meist axillären – GP gestellt. Zudem herrscht Unsicherheit darüber, ob es sich hierbei um eine eigenständige Erkrankung handelt oder ein reaktives Phänomen.

Die GP imponiert histologisch durch intrazelluläre granuläre Ablagerungen im SC, einen Verbleib des Nukleus, auch Parakeratose genannt, sowie Hyperkeratosen. Immunhistochemisch zeigt sich Filaggrin in allen Präparaten im SC als „klumpig“ oder „granulär“ eingelagert.

Ziel der Untersuchungen war es, mögliche Erklärungen für diese Auffälligkeiten zu finden und daraus eine Pathogenese abzuleiten.

In dieser Arbeit ist es gelungen sich der möglichen Pathogenese des histologischen Phänomens der GP zu nähern. Untersucht wurden Hautschnitt-Präparate, die in der klinischen Diagnostik nebenbefundlich eine GP zu den Erkrankungen Zysten, intertriginöse Ekzeme und Condylome zeigten. Die Methodik beruht auf immunhistochemischen Färbungen von Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten histologischen Präparaten mit Antikörpern gegen Caspase-14, VGCC, DSC1 und CDSN.

Von Interesse war das Enzym Caspase-14, da es – wie das Filaggrin – in Keratohyalingranula gespeichert vorliegt und physiologischerweise am Übergang vom SG zum SC ausgeschüttet wird, wo es an der Prozessierung des Filaggrins mitwirkt. Des Weiteren wurde ein bisher wenig erforschter Calcium-Kanal, der VGCC,

immunohistochemisch untersucht, der durch einen intrazellulären Calcium-Anstieg durch Calcium-Influx Konformationsänderungen an Proteinen, als auch Aktivierungen von Enzymen bewirken kann und somit wahrscheinlich einen wichtigen Stellenwert im epidermalen Zellzyklus hat. Zusätzlich wurden die Cadherine DSC1 und CDSN in den Präparaten immunohistochemisch gefärbt um deren Expressionsmuster aufzuzeigen und Aspekte der Zell-Zell-Kontakte im Kontext der GP bei vorliegender Hyperkeratose zu beleuchten.

Die Caspase-14-Antikörper-Färbungen zeigt vor allem in den von Parakeratose betroffenen Abschnitten der Epidermis eine deutliche Anhäufung der Epitope im SC, gepaart mit einem granulären Aspekt, was den Eindruck einer Persistenz der Procaspase-14 in den Keratohyalin-Granula erweckt. Durch eine ausbleibende Ausschüttung der Keratohyalin-Granula kommt es ebenso zu einer Retention des Profilaggrins. Hierdurch findet keine Prozessierung des Filaggrins statt, sodass weder der N-Terminus mit Kernlokalisierungssequenz, der am Abbau des Nukleus beteiligt zu sein scheint, freigesetzt wird, noch eine Aufspaltung des Filaggrins in NMF und Aminosäuren erfolgt. Folglich bleibt der Zellkern bestehen, die intrinsische Ansäuerung des SC kann nicht erfolgen, was pH-wirksame Proteasen funktionell beeinträchtigt (siehe unten). Zudem gelingt eine Kompaktierung, also Abflachung der Zellen im SC nicht vollständig, was sich letztlich in einer Hyperkeratose widerspiegelt.

Der VGCC ist in allen Präparaten nachweisbar, sodass die Existenz dieses Kanals in der Epidermis bestätigt wird. In intertriginösen Lokalisationen scheint die Anzahl der Epitope allerdings reduziert, sodass es einerseits zu einem nicht ausreichend hohen Calciumgehalt intrazellulär, andererseits zu einem höherem Calciumspiegel extrazellulär kommen könnte. Dies könnte zur Folge haben, dass LB ihren Inhalt nicht freisetzen und somit Proteine, wie das CDSN und Enzyme, wie Kallikreine, nicht physiologisch funktionieren. In den Keratinozyten würde der Calcium-Mangel den Abbau von (Pro-)Filaggrin durch Calcium-abhängige Enzyme behindern, was eine Störung der Zellkompaktierung verursacht und eine Bereitstellung von NMF und Ansäuerung des SC verhindert.

Die Cadherine DSC1 und CDSN wurden immunohistochemisch visualisiert um deren Expressionsmuster und den möglichen Einfluss auf Zell-Zell-Kontakte bei vorliegender Hyperkeratose zu überprüfen.

Das CDSN wird bereits ab den basalen Anteilen des SS exprimiert, was möglicherweise etwas früher als in der Literatur angegeben geschieht, aber in der als physiologisch erachteten Zellschicht. Da es in LB gespeichert vorliegt, ist ein Wirken ohne Freisetzung des Proteins ohnehin nicht möglich und hat demnach am ehesten keine Folgen für den epidermalen Zellzyklus. Die Persistenz des CDSN bis ins SC kann entweder durch eine nicht erfolgte Freisetzung aus den LB oder einen ausbleibenden Abbau durch entsprechende Enzyme bedingt sein. Zudem zeigen die Präparate aus genitaler Lokalisation eine geringere Epitopdichte, suggerieren also eine Down-Regulation. Dies würde zu den Beobachtungen von Denda et al. passen, die eine verminderte LB-Produktion bei hoher Umgebungsfeuchtigkeit aufzeigen.

Die Expression des DSC1 zeigt sich bis zum Übergang von SG zum SC schwach und verspätet. Möglicherweise ist dies ebenfalls Ausdruck einer Down-Regulation und soll im Sinne eines höheren Turn-Overs die Zell-Zell-Kontakte lockern, in Anlehnung an die Vermutung, dass Mundschleimhaut aus diesem Grund keine Expression von DSC1 aufweist. Auffallend ist zudem der deutlich positive Nachweis im (teils apikalen) SC, was bei dem hier angewandten Klon für ein nicht abgebautes DSC1 spricht und damit eine Besonderheit darstellt. Dies impliziert, dass die das DSC1-abbauenden Proteasen KLK 5 und 7 entweder nicht aus den LB ausgeschüttet werden und/oder eine Dissoziierung von ihren Inhibitoren (LEKTI) nicht erfolgt, sodass kein Abbau stattfinden kann. Die Trennung der Kallikreine von den LEKTI ist pH-Wert abhängig und geschieht im sauren Milieu. Aufgrund der bei der GP im Verdacht stehenden ausbleibenden Filaggrin-Prozessierung ist eine Ansäuerung des (höheren) SC durch NMF und Aminosäuren möglicherweise nicht gewährleistet. Zudem kommt hinzu, dass der pH-Wert des SC auch extrinsisch durch Schweiß und Okklusion (siehe Kapitel 7.4) beeinflusst wird und eine ausbleibende Ansäuerung verursacht, sodass die Gegebenheiten durchaus eine fehlende Dissoziierung der Kallikreine von LEKTI bedingen könnten.

Die Pathogenese der GP scheint somit ein aus vielen zusammenhängenden Prozessen bestehender Mechanismus zu sein, der synergistisch in eine gemeinsame Endstrecke zu münden scheint.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich unter Berücksichtigung des bekannten Wissens folgende Hypothese zur Pathogenese der GP ableiten: Okklusion und eine hohe Umgebungsfeuchtigkeit werden, vor allem in intertriginösen

Lokalisationen, als Provokationsfaktoren vermutet. Das feuchte Milieu scheint die Produktion und Ausschüttung von LB am Übergang vom SG zum SC zu vermindern. Eine reduzierte Expression von VGCC erhöht einerseits die extrazelluläre Calcium-Konzentration, was die LB-Ausschüttung hemmt und andererseits einen niedrigen intrazellulären Calcium-Gehalt bewirkt, sodass Calcium-abhängige Prozesse, wie der Filaggrin-Abbau behindert werden. Zudem wird die Ausschüttung von Keratohyalin granula durch einen niedrigen zytosolischen Calciumspiegel wahrscheinlich ebenfalls beeinträchtigt.

Durch die gehemmte LB-Ausschüttung verbleibt CDSN in seinem Speicher und kann Desmosomen nicht zu Corneodesmosomen stärken. Die ebenfalls retinierten Kallikreine können die Desmoglea (DSC1 und DSG1) im Verlauf des SC nicht abbauen, sodass eine Hyperkeratose resultiert. Da DSC1 aber nur schwach exprimiert wird, sind die Desmosomen strukturell vermutlich ohnehin schwächer.

Intrazellulär erfolgt am Übergang vom SG zum SC keine Degranulierung von Keratohyalin granula, sodass Profilaggrin und Procaspase-14 nicht im Zytosol wirken können und bis ins SC fortbestehen. Das Profilaggrin wird daher nicht prozessiert, was dazu führt, dass keine Zellkompaktierung, kein Zellkernabbau und keine Herstellung von NMF geschieht. Dies hat eine Hyperparakeratose mit granulärem Aspekt und einen Verbleib des Nukleus zur Folge.

9. Abkürzungsverzeichnis

CDSN	Corneodesmosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC2	Desmocollin-2
DSC1	Desmocollin-1
DSC3	Desmocollin-3
DSG1	Desmoglein-1
ENaC	epithelialer Natrium-Kanal
GP	Granuläre Parakeratose
HAI-1	hepatocyte growth factor activator inhibitor
KIF	Keratinintermediärfilamente
LB	lamellar bodies
LEKTI	Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor
NMF	natural moisturizing factors
PAD	Peptidylarginin-Deiminasen
PCR	polymerase chain reaction
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SG	Stratum granulosum
SS	Stratum spinosum
TEWL	transepidermal water loss
TG	Transglutaminasen
UCA	urocanic acid
VGCC	voltage-gated calcium channel

10. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1	AXILLÄRE GRANULÄRE PARAKERATOSE (SCHEINFELD UND MONES 2005)	6
ABBILDUNG 2	INTERTRIGO SUBMAMMÄR (PLEWIG ET AL. 2018)	8
ABBILDUNG 3	EPIDERMALZyste (PLEWIG UND BRAUN-FALCO 2012)	9
ABBILDUNG 4	CONDYLOMATA ACUMINATA (PLEWIG ET AL.)	10
ABBILDUNG 5	FILAGGRIN-GEN MIT 3 EXONS (BROWN UND MCLEAN, W H IRWIN 2012)	12
ABBILDUNG 6	PROFILAGGRIN-PROZESSIERUNG (SANDILANDS ET AL. 2009)	14
ABBILDUNG 7	ZUSAMMENSPIEL VON PRO-FILAGGRIN UND PROCASPASE-14 (ECKHART UND TSCHACHLER 2011)	19
ABBILDUNG 8	CASPASE-14 EXPRESSION (DENECKER ET AL. 2008)	20
ABBILDUNG 9	VGCC SCHEMATISCH DARGESTELLT (TAKAHASHI ET AL. 1987)	25
ABBILDUNG 10	ENAC-VGCC-SIGNALKASKADE (OVAERE ET AL. 2009)	28
ABBILDUNG 11	DESMOSOMEN UND CORNEODESMOSOMEN (ISHIDA-YAMAMOTO UND IGAWA 2015)	33
ABBILDUNG 12	CASPASE-14, PRÄPARAT 4, ORIGINALAUFNAHME: 1:400, AUSSCHNITT	47
ABBILDUNG 13	CASPASE-14, PRÄPARAT 6, ORIGINALAUFNAHME 1:200, AUSSCHNITT	48
ABBILDUNG 14	CASPASE-14, NORMALHAUT, ORIGINALAUFNAHME 1:100, AUSSCHNITT	48
ABBILDUNG 15	VGCC, PRÄPARAT 2, ORIGINALAUFNAHME 1:400, AUSSCHNITT	50
ABBILDUNG 16	VGCC, NORMALHAUT, ORIGINALAUFNAHME 1:200, AUSSCHNITT	50
ABBILDUNG 17	VGCC, PRÄPARAT 3, ORIGINALAUFNAHME 1:400, AUSSCHNITT	51

ABBILDUNG 18	DSC1, PRÄPARAT 3, ORIGINALAUFNAHME 1:400, AUSSCHNITT	52
ABBILDUNG 19	DSC1, NORMALHAUT, ORIGINALAUFNAHME 1:200, AUSSCHNITT.....	53
ABBILDUNG 20	CDSN, PRÄPARAT 6, ORIGINALAUFNAHME 1:400, AUSSCHNITT	54
ABBILDUNG 21	CDSN, NORMALHAUT, ORIGINALAUFNAHME 1:100, AUSSCHNITT	55
ABBILDUNG 22	CASPASE-14, PRÄPARAT 6, ORIGINALAUFNAHME 1:400, AUSSCHNITT.....	57
ABBILDUNG 23	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES SC (DERAISON ET AL. 2007).....	63
ABBILDUNG 24	CORNEODESMOSOM (ISHIDA-YAMAMOTO ET AL. 2018).....	65
ABBILDUNG 25	MÖGLICHE PATHOGENESE DER GP.....	69

11. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1	GERÄTE.....	39
TABELLE 2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	40
TABELLE 3	REAGENZIEN.....	40
TABELLE 4	LÖSUNGEN.....	41
TABELLE 5	PRIMÄRANTIKÖRPER	42
TABELLE 6	SYMBOL-BEZEICHNUNGEN FÜR DAS FÄRBEVERHALTEN.....	45
TABELLE 7	CASPASE-14-ANTIKÖRPER-FÄRBUNG.....	46
TABELLE 8	VGCC-ANTIKÖRPER-FÄRBUNG	49
TABELLE 9	DSC1-ANTIKÖRPER-FÄRBUNG.....	52
TABELLE 10	CDSN-ANTIKÖRPER-FÄRBUNG	54

12. Literaturverzeichnis

Akkaya, A. Deniz; Oram, Yasemin; Aydın, Özlem (2015): Infantile Granular Parakeratosis. Cytologic Examination of Superficial Scrapings as an Aid to Diagnosis. In: *Pediatric dermatology* 32 (3), S. 392–396. DOI: 10.1111/pde.12444.

Alibardi, Lorenzo; Tschachler, Erwin; Eckhart, Leopold (2005): Distribution of caspase-14 in epidermis and hair follicles is evolutionarily conserved among mammals. In: *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 286 (2), S. 962–973. DOI: 10.1002/ar.a.20234.

Allen, M.; Ishida-Yamamoto, A.; McGrath, J.; Davison, S.; Iizuka, H.; Simon, M. et al. (2001): Corneodesmosin expression in psoriasis vulgaris differs from normal skin and other inflammatory skin disorders. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 81 (7), S. 969–976.

- Altmeyer (Hg.): Altmeyers Enzyklopädie. Online verfügbar unter <https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/photokarzinogenese-15608>, zuletzt geprüft am 15.09.2017.
- Arnemann, J.; Sullivan, K. H.; Magee, A. I.; King, I. A.; Buxton, R. S. (1993): Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. In: *Journal of Cell Science* 104 (Pt 3), S. 741–750. DOI: 10.1242/jcs.104.3.741.
- Brandner, Johanna M.; Haftek, Marek; Niessen, Carien M. (2010): Adherens Junctions, Desmosomes and Tight Junctions in Epidermal Barrier Function. In: *TODJ* 4 (1), S. 14–20. DOI: 10.2174/1874372201004010014.
- Brown, Sara J.; McLean, W H Irwin (2012): One remarkable molecule: filaggrin. In: *The Journal of investigative dermatology* 132 (3 Pt 2), S. 751–762. DOI: 10.1038/jid.2011.393.
- Catterall, William A. (2011): Voltage-Gated Calcium Channels. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (8). DOI: 10.1101/cshperspect.a003947.
- Celli, A.; Sanchez, S.; Behne, M.; Hazlett, T.; Gratton, E.; Mauro, T. (2010): The epidermal Ca(2+) gradient: Measurement using the phasor representation of fluorescent lifetime imaging. In: *Biophysical journal* 98 (5), S. 911–921. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.10.055.
- Chang, Mary Wu; Kaufmann, Julie M.; Orlow, Seth J.; Cohen, David E.; Mobini, Narciss; Kamino, Hideko (2004): Infantile granular parakeratosis: recognition of two clinical patterns. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 50 (5 Suppl), S93-6. DOI: 10.1016/S0190.
- Channual, Jennifer; Fife, Douglas J.; Wu, Jashin J. (2013): Axillary granular parakeratosis. In: *Cutis* 92 (2), 61, 65-6.
- Chidgey, M.; Brakebusch, C.; Gustafsson, E.; Cruchley, A.; Hail, C.; Kirk, S. et al. (2001): Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. In: *The Journal of cell biology* 155 (5), S. 821–832. DOI: 10.1083/jcb.200105009.
- Chien, Andy J.; Presland, Richard B.; Kuechle, Melanie K. (2002): Processing of native caspase-14 occurs at an atypical cleavage site in normal epidermal differentiation. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296 (4), S. 911–917. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)02015-6.
- Denda, M.; Sato, J.; Masuda, Y.; Tsuchiya, T.; Koyama, J.; Kuramoto, M. et al. (1998): Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function. In: *J Invest Dermatol* 111 (5), S. 858–863. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00333.x.
- Denda, Mitsuhiro; Fujiwara, Shigeyoshi; Hibino, Toshihiko (2006): Expression of voltage-gated calcium channel subunit alpha1C in epidermal keratinocytes and effects of agonist and antagonists of the channel on skin barrier homeostasis. In: *Experimental dermatology* 15 (6), S. 455–460. DOI: 10.1111/j.0906-6705.2006.00430.x.

- Denecker, Geertrui; Hoste, Esther; Gilbert, Barbara; Hochepped, Tino; Ovaere, Petra; Lippens, Saskia et al. (2007): Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. In: *Nature cell biology* 9 (6), S. 666–674. DOI: 10.1038/ncb1597.
- Denecker, Geertrui; Ovaere, Petra; Vandenabeele, Peter; Declercq, Wim (2008): Caspase-14 reveals its secrets. In: *The Journal of cell biology* 180 (3), S. 451–458. DOI: 10.1083/jcb.200709098.
- Deraison, Celine; Bonnart, Chrystelle; Lopez, Frederic; Besson, Celine; Robinson, Ross; Jayakumar, Arumugam et al. (2007): LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. In: *Molecular biology of the cell* 18 (9), S. 3607–3619. DOI: 10.1091/mbc.e07-02-0124.
- Donetti, Elena; Bedoni, Marzia; Boschini, Elena; Dellavia, Claudia; Barajon, Isabella; Gagliano, Nicoletta (2005): Desmocollin 1 and desmoglein 1 expression in human epidermis and keratinizing oral mucosa. A comparative immunohistochemical and molecular study. In: *Archives of dermatological research* 297 (1), S. 31–38. DOI: 10.1007/s00403-005-0573-9.
- DSC1 desmocollin 1 [Homo sapiens (human)] (2024). Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1823>, zuletzt aktualisiert am 17.06.2024, zuletzt geprüft am 07.08.2024.
- Eckhart, Leopold; Declercq, Wim; Ban, Jozef; Rendl, Michael; Lengauer, Barbara; Mayer, Christoph et al. (2000): Terminal Differentiation of Human Keratinocytes and Stratum Corneum Formation is Associated with Caspase-14 Activation. In: *J Invest Dermatol* 115 (6), S. 1148–1151. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00205.x.
- Eckhart, Leopold; Tschachler, Erwin (2011): Cuts by Caspase-14 Control the Proteolysis of Filaggrin. In: *J Invest Dermatol* 131 (11), S. 2173–2175. DOI: 10.1038/jid.2011.282.
- Elias, Peter M.; Ahn, Sung K.; Denda, Mitsuhiro; Brown, Barbara E.; Crumrine, Debra; Kimutai, Llewellyn K. et al. (2002a): Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. In: *The Journal of investigative dermatology* 119 (5), S. 1128–1136. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.19512.x.
- Elias, PeterM; Ahn, SungK; Brown, BarbaraE; Crumrine, Debra; Feingold, Kenneth R. (2002b): Origin of the epidermal calcium gradient: regulation by barrier status and role of active vs passive mechanisms. In: *The Journal of investigative dermatology* 119 (6), S. 1269–1274. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.19622.x.
- Elsner, P.; Maibach, H. I. (1990): The effect of prolonged drying on transepidermal water loss, capacitance and pH of human vulvar and forearm skin. In: *Acta dermato-venereologica* 70 (2), S. 105–109.
- Emrich, Hinderk M.; Oelert, Hellmut (1966): pH-Wert und Gesamtammoniak im menschlichen Schweiß. In: *Pflügers Archiv* 290 (4), S. 311–314. DOI: 10.1007/BF00363309.

- Fallon, Padraic G.; Sasaki, Takashi; Sandilands, Aileen; Campbell, Linda E.; Saunders, Sean P.; Mangan, Niamh E. et al. (2009): A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. In: *Nature genetics* 41 (5), S. 602–608. DOI: 10.1038/ng.358.
- Feingold, Kenneth R. (2012): Lamellar bodies: the key to cutaneous barrier function. In: *The Journal of investigative dermatology* 132 (8), S. 1951–1953. DOI: 10.1038/jid.2012.177.
- Forslind, B.; Werner-Linde, Y.; Lindberg, M.; Pallon, J. (1999): Elemental analysis mirrors epidermal differentiation. In: *Acta dermato-venereologica* 79 (1), S. 12–17. DOI: 10.1080/000155599750011624.
- Freinkel, R. K.; Traczyk, T. N. (1983): Acid hydrolases of the epidermis: subcellular localization and relationship to cornification. In: *J Invest Dermatol* 80 (5), S. 441–446. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12555534.
- Furio, Laetitia; Pampalakis, Georgios; Michael, Iacovos P.; Nagy, Andras; Sotiropoulou, Georgia; Hovnanian, Alain (2015): KLK5 Inactivation Reverses Cutaneous Hallmarks of Netherton Syndrome. In: *PLoS genetics* 11 (9), e1005389. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005389.
- Gan, S. Q.; McBride, O. W.; Idler, W. W.; Markova, N.; Steinert, P. M. (1990): Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. In: *Biochemistry* 29 (40), S. 9432–9440.
- Grubauer, G.; Elias, P. M.; Feingold, K. R. (1989): Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. In: *Journal of lipid research* 30 (3), S. 323–333. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2723540/>.
- Hoste, E.; Denecker, G.; Gilbert, B.; van Nieuwerburgh, F.; van der Fits, L.; Asselbergh, B. et al. (2013): Caspase-14-deficient mice are more prone to the development of parakeratosis. In: *The Journal of investigative dermatology* 133 (3), S. 742–750. DOI: 10.1038/jid.2012.350.
- Hoste, Esther; Kemperman, Patrick; Devos, Michael; Denecker, Geertrui; Kezic, Sanja; Yau, Nico et al. (2011): Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin. In: *The Journal of investigative dermatology* 131 (11), S. 2233–2241. DOI: 10.1038/jid.2011.153.
- Ishida-Yamamoto, Akemi; Deraison, Céline; Bonnart, Chrystelle; Bitoun, Emmanuelle; Robinson, Ross; O'Brien, Timothy J. et al. (2005): LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. In: *J Invest Dermatol* 124 (2), S. 360–366. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.23583.x.
- Ishida-Yamamoto, Akemi; Igawa, Satomi (2015): The biology and regulation of corneodesmosomes. In: *Cell and tissue research* 360 (3), S. 477–482. DOI: 10.1007/s00441-014-2037-z.
- Ishida-Yamamoto, Akemi; Igawa, Satomi; Kishibe, Mari; Honma, Masaru (2018): Clinical and molecular implications of structural changes to desmosomes and corneodesmosomes. In: *The Journal of dermatology* 45 (4), S. 385–389. DOI: 10.1111/1346-8138.14202.
- Ishida-Yamamoto, Akemi; Senshu, Tatsuo; Eady, Robin A.J.; Takahashi, Hidetoshi; Shimizu, Hiroshi; Akiyama, Masashi; Iizuka, Hajime (2002): Sequential Reorganization of Cornified Cell Keratin Filaments

Involving Filaggrin-Mediated Compaction and Keratin 1 Deimination. In: *J Invest Dermatol* 118 (2), S. 282–287. DOI: 10.1046/j.0022-202x.2001.01671.x.

Ishida-Yamamoto, Akemi; Simon, Michel; Kishibe, Mari; Miyauchi, Yuki; Takahashi, Hidetoshi; Yoshida, Shigetaka et al. (2004): Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. In: *J Invest Dermatol* 122 (5), S. 1137–1144. DOI: 10.1111/j.0022-202X.2004.22515.x.

Jaconelli, Laure; Doebelin, Bénédicte; Kanitakis, Jean; Saïd, Benoît Ben; Faure, Michel; Claudy, Alain (2008): Granular parakeratosis in a patient treated with liposomal doxorubicin for ovarian carcinoma. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 58 (5 Suppl 1), S84-7. DOI: 10.1016/j.jaad.2007.05.031.

Jelen, Mateja M.; Chen, Ziguï; Kocjan, Boštjan J.; Burt, Felicity J.; Chan, Paul K. S.; Chouhy, Diego et al. (2014): Global genomic diversity of human papillomavirus 6 based on 724 isolates and 190 complete genome sequences. In: *Journal of virology* 88 (13), S. 7307–7316. DOI: 10.1128/JVI.00621-14.

Kazem, Siamaque; van der Meijden, Els; Struijk, Linda; Gruijl, Frank R. de; Feltkamp, Mariet C. W. (2012): Human papillomavirus 8 E6 disrupts terminal skin differentiation and prevents pro-Caspase-14 cleavage. In: *Virus research* 163 (2), S. 609–616. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.12.015.

Kezic, Sanja; O'Regan, Gráinne M.; Lutter, René; Jakasa, Ivone; Koster, Ellen S.; Saunders, Sean et al. (2012): Filaggrin loss-of-function mutations are associated with enhanced expression of IL-1 cytokines in the stratum corneum of patients with atopic dermatitis and in a murine model of filaggrin deficiency. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (4), 1031-1039.e1. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.12.989.

Lee, S. H.; Elias, P. M.; Feingold, K. R.; Mauro, T. (1994): A role for ions in barrier recovery after acute perturbation. In: *J Invest Dermatol* 102 (6), S. 976–979. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12384225.

Lee, S. H.; Elias, P. M.; Proksch, E.; Menon, G. K.; Mao-Quiang, M.; Feingold, K. R. (1992): Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. In: *The Journal of clinical investigation* 89 (2), S. 530–538. DOI: 10.1172/JCI115617.

Lee, Sang Eun; Lee, Seung Hun (2018): Skin Barrier and Calcium. In: *Annals of dermatology* 30 (3), S. 265–275. DOI: 10.5021/ad.2018.30.3.265.

Lundström, A.; Egelrud, T. (1991): Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. In: *Acta dermato-venereologica* 71 (6), S. 471–474. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1685827/>.

Markova, N. G.; Marekov, L. N.; Chipev, C. C.; Gan, S. Q.; Idler, W. W.; Steinert, P. M. (1993): Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. In: *Mol. Cell. Biol.* 13 (1), S. 613–625. DOI: 10.1128/MCB.13.1.613.

Mascia, Francesca; Denning, Mitchell; Kopan, Raphael; Yuspa, Stuart H. (2012): The black box illuminated: signals and signaling. In: *The Journal of investigative dermatology* 132 (3 Pt 2), S. 811–819. DOI: 10.1038/jid.2011.406.

McKinley-Grant, L. J.; Idler, W. W.; Bernstein, I. A.; Parry, D. A.; Cannizzaro, L.; Croce, C. M. et al. (1989): Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (13), S. 4848–4852.

Mechin, M. C.; Enji, M.; Nachat, R.; Chavanas, S.; Charveron, M.; Ishida-Yamamoto, A. et al. (2005): The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (17), S. 1984–1995. DOI: 10.1007/s00018-005-5196-y.

Menon, G. K.; Elias, P. M.; Lee, S. H.; Feingold, K. R. (1992a): Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of the permeability barrier. In: *Cell and tissue research* 270 (3), S. 503–512. DOI: 10.1007/BF00645052.

Menon, G. K.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. (1992b): Lamellar body secretory response to barrier disruption. In: *J Invest Dermatol* 98 (3), S. 279–289. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12497866.

Menon, Gopinathan K.; Grayson, Stephen; Elias, Peter M. (1985): Ionic Calcium Reservoirs in Mammalian Epidermis: Ultrastructural Localization by Ion-Capture Cytochemistry. In: *J Invest Dermatol* 84 (6), S. 508–512. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12273485.

North, A. J.; Chidgey, M. A.; Clarke, J. P.; Bardsley, W. G.; Garrod, D. R. (1996): Distinct desmocollin isoforms occur in the same desmosomes and show reciprocally graded distributions in bovine nasal epidermis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (15), S. 7701–7705.

Northcutt, A. D.; Nelson, D. M.; Tschen, J. A. (1991): Axillary granular parakeratosis. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 24 (4), S. 541–544.

Oji, Vinzenz; Eckl, Katja-Martina; Aufenvenne, Karin; Nätebus, Marc; Tarinski, Tatjana; Ackermann, Katharina et al. (2010): Loss of corneodesmosin leads to severe skin barrier defect, pruritus, and atopy: unraveling the peeling skin disease. In: *American journal of human genetics* 87 (2), S. 274–281. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.07.005.

O'Regan, Grainne M.; Sandilands, Aileen; McLean, W. H. Irwin; Irvine, Alan D. (2009): Filaggrin in atopic dermatitis. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 124 (3 Suppl 2), R2-6. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.07.013.

Ovaere, Petra; Lippens, Saskia; Vandenabeele, Peter; Declercq, Wim (2009): The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. In: *Trends in biochemical sciences* 34 (9), S. 453–463. DOI: 10.1016/j.tibs.2009.08.001.

Plewig, Gerd; Braun-Falco, Otto (Hg.) (2012): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Mit 341 Tabellen. 6., überarb. und erw. Aufl. Berlin: Springer.

Plewig, Gerd; Ruzicka, Thomas; Kaufmann, Roland; Hertl, Michael (2018): Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Presland, R. B.; Kimball, JR; Kautsky, M. B.; Lewis, S. P.; Lo CY; Dale, B. A. (1997): Evidence for specific proteolytic cleavage of the N-terminal domain of human profilaggrin during epidermal differentiation. In: *The Journal of investigative dermatology* 108 (2), S. 170–178.
- Presland, Richard B.; Bassuk, James A.; Kimball, Janet K.; Dale, Beverly A. (1995): Characterization of Two Distinct Calcium-Binding Sites in the Amino-Terminus of Human Profilaggrin. In: *Journal of Investigative Dermatology* 104 (2), S. 218–223. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12612770.
- Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R. (2008): Biochemie. 2., aktualisierte Auflage: Thieme.
- Rawlings, A. V.; Harding, C. R. (2004): Moisturization and skin barrier function. In: *Dermatol Ther* 17 (s1), S. 43–48. DOI: 10.1111/j.1396-0296.2004.04S1005.x.
- Sandilands, Aileen; Sutherland, Calum; Irvine, Alan D.; McLean, W H Irwin (2009): Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. In: *Journal of Cell Science* 122 (Pt 9), S. 1285–1294. DOI: 10.1242/jcs.033969.
- Sandilands, Aileen; Terron-Kwiatkowski, Ana; Hull, Peter R.; O'Regan, Grainne M.; Clayton, Timothy H.; Watson, Rosemarie M. et al. (2007): Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. In: *Nature genetics* 39 (5), S. 650–654. DOI: 10.1038/ng2020.
- Scheinfeld, Noah S.; Mones, Joan (2005): Granular parakeratosis: pathologic and clinical correlation of 18 cases of granular parakeratosis. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 52 (5), S. 863–867. DOI: 10.1016/j.jaad.2004.12.031.
- Schmid-Wendtner, M-H; Korting, H. C. (2006): The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. In: *Skin pharmacology and physiology* 19 (6), S. 296–302. DOI: 10.1159/000094670.
- Scott, I. R.; Harding, C. R. (1986): Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. In: *Developmental biology* 115 (1), S. 84–92. DOI: 10.1016/0012-1606(86)90230-7.
- Serre, Guy; Mils, Valérie; Haftek, Marek; Vincent, Christian; Croute, Françoise; Réano, Alain et al. (1991): Identification of Late Differentiation Antigens of Human Cornified Epithelia, Expressed in Re-Organized Desmosomes and Bound to Cross-Linked Envelope. In: *J Invest Dermatol* 97 (6), S. 1061–1072. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12492589.
- Simon, Michel; Montézin, Martine; Guerrin, Marina; Durieux, Jean-Jacques; Serre, Guy (1997): Characterization and Purification of Human Corneodesmosin, an Epidermal Basic Glycoprotein Associated with Corneocyte-specific Modified Desmosomes. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (50), S. 31770–31776. DOI: 10.1074/jbc.272.50.31770.
- Sprecher, E.; Ishida-Yamamoto, A.; Becker, O. M.; Marekov, L.; Miller, C. J.; Steinert, P. M. et al. (2001): Evidence for novel functions of the keratin tail emerging from a mutation causing ichthyosis hystrix. In: *The Journal of investigative dermatology* 116 (4), S. 511–519. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2001.01292.x.

Steinert, P. M.; Mack, J. W.; Korge, B. P.; Gan, S. Q.; Haynes, S. R.; Steven, A. C. (1991): Glycine loops in proteins. Their occurrence in certain intermediate filament chains, loricroins and single-stranded RNA binding proteins. In: *International journal of biological macromolecules* 13 (3), S. 130–139.

Striessnig, Jörg (2016): Voltage-gated calcium channels – from basic mechanisms to disease. In: *The Journal of Physiology* 594 (20), S. 5817–5821. DOI: 10.1113/JP272619.

Suchi, Mariko; Harada, Nobuhiro; Wada, Yoshiro; Takagi, Yasuyuki (1993): Molecular cloning of a cDNA encoding human histidase. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1216 (2), S. 293–295. DOI: 10.1016/0167-4781(93)90157-9.

Takahashi, M.; Seagar, M. J.; Jones, J. F.; Reber, B. F.; Catterall, W. A. (1987): Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (15), S. 5478–5482.

Tarcsa, E.; Marekov, L. N.; Mei, G.; Melino, G.; Lee, S. C.; Steinert, P. M. (1996): Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (48), S. 30709–30716.

Terrinoni, A.; Puddu, P.; Didona, B.; Laurenzi, V. de; Candi, E.; Smith, F. J. et al. (2000): A mutation in the V1 domain of K16 is responsible for unilateral palmoplantar verrucous nevus. In: *The Journal of investigative dermatology* 114 (6), S. 1136–1140. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00983.x.

Trowers, Andrea B.; Assaf, Rich; Jaworsky, Christine (2002): Granular parakeratosis in a child. In: *Pediatric dermatology* 19 (2), S. 146–147.

Tsien, R. W.; Lipscombe, D.; Madison, D. V.; Bley, K. R.; Fox, A. P. (1988): Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. In: *Trends in Neurosciences* 11 (10), S. 431–438. DOI: 10.1016/0166-2236(88)90194-4.

Walterscheid, Jeffrey P.; Nghiem, Dat X.; Kazimi, Nasser; Nutt, Leta K.; McConkey, David J.; Norval, Mary; Ullrich, Stephen E. (2006): Cis-urocanic acid, a sunlight-induced immunosuppressive factor, activates immune suppression via the 5-HT_{2A} receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46), S. 17420–17425. DOI: 10.1073/pnas.0603119103.

13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen meinen Dank aussprechen, die mich auf diesem Weg unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Michael Flaig, der mir großes Vertrauen entgegenbrachte meine Ideen und Vorstellungen in dieser Forschungsarbeit zu verwirklichen und mir stets Zuversicht schenkt auch große Hürden meistern zu können.

Des Weiteren möchte ich mich bei Johanna Laude und Ursula Puchta für ihre hilfreichen Tipps, Anregungen und aufbauenden Worte bedanken.

Danken möchte ich zudem einer Freundin, die mir mit ihrer Kreativität zur Seite steht.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken: meinen lieben Eltern, dass sie mir Strebsamkeit gelehrt haben und mich meinen Weg haben gehen lassen und meiner Schwester, die immer an mich glaubt.

Ich danke meinem wundervollen Ehemann, der mich stets unterstützt und geduldig für mich da ist.

14. Eidesstattliche Erklärung



Eidesstattliche Versicherung

Evenschor, Natalie Lidia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Immunhistochemische Untersuchungen zur möglichen Pathogenese der granulären Parakeratose

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Poing, 23.05.2025

Ort, Datum

Natalie Lidia Evenschor

Unterschrift Natalie Lidia Evenschor

15. **Lebenslauf**

Nichtveröffentlichung aus Datenschutzgründen.

16. **Publikationsliste**

Brinker, Titus J.; Hekler, Achim; Enk, Alexander H.; Klode, Joachim; Hauschild, Axel; Berking, Carola et al. (2019a): A convolutional neural network trained with dermoscopic images performed on par with 145 dermatologists in a clinical melanoma image classification task. In: *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990) 111, S. 148–154. DOI: 10.1016/j.ejca.2019.02.005.

Brinker, Titus J.; Hekler, Achim; Hauschild, Axel; Berking, Carola; Schilling, Bastian; Enk, Alexander H. et al. (2019b): Comparing artificial intelligence algorithms to 157 German dermatologists: the melanoma classification benchmark. In: *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990) 111, S. 30–37. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.12.016.

Guertler, Anne; Evenschor, Natalie; Seegraeber, Marlene; French, Lars Einar; Weiler, Véronique; Flaig, Michael; Hartmann, Daniela (2021): Lichen Planus Pigmentosus Inversus: A Rare Subvariant of Lichen Planus Pigmentosus. In: *Case Rep Dermatol* 13 (2), S. 407–410. DOI: 10.1159/000515735.

Lapczynski, Natalie L.; Flaig, Michael J. (2018): Polymorphes kutanes T-Zell-Lymphom. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 69 (Suppl 1), S. 52–55. DOI: 10.1007/s00105-018-4218-2.

Lapczynski, Natalie L.; Müller-Lisse, Gerd U.; Herzinger, Thomas (2018): Perforierte Pansinusitis unter dem Bild eines Angioödems. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 69 (Suppl 1), S. 59–61. DOI: 10.1007/s00105-018-4188-4.