

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
-Allgemeine Dermatologie und Venerologie-
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Thomas A. Luger

**Histochemie / Immunhistochemische Charakterisierung von
Verhornungsstörungen: Untersuchungen unter besonderer
Berücksichtigung von Transglutaminase 3, Calpain und Osteonectin**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Funda Schürmeyer-Horst, geb. Dincer

aus Ödemis/Türkei

2003

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Raghunath
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Traupe

Tag der mündlichen Prüfung: Mittwoch, den 29. Oktober 2003

Aus dem Universitätsklinikum Münster
-Allgemeine Dermatologie und Venerologie-
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas A. Luger
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. M. Raghunath
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Traupe

ZUSAMMENFASSUNG

Histochemie / Immunhistochemische Charakterisierung von Verhornungsstörungen: Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung von Transglutaminase 3, Calpain und Osteonectin

Funda Schürmeyer-Horst, geb. Dincer

Bei klinisch definierten Verhornungsstörungen wurden Kandidatenproteine untersucht. Die Transglutaminase 3, Calpain und Osteonectin wurden ausgesucht, weil sie zum einen in der ätiologisch relevanten, histologischen Zielregion (Str. granulosum) exprimiert werden und des Weiteren in Kopplungsstudien chromosomale Regionen für autosomal rezessiv lamelläre Ichthyose (ARLI)/Selbstheilendes Kollodiumbaby (SHCB), Harlekinichthyose (HI), Netherton-Syndrom (NTS) gezeigt wurden, in denen Genorte für die hier untersuchten Proteine platziert werden konnten.

In unserem Kollektiv von Verhornungsstörungen war das TGase 3 Signal bei Patienten mit NTS und HI reduziert bzw. negativ. Wir fanden auch signifikante Calpainreduktion und Fehlverteilung, allerdings nur bei ARLI/SHCB und HI. Komplette negative Epidermis fand sich in Bezug auf Calpain sowohl bei TGase 1 negativen als auch bei TGase 1 positiven ARLI Patienten.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Fehlen oder eine starke Reduktion zweier für die epidermale Biologie relevanter Proteine nachweisen. Die vorliegenden Befunde unterstreichen, dass Calpain I und TGase 3, bzw. die für sie kodierenden Gene als Kandidatengene für ARLI/SHCB und HI in Frage kommen. Die Bedeutung von TGase 3 Defizienz bei NTS kann derzeit als sekundäre Folge des Mangels von LEKTI angesehen werden, einem Serinproteaseinhibitor, der im Str. granulosum exprimiert wird und für den SPINK 5 kodiert.

Für Marcel Cem und Jascha Can Horst

1 INHALTSVERZEICHNIS

1 INHALTSVERZEICHNIS	1	
2 EINLEITUNG	4	
2.1	Verhornungsstörungen	4
2.2	Die Verhornung	4
2.2.1	Umschaltung der Zytokeratintypen	5
2.2.2	Odland-bodies	6
2.2.3	Profilaggrinsynthese und Umwandlung	6
2.2.4	Die Gestaltung des cornified cell envelope	6
2.3	Ichthyosen	9
2.3.1	Erstbeschreibung verschiedener Ichthyosen	9
2.3.2	Die Einteilung der Ichthyosen nach modernen Kriterien	10
2.3.3	Autosomal dominante Ichthyosis vulgaris	12
2.3.4	X-chromosomal rezessive Ichthyose	12
2.3.5	Isolierte congenitale Ichthyosen	13
2.3.5.1	Lamelläre Ichthyosen	13
2.3.5.1.1	Autosomal dominant vererbte lamelläre Ichthyose (ADLI)	13
2.3.5.1.2	Autosomal rezessiv vererbte lamelläre Ichthyose (ARLI)	13
2.3.5.1.2.1	Erythrodermische lamelläre Ichthyose	14
2.3.5.1.2.2	Nicht-erythrodermische lamelläre Ichthyose	15
2.3.5.1.3	Harlekinichthyose (HI)	18
2.3.5.1.4	Assoziierte congenitale Ichthyosen	19
2.3.5.1.4.1	Comèl-Netherton-Syndrom (NTS)	19
2.4	Die Transglutaminasen	23
2.5	Calpain	26
2.6	Osteonectin / SPARC	28
2.7	Genetik der Ichthyosen	32
2.7.1	Autosomal rezessive lamelläre Ichthyose (ARLI)	32
2.7.1.1	Mutationen des TGM 1	33
2.7.2	Netherton-Syndrom	36
2.7.3	Harlekinichthyose	39
2.8	Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit	39
3 MATERIAL UND METHODEN	40	
3.1	Materialgewinnung und Lagerung	40
3.2	Immunhistochemische Darstellung der TGase 3 / Immunfluoreszenz	40
3.2.1	Reagenzien, Probematerialien	40
3.2.2	Lösungen	41
3.2.3	Versuchsdurchführung	42
3.3	Immunhistochemische Darstellung der TGase 3/Immunperoxidase	44
3.3.1	Reagenzien, Probematerialien	44
3.3.2	Lösungen	46
3.3.3	Versuchsdurchführung	47
3.4	Immunhistochemische Darstellung Osteonectins/Immunfluoreszenz	49
3.4.1	Reagenzien, Probematerialien	49
3.4.2	Lösungen	50
3.4.3	Versuchsdurchführung	51
3.5	Immunhistochemische Darstellung des Calpains /Immunperoxidase	52
3.5.1	Reagenzien, Probematerialien	52
3.5.2	Lösungen	54

3.5.3	Versuchsdurchführung	55
4	ERGEBNISSE	56
4.1	Transglutaminaseassay	56
4.2	Immunhistochemische Darstellung der TGase 3 und die Beurteilungskriterien	57
4.2.1	Darstellung der TGase 3 bei Normalhaut	61
4.2.2	Autosomal rezessive lamelläre Ichthyose (ARLI)	61
4.2.2.1	Histologie der autosomal rezessiv lamellären Ichthyose	61
4.2.2.2	Darstellung derTGase 3 bei ARLI	62
4.2.2.2.1	TGase 1 defiziente ARLI	62
4.2.2.2.2	TGase 1 positive ARLI	62
4.2.2.2.3	SHCB	63
4.2.3	Autosomal dominante lamelläre Ichthyose (ADLI)	63
4.2.4	Patienten mit der Diagnose lamelläre Ichthyose ohne weitere Angaben	63
4.2.5	Harlekinichthyose	63
4.2.5.1	Histologie der Harlekinichthyose	63
4.2.5.2	TGase 3 bei Harlekinichthyose	64
4.2.6	Comèl-Netherton-Syndrom	65
4.2.6.1	Histologie des Netherton-Syndroms	65
4.2.6.2	TGase 3 bei Netherton-Syndrom	65
4.2.7	TGase 3 bei Sjögren-Larsson-Syndrom	66
4.2.8	TGase 3 bei unklarer Neuro-Ichthyose	66
4.2.9	Ichthyosis vulgaris	66
4.2.9.1	Histologie der Ichthyosis vulgaris	66
4.2.9.2	TGase 3 bei Ichthyosis vulgaris	66
4.2.10	X-chrom. rez. Ichthyose (XRI)	67
4.2.10.1	Histologie der X-chrom. rez. Ichthyose	67
4.2.10.2	TGase 3 bei XRI	67
4.2.11	TGase 3 bei Patienten mit erythrodermischer ichthyosiformer Haut, Eingangsdiagnose „Kollodiumbaby“ und nicht näher definierten Ichthyosen	67
4.2.12	Psoriasis vulgaris	68
4.2.12.1	Histologie der Psoriasis vulgaris	68
4.2.12.2	TGase 3 bei Psoriasis vulgaris	68
4.2.13	TGase 3 bei Palmoplantarkeratosen, Chondrodysplasia punctata, Conradi-Hünemann-Happle-Syndrom und bei Neurofibromatose	68
4.2.14	Immunhistochemische Darstellung der TGase 3 mit der Methode der Immunperoxidase	68
4.3	Immunhistochemische Darstellung Osteonectins	71
4.3.1	Darstellung Osteonectins bei NH	71
4.3.2	Immunhistochemische Darstellung bei Verhornungsstörungen	71
4.4	Immunhistochemische Darstellung Calpains	74
4.4.1	Darstellung Calpains bei Normalhaut	74
4.4.2	Darstellung Calpains bei autosomal rezessiver lamellärer Ichthyose (ARLI)	78
4.4.2.1	TGase 1 positive ARLI	78
4.4.2.2	TGase 1 defiziente ARLI	79
4.4.2.3	SHCB	80
4.4.3	Darstellung Calpains bei Harlekinichthyose	81
4.4.4	Darstellung Calpains bei Ichthyosis vulgaris, X-chrom. rez. Ichthyose und Psoriasis vulgaris	82
5	DISKUSSION	83
5.1	Übersicht Rekapitulation der Rationale	83
5.2	Interpretation der Ergebnisse	85
5.2.1	Expression epidermaler Transglutaminasen	85
5.2.2	Expression von Osteonectin	87
5.2.3.	Expression von Calpain	87

6 ZUSAMMENFASSUNG	91
7 LITERATURVERZEICHNIS	92
8 GLOSSAR	113
9 ANHANG	114
9.1 Publikation	114
9.2 Abbildungsverzeichnis	114
9.3 Tabellenverzeichnis	115
9.3 Danksagung	116
9.4 Curriculum Vitae	117

2 EINLEITUNG

2.1 Verhornungsstörungen

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Ichthyosen, die zu den hereditären Verhornungsstörungen gehören. Ichthyose leitet sich ursprünglich von dem griechischen Wort " ιχθυος" ab, weil man früher die schuppige, trockene Haut dieser Personen mit Fischeschuppen assoziierte.

Störungen des Gleichgewichts von Neubildung und Abschilferung von Hornzellen (Proliferationshyperkeratose bzw. Retentionshyperkeratose) führen zu dem Bild der Ichthyosen. Verschiedene Defekte der Differenzierung von Basalzellen machen letztendlich die Heterogenität dieser Erkrankung aus.

2.2 Die Verhornung

Die Epidermis besteht aus mehreren deutlich unterscheidbaren Schichten, die jeweils durch einen unterschiedlichen Reifungszustand der hornbildenden Keratinozyten gekennzeichnet sind. Sie besteht zu 90 % aus den Keratinozyten, zwischen denen sich die restlichen 10 % der Zellen, Melanozyten, Merkelzellen, Langerhans-Zellen und auch T-Lymphozyten, befinden.

Durch die spezielle Anordnung der Keratinozyten entsteht das mehrschichtige Plattenepithel, wobei man von basal nach apikal fünf Schichten unterscheiden kann, die jedoch hinsichtlich Dicke und Aufbau regionale Unterschiede aufweisen.

Der Basalmembran aufsitzend liegt das **Stratum basale**, bestehend einlagig aus zylindrischen Zellen. Auf diese Zellschicht folgt das zwei bis fünf Zelllagen dicke **Stratum spinosum**, Stachelzellschicht, die aus polygonalen Zellen besteht. Das **Stratum granulosum** mit ein bis drei Zelllagen, die durch die basophilen Keratohyalinkörner, Vorläufer der Keratinmatrix, gekennzeichnet sind, liegt dem Stratum spinosum auf. Die Keratinozyten sind hier abgeflacht. Das **Stratum lucidum** wird gewöhnlich nur in der dicken Epidermis (Handteller und Fußsohlen) gefunden. Diese Schicht ist dünn und erscheint lichtmikroskopisch homogen. Die Zellkerne

werden pyknotisch und verschwinden dann vollständig. Das **Stratum corneum**, die Hornschicht, besteht aus Korneozyten (kernlose Keratinozyten), deren Keratinfilamente der Innenseite der Zellmembran angelagert sind. Je nach Körperregion bildet das Str. corneum eine unterschiedliche Anzahl von Schichten (ca. 15-20 an der Bauchhaut, ca. 45 am Arm, mehrere 100 an der Handfläche und Fußsohle). Ein Lipidfilm zwischen den Korneozyten sorgt für das Aufrechterhalten des Hydrationszustandes und verhindert somit die Ausdunstung.

Keratinozyten der Epidermis stellen eine sich kontinuierlich erneuernde Zellpopulation dar, in der Mitosen, terminale Differenzierung und Apoptose einander die Waage halten. Die Mitosen finden ausschließlich im Stratum basale in den Stammzellen statt, die sich in den Retezapfen befinden und einer sich selbsterneuernden Zellpopulation angehören. An den Handtellern und Fußsohlen oder bei pathologischen Hautzuständen sind auch suprabasale Zellteilungen existent. Unter Veränderung seiner Struktur (Basalzelle, Stachelzelle, Körnerzelle und Hornzelle) steigt der Keratinozyt bis zur Oberfläche. Die durchschnittliche Zeit zwischen dem Austritt eines Keratinozyten aus dem Str. basale und seiner Abschilferung von der Hautoberfläche beträgt ca. 4 Wochen (Fritsch 1998; Löffler, Petrides 1997). Die Umwandlung lebender Keratinozyten geschieht durch Syntheseprodukte. Diese laufen auf **vier getrennten, aber parallelen Wegen** ab.

2.2.1 Umschaltung der Zytokeratintypen

Die Zytokeratine, die suprabasal synthetisiert werden, werden in Keratinsubtypen unterteilt. Aus diesen entstehen niedermolekulare oder hochmolekulare Zytokeratine. Hier ist die Verdrängung der niedermolekularen, basalen Zytokeratine K5, K14 zugunsten der hochmolekularen K1, K10, K11-K2e/K9 von Bedeutung. Diese Keratine bilden die Zwischenfilamente, die den Zellkern umschließen und mit den Desmosomen der Zellmembranen verbinden (Verspannungssystem und Verankerungssystem der Keratinozyten) (Fritsch 1998; Löffler, Petrides 1997).

2.2.2 Odland-bodies

Im oberen Str. spinosum werden Odland-bodies synthetisiert. Sie enthalten reichlich Glycosylceramide, Sterolester, Phospholipide und Enzyme. Sie werden am Übergang des Stratum granulosum zu Stratum corneum durch Exozytose in den Interzellularraum ausgestoßen. Hier werden sie in das Barrierelipid umgewandelt und zu parallelen Lipidlamellen remoduliert (wasserdichte Abdichtung des Interzellularraums) (Fritsch 1998; Löffler, Petrides 1997). Die Odland-bodies stabilisieren außerdem die Oberfläche des "cornified cell envelope" (Van Hooijdonk et al. 1991; Reichert et al. 1993).

2.2.3 Profilaggrinsynthese und Umwandlung

Das histidinreiche Profilaggrin wird im oberen Stratum spinosum synthetisiert und bildet mit Keratinfilamenten zunächst klumpige Aggregate (Keratinhyalingranula). Im Zuge der Differenzierung treten die Keratinzwischenfilamente mit Filaggrin zu einer hochorganisierten Struktur zusammen (Fritsch 1998; Löffler, Petrides 1997).

2.2.4 Die Gestaltung des cornified cell envelope

Der "cornified cell envelope" (verhornter Zellumschlag) hat eine stark unlösliche, komplexe Struktur und ist extrem widerstandsfähig. Er stellt eine aus mehreren Proteinen bestehende Verdichtung der Plasmamembran dar, die den Hornzellen ihre rigide Beschaffenheit verleiht. Die Produktion von Proteinen (Involucrin, SPRP (small proline-rich proteins), Loricrin, Filaggrin, andere desmosomale Proteine etc.) und ihre Quervernetzung spielt eine große Rolle. Diese Proteine sind der Plasmamembran in den terminal differenzierten Keratinozyten am Übergang des Stratum granulosum zu Stratum corneum angelagert (Steinert und Marekov 1995; Robinson et al. 1997). Die Verteilung von Involucrin ist dabei größtenteils auf die höheren Schichten des Stratum spinosum und das Stratum granulosum beschränkt. Loricrin und Filaggrin sind bis auf sehr geringe Mengen in der Peripherie nur im Stratum granulosum zu finden (Hohl et al.

1993). Durch Quervernetzung mittels dieser Vorboten durch die epidermalen Transglutaminasen 1 und 3 wird die unlösliche Hülle von 10-15 nm Dicke gebildet. Diese Hülle erlaubt eine leichte Verankerung der Fette mit den Keratinozyten (Simon und Green 1984; Schmidt et al 1985; Simon und Green 1985; Michel et al. 1988; Tacher und Rice 1985; Hohl et al. 1991; Kim et al. 1992). Die genaue Funktion und das Zusammenspiel, während der Erzeugung der "cornified cell envelope" Prozesse, ist allerdings noch unklar.

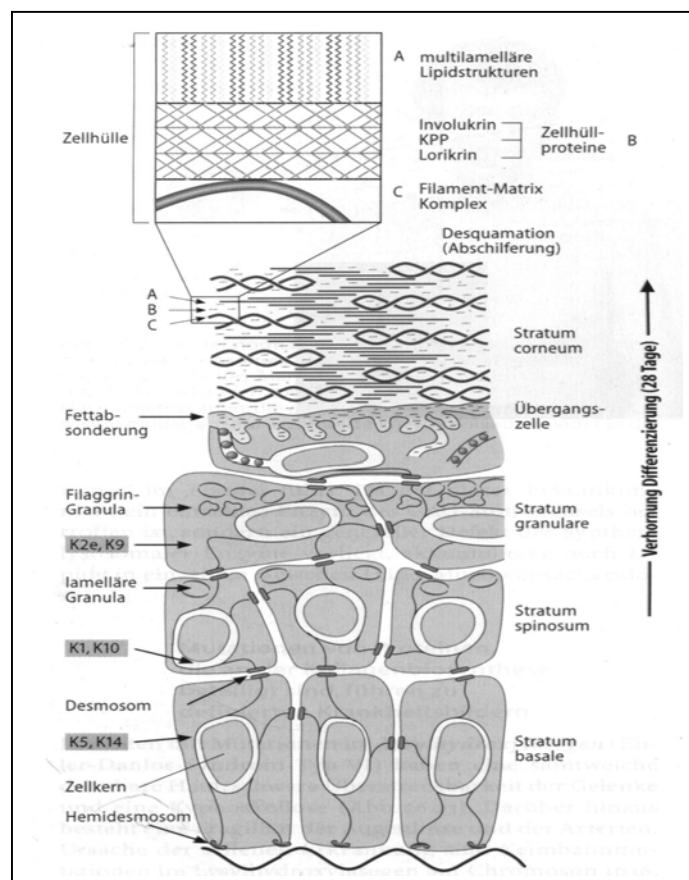


Abbildung 1: Histologischer Aufbau der Epidermis und ihre Bestandteile (Löffler, Pedrides 1997)

Diese Prozesse sind allesamt so komplex, dass unterschiedliche Störungen eines der Proteine Involucrin, Loricrin oder auch Filaggrin, die nicht selten ein anomales Verteilungsmuster zeigen, letztendlich zu unterschiedlichen Hauterkrankungen führen.

Bei der lamellären Ichthyose sind beispielsweise bereits sechs verschiedene Ausprägungsmuster des Filaggrin bekannt (Pena et al. 1998).

Aber nicht nur das Verteilungsmuster, auch die Aktivität der unterschiedlichen Enzyme können Ursache für einen defekten Aufbau des Gerüsts sein (Hohl et al. 1993 ; Candi et al.1995). Dieser Defekt kann sich in unterschiedlichen Hautkrankheiten, wie zum Beispiel der palmoplantaren Keratose (PPK) äußern.

Die Transglutaminasen sind bei der Entstehung der Hornschicht so entscheidend, dass ihre Abwesenheit oder Reduktion einen großen Einfluss auf einen Teil der congenitalen Ichthyosen hat (Huber et al. 1995; Huber et al. 1997; Parmentier et al.1995).

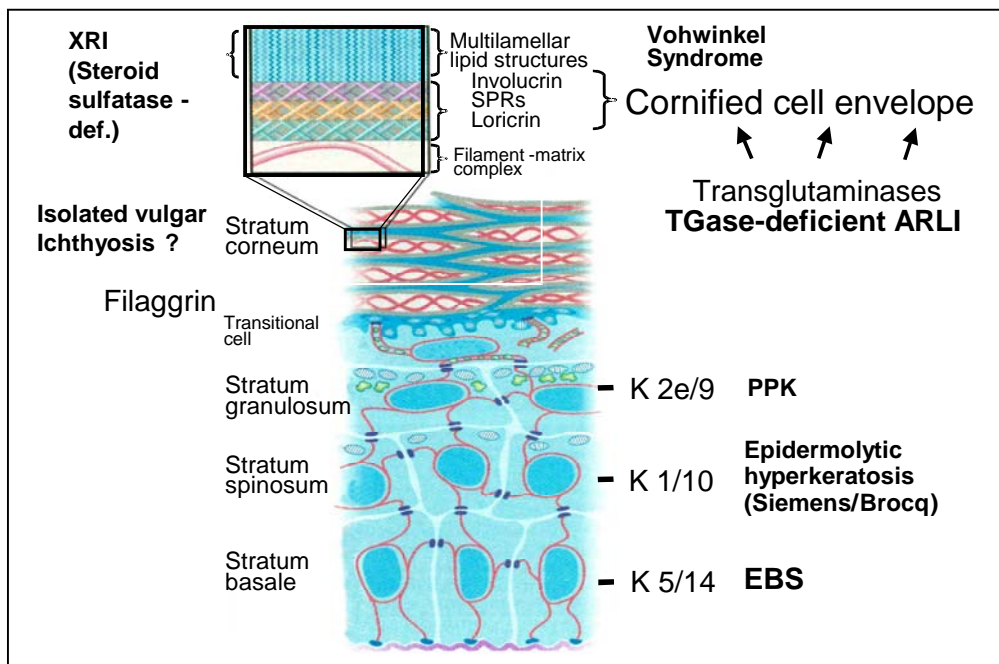


Abbildung 2: Lokalisation verschiedener struktureller und/oder enzymatischer Defekte bei unterschiedlichen epidermalen Störungen (modifiziert nach Roop 1995)

2.3 Ichthyosen

Ichthyosen sind eine heterogene Gruppe erblicher Krankheiten, die durch übermäßige Hornproduktion charakterisiert sind. Sie unterscheiden sich im klinischen Bild, Schweregrad, Vererbungsmodus, Histologie und Ultrastruktur, wobei die molekularbiologischen Grundlagen bis heute nur teilweise bekannt sind. Somit ist die Bezeichnung Ichthyose ein Überbegriff für verschiedene Verhornungsstörungen. Klinisch ist besonders die Schuppung auffällig, die von kleinlamellös über mittellamellös, mittelgroß, groß, hellbraun bis dunkelbraun reicht. Ein gemeinsames Merkmal ist der Befall des gesamten Hautorgans oder zumindest ist ein großer Teil davon betroffen (Traupe, The Ichthyoses, 1989).

2.3.1 Erstbeschreibung verschiedener Ichthyosen

Die überhaupt ersten Informationen über Ichthyosen führen zum achtzehnten Jahrhundert.

Penrose und Stern 1958 erwähnten eine Familie Lambert aus dem Jahre 1731, deren Sohn an Ichthyosis hystrix litt. Bis 1958 nahm man an, dass es sich bei dieser Form der Ichthyose, um eine Y-chromosomale Vererbung handelte. Alibert beschrieb 1806 die autosomal dominante Ichthyosis vulgaris. Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts teilte Rieckes die congenitalen Ichthyosen in drei Gruppen ein. Typ 1 entsprach dem heutigen Harlekin Fetus, Typ 2 entsprach der lamellären Ichthyosen und Typ 3 den erworbenen Störungen.

Im Rahmen der ersten histopathologischen Einteilung von Gassmann 1904 wurde das Fehlen des Stratum granulosum bei der dominanten Form der Ichthyosis vulgaris und das besonders ausgeprägte Str. granulosum bei der X-chromosomal rezessiven Form beschrieben. 1929 wurde von Siemens der autosomal dominante Erbgang bei Ichthyosis vulgaris erkannt und der autosomal rezessive Erbgang bei den congenitalen Ichthyosen betont.

Eine Reihe von Syndromen wurde nach 1946 beschrieben. Sigvald Refsum zeigte das Refsum-Syndrom, eine Kombination aus Ichthyose, Retinitis pigmentosa, progrediente Schwerhörigkeit, Polyneuropathien, zerebrale Symptome und Reizleitungsstörungen des Herzens.

Comèl und Netherton entdeckten das autosomal rezessiv vererbte Comèl-Netherton-Syndrom. Hierbei handelt es sich um eine Kombination von Ichthyose, Trichorrhexis invaginata (Haarwuchsstörungen), Gedeihstörungen und Atopien (Comèl 1949; Netherton 1958).

1957 wurde von Sjögren und Larsson eine konnatale ichthyosiforme Erythrodermie in Verbindung mit einer geistigen Behinderung, spastischer Di- oder Tetraparese und auch Netzhautdegenerationen beschrieben, das Sjögren-Larsson-Syndrom.

Unter den Gesichtspunkten der Klinik, Histologie, Biochemie (Bergers et al. 1990) und der Ultrastruktur (Anton-Lamprecht und Schnyder 1974) etablierte Traupe eine moderne Klassifikation der Ichthyosen (Traupe, The Ichthyoses, 1989 S.9).

2.3.2 Die Einteilung der Ichthyosen nach modernen Kriterien

1989 stellte Traupe eine moderne Einteilung der Ichthyosen vor. Traupe unterscheidet vier Hauptgruppen (Traupe 1989 S.9).

- 1) Congenitale Ichthyosen** (Ichthyose existiert schon nach der Geburt)
- 2) Vulgäre Ichthyosen** (entwickelt sich erst nach der Geburt im ersten Lebensjahr)
- 3) Isolierte Ichthyosen** (Hautveränderung ist das einzige Symptom)
- 4) Assoziierte Ichthyosen (gehört zu einem Syndrom)**

Diese vier Haupttypen werden in Subtypen unterteilt (Traupe, The Ichthyoses, 1989 S.10, Tabelle 1):

Tabelle 1: Unterteilung der Ichthyosen nach Traupe mit Vererbungsmodus (Traupe 1989 S.10)

<p>I. Isolierte vulgäre Ichthyosen</p> <p>I.1 Autosomal dominante Ichthyosis vulgaris (ADI)</p> <p>I.2 X-chromosomal rezessive Ichthyose (XRI)</p>	<p>III. Assoziierte vulgäre Ichthyosen</p> <p>III.1 Refsum-Syndrom (AR)</p> <p>III.2 Multipler Sulfatasemangel (AR)</p> <p>III.3 Assoziierte Steroid-Sulfatasemangel (XR)</p> <p>III.4 Atypische Ichthyosis vulgaris mit Hypogonadismus (unbekannt)</p>
<p>II. Isolierte congenitale Ichthyosen</p> <p>II.1 <u>Lamelläre Ichthyose</u></p> <p>II.1.1 Autosomal dominante lamelläre Ichthyose (AD)</p> <p>II.1.2 Erythrodermische lamelläre Ichthyose (AR)</p> <p>II.1.3. Nicht-erythrodermische lamelläre Ichthyose (AR)</p> <p>II.2 <u>Bullöse Ichthyose</u></p> <p>II.2.1 Bullöse ichthyotische Erythrodermie (AD)</p> <p>II.2.2 Ichthyosis bullosa Siemens (AD)</p> <p>II.3 <u>Spezielle Varianten</u></p> <p>II.3.1 Ichthyosis hystrix Typ Curth-Macklin (AD)</p> <p>II.3.2 Harlekin Ichthyose (AR)</p>	<p>IV. Assoziierte congenitale Ichthyose</p> <p>IV.1 KID Syndrom (AD)</p> <p>IV.2. X-chromosomal dominante Ichthyose (XD, letal für betroffenen männlichen Embryo)</p> <p>IV.3 Comèl-Netherton-Syndrom (AR)</p> <p>IV.4 Neutrale Fettspeicherkrankheit (AR)</p> <p>IV.5 Sjögren-Larsson-Syndrom (AR)</p> <p>IV.6 Tay-Syndrom (AR)</p> <p>IV.7 HID-Syndrom (unbekannt)</p> <p>IV.8 IFAP-Syndrom (unbekannt)</p>

AD= autosomal dominant, AR= autosomal rezessiv, XR= X-chromosomal rezessiv, XD= X-chromosomal dominant

In der vorliegenden Arbeit spielten besonders die unter Punkt II.1, II.3, IV.3 und IV.5 genannten congenitalen Ichthyosen eine Rolle, allerdings wurden auch die isolierten vulgären Ichthyosen, genannt unter Punkt I.1 und I.2, mitberücksichtigt.

2.3.3 Autosomal dominante Ichthyosis vulgaris

Diese Form der Ichthyose liegt bei der Geburt nie vor. Meist manifestiert sie sich erst nach dem ersten Lebensjahr. Die Schuppen sind klein und in der Regel hellgrau. Sie haften relativ stark, wobei die Extremitäten schwerer befallen sind als der Rumpf und das Gesicht. Die Mehrzahl der Patienten weisen folliculäre Keratosen und betonte Linien an den Handfurchen und Fußsohlen auf. Die großen Gelenkbeugen sind immer ausgespart. Histologisch haben diese Patienten eine Orthohyperkeratose. Das Stratum granulosum ist meistens nur spärlich oder gar nicht vorhanden (Traupe, The Ichthyoses, 1989).

2.3.4 X-chromosomal rezessive Ichthyose

Diese Ichthyoseform ist eine häufige Genodermatose, die enzymatisch aufgeklärt und biochemisch relativ gut erforscht worden ist. Die Manifestation erfolgt im Säuglingsalter, sehr selten bei der Geburt. Die Schuppung ähnelt dem autosomal dominanten Ichthyosis vulgaris, ist aber stärker ausgeprägt. Sie ist schmutziggrau bis gelbbraun, dicker und gröber gefeldert. Die Gelenkbeugen sind meist ausgespart. Die Handflächen und die Fußsohlen sind normal, außerdem fehlen folliculäre Keratosen (Traupe, The Ichthyoses, 1989). Histologisch ist eine Orthohyperkeratose vorherrschend. Das Stratum granulosum ist gut erhalten. Der zugrundeliegende Enzymdefekt ist eine Defizienz der Steroidsulfatase (Lokalisiert auf Chromosom Xp 22.32.) (Webster et al. 1978; Elias et al 1984).

2.3.5 Isolierte congenitale Ichthyosen

Die isolierten congenitalen Ichthyosen umfassen eine Reihe verschiedener Erkrankungen, die bei der Geburt oder innerhalb der ersten zwei Wochen manifest sind.

2.3.5.1 Lamelläre Ichthyosen

2.3.5.1.1 Autosomal dominant vererbte lamelläre Ichthyose (ADLI)

Bei dieser Form der lamellären Ichthyose haben die Patienten einen starken Juckreiz, leichte Schuppung schon nach der Geburt und typische Verteilungsmuster der Hyperkeratose, d.h. große und dunkelbraune Schuppen am gesamten Körper einschließlich Hände und Füße mit Plantarkeratose, Lichenifikation an den Handgelenken, Händen, Füßen und Knöcheln. Die Haare fallen aus, allerdings ist das Haarwachstum nicht verändert (Traupe et al. 1984). Histologisch zeigt sich eine verbreiterte Transitionszone (bis zu sechs Zellschichten) zwischen Stratum granulosum und dem Stratum corneum (Kolde et al. 1985). Neben Orthokeratose findet man parakeratotische Bereiche (Traupe et al. 1984), auch Akanthose und suprapapilläre epidermale Atrophie sind vorhanden (Toribio et al. 1986). Die Tonofilamente und Keratohyalin granula sind ebenso wie das Keratinmuster unverändert, die Strukturproteine zeigen also keinen spezifischen Defekt (Kolde et al. 1985). Die ADLI zeigt im Gegensatz zu den anderen lamellären Ichthyosen hohe freie Fettsäuren, Triglyceride, n-Alkane, reduzierte freie Sterole und Ceramide in den Schuppen (Melnik et al. 1989).

2.3.5.1.2 Autosomal rezessiv vererbte lamelläre Ichthyose (ARLI)

Die autosomal rezessiv vererbten lamellären Ichthyosen unterscheidet man unter dem Gesichtspunkt der Klinik in eine erythrodermische und nicht erythrodermische

Verlaufsform. Die nicht erythrodermische Form wird meist mit der klassischen lamellären Ichthyose gleichgesetzt.

2.3.5.1.2.1 Erythrodermische lamelläre Ichthyose

Hier fallen die Patienten vor allem durch die Erythrodermie auf. Sie kann ein Leben lang bestehen bleiben, oder aber in ihrer Intensität abnehmen. Einige Kinder werden als „Kollodiumbabies“ geboren. Hier variiert die Art der Schuppung zwischen fein und hell, wobei die helle Schuppung häufiger vorkommt. Handflächen und Fußsohlen sind häufig involviert, auch ein Ektropium ist nicht selten (Traupe, *The Ichthyoses*, 1989). Bei einem Teil der Patienten ist eine Alopezie beschrieben (Traupe und Happle 1983; Williams und Elias 1985b).

Die Histologie zeigt eine Akanthose, Parakeratose im Stratum corneum und eine Hypergranulose (Rossmann-Ringdahl et al. 1986; Williams und Elias 1985b; Hazel und Marks 1985; Paller 1994; Choate et al. 1998). Im Stratum corneum sind typischerweise Lipidvakuolen zu finden (Niemi et al. 1991; Rossmann-Ringdahl et al. 1986). Im Stratum basale und in den suprabasalen Schichten finden sich gehäuft Mitosen, die Melanozyten und Langerhanszellen sind unauffällig.

Auffällig ist eine verringerte dermale Kapillarisation. Im Gegensatz zu den nicht-erythrodermischen lamellären Ichthyosen sind die Turnoverzeiten der Zellen vermindert (Williams und Elias 1985a; Hazel und Marks 1985).

Des Weiteren finden sich ein Anstieg der n-Alkane von ungefähr 25% im gesamten Fettanteil des Stratum corneums und eine eindeutige Verringerung sowohl der Triglyceride als auch der freien Fettsäuren (Niemi et al. 1991; Williams und Elias 1985a).

Erwähnenswert bei dieser Form der lamellären Ichthyose ist die Verringerung der β -Glucosidasen und der Phospholipasen A_2 . Bergers et al. 1990 zeigten, dass das Verhältnis Butyrase/ β -Glucosidase bei der erythrodermischen Form über 45 liegt, zumindest soll dieser Wert auf die erythrodermische Form hinweisen.

Bezüglich der Transglutaminasen scheint die Aktivität und auch die Expression der Transglutaminase 1 verändert zu sein. Die Transglutaminase 1 zeigt ein intrazelluläres Muster im Stratum granulosum und im Stratum corneum. Choate et al. 1998 zeigten immunhistochemisch an Aceton fixierten Hautbiopsien eine „distinctive“ zytoplasmatische Akkumulation der Transglutaminase 1 Expression im Stratum granulosum und im inneren Stratum corneum der Epidermis.

2.3.5.1.2.2 Nicht-erythrodermische lamelläre Ichthyose

Diese Form der lamellären Ichthyose ist in zwei Untergruppen unterteilt.

Die *erste Form* wird unter rein makroskopischen Aspekten als „klassische lamelläre Ichthyose“ bezeichnet oder auch „nicht-erythrodermische lamelläre Ichthyose“. Sie ist charakterisiert durch generalisierte, große, plattenartige, dunkelbraune Hyperkeratosen, Abb. 3 a-b. Diese Patienten sind meist schwer befallen. Auch hier betreffen die Verhornungsstörungen das gesamte Organ, wobei die Handteller, Fußsohlen, Gesicht, Ellenbeugen und Kniekehlen mitbeteiligt sind. Die Patienten zeigen außerdem oft Alopezie, Hypohydrosis, Nageldystrophie, Ektropien und Eklabium (Traupe, The Ichthyoses, 1989).



a)



b)

Abbildung 3 a-b: TGase 1 defiziente ARLI, CS

Die a) Nicht-erythrodermische lamelläre Ichthyose mit grobschmutziger Hyperkeratose. Die Handflächen und die Fußsohlen b) sind schwielig verdickt.

Oft präsentieren sich die Neugeborenen als Kollodiumbabies. Das Kollodiumbaby ist perinatal eingehüllt in einen glänzenden Film, der nach 48 Stunden aufbricht, Abb.4. Häufig besteht Ekklabium, Ektropium. Die Mortalität liegt bei 11%. Diese Babies entwickeln sich interessanterweise in unterschiedliche Richtungen wie z.B. in TGase 1 defiziente lamelläre Ichthyose, erythrodermische lamelläre Ichthyose, Trichothiodystrophie, Sjögren-Larsson-Syndrom, M.Gaucher. Kurz nach der Geburt kann das klinische Bild dieser Babies sehr heftig sein, aber die Abschuppung später mild (Williams und Elias 1987 in Russel et al. 1994). Eine Erythrodermie ist bei Geburt nur selten vorhanden und wenn, dann nur milde ausgeprägt.



a)



b)

Abbildung 4 a-b: Kollodiumbaby

a) Das Kollodiumbaby KTh 2 Tage nach seiner Geburt; b) selbstheilendes Kollodiumbaby VS im Alter von 5 Tagen.

Ungefähr 10% dieser Kollodiumbabies heilen innerhalb der ersten Wochen ab oder zeigen einen milden Residualzustand. Unter diesen „**Selbstheilenden Kollodiumbabies**“ (SHCB) gibt es einige die eine starke TGase 1 Reduktion

aufweisen, die auf einer gemischten TGM1 Mutation beruht und somit eine allelische Variante der lamellären Ichthyose darstellt (Huber et al. 1997; Hennies et al. 1998a).

Die *zweite Form* der nicht-erythrodermischen lamellären Ichthyose kann eine leichte Erythrodermie aufweisen, allerdings ist die Schuppung hier eher fein und grauweißlich. Auch ist hier ein Befall der Fußsohlen und Handflächen typisch.

Im Vergleich zu erythrodermischen Form der lamellären Ichthyose ist histologisch die zweite Form der nicht-erythrodermischen lamellären Ichthyose mit einer zwei bis dreimal höheren Orthohyperkeratose und mit einem normalen bzw. vergrößerten Stratum granulosum gekennzeichnet (Hazel und Marks 1985; Paller 1994).

Im Stratum corneum sind die n-Alkane normal, wobei hohe Werte von Sphingolipiden und freien Sterolen zu verzeichnen sind (Williams und Ellias 1985a). Ein Zeichen für gestörten Lipidmetabolismus im Stratum corneum sind Cholesterolsplalten. Ein dünner bzw. fehlender "cornified cell envelope" könnte auf einen Proteinsynthesefehler hinweisen (Niemi et al. 1991). Diese Form der nicht-erythrodermischen lamellären Ichthyose ist höchst wahrscheinlich bei einer in Schuppe gemessenen Ratio von Butyrase/ β -Glucosidase unter 11, da die Butyrase (kurzkettige Carboxylesterase) erniedrigt ist (Bergers et al. 1990).

Trotz der unterschiedlichen, phänotypischen Ausprägung der lamellären Ichthyosen gibt es, wie Hennies et al. 1998b schon bestätigten, keinen Hinweis auf den speziellen Genotyp, der die unterschiedliche Ausprägung der lamellären Ichthyosen erklären würde.

Letztendlich hat man bei der erythrodermischen Form und bei der nicht-erythrodermischen Form veränderte „lamellar bodies“ und einen veränderten interzellulären Aufbau entdeckt (Ghadially et al. 1992). So scheint die Unterscheidung zwischen "nicht erythrodermischer lamellärer Ichthyose" und "erythrodermischer lamellärer Ichthyose" außer nach klinischen Gesichtspunkten derzeit fraglich.

2.3.5.1.3 Harlekinichthyose (HI)

Das Harlekinbaby stellt die schlimmste Verhornungsstörung dar. Diese Art der Ichthyose wird autosomal rezessiv vererbt. Stewart et al. berichteten 2001 über eine Deletion auf Chromosom 18q bei einem Harlekinbaby, sodass 18q mögliche Kandidatengene zu enthalten scheint. Oft stirbt ein Teil von diesen Harlekinbabies in den ersten Lebenstagen. Allerdings ist es heute der Intensivmedizin zu verdanken, dass diese Kinder überleben können. Die Harlekinichthyose ist klinisch charakterisiert durch massivste generalisierte Hyperkeratosen. Die Babies weisen daher eine panzerartige Haut auf, durch diese sie bei der Nahrungsaufnahme und Atmung beeinträchtigt werden. Diese massiven Keratosen führen zu fischmaulartig aufgeworfenen, klaffenden Lippen, ektropionierten Lidern, einer eingengten Nase und klumpig verdickten oder eingezogenen Ohrmuscheln (Traupe, The Ichthyoses, 1989).

Wenn die Neugeborenen überleben, kann die weitere Entwicklung der Erkrankung sich auch günstig gestalten, sodass diese Kinder die Symptomatik einer schweren lamellären Ichthyose zeigen, Abb. 5-6.



Abbildung 5: Harlekinichthyose bei TS

Die Harlekinichthyose kann sich in der weiteren Entwicklung milder gestalten, sodass sie in eine schwere lamelläre Ichthyose über geht.

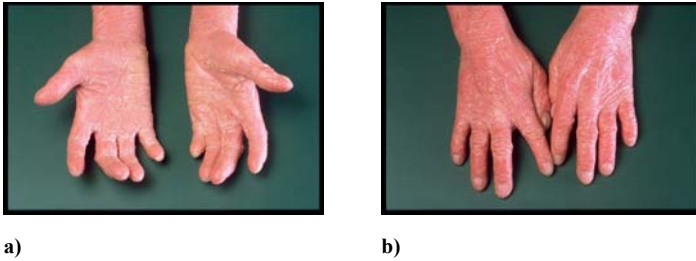


Abbildung 6 a-b: Handflächen und die Handrücken bei Harlekinichthyose
 Beim Patient TS sind die Hände stark hyperkeratotisch.

Histologisch gibt es zwei verschiedene Typen, die Retentionshyperkeratose und wenige Fälle mit Parakeratose. Das Stratum granulosum fehlt entweder völlig oder ist sehr deutlich reduziert (Luderschmidt et al. 1980), außerdem ist elektronenmikroskopisch die Abwesenheit der lamellar bodies und die Anwesenheit des marginalen Bandes der Kerantinozyten des Str. corneums charakteristisch. (Sandler und Hashimoto 1998)

2.3.5.1.4 Assoziierte congenitale Ichthyosen

Diese Gruppe der Erkrankungen sind eher selten. Sie gehören der assoziierten congenitalen Ichthyose an, bei denen die congenitale Ichthyose einen Teil des übergeordneten Symptomkomplexes darstellt. Hierzu gehören u. a. wie in der Tabelle 1 dargestellt das Netherton-Syndrom, das Happle-Syndrom, das Tay-Syndrom, das Sjögren-Larsson-Syndrom, das Kid-Syndrom und die Neutralfett-speicherkrankheit (Traupe, The Ichthyoses, 1989).

Darüber hinaus gibt es noch andere Fehlbildungen, die mit der congenitalen Ichthyose gemeinsam vorkommen, allerdings auf diese ausführlicher einzugehen, würde hier den Rahmen sprengen.

2.3.5.1.4.1 Comèl-Netherton-Syndrom (NTS)

Das „Comèl-Netherton-Syndrom“ (Comèl 1949; Netherton 1958) ist eine seltene autosomal rezessive Genodermatose, die mit ichthyosiformer Dermatitis, spezifischen Haarschaftanomalien und Atopien kombiniert einhergeht (Traupe, The Ichthyoses

1989). Die Natur des Hautbildes ist variabel, wobei einige Patienten generalisierte exfoliative Erythrodermien zeigen, während andere polyzyklisch wandernde Plaques mit doppelseitiger Schuppenkrause aufweisen, bekannt als Ichthyosis linearis circumflexa (ILC) (Hauser und Anton-Lamprecht 1996).

Oft haben Patienten bei der Geburt eine congenitale ichthyosiforme Erythrodermie (CIE). Bei einigen Patienten mit Ichthyose entwickelt sich später erst eine ILC. Die zunächst als Bambushaare bei Netherton-Syndrom beschriebene Trichorrhexis invaginata (TI) resultiert aus vorübergehenden, aber immerwiederkehrenden Defekten der Keratinisation (Sybert 1997). Weitere Haaranomalien sind Pili torti und Trichorrhexis nodosa (TN). Der pathognomonische Haardefekt (Trichorrhexis invaginata) ist jedoch nicht immer vorhanden und selbst wiederholte Haarprobenuntersuchungen können negativ sein. In der klinischen Praxis haben sich Analysen von Augenbrauhaaren bewährt, da hier der charakteristische Haardefekt häufiger nachweisbar ist. Die gleichzeitige atopische Diathese mit hohen IgE Spiegeln im Serum, Asthma und Heufieberfrequenzen führen zur Fehlinterpretationen der Erkrankung als Atopische Dermatitis.

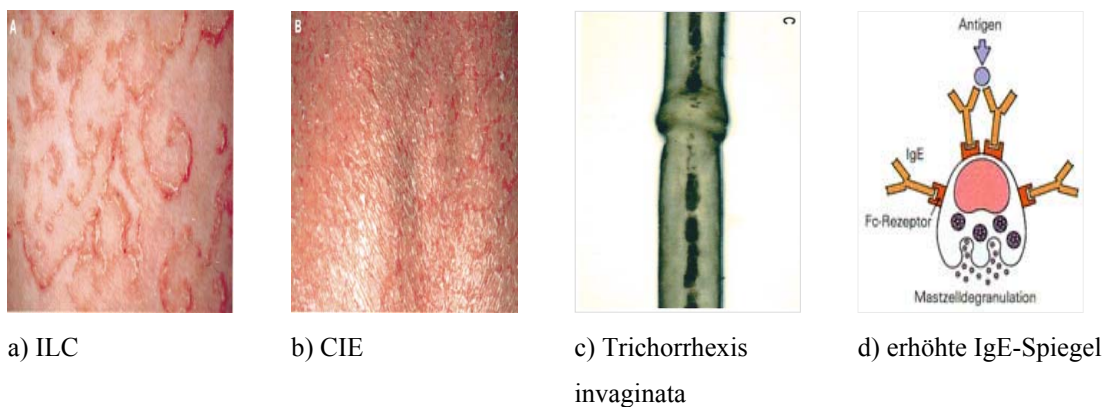


Abbildung 7 a-d: Netherton-Syndrom und seine klinischen Besonderheiten (Sprecher et al. 2001)

Andere assoziierte Störungen bei Netherton-Syndrom können verzögerte Entwicklung, wiederkehrende Infektionen, Urtikaria, Angioödeme, Aminoazidurie und manchmal auch leichte mentale Retardierung sein (Greene et al. 1985).

Die Diagnose des Netherton-Syndroms ist oft durch die Variabilität der Hautsymptomatik und durch die Vielzahl der Haarabnormalitäten schwierig. Wenige Fälle werden manchmal falsch als Leiner-Disease (seborrhoische generalisierte Dermatitis) diagnostiziert (El Shabrawi-Caelen et al. In press).

Histopathologische Untersuchungen sind bei der Diagnose kaum zielführend, da sich das Netherton-Syndrom von anderen Erkrankungen wie z.B. Psoriasis histopathologisch kaum unterscheidet. Beide Erkrankungen zeigen fokale Parakeratosen mit psoriasisformen epidermalen Hyperplasien, fokales Fehlen des Stratum granulosum und intraepidermale Akkumulation von Neutrophilen. Missgestaltete PAS positive Granula in den cornealen und granulären Zellschichten scheinen das Netherton-Syndrom zu charakterisieren. Doch sind diese bei atopischer Dermatitis und Psoriasis ebenfalls beschrieben (Zina et al. 1979).

Die klinischen Differentialdiagnosen schließen letztendlich die Atopische Dermatitis, erythrodermische Psoriasis, kongenitale ichthyosiforme Erythrodermie, Leiner-Disease und Erythrokeratoderma variabilis ein. Außerdem gleichen die perioralen und perianalen Akzentuierungen der Erytheme und der Schuppung dem klinischen Bild der Akrodermatitis enteropathica (Greene et al. 1985).

Die Prognose des Netherton-Syndroms kurz nach der Geburt ist nicht immer günstig, da die Kinder oft hypernatriämische Dehydratationen und Infektionen entwickeln. Wachstumsretardierung, Nierenversagen kommen ebenfalls bei einigen vor (Juge et al. 1994; Jones et al. 1986).

Seit kurzem kennt man den Genlocus für Netherton-Syndrom 5q32 (Chavanas et al. 2000a) und die Mutationen des SPINK 5 Gens, ein Serinprotease Inhibitor auch genannt LEKTI (lympho-epithelial-kazal type inhibitor) (Mägert et al. 1999; Sprecher 2001; Chavanas et al. 2002b; Komatsu et al. 2002; Bitoun et al. 2002a, 2002b; Müller et al. 2002), Abb.8.

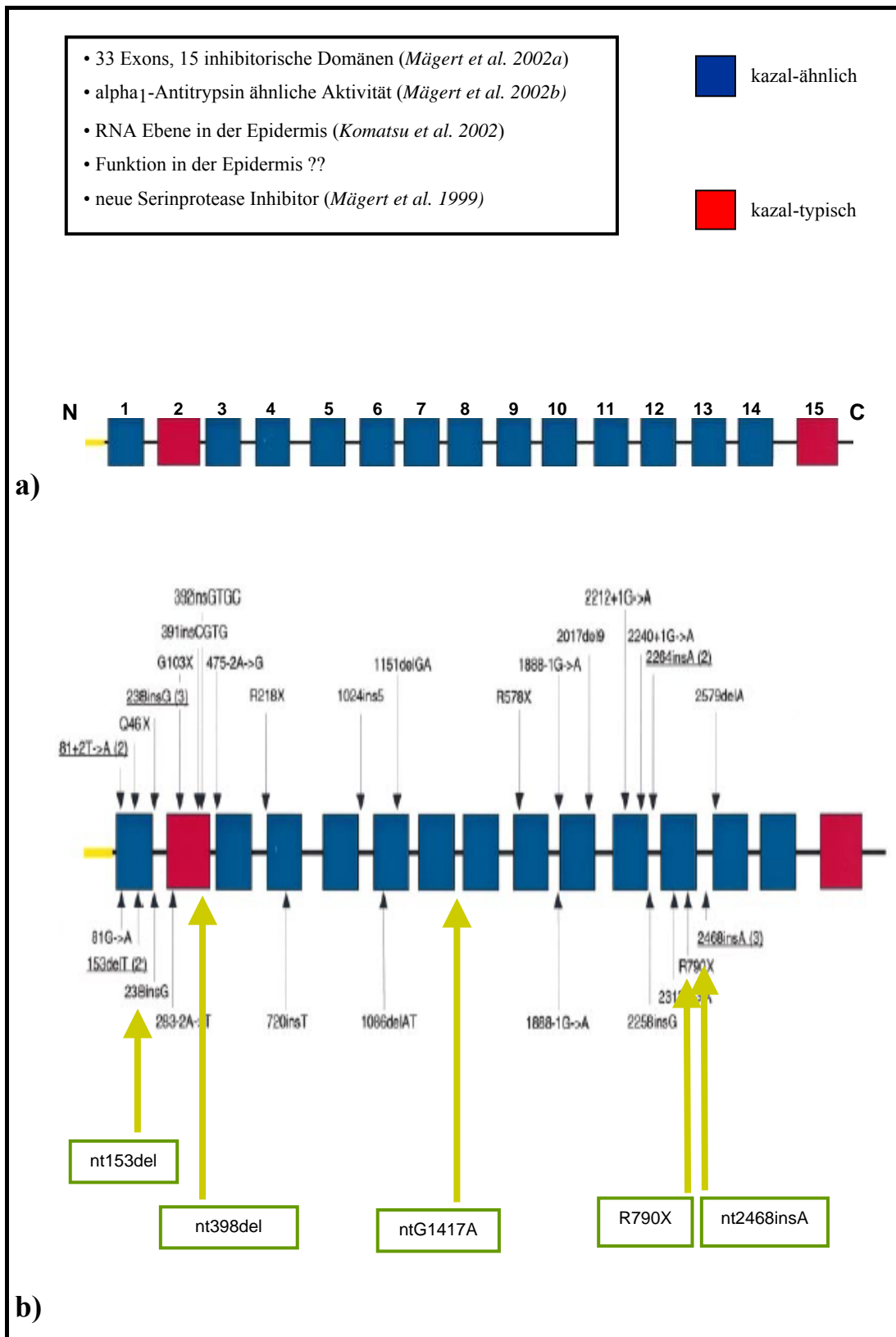


Abbildung 8 a-b: a) Lympho-Epithelial Kazal Type Inhibitor; b) Mutationen des SPINK 5 (Sprecher et al. 2001, Raghunath et al. submitted).

2.4 Die Transglutaminasen

Transglutaminasen (TGasen) sind kalziumabhängige Enzyme, die die Bildung von Querverbindungen von N (γ -Glutamyl) Lysin Isopeptiden katalysieren. Sie verknüpfen Glutaminylreste (γ -Amid eines Donator-Glutamins) und Lysylreste (ϵ -NH₂ eines Acceptor-Lysins) innerhalb oder zwischen Polypeptiden kovalent miteinander (Folk 1983; Greenberg et al. 1991; Polakowska und Goldsmith 1991). Bisher wurden keine Enzyme zur Spaltung dieser Isopeptidbindungen gefunden, somit handelt es sich hier, um eine fast irreversible Reaktion, die wesentlich zur Stabilisierung von Gewebe beiträgt. (Aeschlimann und Paulsson 1994).

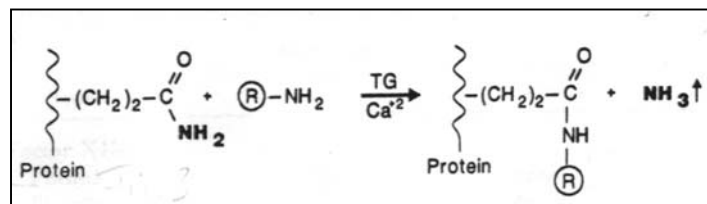


Abbildung 9: TGasen katalysieren die kalziumabhängige Acylreaktion zwischen γ -Carboxamid Gruppe von Glutaminresten und die primäre Aminogruppe von Lysinen oder Polyaminen

Transglutaminasen bilden eine große Proteinfamilie und sind in verschiedenen Zellen und Geweben verteilt (Greenberg et al. 1991). Sie sind verantwortlich für Blutgerinnung, Apoptose (Fesus et al. 1991), Quervernetzung von intrazellulären Proteinen bezüglich der Gestaltung des "cornified cell envelope" (Aeschlimann und Paulsson 1994).

Es gibt bisher acht bekannte Gene in höher differenzierten Wirbeltieren (Aeschlimann und Paulsson 1994; Aeschlimann et al. 1998). Diese exprimieren Transglutaminase 1, 2, 3, 4, 5, 6, Bande 4.2, 7 und Faktor XIIIa (Phillips et al. 1992; Russell et al. 1994; Kim et al. 1994; Wang et al. 1994; Grenard et al. 2001).

Tabelle 2: Transglutaminase-Terminologie; die im Text verwendeten Bezeichnungen sind unterstrichen

Genprodukt	alternative Bezeichnungen	Genname/Genlocus
TG _K	Keratinocyten Transglutaminase, <u>TGase 1</u>	TGM1/Chr. 14q11.2
TG _E	Epidermal Transglutaminase, <u>TGase 3</u>	TGM3/Chr. 20q11.2-q12
TG _C	Gewebe Transglutaminase, <u>TGase 2</u>	TGM2/Chr. 20q11-12
TG _X	<u>TGase 5</u>	TGM5/Chr. 15q15.2
TG _Y	TGase 6	TGM6/Chr. 20q11
TG _Z	<u>TGase 7</u>	TGM7/Chr. 15q15.2
TG _P	Prostata Transglutaminase, TGase 4	TGM4/Chr. 3p21-22
Faktor XII a-subunit	Faktor XII a, Plasma Transglutaminase	F13A1/Chr. 6p24-25
Bande 4.2	Erythrozyten Protein <u>Bande 4.2</u>	EPB42/Chr. 15q15.2

TGase 2 wird ubiquitär im Gewebe exprimiert, stabilisiert die dermoepidermale Junctionszone im Stratum basale (Raghunath et al. 1996).

Kürzlich wurde eine weitere epidermale Transglutaminase, **TGase 5**, beschrieben und das Gen charakterisiert (Aeschlimann et al. 1998; Grenard et al. 2001). Gleichzeitig ist im menschlichem Prostatagewebe die **TGase 7**, die u. a. auch in der Epidermis vorkommt, entdeckt worden. Beide Enzyme sind in unterschiedlichen Geweben verteilt. Ihre Funktion ist noch unbekannt (Grenard et al. 2001). Auffällig ist die Anordnung der Gene, TGase 5, TGase 7 und der TGase Bande 4.2. Diese sind in Form eines Tandems auf Chromosom 15 angeordnet (TGase 7 proximal und Bande 4.2 distal der TGase 5).

TGase 1 und **TGase 3** sind wichtige Enzyme für die Gestaltung des "cornified cell envelope". Beide kalziumabhängigen Enzyme werden in den Keratinozyten des Stratum granulosum synthetisiert (Rice and Green 1977; Thacher and Rice 1985; Greenberg et al. 1991; Polakowska et al. 1991).

Die Mehrzahl des TGase 1 Enzyms ist membran-assoziiert, welches in allen epithelialen Schichten zu finden ist. TGase 3 stellt ein cytoplasmatisches Enzym aus 693 Aminosäuren dar. Sie wird in den inneren Scheidewurzeln, in der Markregion der Haarfollikeln und in den terminalen Keratinozyten exprimiert (Kim et al. 1993; Lee et al. 1993b).

Die genaue Funktion von TGase 1 und TGase 3 und ihre Beziehung zueinander bezüglich der Prozesse, während des "cornified cell envelope" Aufbaues ist noch nicht ganz klar. Fest steht jedoch, dass das Fehlen der TGase 1 nicht durch TGase 3 kompensiert werden kann. Vermutlich geht die Quervernetzung von Proteinen durch TGase 1 der durch TGase 3 voraus. Bisherige Studien zeigten, dass für die Gestaltung des "cornified cell envelope" TGase 1 initial Involucrin quervernetzt, wobei später erst die Quervernetzung anderer Proteine wie SPRP und Loricrin durch TGase 3 erfolgt (Steinert et al. 1995). Ebenso ist demonstriert worden, dass die Quervernetzung des Loricrins für die Utilisation von verschiedenen Glutaminen und Lysininen beide Enzyme erfordert (Candi et al. 1995), so dass offenbar beide Enzyme sich nicht kompensieren können. Im Gegensatz zu TGase 1 sind TGase 3 Defekte bislang noch nicht beschrieben worden.

2.5 Calpain

Calpaine bilden eine neutrale kalziumabhängige Familie von Proteasen (Cysteinprotease), die ubiquitär im Zytoplasma vieler verschiedener Zellen einschließlich der Epidermis vorkommen. Calpain ist in verschiedene zelluläre Funktionen wie Exozytose, Zellfusionen, Apoptose und Proliferation involviert (Saido et al. 1994). Bisher sind u. a. zwei Isoenzyme, m-Calpain und μ -Calpain, mit verschiedener Kalziumsensivität, die für ihre Aktivität millimolare und mikromolare Kalziumkonzentrationen erfordern, bekannt (Croall et al. 1991). Die beiden ubiquitären Isoenzyme bestehen aus einer heterodimeren Struktur, wobei die Struktur eine große und eine kleine Untereinheit umfasst. Die große Einheit hat eine Molekülmasse von 80 kDa, die kleine Einheit von 30 kDa (Sorimachi et al. 1994). Die großen Untereinheiten von Calpain L1, L2 und auch L3, ein muskelspezifisches, proteinverwandtes Calpain, haben unterschiedliche Aminosäuresequenzen (Ohno et al. 1986/ 1987; Suzuki 1987; Sorimachi et al. 1989) und werden von verschiedenen Genen codiert (Ohno et al. 1990), während die kleinen Untereinheiten bei beiden Isoenzymen vom gleichen Gen exprimiert werden (Ohno et al. 1990; Saido et al. 1994), Tabelle 3.

Tabelle 3: Genloci des Calpains mit verschiedenen Genen, die die Untereinheiten codieren (Ohno et al. 1990).

Bezeichnung	Genname	Genlocus
Calpain 1 (large subunit)	CAPN1= Calpain L1 (μ /I)	Chr. 11q13
Calpain 2 (large subunit)	CAPN2= Calpain L2 (m/II)	Chr. 1
Calpain 3 (large subunit)	CAPN3= Calpain L3 (p94)	Chr. 15q15.1-q21.1
Calpain 4 (small subunit)	CAPN4= Calpain S	Chr. 19q13.1

Die Calpaine haben die Fähigkeit durch die limitierte Proteolyse die Aktivität oder die Funktion von verschiedenen zytoskeletalen Proteinen, Proteinkinasen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren zu verändern (Cassel et al. 1982; Kishimoto et al. 1983; Bodwell et al. 1985). Das Calpain wird vor der Substratproteolyse (Transglutaminasen, Filaggrin etc.) über die Autolyse nach Kalziumbindung an die calmodulinähnliche Domäne in den großen Untereinheiten aktiviert (Saido et al. 1993). Der Prozess der Aktivität wird durch die Translokation von Calpain an die Zellmembran vergrößert. Sie wird durch das Niveau und der zellulären Aufteilung des Enzyms und durch seinen endogenen Inhibitor, Calpastatin reguliert (Eto et al. 1995).

Speziell das μ -Calpain ist in den mittleren bis oberen Lagen der humanen Epidermis nachgewiesen worden (Miyachi et al 1986). Das Protein Filaggrin, das in die Umgestaltung der Intermediär-Filamente einbezogen ist, präsentiert sich mit Calpain zusammen im Str. granulosum (Resing et al. 1993). Die Regulation der Transglutaminasen durch Calpaine wurde von Zhang et al. 1998 beschrieben, wobei schon 1988 die Untersuchungen von Ando et al. darauf hindeuteten, dass einer der Calpainfunktionen die Aktivierung von epidermalen Transglutaminasen in der Epidermis sein könnte (Ando et al. 1988). Untersuchungen mit einem Calpaininhibitor zeigten die Blockierung der Bildung des "cornified cell envelope" (CE) spezifisch durch Behinderung der **Transglutaminase 1** Aktivierung (Kim und Bae 1998). Hitomi et al. beschrieben 1999 u. a. an einer rekombinanten TGase 3, dass Calpain keinen Effekt auf die Aktivierung dieses Proteins hat.

Zu dem wiesen neueste Befunde auf eine Beteiligung von Calpainen bei der normalen epidermalen Differenzierung über Prozessierung von Caspase hin (Chien et al 2002).

Außer dieser beschriebenen Calpainproteine gibt es noch andere (z.B. CAPN5 = Chr. 11q14; CAPN7 = Chr. 3p24; CAPN10 = Chr. 2q37.3), wobei nicht alle chromosomalen Lokalisationen identifiziert sind.

2.6 Osteonectin / SPARC

Osteonectin (BM 40, SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein), Tabelle 4) ist ein calciumbindendes extrazelluläres Glykoprotein (Mason et al. 1986), das von vielen unterschiedlichen Zelltypen synthetisiert wird (Maillard et al. 1992) und in die Mineralisation von Knochen und Knorpel (Yan et al. 1999), Zellproliferation und Angiogenese (Sage 1996), Tumorgenese (Jendraschak und Sage 1996), Katarraktogenese (Gilmour et al. 1998) und Wundheilung (Reed und Sage 1996) eingreift.

Tabelle 4: Terminologie des Osteonectins

alternative Bezeichnungen	Literatur
Osteonectin (Protein der Knochenmatrix)	Termine et al 1981
SPARC (<u>S</u> ecreted <u>P</u> rotein <u>A</u> cidic and <u>R</u> ich in <u>C</u> ystein)	Mason et al. 1986
BM 40 (Basalmembrankomponente)	AG Timpl, Mann et al. 1987/ Maurer et al. 1992

Spezifische Interaktionen zwischen Osteonectin und Wachstumsfaktoren, extrazellulären Proteinen und Zelloberflächen-Proteinen (Thrombospondin 1, Vitronectin, Enhactin, fibrilläres Kollagen (Typ I, II, III, V), Kollagen IV etc.) tragen zum Aktionsspektrum von Osteonectin bei, Tabelle 5.

Tabelle 5: Osteonectininteraktionen

Interaktionen	Referenzen
unterbricht Zelladhäsionen	Murphy-Ullrich et al. 1995
reguliert Zellgestaltung	Sage et al. 1989a; Sage et al. 1989b; Lane und Sage 1990
hemmt Zellzyklen	Funk und Sage 1991; Funk und Sage 1993
reguliert Zelldifferenzierungen	Bassuk et al.1999
inaktiviert Zellantworten bestimmter Wachstumsfaktoren	Hasselaar und Sage 1992
Reguliert die Produktion von extrazellulärer Matrix und Matrix-Metalloproteasen	Hasselaar et al. 1991 ; Temble et. al 1993

Das Osteonectin Gen liegt auf Chromosom 5q31.3-q32 (Le Beau et al. 1993) und exprimiert ein Protein, das aus vier Domänen besteht, wobei jede dieser Domänen eigene Aktivitäten und Eigenschaften zeigen, Abb.10. Die EC-Domäne und die follistatin-ähnliche Domäne wurden erst kürzlich aufgeklärt.

Die N-Terminale Domäne, bindet Kalziumionen mit niedriger Affinität (Maurer et al. 1992) und interagiert mit Hydroxyapatit (Romberg et al. 1985). Sie greift in die Mineralisation von Knorpel und Knochen ein. Ein besonderes Merkmal dieser Domäne ist die Transglutaminase 2 katalysierte Quervernetzung. Das Osteonectin stellt ein Glutaminyl-Substrat (Aminakzeptor) in der Chondrozyten-Matrix dar und stabilisiert wohl so die extrazelluläre Matrix des Knorpels (Aeschlimann et al. 1995; Hohenadl et al. 1995).

Die follistatin-ähnliche (FS) Domäne ist cysteinreich und hemmt entsprechend der Follistatin- und Kazaltyp-Proteaseinhibitoren die Proliferation (Patthy et al. 1991).

Außerdem enthält diese Domäne zwei Bindungsstellen, von denen einer die Sequenz KGHK (AS 119-122) beinhaltet und die Zellproliferation und Angiogenese stimuliert (Funk und Sage 1991; Lane et al. 1994).

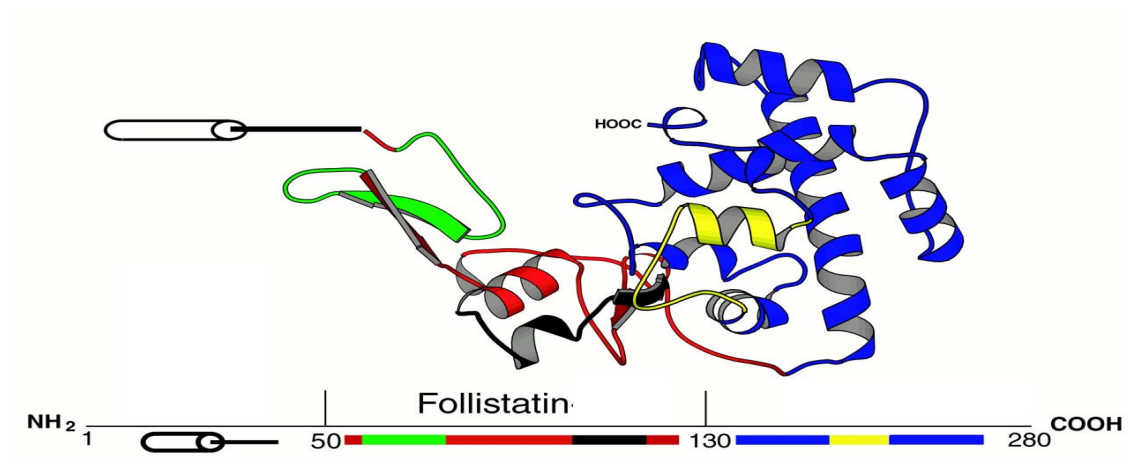
Domäne III (EC Domäne) (extrazelluläre Ca^{++} -Bindung) ist die größte Domäne und enthält ein Paar "EF Hands" mit hoher Ca^{++} -Bindungsaffinität und beinhaltet Bindungsstellen für das Kollagen IV (Mayer et al. 1991).

Die C-Terminale Domäne IV interagiert mit endothelialen Zellen (Murphy-Ulrich et al. 1995; Sage et al. 1995). Sie schließt ebenfalls "EF hand" mit hoher Ca^{++} -Bindungsaffinität und Kollagenbindung ein (Pottgiesser et al. 1994), somit repräsentieren Domäne III und IV eigentlich eine gemeinsame Domäne.

Abbildung 10: Struktur des Osteonectins

Die repräsentativ jeder Domäne zugeschriebenen Aktivitäten werden unterhalb der gekennzeichneten Aminosäuren dargestellt.

Die follistatin-ähnliche Domäne beinhaltet die Aminosäuren 54-137. Die EC-Domäne beinhaltet die Aminosäuren 138-286 (Hohenester et al. 1997).



NH ₂ -Domäne/ Domäne I	Follistatin-ähnliche Domäne II (in Homologie zu Follistatin- ähnlichen und <u>Kazal-ähnlichen</u> Proteaseinhibitoren)	EC -Domäne /C-Domäne Domäne III-IV
<p>-Ca⁺⁺-Bindungs-Domäne (niedrige Affinität)</p> <p>-Transglutaminase Quervernetzung</p> <p>-hemmt Zellwachstum</p>	<p>-hemmt Proliferation</p> <p>-Aufhebung fokaler Adhäsionen</p> <p>-nach Freigabe von Angiopeptiden Stimulierung der Proliferation und Angiogenese</p>	<p>-Ca⁺⁺-Bindungs-Domäne (hohe Affinität)</p> <p>-hemmt Zellwachstum</p> <p>-hemmt Proliferation</p> <p>-Aufhebung fokaler Ad- häsionen, bindet an Zellen und Matrix</p>

2.7 Genetik der Ichthyosen

2.7.1 Autosomal rezessive lamelläre Ichthyose (ARLI)

Bisher sind sechs Genloci der lamellären Ichthyosen identifiziert worden.

Russel et al. fanden bereits 1994 mit Hilfe von Kopplungsanalysen einen Genlocus der lamellären Ichthyose auf Chromosom 14q11. Nur schwere Fälle mit phänotypisch nicht-lamellären Ichthyosen wurden bei dieser Untersuchung einbezogen. Der Phänotyp war bezüglich der Erythrodermie nicht definiert.

Ein zweiter Genort für die lamelläre Ichthyose wurde 1996 auf Chromosom 2q33-35 identifiziert (Parmentier et al. 1996).

Im März 2000 fand man einen weiteren Ort auf dem Chromosom 19p12-q12, wobei neun große consanguine Familien untersucht wurden (Fischer et al. 2000). Fischer et al. zeigten außerdem einen Genlocus auf Chromosom 3p21, der mit der erythrodermischen Form der lamellären Ichthyose assoziiert ist.

Eine andere Arbeitsgruppe entdeckte zeitgleich auf Chromosom 19p13.1-p13.2 eine Lokalisation bei nichtlamellären, nichterythrodermischen autosomal rezessiven congenitalen Ichthyosen an einer großen finnischen Familie (Virolainen et al. 2000).

Letztendlich bei weiteren Untersuchungen an vier Familien aus Deutschland, Türkei und den Vereinigten arabischen Emiraten ist die genetische Heterogenität der autosomal rezessiv congenitalen Ichthyosen (ARCI) nochmals durch die Entdeckung eines neuen Genlocus zwischen den Markern D17S938 und D17S1856 auf dem Chromosom 17p bei der deutschen und der türkischen Familie verdeutlicht worden. Die beiden Familien aus den Vereinigten arabischen Emiraten zeigten weder zu den schon bekannten Loci noch zu dem neuen Locus eine Verbindung (Krebsová et al. 2001). Jopard et al. grenzten 2002 den Locus auf Chromosom 17 ein und berichteten über Mutationen in Lipogenase-3 (ALOXE3) und 12 (R)-Lipogenase (ALOX12B) Genen in nicht bullöser congenitaler ichthyosiformer Erythrodermie auf Chromosom 17p13.1.

2.7.1.1 Mutationen des TGM 1

Das TGase 1 Gen liegt auf Chromosom 14q11.2-13 und besteht aus 14.133 Basenpaaren. Diese beinhalten 15 Exons, die durch 14 Introns unterbrochen werden (Phillips et al. 1990; Kim et al. 1992; Yamanishi et al. 1992). Huber et al. berichteten im Januar 1995 über mehrere Patienten aus drei verschiedenen Familien mit stark verminderter Aktivität der Transglutaminase 1. Man legte Keratinozytenkulturen von fünf betroffenen Patienten an, wobei die Zellen in eine cytosolische Fraktion und in eine Membranfraktion aufgebrochen wurden. Die Transglutaminase 1 Aktivität wurde in diesen Fraktionen durch die Einbaurate von ^{14}C -Putrescin in Casein radiochemisch bestimmt. Die Zellen wurden in Hochkalziummedium zur maximalen Expression der TGase 1 Aktivität gehalten. Unter diesen Bedingungen, zeigte sich im Zelllysate eine deutlich verminderte Aktivität der Transglutaminase 1. Gleichzeitig wurden homozygote und heterozygote Mutationen im TGase 1 Gen nachgewiesen (Huber et al. 1995a). Ergebnisse von Huber et al. im November 1995 legten den Verdacht der genetischen Heterogenität nahe. Sie untersuchten zwei weitere Fälle auf eine Mutation im TGase 1 Gen auf Chromosom 14q11. Die Ergebnisse zeigten, dass bei diesen kein Transglutaminasemangel und keine Mutation des bisher bekannten TGase 1 Gens vorlag (Huber et al. 1995b).

Im gleichen Jahr entdeckten Russel et al. bei weiteren Patienten neue Punktmutationen, Arg141His und Arg142His im TGM 1.

Bale et al. bestätigten die Aussage der genetischen Heterogenität 1996. In ihrer Studie untersuchten sie zwei erkrankte Familien, die nicht zu 14q11 koppelten. Dies unterstrich, dass viele Gene für die Ausbildung der terminalen Differenzierung notwendig sind und die Mutationen unterschiedlicher Gene zum gleichen Phänotyp einer Krankheit führen können.

Sieben weitere Mutationen, die stark verminderte Transglutaminase 1 Aktivität verursachen, wurden 1997 von Huber et al. gezeigt. Die meisten Mutationen zeigten sich bei fünf der sieben Patienten in der Änderung von nur einer Aminosäure, die zu einer Nukleotidveränderung geführt hat (R315C, R687C, S358R, G473S und V379L). Bei einem Patienten fand eine "in frame" Deletion von 18 Aminosäuren statt (Δ 679-

696), bei einem anderen Patienten wurde eine Punktmutation gefunden, die zu einem frühzeitigen Stopcodon führte (R127Stop).

Weitere fünf Mutationen des TGM1 Gens (Arg141His, Arg142Cys, Arg395Leu, Gly217Ser und Val378Leu) wurden bei einer finnischen Population gefunden, wobei auch Patienten mit der erythrodermischen Form Mutationen im TGM1 Gen zeigten (Laiho et al. 1997). Die Schlussfolgerung liegt somit nahe, dass Mutationen zu unterschiedlichen Phänotypen führen können.

Neue Punktmutationen auf TGM1 Gen wurden bei drei Patienten mit drastisch reduzierter Transglutaminase 1 Aktivität gefunden; homozygote Mutationen-Gly143Glu in Exon 3, Val382Met in Exon 7, eine C→T Mutation in der Promotorregion- und eine bereits bekannte "splice site" Mutation (Petit et al. 1997).

Ebenfalls 1997 fanden Schorderet et al. eine R127X Mutation in Exon 3 des TGase 1 Gens.

Bei einer Untersuchung von Eheleuten mit lamelläre Ichthyose wurden zwei neue Mutationen in Exon 3, 1387insCAGC und in Exon 8, 456delAC, entdeckt. In der folgenden Zwillingschwangerschaft konnten ebenfalls mit Hilfe pränataler DNA-Analysen in der 14. Schwangerschaftswoche Aussagen über den Gesundheitszustand der Kinder gemacht werden. Die Kinder wurden ohne Hautveränderung geboren, da ihnen nur die väterliche Mutation (1387insCAGC in Exon 3) vererbt wurde und beide Mutationen für das Auftreten der Ichthyose notwendig gewesen wären (Bichakjian et al. 1998).

Hennies et al berichteten 1998 von sieben unterschiedlichen "missense" Mutationen, von denen bislang fünf noch nicht bekannt waren (bereits bekannt: R142H und R323Q, neu: G144R, R225H, R315C, G382R, V518M) und der "splice site" Mutation A3447G. Anhand zweier nicht miteinander verwandter Patienten mit der gleichen homozygoten Mutation beschrieben sie zusätzlich die Unmöglichkeit vom Phänotyp einer LI auf den Genotyp zu schließen (Hennies et al. 1998a).

Noch im gleichen Jahr wurde bei einem Patienten sowohl die neue "missense" Mutation C53S, als auch die bereits bekannte "splice site" Mutation A3447G gefunden. Ein weiterer Patient hatte die bisher unbekannte "nonsense" Mutation W263X (Hennies et al. 1998b).

Die Untersuchungen in Norwegen bei 36 Patienten mit lamelläre Ichthyose und sieben Patienten mit einer erythrodermischen lamellären Ichthyose schienen auf eine einzelnen Grundmutation (founder effect) hinzuweisen (A→G Insertion an der "Splice Acceptor Stelle" des Intron 5) (Pigg et al. 1998).

1999 wurden bei zwei nicht verwandten Familien weitere Mutationen entdeckt, dabei handelte es sich um P248L, F400V und eine homozygote Mutation, R315L, (Tok et al. 1999).

2001 letztendlich wurden von Esposito et al. sechs nicht miteinander verwandte italienische Familien mit lamelläre Ichthyose untersucht und eine neue Mutation E520G und drei "missense" Mutationen (V518M, E520G, S272P) und die bereits bekannte "splice site" Mutation auf TGM1 Gen gefunden (Eposito et al. 2001).

Im gleichen Jahr entdeckten Akiyama et al. eine weitere Mutation L204Q bei einer milden Form der lamellären Ichthyose (Akiyama et al. 2001).

Raghunath et al. entdeckten weitere Mutationen des TGM 1 Gens bei einer aus dem Kosovo stammenden Familie. Einer der Mutationen, G278R, wurde durch Cserhalmi-Friedmann et al. 2001 in Kombination mit R286Q bei einem Patienten mit lamelläre Ichthyose schon beschrieben. Dreidimensionale Modelle wiesen daraufhin, dass G278R keine Aktivität zeigte. Zwei Geschwister aus der untersuchten Familie wiesen zwei gleiche heterozygote Mutationen des TGM 1 Gens auf. Hier wurde das SHCB als eine allelische Variante der autosomal rezessiv lamellären Ichthyose (ARLI) beschrieben. Die neue Mutation, D490G, führt im aktiven Zentrum des TGase 1 Proteins unter dem Einfluss von Wassermolekülen zu einer Hemmung der Enzymfunktion. Eine reduzierte Aktivität in G278R und die Formation von Wassermolekülen in D490G führen zu einem mutierten Enzym mit einer inaktivierten *trans* Konformation im Uterus. Nach der Geburt werden die Wassermoleküle entfernt und das Enzym in eine partiell aktive *cis* Form umgewandelt. Diese Gegebenheiten belegten Raghunath et al. mit Hilfe eines "3-D-Protein-Modelling", das unter dem Einfluss von Wasser eine Konformationsänderung des Enzyms von *cis* in *trans* an entsprechender Stelle zeigte. Da im Uterus ein erhöhter Wasserdruck herrscht, ist so die dramatische Verbesserung des Hautzustandes nach der Geburt zu erklären (Raghunath et al. 2003).

2.7.2 Netherton-Syndrom

Chavanas et al. fanden im März 2000 den Genlocus für Netherton-Syndrom auf 5q32 (Chavanas et al. 2000a) und etwas später berichteten sie von 11 verschiedenen Mutationen in 13 Familien im SPINK 5 (serine protease inhibitor, kazal-type 5) Gen. Hierbei fanden sich eine "nonsense" Mutation (R790X), vier mononukleotide Insertionen (238insG, 720insT, 2258insG, 2468insA), zwei mono/dinukleotide Deletionen (153delT, 1086delAT) und vier "splice site" Mutationen (81G→A, 283-2A→T, 1888-1G→A, 2313G→A), Tabelle 6 (Chavanas et al. 2000b). Das Netherton-Syndrom zeigt eine starke Störung der epidermalen Barrierefunktion, wie allerdings die gestörte SPINK 5 Funktion dazu führt, ist bislang nicht ganz klar.

Eine verfrühte Sekretion von lamellar bodies und Herde von elektronendichtem Material im interzellulären Raum des Stratum corneums wurden 1999 von Fartach et al. beschrieben. Da diese Auffälligkeiten bei keiner anderen erythrodermischen Erkrankung vorhanden waren, scheinen sie spezifisch für das Netherton Syndrom zu sein (Fartach et al. 1999).

SPINK 5, auch LEKTI genannt, ist ein neuer menschlicher Serinprotease Inhibitor (Mägert et al. 1999), der durch ein 33-Exon-Gen codiert wird und 15 kazal-typ-ähnliche Inhibitionsdomänen umfasst. LEKTI hat insgesamt eine α_1 -Antitrypsin ähnliche Aktivität, aber die genaue Aufgabe der Inhibitionsaktivität, der einzelnen Domänen ist bisher noch nicht beschrieben worden. LEKTI wurde in der RNA Ebene der Epidermis gefunden (Komatsu et al. 2002), jedoch ihre genaue Funktion bleibt unklar.

Mittlerweile sind noch einige neue Mutationen des SPINK 5 durch Sprecher et al. 2001, Komatsu et al. 2002, Bitoun et al. 2002a und 2002b, und Müller et al. 2002 gefunden worden. Tabelle 6 zeigt einige dieser Mutationen.

2003 fanden Raghunath et al. bei fünf unterschiedlichen Familien (zwei aus Bosnien, 2 aus Deutschland und eine aus Österreich) drei schon publizierte und zwei neue Mutationen des SPINK 5 Gens. Aus dem Blut dieser Netherton-Syndrom Patienten wurde das Genom DNA von peripheren Leukozyten mit Standardmethoden extrahiert (Sambrook et al. 1989).

Alle 33 Exons des SPINK 5 Gens wurden unter Benutzung der publizierten Primer (Sprecher et al 2000; Chavanas et al.2000b) amplifiziert. Bei den neuen Mutationen handelt es sich um die 2bp Deletion (398delTG) im Exon 5 bei einer der deutschen Familien und die 1432-13G→A im Intron 15 an der Grenze zu Exon 16 bei der österreichischen und einer der bosnischen Familien. Die 398delTG repräsentiert eine "frameshift" Mutation, der zu einem vorzeitigen Stopcodon führt. Die Mutation im Intron 15 (1432-13G→A) führt zu einer vorzeitigen "Splice Acceptor Site" 10bp stromaufwärts der erwarteten "Splice Acceptor Stelle".

Tabelle 6: Einige SPINK 5 Mutationen

Mutationen	Lokalisation	Nukleotid Wechsel	Konsequenzen	Literatur
153delT	Exon 3	A(T)6C→A(T)5C	"Frameshift"	Chavanas et al. 2000B
1086delAT	Exon 12	TCATATG→TCATG	"Frameshift"	
238insG	Exon 4	GGGC→GGG <u>G</u> C	"Frameshift"	
720insT	Exon 9	CACG→CA <u>T</u> CG	"Frameshift"	
2258insG	Exon 24	AGAA→AGG <u>A</u> A	"Frameshift"	
2468insA	Exon 26	T(A)10G→T(A)11G	"Frameshift"	
R790X	Exon 25	ACTCGA→ACTTGA	"nonsense"	
81G→A	Exon 2	AGgttagtA <u>A</u> gttagt	"Splice site"	
283-2A→T	Intron 4	cagCTG→c <u>t</u> gCTG	"Splice site"	
1888-1G→A	Intron 20	agGAG→a <u>g</u> GAG	"Splice site"	
2313G→A	Exon 24		Skip exon 24	Sprecher et al. 2001
81+2T→A	Intron 2	CACgtt→CAGgat	"Splice site"	
Q46X	Exon 3	CCCAG→CC <u>T</u> AG	"nonsense"	
G103X	Exon 5	AAGGAG→AATGAG	"nonsense"	
391insCGTG	Exon 5	TGCA→TGCGTGCA	"Frameshift"	
392insGTGC	Exon 5	GCAC→GCGTGCAC	"Frameshift"	
475-2A→G	Intron 6	cagGAT→c <u>g</u> gGAT	"Splice site"	
R218X	Exon 8	GACGAA→GATGAA	"nonsense"	
1024ins5	Exon 12	AAG→AGAAAAAAG	"Frameshift"	
1151delGA		GAGAAC→GAAC	"Frameshift"	
R578X	Exon 19	ATGGAC→AT <u>T</u> GAC	"Frameshift"	
2017del9	Exon 22	ACTCAGgtgag→Ag	"Splice site"	
2212+1G→A	Intron 22	CAGgtg→CAGatg	"Splice site"	
2240+1G→A	Intron 23	ATTgt→ATTat	"Splice site"	
2264insA	Exon 24	AAAAT→AAAA <u>A</u> T	"Frameshift"	
2579delA	Exon 27	GAAAG→GAAG	"Frameshift"	
1036insG(A)4	Exon 12	G(A) ₄ AGG→G(A) ₄	"Frameshift"	Bitoun et al. 2002
R371X	Exon 13	1111C→TG(A) ₄ AGG	"nonsense"	
2041delAG	Exon 22	GAGGA→GGA	"Frameshift"	
1608-1G→A	Intron 17	AgCAA→aaCAA	"Splice site"	
R217X	Exon 8	649C→T	"nonsense"	
R210X	Exon 8	628C→T	"nonsense"	
56G→A	Exon 1	AGGgt→AGAgt	"Splice site"	
377delAT	Exon 5	ATATG→ATG	"Frameshift"	
398delTG	Exon 5	TGTGCT→TGCTGA	"Frameshift"	Raghunath et al. submitted
1432-13G→A	Intron 15	cggttcttaagTCAA→cagttcttaagTCAA	"additional splice site upstream"	

2.7.3 Harlekinichthyose

Stewart et al. fanden 2001 eine de novo Deletion des Chromosom 18q (del (18) (q21.3)). Vermutlich liegt das Gen für HI in dieser Lokalisation oder distal davon und demaskiert möglicherweise zum Teil diese autosomal rezessive Verhornungsstörung.

2.8 Fragestellung und Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die immunhistochemische Expression von Kandidatenproteinen bei Patienten mit klinisch definierten Verhornungsstörungen zu untersuchen.

Als Kandidatenproteine kamen TGase 1 und 3, Calpain und Osteonectin in Frage, weil sie zum einen in der histologischen Zielregion (Str. granulosum) exprimiert werden und des Weiteren in Kopplungsstudien chromosomale Regionen für ARLI/SHCB , Harlekin, NTS gezeigt wurden, in denen Genorte für die hier genannten Proteine platziert werden konnten.

1. Welche Unterschiede gibt es in der Expression von TGase 1 und TGase 3 bei Patienten mit den definierten Verhornungsstörungen im Gegensatz zu Normalhaut?
2. Was für eine Rolle spielt das Calpain, als Aktivator der Transglutaminase 1 und das Osteonectin als Substrat für Transglutaminasen?

Das Patientenkollektiv schloss insgesamt 98 Patienten ein, davon 55 mit isolierter congenitaler Ichthyose. Fünf Patienten hatten die Diagnose Kollodiumbaby. Neben diesen wurden elf Patienten mit assoziierten congenitalen Ichthyosen und fünfzehn mit isolierten vulgären Ichthyosen untersucht. Vier weitere Patienten hatten die Diagnose Ichthyose ohne weitere Definition. Zwei Patienten waren mit entzündlichen Ichthyosen diagnostiziert. Die restlichen verteilten sich auf Palmoplantarkeratose (2), Psoriasis (3), Neurofibromatose (1).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialgewinnung und Lagerung

Alle Stanz-Biopsien, ca. 3-4 mm groß, wurden in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Behandlung eingefroren (ca. -80 °C).

Zur mikroskopischen Untersuchung musste die Biopsie in dünne Schnitte, 2,5-3,5µm, geschnitten werden.

3.2 Immunhistochemische Darstellung der TGase 3 / Immunfluoreszenz

3.2.1 Reagenzien, Probematerialien

1. Swine Serum (Normal)
Firma DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland, Code No. X 090, Lot 096
2. Rabbit Anti-Transglutaminase 3
geschickt von Dr Soo Youl Kim, NIH, Bethesda, MD
3. FITC-Conjugated, Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins,
Firma DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland, Code No. F0205, Lot 108
4. Mowiol 4-88
Polyvinylalkohol
Firma Hoechst, Frankfurt, Deutschland,

5. PBS (phosphate buffered saline)
Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Tabletten Gibco BRL,
Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland, Cat No 18912- 014,
Lot No. 3027121
6. DAKO-Pen
Firma DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland, Code No. S 2002
7. aqua destillata
8. Gefrierschnitte von Normalhaut und Patientenhaut

3.2.2 Lösungen

PBS-Lösung

Zwei PBS-Tabletten in aqua destillata lösen (ad 1000 ml)

Swine Serum (Normal) 10 % in PBS

100 µl Swine Serum + 900 µl PBS

Rabbit Anti-Transglutaminase 3 1:100

10 µl Rabbit Anti-Transglutaminase + 990 µl PBS

FITC-Conjugated, Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins 1:20 in PBS

50 µl Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins + 950 µl PBS

Mowiol

20 g Mowiol in 80 ml PBS geben und 40 ml Glycerin hinzufügen, 8 Std. in Raumtemperatur rühren. Die ungelösten Mowiolpartikel werden durch Zentrifugation entfernt (15 Min bei 12'000 rpm).

3.2.3 Versuchsdurchführung

Tag 1:

Gefrierschnitte von Normalhaut und Patientenhaut wurden 10 Minuten in Raumtemperatur luftgetrocknet.

Nach der Beschriftung und Markierung mit DAKO-Pen wurden sie mit 10% Swine Serum (Normal) überschichtet und 30 Minuten inkubiert. Dieser erste Schritt diente zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen.

Ohne Spülvorgang wurde das überschüssige Serum abgesaugt bzw. abgeklopft, sodass eine dünne Schicht auf dem Gewebe stehen blieb.

Die Inkubation der Hautschnitte mit der Primärantikörperlösung (Rabbit Anti-Transglutaminase 3) betrug 16 Stunden in Raumtemperatur.

Vor der Überschichtung mit dem Primärantikörper wurde eine Negativkontrolle hergestellt, zwecks Überprüfung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse. Ein Normalhautschnitt wurde anstelle des Primärantikörpers nur mit dem Normalserum des Schweins beschichtet. Diese Ersatzkontrolle diente als Leerpräparat. Jede dabei auftretende positive Anfärbung wäre nicht Ausdruck der antikörperbedingten Lokalisation des Antigens, sondern hätte die Folge einer unspezifischen Proteinbindung bedeutet.

Tag 2:

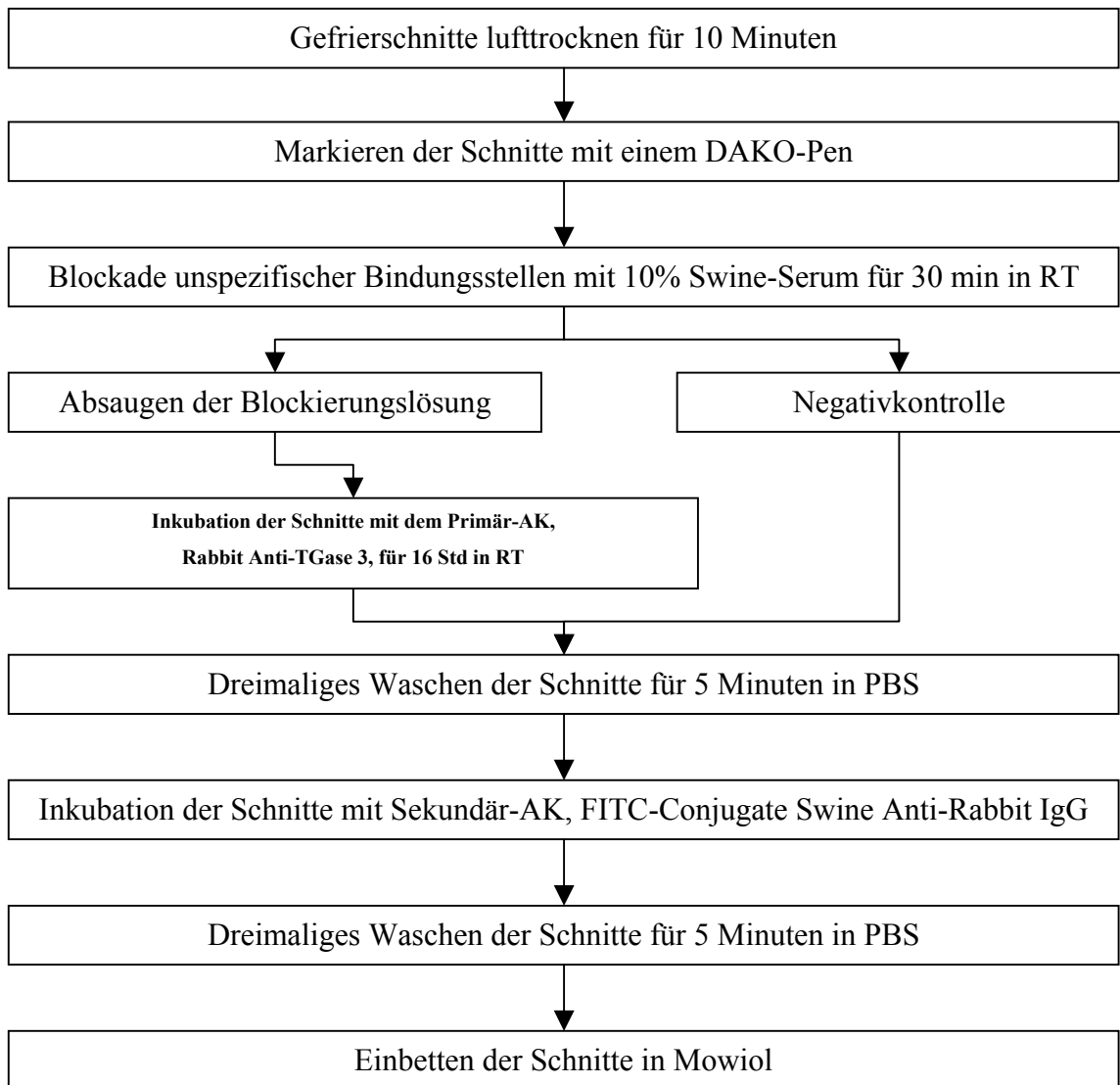
Die Schnitte wurden nach 16 Stunden Inkubation 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen.

Überschichtung mit dem Sekundärantikörper, FITC-Conjugatet Swine Anti-Rabbit IgG für 30 Minuten in Raumtemperatur.

Nach der Inkubation von 30 Minuten wurden die Schnitte wiederum 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen.

Als letzter Schritt folgte die Fixierung der Hautschnitte mit Mowiol und Deckblättchen. Nach der Beendigung des Versuchsvorganges wurden die Schnitte unter dem Immunfluoreszenzmikroskop von Zeiss bei 20- bzw. 40-facher Vergrößerung betrachtet und mit Axioacam HR Videocamera und Axiovision 3.0 Software (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) digitalisiert.

Flussdiagramm für die Darstellung von TGase



3.3 Immunhistochemische Darstellung der TGase 3/Immunperoxidase

3.3.1 Reagenzien, Probematerialien

1. BSA (bovine serum albumin)
SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland, Art.Nr.: A
2153
2. Rabbit Anti-Transglutaminase 3
Dr. Soo Youl Kim, NIH, Bethesda, MD
3. Dako EnVision +TM, Peroxidase, Rabbit
Firma DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland, Code No.: K4002 (goat
anti-rabbit IgG konjugiert mit Peroxidase)
4. PBS (phosphate buffered saline)
Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Tabletten Gibco BRL,
Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland, Cat No 18912-014,
Lot No. 3027121
5. AEC-Substrat:
Acetatpuffer: Essigsäure 100 %
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat wasserfrei
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
AEC-Stammlösung: 3-Amino-9-Ethylcarbazole
SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland 10 g,
N,N-Dimethylformamide (DMF)
SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland 500 ml

6. S+S Faltenfilter 5 (Schleicher+Schüll)
7. Perhydrol 30 % H₂O₂
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland, 250 ml
8. Mayers Hämaunlösung
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland, 500 ml
9. Kaisers Glyceringelatine
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland, 100 g
10. aqua destillata
11. Gefrierschnitte von Normalhaut und Patientenhaut

3.3.2 Lösungen

PBS- Lösung

Zwei PBS Tabletten in aqua destillata lösen (ad 1000 ml)

2 % BSA in PBS

2 g BSA-Pulver + 100 ml PBS

1 % BSA in PBS

1 g BSA-Pulver + 100 ml PBS

Rabbit Anti-TGase 3 1:100

10 µl Rabbit Anti-Tgase 3 + 990 µl PBS

AEC-Substrat

Lsg A: 12 ml Eisessig / L Aqua bidest (0,2 M)

Lsg B: 16,4 g Na-Acetat/ L Aqua bidest (0,2 M)

Lsg A 22,2 ml

Lsg B 52,8 ml

ad 225 ml Aqua bidest, pH 4,7

½ Acetatpuffer vorwärmen 37 °C

½ Acetatpuffer kaltstellen 4 °C

AEC-Stammlösung

1 g AEC in 200 ml DMF (dunkel stellen)

150 ml warmen Acetatpuffer + 7,5 ml AEC-Stammlösung

Faltenfilter filtrieren

3.3.3 Versuchsdurchführung

Tag 1:

Gefrierschnitte von Normalhaut und Patienten wurden 10 Minuten in Raumtemperatur luftgetrocknet.

Zur Vorinkubation wurde 2 % BSA in PBS hergestellt.

Die Schnitte wurden mit diesem Rinderalbumin überschichtet. BSA diente zur unspezifischen Blockade der Hautschnitte.

Nach 30 Minuten Vorinkubation und Erstellung einer Konjugatkontrolle (Negativkontrolle), Bearbeitung der Schnitte mit dem Primärantikörper, Rabbit Anti-Transglutaminase 3. Die Hautschnitte wurden 16 Stunden in Raumtemperatur inkubiert.

Tag 2:

Nach 16 Stunden Inkubation wurden die Schnitte 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen, wobei der letzte Waschgang mit 1 % BSA in PBS durchgeführt wurde.

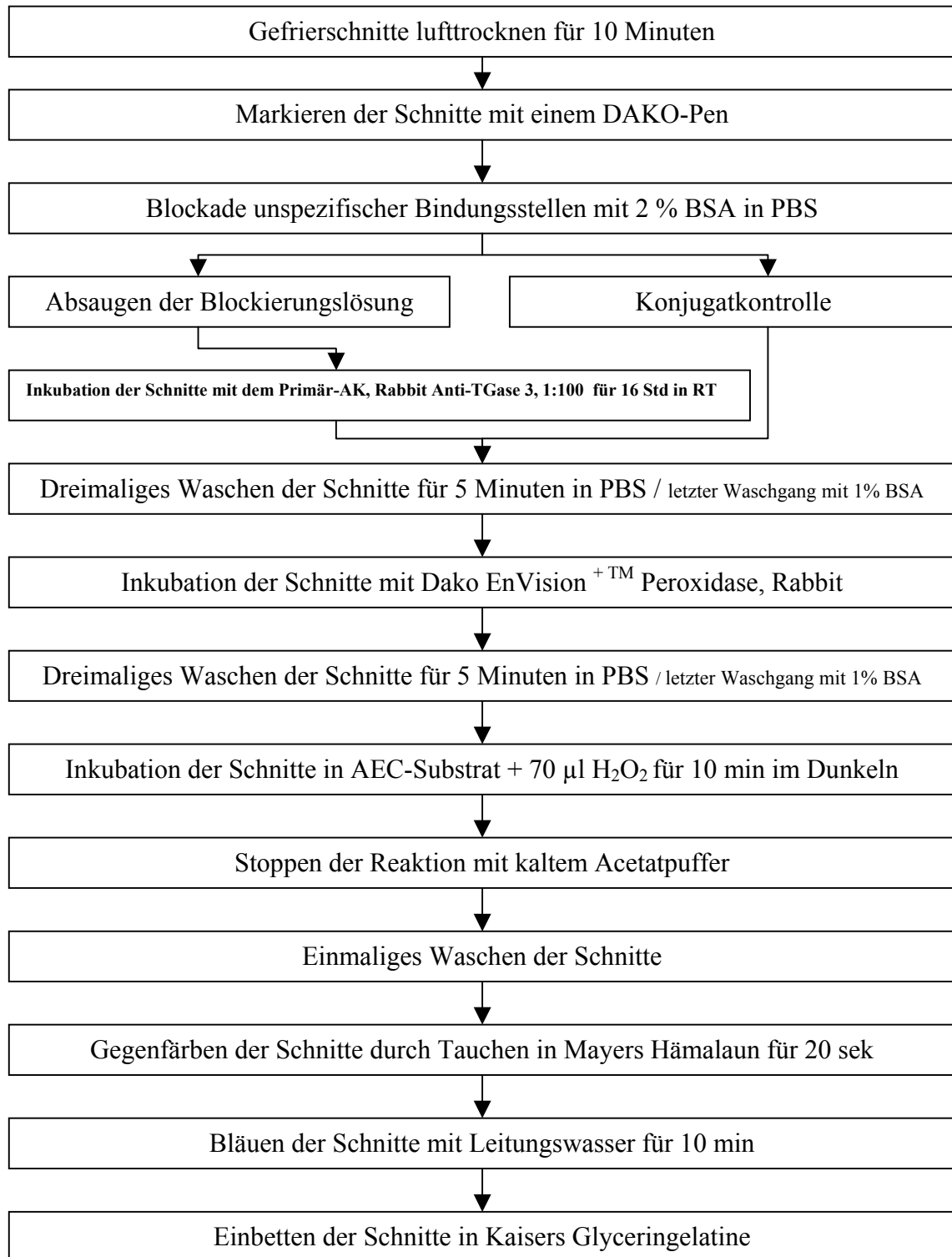
Nach den Waschgängen Überschichtung der Schnitte mit dem Konjugat, Dako EnVision +TM Peroxidase, rabbit. Nach Inkubation von 30 Minuten wurden die Schnitte wiederum 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen.

Im weiteren Verlauf wurden 150 ml vorgewärmter Acetatpuffer und 7,5 ml AEC-Stammlösung mit Faltenpapier filtriert. In eine vorgewärmte Küvette wurden 70 µl H₂O₂ (Katalysator) und AEC-Substrat gegeben. Dann Inkubation der Schnitte in dieser Küvette 10 Minuten bei 37 °C dunkel. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten mit kaltem Acetatpuffer gestoppt.

Nach einmaliger Waschung der Schnitte, eintauchen dieser 20 sec in Mayers Hämalaun (frisch filtriert), um sie gegenzufärben, sodass diese zweite Färbung einen Kontrast gegenüber der primären Farbreaktion zeigen konnte.

Anschließend Bläuen der Schnitte 10 Minuten mit Leitungswasser und Eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine.

Flussdiagramm für die Darstellung des TGase3 Signals



3.4 Immunhistochemische Darstellung Osteonectins/Immunfluoreszenz

3.4.1 Reagenzien, Probematerialien

1. Swine Serum (Normal)
Firma DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland, Code No. X 090, Lot 096

2. Rabbit Anti-Osteonectin, polyklonal,
Immun Diagnostik AG, 64625 Bensheim Deutschland, Code No. A 42251
und
Rabbit Anti-Osteonectin, BM 40
(von Frau PD Dr. Roswitha Nischt, Universitätshautklinik Köln)

3. FITC-Conjugated, Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins,
Firma DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland, Code No. F0205, Lot 108

4. Mowiol 4-88
Polyvinylalkohol, Firma Hoechst, Frankfurt, Deutschland

5. PBS (phosphate buffered saline)
Dulbecco`s phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Tabletten Gibco BRL,
Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland, Cat No 18912-014,
Lot No. 3027121

6. DAKO-Pen
Firma DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland, Code No. S 2002

7. aqua destillata

8. Gefrierschnitte von Normalhaut und Patientenhaut

3.4.2 Lösungen

PBS-Lösung

Zwei PBS-Tabletten in aqua destillata lösen (ad 1000 ml)

Swine Serum (Normal) 10% in PBS

100 µl Swine Serum + 900 µl PBS

Rabbit Anti-Osteonectin, 1:400 und 1:800 in PBS

1 µl Rabbit Anti-Osteonectin + 399 µl PBS

1 µl Rabbit Anti-Osteonectin + 799 µl PBS

FITC-Conjugated, Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins 1:20 in PBS

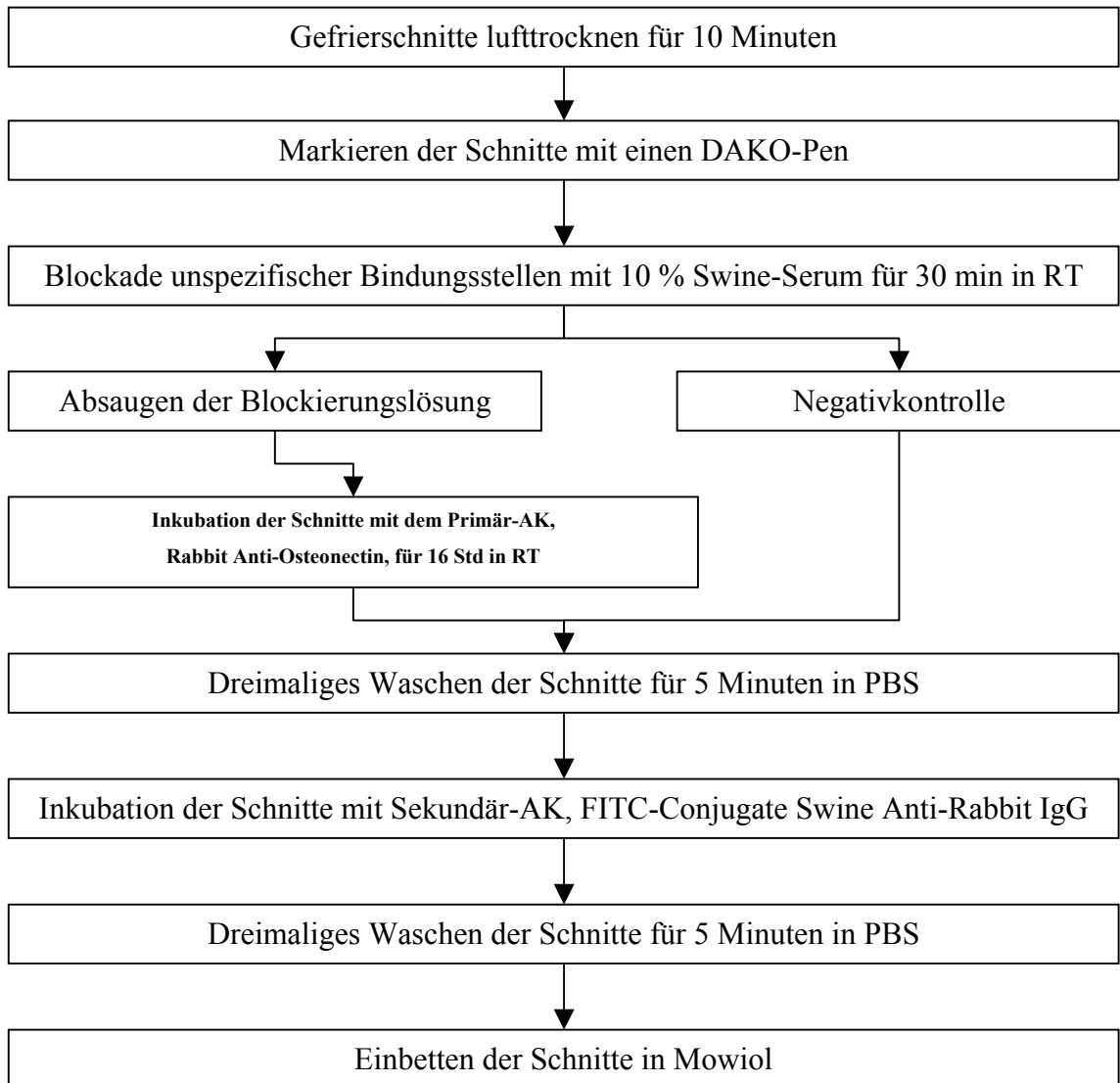
50 µl Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins + 950 µl PBS

Mowiol

20 g Mowiol in 80 ml PBS geben und 40 ml Glycerin hinzufügen, 8 Std. in Raumtemperatur rühren. Die ungelösten Mowiolpartikel werden durch Zentrifugation entfernt (15 Min bei 12'000 rpm).

3.4.3 Versuchsdurchführung

Flussdiagramm für die Darstellung des Osteonectin-Signals



3.5 Immunhistochemische Darstellung des Calpains /Immunperoxidase

3.5.1 Reagenzien, Probematerialien

1. BSA (bovine serum albumin)
SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland, Art.Nr.: A
2153
2. Monoclonal (Mouse) Anti- μ -Calpain (IgG), (Clone 9A4H8D3)
Dianova, 20354 Hamburg, Catalog Number MA3-940
3. Dako EnVision +TM, Peroxidase, Mouse Code No.: K4000 (goat anti-
mouse IgG konjugiert mit Peroxidase)
Firma DAKO Diagnostika, Hamburg, Deutschland
4. PBS (phosphate buffered saline)
Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Tabletten Gibro BRL,
Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland, Cat No 18912-014,
Lot No. 3027121
5. AEC-Substrat:
Acetatpuffer: Essigsäure 100 %
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat wasserfrei
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
AEC-Stammlösung: 3-Amino-9-Ethylcarbazole
SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland 10 g,
N,N-Dimethylformamide (DMF)
SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland 500 ml

6. S+S Faltenfilter 591 ½ (Schleicher+Schüll)

7. Perhydrol 30 % H₂O₂
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland, 250 ml

8. Mayers Hämaunlösung
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland, 500 ml

9. Kaisers Glyceringelatine
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland, 100 g

10. aqua destillata

11. Gefrierschnitte von Normalhaut und Patientenhaut

3.5.2 Lösungen

PBS- Lösung

Zwei PBS Tabletten in aqua destillata lösen (ad 1000 ml)

2 % BSA in PBS

2 g BSA-Pulver + 100 ml PBS

1 % BSA in PBS

1 g BSA-Pulver + 100 ml PBS

Monoclonal (Mouse) Anti- μ 1-Calpain (IgG) 1:800 und 1:1600

3 μ l Mouse Anti- μ 1-Calpain + 2400 μ l PBS

AEC-Substrat

Lsg A: 12 ml Eisessig / L Aqua bidest (0,2 M)

Lsg B: 16,4 g Na-Acetat/ L Aqua bidest (0,2 M)

Lsg A 22,2 ml

Lsg B 52,8 ml

ad 225 ml Aqua bidest, pH 4,7

$\frac{1}{2}$ Acetatpuffer vorwärmen 37 °C

$\frac{1}{2}$ Acetatpuffer kaltstellen 4 °C

AEC-Stammlösung

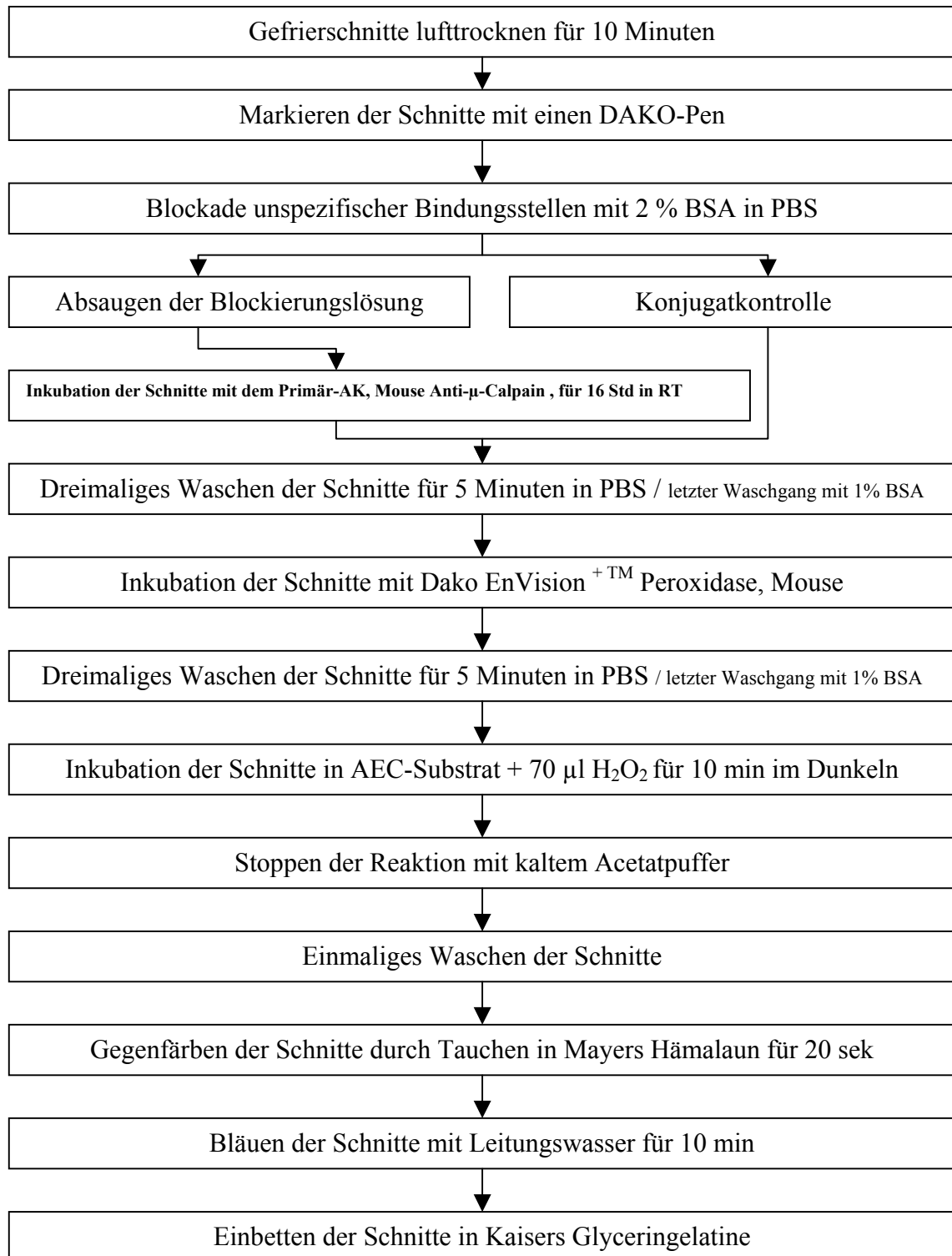
1 g AEC in 200 ml DMF (dunkel stellen)

150 ml warmen Acetatpuffer + 7,5 ml AEC-Stammlösung

Faltenfilter filtrieren

3.5.3 Versuchsdurchführung

Flussdiagramm für die Darstellung des Calpains



4 ERGEBNISSE

Insgesamt wurden **98** Patienten untersucht, die an unterschiedlichen Verhornungsstörungen leiden (Tab.7).

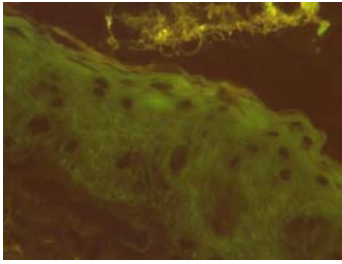
Das Patientenkollektiv setzte sich aus 19 Gruppen bzw. verschiedenen Diagnosen zusammen; darunter ARLI (TGase 1 negativ (19), TGase 1 positiv (16)), ADLI (1), SHCB (5), Harlekinichthyose (6), Netherton-Syndrom (7), Ichthyosis vulgaris (8), X-chrom. rez. Ichthyose (7) und weitere assoziierte Syndrome. Als Kontrastgruppe diente Psoriasis (3). Normalhäute wurden an den Versuchstagen als Positivkontrolle immer mitgeführt.

4.1 Transglutaminaseassay

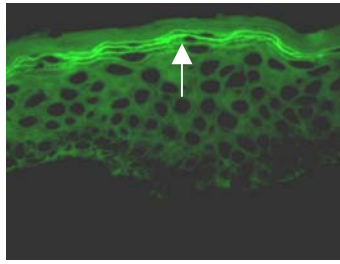
Raghunath et al. etablierten 1998 den Transglutaminaseaktivitätstest. Dieser macht die Transglutaminaseaktivität auf Kryoschnitten von Haut der Patienten mit ichthyosiformen Zuständen sichtbar und weist so auf einen Defekt des Enzyms hin. Mit Hilfe dieses Screening-Tests wird die Einteilung von Ichthyosepatienten in drei Chemotypen möglich: normale Transglutaminaseaktivität, abwesende bzw. stark reduzierte Transglutaminaseaktivität. Für die Sichtbarmachung der Aktivität wird ein Substratpuffer aus Tris/HCL, CaCl_2 -Lösung und biot C benötigt. Das durch TGase Aktivität eingebaute Substrat wird mit Streptavidin-DTFA, einem fluoreszierenden Marker, sichtbar gemacht. In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigen die transamidierten Strukturen dann eine typische, grüne Fluoreszenz.

Bei pH 7,4 wird vorzugsweise die Aktivität der TGase 1, bei pH 8,4 zusätzlich die Aktivität von TGase 2 und 3 dargestellt, wobei TGase 2 in der Dermis auftritt (Raghunath et al. 1996).

Die Normalhaut zeigt eine normale TGase-Aktivität konzentriert auf das Str. granulosum in ein bis zwei Zellschichten, überwiegend perizellulär.



a)



b)

Abbildung 11 a-b: TGase 1 Aktivität auf NH

a) Die mit der EDTA-Lösung inkubierten Schnitte zeigen keinerlei Einbau des biot C (Negativkontrollen). b) Auf normaler Haut ist die TGase 1 Aktivität in der Epidermis im Bereich Str. granulosum als ein breites Band perizellulär sichtbar (Pfeil).

4.2 Immunhistochemische Darstellung der TGase 3 und die Beurteilungskriterien¹

Die Haut von 95 Patienten wurde untersucht. Normalhäute wurden immer mitgeführt (siehe Tab 7).

Die Beurteilung der TGase 3 wurde anhand von Kriterien erstellt, die folgendermaßen definiert waren:

1. Ist das dargestellte Signal mehrfach oder einfach positiv, reduziert oder abwesend?
2. Ist das dargestellte Signal konzentriert auf Stratum granulosum oder kommt es in mehreren Schichten vor

¹ Alle im folgenden geschilderten Daten beruhen sich auf den Nachweis des Proteins TGase 3 mittels Immunfluoreszenz. Parallel durchgeführte Untersuchungen mittels Immunperoxidase für die Lichtmikroskopie zeigten identische Resultate.

Tabelle 7: Patientenkollektiv und die immunhistochemische Analyse unter Berücksichtigung von TGase 3 (Abkürzungen am Ende der Tabelle definiert).

Nr.	Initialen	Diagnose und epidermale TGase – Aktivität	TGase 3 Signal	Verteilung / Lokalisation
1	TB	ARLI -	+	wie NH
2	NE	ARLI -	+	wie NH
3	MG	ARLI -	++	wie NH
4	MG	ARLI -	++	wie NH
5	MG	ARLI -	+	wie NH
6	EG	ARLI -	+	wie NH
7	DL	ARLI -	++	teils fleckig-cytoplasm., breit im Str. corneum, wirkt missverteilt
8	CN	ARLI -	+	grenzschichtig
9	AP	ARLI -	++	perizellulär, konzentriert auf Str. granulosum
10	CS	ARLI -	++	ab Str. corneum aufwärts
11	AS	ARLI -	+ / ++	wie NH
12	RT	ARLI -	+	grenzschichtig
13	RS	ARLI - / (+)	+	grenzschichtig
14	EL	ARLI - / (+)	+	grenzschichtig
15	DB	ARLI (+)	+ / ++	grenzschichtig
16	FB	ARLI (+)	+ / ++	grenzschichtig
17	SK	ARLI (+)	+	grenzschichtig
18 a	PB ¹	ARLI - betroffene Haut TGM-A3447G, TGM-R315C	++	grenzschichtig
18 b	PB ¹	ARLI (+) nicht betroffene Haut reduziert	+ / ++	grenzschichtig
19 a	MM ¹	ARLI - betroffene Haut	+ / ++	wie NH
19 b	MM ¹	ARLI - nicht betroffene Haut	+	Breite Corneumzone
20	CA	ARLI +	+	wie NH
21	SA	ARLI +	++	wie NH
22	JB	ARLI +	+	grenzschichtig
23	KB	ARLI +	+	wie NH
24	AB	ARLI +	(+)	wie NH
25	HC	ARLI +	++	wie NH
26	E	ARLI +	+ / ++	wie NH
27	MH	ARLI +	++	wie NH
28	WM	ARLI +	+	grenzschichtig
29	MO	ARLI +	+	wie NH
30	NP	ARLI +	+	Breite Corneumzone
31	MS	ARLI +	++	wie NH
32	USH	ARLI +	++	perizellulär, konzentriert auf Str. granulosum

¹ MM und PB: jeweils zwei Biopsien der gleichen Patienten mit „Badehosenichthyose“. Besondere Verteilungsform mit stammbetonter Ichthyose bei überwiegend freien Extremitäten.

Nr.	Initialen	Diagnose und epidermale TGase – Aktivität	TGase 3 Signal	Verteilung / Lokalisation
33	CU	ARLI +	+	wie NH
34	DB	ARLI ++	+	grenzschichtig
35	DH	ARLI ++	(+)	grenzschichtig
36	CN	ADLI +	+ / ++	grenzschichtig
37	MK	SHCB -	++	Breite Corneumzone
38	NS	SHCB ((+))	++ / +++	Breite Corneumzone
39	VS	SHCB ((+))	++	Breite Corneumzone
40	AG	SHCB +	+++	wie NH
41	FM	SHCB +	++	Wie NH
42	W	Kollodiumbaby -	+	eins- bis drei Zelllagen
43	RW	Kollodiumbaby -(+)	+	grenzschichtig
44	FA	Kollodiumbaby +	+	grenzschichtig
45	BK	Kollodiumbaby +	+	zwei- bis drei Zelllagen
46	MA	Kollodiumbaby ++	+	grenzschichtig
47	HAT	lamelläre Ichthyose +	+	grenzschichtig
48	IM	lamelläre Ichthyose +	+ / (+)	grenzschichtig
49	GM	lamelläre Ichthyose +	+	grenzschichtig
50	CP	lamelläre Ichthyose +	+	abschnittsweise mehrschichtig
51	JP	lamelläre Ichthyose / Harlekin -	++	fleckig betonte, aber durchgehende Verteilung entlang der Grenze
52	SD	Harlekin +	- / (+)	Im Prinzip abwesende TGase3 !
53	TSch	Harlekin +	- / (+)	überwiegend abwesend, wenige Inseln feingranulär im Str. corneum
54	NW	Harlekin +	nicht auswertbar	nicht auswertbar (fast nur Corneum)
55	JK	Harlekin ++	- / ((+))	ausgesprochener Mangel
56	TS	Harlekin ++	- / (+)	ganz starke Reduktion
57	KG	Harlekin (+)	(+)	wenige Zellen im Str. granulosum, Farbflecken cytoplasmatisch verteilt
58	AM	Netherton-Syndrom +	-	komplett abwesend !
59	EA	Netherton-Syndrom +	(+)	Farbflecken in drei- bis vier Zelllagen
60	TH	Netherton-Syndrom +	- / (+)	
61	MM	Netherton-Syndrom +	-	komplett abwesend !
62	LK	Netherton-Syndrom ++	- / (+)	schwache Farbflecken
63	MS	Netherton-Syndrom ++	- / (+)	abschnittsweise Farbflecken
64	JS	Netherton-Syndrom ++, breite Zone bis suprabasal	-	grenzschichtig
65	TO	Sjögren-Larsson-Syndrom (+)	+	wie NH
66	CK	Unklare Neuro-Ichthyose +	+	grenzschichtig
67	KH	Ichthyosis vulgaris +	+	grenzschichtig
68	SB	Ichthyosis vulgaris +	+	cytoplasmatisch, grenzschichtig
69	FK	Ichthyosis vulgaris +	+	wie NH

Nr.	Initialen	Diagnose und epidermale TGase - Aktivität	TGase 3 Signal	Verteilung / Lokalisation
70	IM	Ichthyosis vulgaris +	(+)/+	grenzschichtig
71	KS	Ichthyosis vulgaris +	+	grenzschichtig
72	ST	Ichthyosis vulgaris +/++	+	wie NH
73	LC	Ichthyosis vulgaris DD XRI +	(+)/+	abschnittsweise Darstellung des Signals
74	MB	v.a. Ichthyosis vulgaris +	+	grenzschichtig
75	LK	X-chrom.rez. Ichthyose DD lamelläre Ichthyose +	+	TGase 3 ist vorhanden, aber sie erstreckt sich vom Str. corneum nach unten, cytoplasmatische Verteilung
76	RW	X-chrom.rez. Ichthyose DD lamelläre Ichthyose +	+	TGase 3 positiv an der Grenze zwischen Str. granulosum und Str. corneum
77	MH	X-chrom.rez. Ichthyose +	+ / ++	abschnittsweise verbreitert, perizellulär im Str. granulosum
78	PF	X-chrom.rez. Ichthyose DD lamelläre Ichthyose +	+ / ++	ein- bis zwei Zelllagen
79	RS	X-chrom.rez. Ichthyose DD lamelläre Ichthyose +	+	zwei- bis drei Zelllagen
80	JS	X-chrom.rez. Ichthyose DD lamelläre Ichthyose +	+	grenzschichtig
81	JO	X-chrom.rez. Ichthyose DD lamelläre Ichthyose ++	+	grenzschichtig
82	TM	congenitale ichthyosiforme Erythrodermie	+	wirkt normal verteilt, entsprechend der gestörten epidermalen Architektur
83	DS	entzündliche Ichthyose +++	++	wie NH
84	KS	Ichthyose +	+	grenzschichtig
85	CL	Ichthyose +	+	grenzschichtig
86	RA	Ichthyose ++	(+)	grenzschichtig
87	DM	Palmoplantarkeratose +	(+)/+	grenzschichtig
88	UH	Palmoplantarkeratose ++	+	
89	WK	Chondrodysplasia punctata +/++	+	grenzschichtig, abschnittsweise drei- bis vier Zelllagen schwache Färbung
90	BR	Chondrodysplasia punctata ++	+	grenzschichtig
91	ER	Conradi-Hünemann-Happle-Syndrom +	+	abschnittsweise drei- bis sechs Zelllagen
92	ML	Psoriasis +	+	eindeutig unterhalb des Str. corneum
93	MW	Psoriasis +	(+)/+	cytoplasmatisch, diffus im Str. spinosum
94	ST	Psoriasis ++	+	TGase 3 Signal positiv an der Grenzfläche zu Str. corneum
95	BR	Neurofibromatose Recklinghausen +	+ / ++	wie NH, Haarbälge positiv

Auswertung: Die Protein-Signale werden subjektiv gradiert: + = einfach positiv; ++ = zweifach positiv; +++ = dreifach positiv; (+) = schwach positiv; ((+)) = stark reduziert; - = negativ; NH = Normalhaut; grenzschichtig = zwischen Str. granulosum und Str. corneum

4.2 1 Darstellung der TGase 3 bei Normalhaut

In allen bisher untersuchten Normalhäuten zeigte sich das Signal der TGase 3 als ein unscharf begrenztes Band, abschnittsweise cytoplasmatisch an der Grenze zwischen Str. corneum und Str. granulosum, dass das untere 1/3 des Str. corneums umfasste.

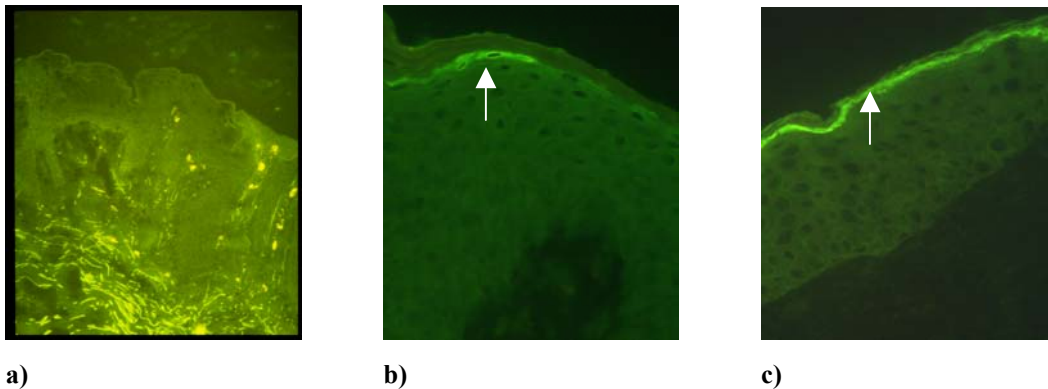


Abbildung 12 a-c: Darstellung der TGase 3 auf NH

a) Negativkontrolle b) TGase 3 sichtbar teils cytoplasmatisch (Pfeil). c) TGase 3 sichtbar als ein unscharf begrenztes Band zwischen Str. granulosum und Str. corneum (Pfeil).

4.2.2 Autosomal rezessive lamelläre Ichthyose (ARLI)

4.2.2.1 Histologie der autosomal rezessiv lamellären Ichthyose

Bei dieser Erkrankung ist die Epidermis orthohyperkeratotisch und akanthotisch verbreitert. Das Stratum granulosum zeigt sich gut erhalten. Die Epidermis ist sonst unauffällig.

4.2.2.2 Darstellung der TGase 3 bei ARLI

4.2.2.2.1 TGase 1 defiziente ARLI

Bei 17 von 19 untersuchten Patienten mit negativer bzw. stark reduzierter TGase 1 Aktivität war das Signal sowohl bezüglich Intensität als auch Verteilung mit NH vergleichbar. Patientin DL zeigte eine fleckig-cytoplasmatische Fehlverteilung breit im Stratum corneum. Bei MM und PB mit Badehosenichthyose zeigte die betroffene Hautregion unabhängig von TGase 1 Aktivität ein ein- bis zweifaches Signal wie Normalhaut.

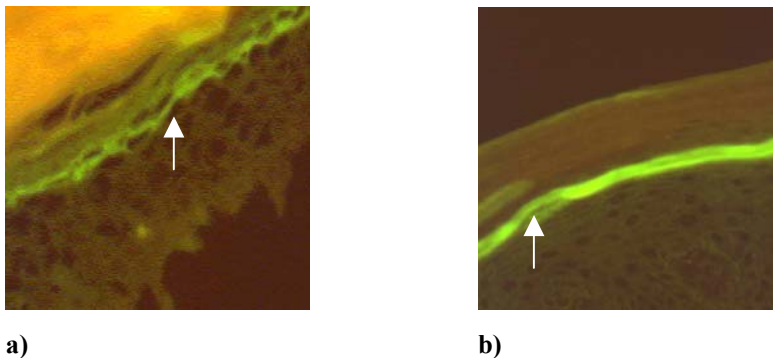


Abbildung 13 a-b: Darstellung der TGase 3 bei ARLI mit TGase 1 Defizienz (Pfeile).

4.2.2.2.2 TGase 1 positive ARLI

Diese Gruppe der Patienten zeigte eine normale Verteilung der TGase 3, allerdings mit unterschiedlich starker Intensität. Von 16 untersuchten Patienten hatten sechs Patienten ein zweifach positives Signal, acht Patienten ein einfach positives und zwei Patienten ein schwach positives Signal.

4.2.2.2.3 SHCB

Von fünf untersuchten SHCB` s hatten die mit abnormer TGase 1 Aktivität zwar eine TGase 3 Intensität wie Normalhaut, aber eine Fehlverteilung breit im Stratum corneum. Bei den übrigen zwei Patienten mit normaler TGase 1 Aktivität war das Signal sowohl in der Intensität, als auch in der Verteilung mit Normalhaut vergleichbar.

4.2.3 Autosomal dominante lamelläre Ichthyose (ADLI)

Hier stand nur eine Hautbiopsie zur Verfügung. Diese zeigte eine mit Normalhaut vergleichbare Verteilung und Signalintensität.

4.2.4 Patienten mit der Diagnose lamelläre Ichthyose ohne weitere Angaben

Bei allen fünf Patientenhäuten war die TGase 3 sichtbar. Patientin JP wurde ursprünglich mit der Diagnose Harlekinichthyose vorgestellt. Im Zuge weiterer Untersuchungen identifizierten wir eine TGase 1 Defizienz. In dieser Haut war ein deutliches TGase 3 Signal nachweisbar.

4.2.5 Harlekinichthyose

4.2.5.1 Histologie der Harlekinichthyose

Histologisch gibt es zwei verschiedene Typen: Retentionshyperkeratose und wenige Fälle mit Parakeratose. Das Stratum granulosum fehlt entweder völlig oder ist sehr deutlich reduziert.

4.2.5.2 TGase 3 bei Harlekinichthyose

Es wurden sechs Harlekinichthyose Patienten untersucht, alle Patienten waren negativ bzw. schwach positiv bezüglich des Signals. Bei Patient KG zeigten sich wenige Zellen im Str. granulosum cytoplasmatisch mit einer fleckigen Verteilung. Alle Häute zeigten eine klare TGase 1 Aktivität (nicht gezeigt).

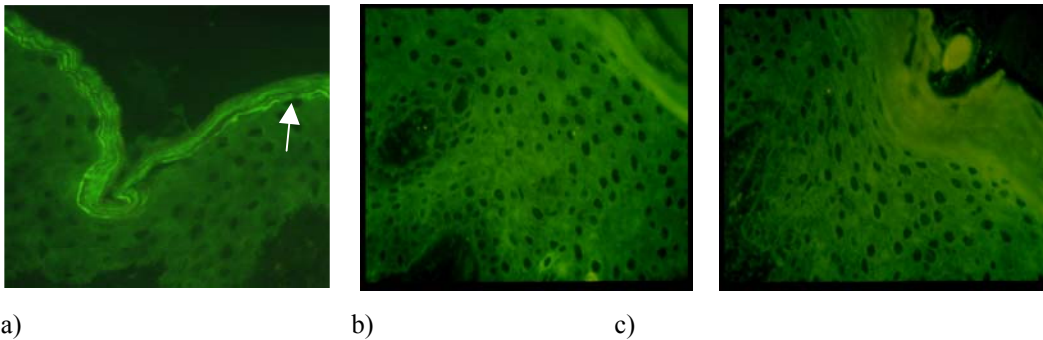


Abbildung 14 a-c: Darstellung der TGase 3 bei NH und Harlekinichthyose

a) TGase 3 Signal bei NH (Pfeil). b-c) Deutlich erkennbar die Abwesenheit der TGase 3 bei Harlekinichthyose.

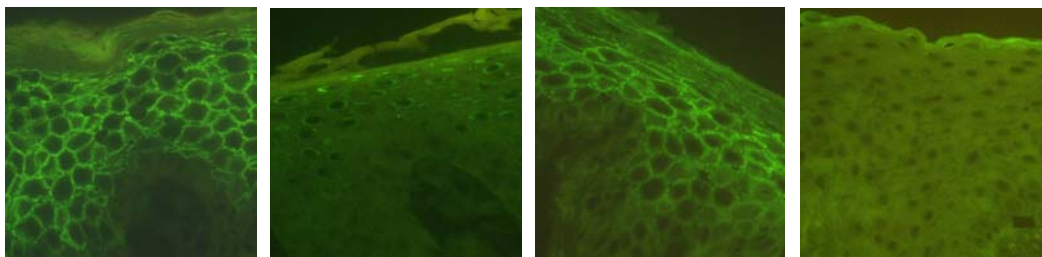
4.2.6 Comèl-Netherton-Syndrom

4.2.6.1 Histologie des Netherton-Syndroms

Die Epidermis weist hier weitgehend eine parakeratotische Verhornung auf, wobei die Hornschicht oft von der vitalen Epidermis abgehoben ist. Außerdem weist sie regelmäßig eine psoriasiforme hyperplastische Verbreiterung auf. Das Stratum granulosum kann komplett fehlen.

4.2.6.2 TGase 3 bei Netherton-Syndrom

Sieben Netherton-Syndrom-Patienten wurden untersucht, die allesamt eine erhöht positive TGase 1 Aktivität zeigten, mit Erweiterung der Aktivitätszone bis in suprabasale Zellschichten. TGase 3 war bei drei Patienten abwesend, vier Patienten zeigten abschnittsweise sehr schwach positive oder negative Reaktion.



a) Darstellung der TGase 1 Aktivität bei EA: Mehrere Zelllagen deutlich starke Aktivität mit perizellulärer Verteilung. b) Darstellung der TGase 3 bei EA: Nur eine sehr schwache Anfärbung. c) Darstellung der TGase 1 Aktivität bei ThH: Mehrere Zelllagen deutlich starke Aktivität mit perizellulärer Verteilung d) Darstellung der TGase 3 bei ThH: keine Anfärbung.

4.2.7 TGase 3 bei Sjögren-Larsson-Syndrom

Der Patient mit Sjögren-Larsson-Syndrom mit einer reduzierten TGase 1 Aktivität zeigte eine einfach positive TGase 3 Anfärbung. Das Protein war grenzschichtig zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum perizellulär verteilt.

4.2.8 TGase 3 bei unklarer Neuro-Ichthyose

Hier zeigte das Präparat eine normale Verteilung mit einfacher TGase 3 Färbung.

4.2.9 Ichthyosis vulgaris

4.2.9.1 Histologie der Ichthyosis vulgaris

Hierbei handelt es sich um eine normal dicke Epidermis mit einer Orthohyperkeratose und follikulärer Keratose. Das Stratum granulosum fehlt meist weitgehend.

4.2.9.2 TGase 3 bei Ichthyosis vulgaris

Von acht Patienten zeigten sechs eine einfach positive Immunreaktion. Bei zwei Patienten war ein schwach bis einfach positives Signal darstellbar. Die Verteilung des Proteins war grenzschichtig, zwischen Str. granulosum unter Einbezug des unteren Str. corneums, also normal.

4.2.10 X-chrom. rez. Ichthyose (XRI)

4.2.10.1 Histologie der X-chrom. rez. Ichthyose

Die Epidermis ist hier orthohyperkeratotisch, wobei das Stratum granulosum gut erhalten ist bzw. verbreitert vorkommt. Auch sind die Reteleisten verbreitert. In der Regel ist die Epidermis sonst unauffällig.

4.2.10.2 TGase 3 bei XRI

Bei sieben untersuchten Patienten stellte sich das TGase 3 Protein in der Intensität wie Normalhaut dar. Die Verteilung des Signals in der Epidermis war allerdings recht unterschiedlich: Drei Patientenhäute zeigten eine Verteilung zwischen Str. corneum und Str. granulosum, wobei die Verteilung bei den anderen eher mehrschichtig war. Bei Patient LK erstreckte sich das Signal intrazellulär vom Str. corneum abwärts.

4.2.11 TGase 3 bei Patienten mit erythrodermischer ichthyosiformer Haut, Eingangsdiagnose „Kollodiumbaby“ und nicht näher definierten Ichthyosen

In diesem Patientenkollektiv war das Signal sowohl in der Intensität als auch in der Verteilung wie Normalhaut, allerdings mit Ausnahme von zwei Kollodiumbabies, die eine Färbung über zwei bis drei Zelllagen zeigten.

4.2.12 Psoriasis vulgaris

4.2.12.1 Histologie der Psoriasis vulgaris

Hier sieht man eine parakeratotisch verhornte Epidermis, die oft akanthotisch verbreitert ist. Das Stratum granulosum fehlt.

4.2.12.2 TGase 3 bei Psoriasis vulgaris

Bei diesen Patienten stellte sich die TGase 3 einfach positiv dar, wobei sich die Verteilung an der Grenze zu Stratum corneum (eindeutig unterhalb des Stratum corneums) befand.

4.2.13 TGase 3 bei Palmoplantarkeratosen, Chondrodysplasia punctata, Conradi-Hünemann-Happle-Syndrom und bei Neurofibromatose

Mit Ausnahme des Patienten DM, der eine Palmoplantarkeratose hatte, war das Signal wie bei Normalhaut.

4.2.14 Immunhistochemische Darstellung der TGase 3 mit der Methode der Immunperoxidase

Bei Gefrierschnitten von 10 ausgewählten Patienten wurde das TGase 3 Protein auch mittels Immunperoxidase-reaktion untersucht, da dieses Nachweisverfahren empfindlicher ist. Zwei Patienten mit NTS, die mittels Fluoreszenz bezüglich der TGase 3 keine Immunreaktion zeigten, wiesen mit der Immunperoxidase-Methode an der Grenzschicht noch ein sehr geringfügiges Signal auf. Auch

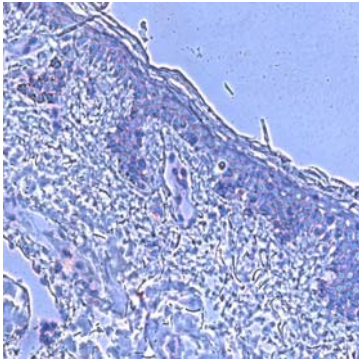
Patienten mit Harlekinichthyose zeigten teilweise eine sehr geringfügige Färbung. Zwei Patienten mit ARLI wiesen wie erwartet eine Färbung vergleichbar mit Normalhaut auf (Tab.8).

Tabelle 8: Untersuchte Patienten bezüglich der TGase 3 mittels Immunperoxidase

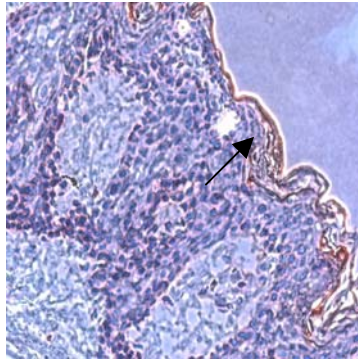
Nr.	Initialen	Diagnose und epidermale TGase - Aktivität	TGase 3 Signal Immunfluoreszenz	TGase 3 Peroxidase
1	ThH	Netherton +	-/(((+)))	(((+)))
2	AM	Netherton +	-	(((+)))
3	TB	ARLI -	+	+
4	MS	ARLI +	++	+
5	TS	Harlekin +	-/(+)	(((+))) fleckig
6	SD	Harlekin +	-/(+)	-/(((+))) einige Inseln
7	J-PK	Harlekin ++	-/(((+)))	(((+)))
8	KG	Harlekin (+)	(+)	((+))
9	NW	Harlekin +	nicht auswertbar	Nicht auswertbar
10	JP	Harlekin/lamelläre Ichthyose -	++	+ fein diffus

++ = zweifach positiv, + = einfach positiv, (+) = schwach positiv, ((+)) = stark reduziert, (((+))) = sehr stark reduziert, - = abwesend.

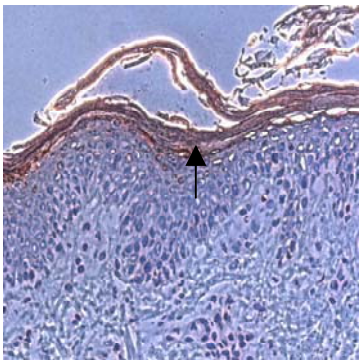
Fazit: Auch bei deutlich empfindlicherem Nachweis im wesentlichen identische Ergebnisse.



a)



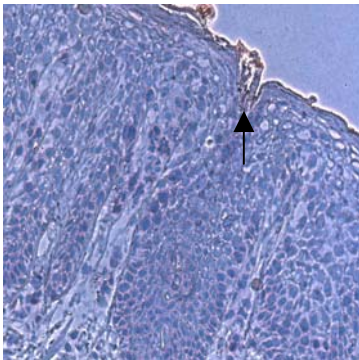
b)



c)



d)



e)

Abbildung 16 a-f: Darstellung der TGase 3 mittels Immunperoxidase

a) Negativkontrolle b) Normalhaut mit einfach positiver Immunreaktion (Pfeil) c) TGase 1 positive ARLI einfach positive Immunreaktion (Pfeil) d) Harlekinichthyose mit geringfügiger Anfärbung (Pfeil) e) Netherton-Syndrom mit geringfügiger Anfärbung (Pfeil).

4.3 Immunhistochemische Darstellung Osteonectins¹

4.3.1 Darstellung Osteonectins bei NH

Die Normalhäute zeigten in der *Epidermis* meist eine *einfach positive* Anfärbung mit perizellulärer Verteilung vom Stratum corneum bis suprabasal, wobei das Stratum corneum eine Betonung aufwies. *Die Dermis* zeigte Färbung der Hautanhangsgebilde, der glatten Muskulatur und der elastischen Mikrofibrillen.

4.3.2 Immunhistochemische Darstellung bei Verhornungsstörungen

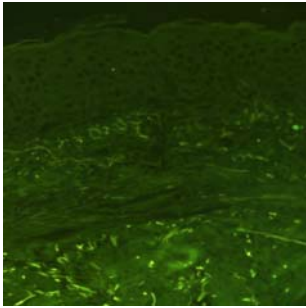
Im wesentlichen sehr vergleichbare Befunde, die der Normalhaut entsprechen (siehe Tab. 9).

¹ alle geschilderten Daten beziehen sich auf Immunfluoreszenz

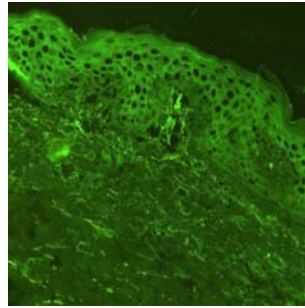
Tabelle 9: Patienten und die immunhistochemische Analyse unter Berücksichtigung von Osteonectin.

Nr.	Initialen	Diagnose und epidermale TGase - Aktivität	TGase 3 Signal	Verteilung / Lokalisation der TGase 3	Osteonectin Signal
1	KT	ARLI +			Epidermis +
2	HJK	ARLI +			Epidermis (+)
3	RS	ARLI +			Epidermis (+)
4	NP	ARLI +		breite Corneumzone	Epidermis ++
5	DB	ARLI ++	+	grenzschichtig	Epidermis +
6	AB	ARLI +	(+)	wie NH	Epidermis +
7	US	ARLI +	++	perizellulär, konzentriert auf Str. granulosum	Epidermis +
8	TB	ARLI-	+	wie NH	Epidermis +
9	MHA	ARLI-			Epidermis +
10	CS	ARLI-	++	ab Str. corneum aufwärts	Epidermis +/+++
11	MG	ARLI-	++	wie NH	Epidermis (+)
12	DL	ARLI-	++	teils fleckig-cytoplasmatisch, breit im Str. corneum, wirkt missverteilt	Epidermis (+)
13 a	MM	ARLI betroffene Haut -	+ / ++	wie NH	Epidermis (+) fleckig
13 b	MM	ARLI nicht betroffene Haut -	+	breite Corneumzone	Epidermis (+) pericelluläre Verteilung
14	NS	SHCB (+)	++ / +++	breite Corneumzone	Epidermis + / (+)
15	SD	Harlekin +	- / (+)	Im Prinzip abwesende TGase 3 !	Epidermis +
16	KG	Harlekin (+)	((+))	wenige Zellen im Str. granulosum, cytoplasmatisch, fleckig verteilt	1) Epidermis + 2) ++ an der Papillenspitze
17	TS	Harlekin ++	- / (+)	ganz starke Reduktion	Epidermis +
18	AM	Netherton-Syndrom +	-	komplett abwesend !	Epidermis +
19	TH	Netherton-Syndrom +	- / (+)		Epidermis +
20	JS	Netherton-Syndrom ++	-	grenzschichtig	Epidermis +

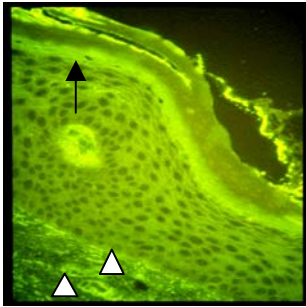
Auswertung: Die Protein-Signale werden subjektiv gradiert: + = einfach positiv; ++ = zweifach positiv; +++ = dreifach positiv; (+) = schwach positiv; ((+)) = stark reduziert; - = negativ, NH = Normalhaut; grenzschichtig = zwischen Str. granulosum und Str. corneum



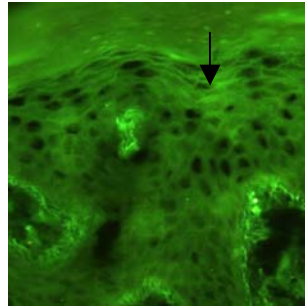
a) Normalhaut/Negativkontrolle (NK)



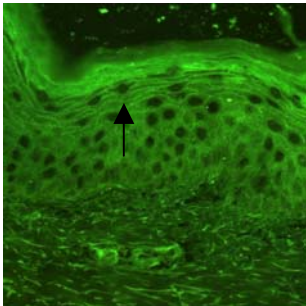
b) Normalhaut (NH)



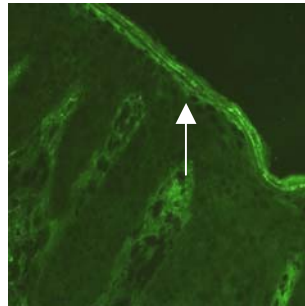
c)



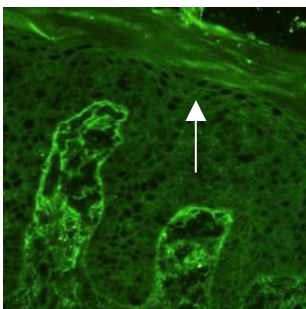
d)



e)



f)



g)

Abbildung 17 a-f: Osteonectin Signal

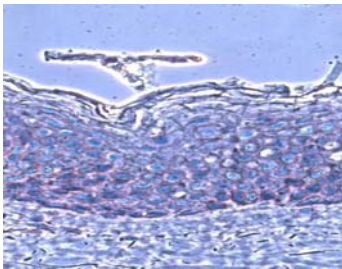
a) NH/NK b) NH c) TB mit TGase 1 defizienter ARLI, zeigt positive Färbung in der Epidermis mit Betonung des Str. granulosums (Pfeil), Die Pfeilspitzen zeigen im Bereich der papillären Dermis Anfärbung von elastischen Mikrofibrillen. d) CH, TGase 1 defizienter ARLI, mit deutlich perizellulärer Färbung in der Epidermis. e) f) Netherton-Syndrom, AM, mit Betonung des Str. granulosums (Pfeil) g) Harlekinichthyose mit positiver Färbung (Pfeil).

4.4 Immunhistochemische Darstellung Calpains¹

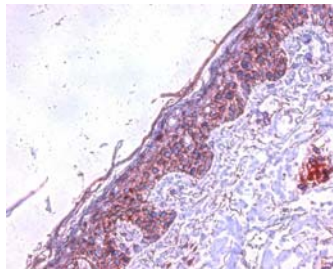
Insgesamt wurde die Epidermis von 48 Patienten untersucht. Normalhäute wurden immer mitgeführt (Tab.10).

4.4.1 Darstellung Calpains bei Normalhaut

Die normalen Hautschnitte zeigten in der Regel eine *ein- bis zweifach positive* Anfärbung mit perizellulär, granulärer Verteilung in der gesamten Epidermis. Regional unterschiedliche Intensitäten waren sichtbar. Teilweise gab es cytoplasmatische Bereiche. Die Hautanhangsgebilde waren abschnittsweise positiv gefärbt. Es wurden Verdünnungen 1:800 und 1:1600, die sich nur in der Intensität unterschieden, etabliert.



a)



b)

Abbildung 18 a-b: Darstellung des Calpains bei NH

a) Negativkontrolle b) Positive Färbung bei NH in der Epidermis (Pfeil)

¹ Alle für den Calpainnachweis geschilderten Daten beziehen sich auf die Benutzung des Immunperoxidase kits EnVision+™ für die Lichtmikroskopie.

Tabelle 10: Patienten und die immunhistochemische Analyse unter Berücksichtigung von Calpain
(Abkürzungen am Ende der Tabelle definiert).

Nr.	Initialen	Diagnose und epidermale TGase - Aktivität	TGase 3 Signal	Verteilung / Lokalisation der TGase 3	Calpain Signal
1	KB	ARLI +	+	wie NH	Epidermis -
2	AB	ARLI +	(+)	wie NH	Epidermis -
3	EK	ARLI +	+ / ++	wie NH	Epidermis - / ((+))
4	AJ	ARLI +			Epidermis -
5	NP	ARLI +	+	breit ab Grenze	Epidermis ((+))
6	CA	ARLI +	+	wie NH	Epidermis - / (+)
7	CU	ARLI +	+	wie NH	Epidermis ((+))
8	MH	ARLI +	++	wie NH	Epidermis +
9	MS	ARLI +	++	wie NH	Epidermis + perizellulär
10	HC	ARLI +	++	wie NH	Epidermis +
11	SA	ARLI +	++	wie NH	1) Epidermis + 2) Haarfollikel epithel kräftig gefärbt
12	DB	ARLI ++	+	grenzschiechtig	Epidermis +
13	US-H	ARLI +	++	perizellulär, konzentriert auf Str. granulosum	Epidermis ++ cytoplasmatisch
14	AH	ARLI ((+))			Epidermis (+)
15	TB	ARLI -	+	wie NH	1) abschnittsweise in der Epidermis (+), sonst - 2) Haarfollikel epithel (+)
16	MG	ARLI -	++	wie NH	Epidermis -
17	MG	ARLI -	++	wie NH	1) Epidermis - 2) einzelne Haarzellen + 3) einzelne Zellen in der Dermis +
18	NEF	ARLI -	+	wie NH	Epidermis (+), teilweise cytoplasmatisch fleckig verteilt
19	E G	ARLI -	+	wie NH	1) Epidermis - 2) Dermis -
20	S (arab Mann)	ARLI -	+ / ++	wie NH	Epidermis -
21	Haut aus Innsbruck	ARLI -			Epidermis -, wenige Stellen +

Nr.	Initialen	Diagnose und epidermale TGase - Aktivität	TGase 3 Signal	Verteilung / Lokalisation der TGase 3	Calpain Signal
22	MHAI	ARLI ((+))			Epidermis ((+))
23 a	MCM	„Badehosenichthyose“	+ / ++	wie NH	Epidermis +
23 b	MCM	ARLI <u>betroffene</u> Haut - „Badehosenichthyose“ ARLI <u>nicht betroffene</u> Haut -	+	breite Corneumzone	Epidermis +, basal betont teils cytoplasmatisch und teils perizellulär
24 a	DhrNE K	„Badehosenichthyose“ ARLI <u>betroffene</u> Haut ((+))			Epidermis + fleckig
24 b	DhrNE K	„Badehosenichthyose“ ARLI <u>nicht betroffene</u> Haut (+)			Epidermis ++ wie NH
25	D L	ARLI -	++	teils fleckig-cytoplasmatisch, breit im Str. corneum, wirkt missverteilt	Epidermis + Betonung Str. granulosum
26	CS	ARLI -	++	ab Str. corneum aufwärts	Epidermis +, teils cytoplasmatisch und teils perizellulär
27	AP	ARLI -	++	perizellulär, konzentriert auf Str. granulosum	Epidermis +, teils cytoplasmatisch und teils perizellulär
28	MK	SHCB -	++	breite Corneumzone	Epidermis -
29	N S	SHCB ((+))	++ / +++	breite Corneumzone	Epidermis ((+))
30	VS	SHCB ((+))	++	breite Corneumzone	Epidermis (+), abschnittsweise +
31	FM	SHCB +	++	wie NH	Epidermis+, basal betont
32	AG	SHCB +	+++	wie NH	Epidermis (+) / +, basal betont
33	DS	entzündliche Ichthyose+++	++	wie NH	Epidermis ++ perizellulär
34	SD	Harlekin +	- / (+)	Im Prinzip abwesende TGase3	Epidermis + / ++ basale Betonung
35	TS	Harlekin ++	- / (+)	ganz starke Reduktion	Epidermis+, teilweise (+) basal betont
36	KG	Harlekin (+)	-	wenige Zellen im Str. granulosum, cytoplasmatisch, fleckig verteilt	Epidermis (+)

Nr.	Initialen	Diagnose und epidermale TGase - Aktivität	TGase 3 Signal	Verteilung / Lokalisation der TGase 3	Calpain Signal
37	J-PK	Harlekin ++	-((+))	ausgesprochener Mangel	Epidermis (+) fleckig eingestreut
38	ST	Ichthyosis vulgaris +/+++	+	wie NH	Epidermis + perizelluläre Anfärbung
39	KH	Ichthyosis vulgaris +	+	grenzschichtig	Epidermis abschnittsweise (+) perizellulär
40	KS	Ichthyosis vulgaris +	+	grenzschichtig	Epidermis + fleckige, cytoplasmatische Färbung
41	IM	Ichthyosis vulgaris +	+/(+)	grenzschichtig	Epidermis -/(+)
42	S B	Ichthyosis vulgaris +	+	cytoplasmatisch, fein granulär, grenzschichtig	Epidermis ++ mit cytoplasmatischen Zellnestern
43	LK	X-chrom.rez. Ichthyose DD lamelläre Ichthyose +	+	TGase 3 ist vorhanden, aber sie erstreckt sich vom Str. corneum nach unten, intrazelluläre Verteilung	Epidermis (+)
44	RW	X-chrom.rez. Ichthyose DD lamelläre Ichthyose +	+	TGase 3 positiv an der Grenze zwischen Str. granulosum und Str. corneum	Epidermis + von der Grenze bis basal, perizellulär
45	MH	X-chrom.rez. Ichthyose +	+/>+++	abschnittsweise verbreitert, perizellulär im Str. granulosum	Epidermis -/(+)
46	MW	Psoriasis +	+/(+)	cytoplasmatisch, diffus im Str. spinosum	Epidermis +, perizelluläre Anfärbung bis in die Papillenspitzen
47	ML	Psoriasis +	+	eindeutig unterhalb des Str. corneum	Epidermis (+), cytoplasmatisch
48	ST	Psoriasis ++	+	TGase 3 Signal positiv an der Grenzfläche zu Str. corneum	Epidermis + teils perizellulär, teils cytoplasmatisch

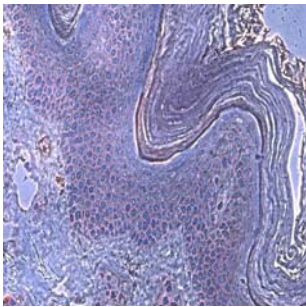
Auswertung: Die Protein-Signale werden subjektiv gradiert: + = einfach positiv; ++ = zweifach positiv; +++ = dreifach positiv; (+) = schwach positiv; ((+)) = stark reduziert; - = negativ, NH = Normalhaut; grenzschichtig = zwischen Str. granulosum und Str. corneum

4.4.2 Darstellung Calpains bei autosomal rezessiver lamellärer Ichthyose (ARLI)

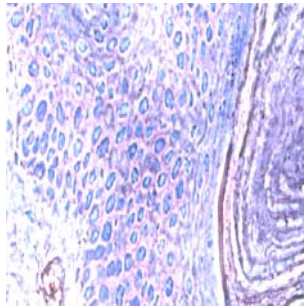
4.4.2.1 TGase 1 positive ARLI

Von 13 untersuchten Häuten waren 23 % (3) negativ für Calpain. 31 % (4) der Patientenhäute waren calpainreduziert. Eine positive Färbung hatten 46 % (6) der Häute.

Unter Reduktion verstehen wir auch, wenn das Signal abschnittsweise fehlt.



a)

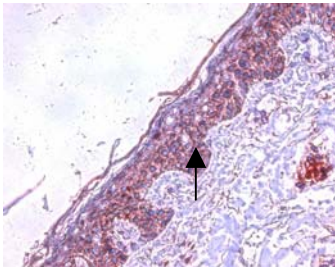


b)

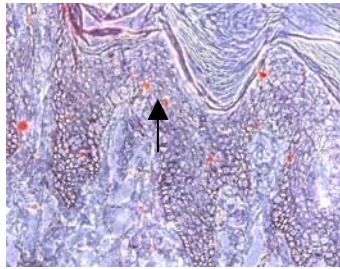
Abbildung 19 a-b: Darstellung des Calpains bei TGase 1 positiver ARLI mit reduziertem Signal in der Epidermis

4.4.2.2 TGase 1 defiziente ARLI

Von 14 untersuchten Patientenhäuten waren 36 % (5) negativ für Calpain. 28 % (4) der Häute zeigten ein reduziertes Signal. Positiv gefärbt waren 36 % (5). Meistens wies das Haarfollikel­epithel eine kräftige Färbung auf. Patienten MM und DNE, mit "Badehosenichthyose" zeigten sowohl an der betroffenen als auch an der unbetroffenen Haut ein positives Calpain-Signal, wobei das Calpain an der nicht betroffenen Haut von DNE stärker exprimiert war. Die Verteilung des Proteins war recht unterschiedlich, perizellulär und/oder cytoplasmatisch. Oft waren Zellnester unterschiedlicher Anzahl zuerkennen.



a)



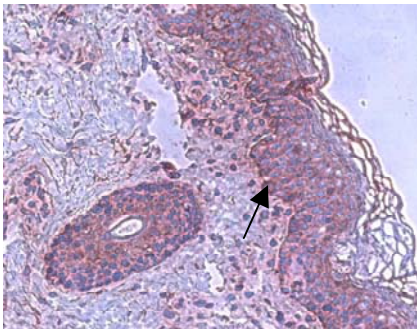
b)

Abbildung 20 a-b: Calpain-Signal bei TGase 1 defizienter ARLI

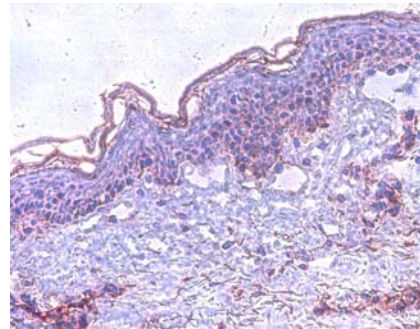
a) Positive Färbung bei NH in der Epidermis (Pfeil) b) Positiv gefärbte Zellnester in der Epidermis bei TB, sonst keine Färbung

4.4.2.3 SHCB

Von fünf untersuchten Patientenhäuten waren drei (alle TGase 1 defizient bzw. stark reduziert) negativ bzw. reduziert für Calpain. Zwei der untersuchten Häute (beide TGase 1 positiv) zeigten in der Epidermis eine positive Färbung mit basaler Betonung.



a)



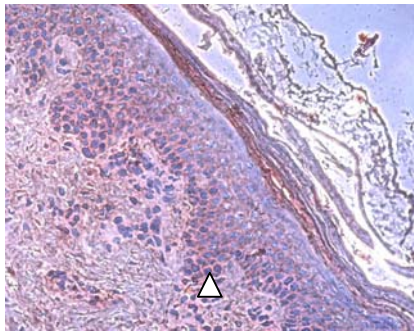
b)

Abbildung 21 a-b: Darstellung des Calpains bei SHCB

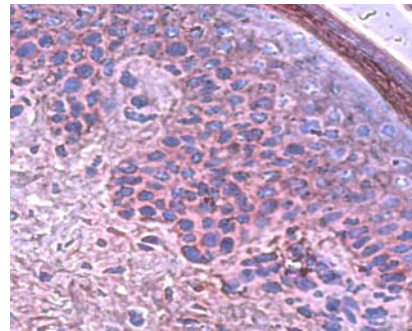
a) Patient AG mit TGase 1 Aktivität zeigt ein einfach positives Calpain basal betont (Pfeil) b) SHCB NS mit reduzierter TGase 1 Aktivität zeigt eine stark reduzierte Färbung

4.4.3 Darstellung Calpains bei Harlekinichthyose

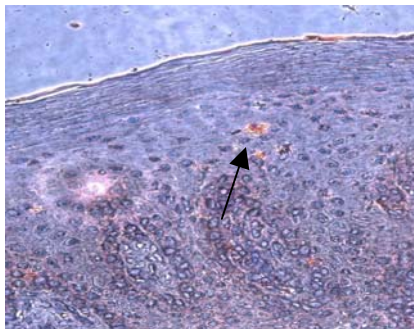
Vier Patienten mit Harlekinichthyose wurden untersucht. Bei zwei der Patienten war eine klare Calpainreduktion zu finden. Beide Patienten (PK und KG) waren zum Zeitpunkt der Biopsien neugeboren bzw. im Säuglingsalter. Patienten TS und SD mit positivem Signal waren zum Zeitpunkt der Biopsien 6 bzw. 8 Jahre alt.



a)



b)



c)

Abbildung 22 a-c: Darstellung des Calpains bei Harlekinichthyose, TS

a) b) Signal basal betont (Pfeilspitze); Str. corneum stellt sich positiv dar c) einzelne eingestreute Zellnester mit starker Färbung (Pfeil)

4.4.4 Darstellung Calpains bei Ichthyosis vulgaris, X-chrom. rez. Ichthyose und Psoriasis vulgaris

Gefrierschnitte von fünf Patienten mit Ichthyosis vulgaris, drei Patienten mit X-chrom. rez. Ichthyose und drei weitere Patienten mit Psoriasis wurden untersucht. Bei diesen drei Diagnosen war das Signal in der Haut im wesentlichen vergleichbar mit der Normalhaut. Bei einigen Patientenhäuten dieser drei Krankheitsbilder war eine leichte Reduktion in der Intensität des Signals (normale Schwankungen) zu finden.

5 DISKUSSION

5.1 Übersicht Rekapitulation der Rationale

Bei klinisch definierten Verhornungsstörungen wurden Kandidatenproteine untersucht. Die Transglutaminase 1 und 3, Calpain und Osteonectin wurden ausgesucht, weil sie zum einen in der ätiologisch relevanten, histologischen Zielregion (Str. granulosum) exprimiert werden und des Weiteren in Kopplungsstudien chromosomale Regionen für ARLI/SHCB , HI, NTS, gezeigt wurden, in denen Genorte für die hier untersuchten Proteine platziert werden konnten.

Tab. 11: Congenitale Ichthyosen und ihre genetische Ursachen/möglichen Ätiologien

Erkrankung	Kopplung	Protein	Funktion	Gen/Locus
ARLI/SHCB LI1	14q11.2-13	TGase1	Stabilisiert CE	TGM1/14q11
ARLI LI2	2q33-35	?	?	Gen nicht identifiziert
ARLI LI3	19p12-q12	?	?	Gen nicht identifiziert
ARLI LI4	3p21			
ARLI LI5	17p13.2-p13.1	12 (R)-Lipoxygenase, Lipoxygenase 3	Differenzierung im Bereich der kutanen Permeabilitätsbarriere (Str. corneum), Funktion bzgl. biol. Aktivität der essenti. Fettsäuren	ALOX12B/ ALOXE 3/ 17p13.1-p13.2
ARCI	19p13.1-p13.2	?	?	Gen nicht identifiziert
	?	<u>TGase 3</u>	Stabilisiert CE	TGM3/20q11.2-q12
	?	<u>Calpain</u>	Rolle in Regulation von Keratinozytendiff. und -proliferation Transglutaminasen → TGase 1 Aktivierung	CAPN1=L1/11q13 CAPN4=S/19q13.1
Harlekin	18q21.3	?	?	Gen nicht identifiziert
	?	<u>Osteonectin</u>	u.a. Substrat für TGasen	5q31.3-q32
NTS	5q32	LEKTI	noch unklar (α_1 -Antitrypsin ähnl. Aktivität), Serinproteaseinhib. im Str. granulosum	SPINK 5/5q32

Da bei diesen seltenen Erkrankungen i.d.R. sporadische Fälle auftreten, sind häufig keine informativen Familien für Genkopplungsanalysen zu erhalten. Daher wurde auf diesem Wege versucht, durch gezielte Untersuchung von geeigneten Kandidatenproteinen Aufschlüsse über die Ätiologie, der hier vorliegenden 18 verschiedenen Verhornungsstörungen zu erlangen. Schwerpunkt lag auf ARLI, SHCB, HI und NTS, da hier genetische Informationen vorliegen.

5.2 Interpretation der Ergebnisse

5.2.1 Expression epidermaler Transglutaminasen

Die Funktion der TGase 1 sind bereits gut charakterisiert, eine Reihe von Substratproteinen (CD-Proteine, Proteasehemmer wie z.B. Elafin, Cystatin, etc.) wurden identifiziert. Klar wurde auch, dass die diversen epidermalen TGasen einander in ihrer Aktivität nicht kompensieren können, zumindest ist dies bei TGase 1 hinreichend geklärt (Raghunath et al. 1998). Wenn ein TGase 1 Mangel vorliegt, führt dies zu einer manifesten Ichthyose im Sinne einer ARLI. Dieser Mangel ist histochemisch sehr gut fassbar (Hennies et al. 1998, Raghunath et al. 1998). In diesem Zusammenhang interessant war, der kürzliche Befund eines histochemischen *relativen TGase 1 Mangels* bei SHCB, der genetisch als eine sehr spezielle allelische Variante der ARLI (TGM1 Mutationen) aufgeklärt werden konnte (Raghunath et al. 2003). In der vorliegende Arbeit werden deshalb die SHCB Patienten als ARLI betrachtet. Ob ARLI oder SHCB, es finden sich offensichtlich zwei Chemotypen, TGase 1 positiv und TGase 1 negativ. Während bei dem TGase 1 negativen von einer TGM1 Mutation ausgegangen werden kann, ist die ätiologische Ursache bei TGase 1 positivem ARLI ungeklärt. In unserem Kollektiv waren von den TGase 1 negativen Patienten PB, NS und VS¹ genetisch untersucht, mit dem Ergebnis der Mutationen von TGM1 Gen. Bei den anderen stehen entsprechende Untersuchungen noch aus. Es gibt aber TGase Patienten bei denen eine Mutation trotz Analyse nicht gefunden werden konnte (MK). Bei der Untersuchung des Patienten JP konnte aufgrund des klaren histochemischen TGase Mangels die Diagnose Harlekinichthyose ausgeschlossen und die einer ARLI etabliert werden.

Die Funktionen der TGase 3 sind derzeit bei weitem schlechter aufgeklärt. Mögliche Funktionen und Substrate sind Quervernetzung von CE-Proteinen wie SPRP, Loricrin, Involucrin, Trichohyalin, etc. Wir fanden eine normale

¹ Genetische Untersuchung im Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin

Verteilung bei allen ARLI`s unabhängig vom TGase 1 Status. Ein überraschender und konsistenter Befund war jedoch, das vollständige oder fast vollständige Fehlen des TGase 3 Proteins bei Harlekinichthyose und NTS. Dies führte initial zu der Annahme, dass hiermit das entsprechende Kandidatengen TGM3 auf Chr. 20q in Frage käme. Folgerichtig wurde im Zeitraum 1999–2000 eine molekulargenetische Untersuchung der entsprechenden Patienten (EDTA-Blut) durch Frau. Dr. med. Christina Has, Arbeitsgemeinschaft Prof. Traupe, auf TGM3 durchgeführt. Es konnten jedoch keinerlei Mutationen nachgewiesen werden. Beim Netherton Syndrom wurden 2000 dann durch Genkopplung Chr. 5q32 identifiziert und Mutationen im SPINK5 Gen nachgewiesen (Chavanas et al. 2000, Sprecher et al. 2001, Bitoun et al. 2002, Raghunath et al. submitted). Damit muss der TGase 3 Defekt als sekundäre Folge des Mangels von LEKTI angesehen werden, dem Serinproteaseinhibitor im Str. granulosum, für den SPINK 5 kodiert. Die Häute von Psoriasis Patienten zeigten eine massive Erhöhung der TGase 1 Aktivität und Verbreiterung der Hornschicht, die durch die Hyperkeratose und die Akanthose begründet werden können. Die TGase 1 Aktivität bei den Patienten mit Psoriasis findet sich in allen suprabasalen Schichten (Bernard et al. 1986/1988). Obwohl die Architektur der Haut bei NTS dem der Psoriasis sehr ähnlich ist und die TGase 1 Aktivität bei beiden Störungen in der Epidermis eine sehr breite Zone zeigt, einschließlich der meisten suprabasalen Schichten, war bei Psoriasis Patienten das TGase 3 Signal nicht abwesend, wie es bei NTS Patienten der Fall war. Dieses verstärkt die vorherige Aussage, dass bei NTS der TGase 3 Defekt sekundär entstanden ist. Das Fehlen von TGase 3 als Ausdruck einer Differenzierungsstörung konnte jüngst ebenfalls ausgeschlossen werden, da andere Differenzierungsmarker wie Involucrin, Annexin I und II beim NTS normal exprimiert sind (M. Raghunath, persönliche Mitteilung Juni 2003).

Die Ursache des TGase 3 Mangels bei der Harlekinichthyose bleibt daher derzeit ebenfalls unklar, mögliche Kandidatengene befinden sich auf Chr. 18q, zumindest wurde ein Fall dokumentiert, bei dem eine Deletion im Bereich des langen Armes von Chr. 18 beschrieben wurde; die Zahl der in Frage kommenden Gene beläuft sich in die Hunderte, sodass mangels informativer Familien für eine Kopplungsanalyse eine baldige Aufklärung fraglich ist. Es ist jedoch

bemerkenswert, dass sowohl bei Harlekinichthyose als auch NTS histologisch gesehen das Str. granulosum meist fehlt, sodass bei ähnlichem TGase 3 Bild bei der Harlekinichthyose möglicherweise die gleichen genetischen Defekte wie beim NTS vorliegen. Bei allen anderen Ichthyosen, seien sie isoliert oder assoziiert, fanden sich keine signifikanten Störungen der TGase 3 Expression.

5.2.2 Expression von Osteonectin

Osteonectin ist ein extrazelluläres Matrix-Protein, das drei Bezeichnungen hat, weil es von drei verschiedenen Untersucherguppen im Knochen (Osteonectin: AG Termine et al. 1981), "murinem embryo parietal endoderm" (SPARC: AG Brigid Hogan, Mason et al. 1986) und erneut als Basalmembranprotein (BM-40 , AG Rupert Timple, Mann et al. 1987) beschrieben wurde. Da Osteonectin Kalzium bindet und auch in der Epidermis nachgewiesen wurde (Hunzelmann et al. 1998), kam es prinzipiell für die Untersuchung von Verhornungsstörungen in Frage. Bemerkenswerterweise liegt der Genlocus 5q31 in der Nähe des NTS Locus, auch weist Osteonectin Serinproteinaseinhibitordomänen vom Kazal-Typ auf. Bekannt ist ferner, dass Osteonectin über seinen N-Terminus ein Transglutaminasesubstrat darstellt (Aeschlimann et al. 1995). Insgesamt fanden sich immunhistochemisch im Vergleich zu Normalhäuten keinerlei Auffälligkeiten, auch nicht beim NTS.

5.2.3. Expression von Calpain

Calpain ist eine kalziumabhängige Cysteinprotease, die ubiquitär im Zytoplasma von verschiedenen Zellen u. a. Zellen der Epidermis vorkommt. Bisher sind u.a. zwei Isoenzyme, Calpain I (μ -Calpain) und Calpain II (m-Calpain), die eine heterodimere Struktur haben beschrieben. Beide Isoenzyme bestehen aus je zwei Untereinheiten mit jeweils einer großen und einer kleinen Untereinheit, wobei die großen Untereinheiten verschiedene Aminosäuresequenzen besitzen. Diese werden von verschiedenen Genen exprimiert (Ohno et al. 1990).

Calpain erschien in der vorliegenden Untersuchung von besonderer Bedeutung, weil die Gene für die seine Untereinheiten mit zwei möglichen, aber noch nicht näher charakterisierten Loci für ARLI korrespondieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Calpain I und II kalziumabhängig TGase1 aktivieren (Ando et al. 1988; Zhang et al. 1998; Kim & Bae 1998). Calpain konnte ferner biochemisch und immunhistochemisch in der humanen Epidermis nachgewiesen werden (Miyachi et al. 1986). Zu dem weisen neueste Befunde auf eine Beteiligung von Calpainen bei der normalen epidermalen Differenzierung über Prozessierung von Caspase hin (Chien et al 2002). Wir konnten die Präsenz der L1 Untereinheit von μ -Calpain in humaner normaler Haut bestätigen. Insbesondere fand sich das Enzym in der gesamten Epidermis i.d.R. mit perizellulärer, granulärer, teils aber auch mit cytoplasmatischer, Verteilung. Bei der Gradierung von Calpainverteilungsstörungen fanden wir sowohl komplette Abwesenheit des epidermalen Signals als auch eine inhomogene inselartige Verteilung mit eingestreuten komplett calpainfreien Abschnitten. Beide Muster wurden als calpaindefizient eingestuft. Leichte Reduktionen in der Intensität des Nachweises waren durchaus in Einzelfällen bei den anderen Krankheitsbildern zu finden, wurden aber von der Gradierung her als im Rahmen biologischer Schwankungen eingestuft. In unserem Kollektiv von Verhornungsstörungen fanden wir signifikante Reduktion und Fehlverteilung, allerdings nur bei ARLI/SHCB und HI (NTS Patienten waren nicht untersucht worden). Komplette negative Epidermis fand sich sowohl bei TGase 1 negativen als auch positiven ARLI Patienten. Bei den SHCB Patienten die TGase 1 defizient waren, bestand auch eine Calpain-Defizienz. Allerdings war bei zwei von drei SHCB Patienten kürzlich eine TGM1 Mutation, die wir als ursächlich für das Krankheitsbild ansehen, identifiziert worden (Raghunath et al 2003). Beim dritten SHCB Patienten (MK) war die Mutationssuche auf TGM1 erfolglos gewesen (PD Dr. HC Hennies, MDC Berlin persönliche Mitteilung 2000). Ausgehend von der Hypothese, dass Calpaindefekte einen funktionellen TGase 1 Mangel (Aktivierungsdefekt) hervorrufen können, konnte daher kein auf der Hand liegender Zusammenhang zwischen histochemischer TGase Defizienz und Calpain-Defizienz (s.o.) hergestellt werden. Es gilt aber zu bedenken, dass der immunologische Nachweis eines Proteins

keinerlei Auskunft über dessen Funktionstüchtigkeit zulässt. Derzeit bestehen keine in situ Assays für Calpainaktivität, zudem sind die derzeit erhältlichen Peptidsubstrate keinesfalls spezifisch für Calpaine, sodass die Entwicklung eines calpainspezifischen Assays unwahrscheinlich erscheint (M. Raghunath persönliche Mitteilung Juni 2003). Es war daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur möglich, mit spezifischen Antikörpern gegen Calpainuntereinheiten zu arbeiten. Es ist daher durchaus möglich, dass immunhistochemisch nachgewiesenes Calpain bei histochemischem TGase Mangel dennoch funktionsuntüchtig ist, das gilt ohnehin bei immunhistochemischem Calpain-Mangel und histochemischem TGase 1 Mangel. Bei den meisten histochemisch TGase 1 defizienten ARLI Patienten finden sich TGM1 Defekte. Eine Mutationsanalytik bei CAPN Genen bietet sich hier allerdings auf jeden Fall an, da nicht bei allen histochemisch defizienten TGase 1 Patienten TGM1 Mutationen nachzuweisen sind, und da möglicherweise Calpain-Mutationen als Modifikatoren des Phänotyps durchaus in Frage kommen.

Bei insgesamt 54 % der histochemisch TGase positiven Patienten bestand ein Mangel/starke Reduktion des immunhistochemischen Calpain-Signals, demgegenüber zeigten 64 % der histochemisch TGase defizienten Patienten eine Calpain-Defizienz. Schwierig im Sinne der vorgeschlagenen Hypothese sind unsere Befunde zu erklären, die bei histochemisch TGase 1 positiven ARLI/SHCB Patienten 23 % ein immunhistochemisches Fehlen von Calpain zeigten. Es ist möglich, dass es bei bestimmten ARLI Gruppen eine proteolytische Aktivierung von TGase 1 im Nebenschluss durch andere Proteinasen gibt, sodass ein Calpain-Mangel kompensiert werden kann. Mögliche Phänotypen eines Calpain-Mangels sind als "limb girdle muscular dystrophy type 2A" beschrieben. Diese, die Muskeln betreffende Störungen, sind durch abnormale Degradation von Muskelproteinen charakterisiert. Hierbei kommt Calpain III, ein muskelspezifisches Protein, in Frage, das von CANP3 Gen auf Chromosom 15q15.1-q21.1 exprimiert wird. Richard et al. identifizierten 1995 15 Mutationen des CAPN3, die für diese Erkrankung in Frage kommen. Beschrieben worden sind hier jedoch keine assoziierten Ichthyosen.

Bei zwei von vier Harlekinichthyosen fanden wir eine klare Calpainreduktion. Beide Patienten (JPK und KG) waren zum Zeitpunkt der Biopsien neugeboren bzw. im Säuglingsalter, (KG hat definitiv nicht überlebt, JPK: keine Information über weitere Entwicklung). Patienten TS und SD waren zum Zeitpunkt der Biopsien 6 bzw. 8 Jahre alt und hatten unter initialer Retinoidtherapie dieses potentiell lebensbedrohliche Krankheitsbild überlebt. Es ist möglich, dass der Calpain-Mangel mit Schweregrad der Erkrankung bzw. Entwicklungsalter der Kinder zusammenhängt. Bemerkenswert ist daher die Arbeit von Michel et al (1999), die bei sieben neonatalen HI Kindern eine signifikant reduzierte Expression von Calpain I nachweisen und diesen Befund für HI spezifisch halten. Es gibt allerdings keine Nachuntersuchungen zum Patientenkollektiv von Michel et al (1999).

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Fehlen oder eine starke Reduktion zweier für die epidermale Biologie relevante Proteine nachweisen. Die vorliegenden Befunde unterstreichen, dass Calpain I und TGase 3, bzw. die für sie kodierenden Gene als Kandidatengene für ARLI/SHCB und HI in Frage kommen. Der molekulargenetische Zugang zur Aufklärung dieser Erkrankungen ist derzeit stark erschwert zum einen durch das Fehlen größerer informativer Familien, zum anderen gelangten viele Patienten wie im Falle HI durch frühzeitiges Versterben der Patienten nicht zur Diagnostik.

Die aktuellen Erfolge in der Pflege und Therapie dieser massiven Verhornungsstörungen haben ein Überleben der Patienten möglich gemacht. Dennoch handelt es sich bei diesen Erkrankungen um sporadische Fälle. Es bleibt derzeit daher nur die Möglichkeit, Evidenzen zu sammeln und gezielt mögliche Kandidatengene zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit hat dazubeigetragen, diesem Ziel näher zu kommen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei klinisch definierten Verhornungsstörungen wurden Kandidatenproteine untersucht. Die Transglutaminase 3, Calpain und Osteonectin wurden ausgesucht, weil sie zum einen in der ätiologisch relevanten histologischen Zielregion (Str. granulosum) exprimiert werden und des Weiteren in Kopplungsstudien chromosomale Regionen für autosomal rezessiv lamelläre Ichthyose (ARLI)/Selbsteilendes Kollodiumbaby (SHCB), Harlekinichthyose (HI), Netherton-Syndrom (NTS) gezeigt wurden, in denen Genorte für die hier untersuchten Proteine platziert werden konnten.

In unserem Kollektiv von Verhornungsstörungen war das TGase 3 Signal bei Patienten mit NTS und HI reduziert bzw. negativ. Wir fanden auch signifikante Calpainreduktion und Fehlverteilung, allerdings nur bei ARLI/SHCB und HI. Komplette negative Epidermis fand sich in Bezug auf Calpain sowohl bei TGase 1 negativen als auch bei TGase 1 positiven ARLI Patienten.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Fehlen oder eine starke Reduktion zweier für die epidermale Biologie relevanter Proteine nachweisen. Die vorliegenden Befunde unterstreichen, dass Calpain I und TGase 3, bzw. die für sie kodierenden Gene als Kandidatengene für ARLI/SHCB und HI in Frage kommen. Die Bedeutung von TGase 3 Defizienz bei NTS kann derzeit als sekundäre Folge des Mangels von LEKTI angesehen werden, einem Serinproteaseinhibitor, der im Str. granulosum exprimiert wird und für den SPINK 5 kodiert.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Aeschlimann D, Paulsson M (1994) Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thromb and Haemostasis* **71**: 402-415

Aeschlimann D, Kaup O, Paulsson M (1995) Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminy substrate. *J Cell Biol* **129**: 881-892

Aeschlimann D, Koeller MK, Allen-Hoffmann BL, Mosher DF (1998) Isolation of a cDNA encoding a novel member of the transglutaminase gene family from human keratinocytes: detection and identification of transglutaminase gene products based on reverse transcription-polymerase chain reaction with degenerate primers. *J Biol Chem* **273**: 3452-3460

Akiyama M, Takizawa Y, Kokaji T, Shimizu H, (2001) Novel mutations of TGM1 in a child with congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol* **144**: 401-407

Alibert L (1806) Descriptions des maladies de la peau, observés á l'hôpital Saint-Louis et exposition des meilleurs méthodes suivies pour le traitement. Paris

Ando Y, Imamura S, Murachi T, Kannagi R (1988) Calpain activates two transglutaminases from porcine skin. *Arch Dermatol Res* **280(6)**: 380-384

Anton-Lambrecht I, Schnyder UW (1974) Ultrastructure of inborn errors of keratinization. VI. Inherited ichthyosis: a model system for heterogeneties in keratinization disturbances. *Arch Dermat Forsch* **250**: 207-227

Bale SJ, Russel LJ, Lee ML, Compton JG, DiGiovanna JJ (1996) Congenital recessive ichthyosis unlinked to loci for epidermal transglutaminases. *J Invest Dermatol* **107**: 808-811

Bassuk JA, Birkebak T, Rothmier JD, Clark JM, Bradshaw A, Muchowski PJ, Howe CC, Clark JI, Sage EH (1999) Disruption of the Sparc locus in mice alters the differentiation of lenticular epithelial cells and leads to cataract formation. *Exp Eye Res* **68**: 321-331

Bergers M, Traupe H, Dunnwald SC, Mier PD, van Dooren-Greebe R, Steijlen P, et al (1990) Enzymatic distinction between two subgroups of autosomal recessive lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol* **94**: 407-412

Bernard BA, Reano A, Darmon YM, Thiovolet J (1986) Precocious appearance of involucrin and epidermal transglutaminase 1 during differentiation of psoriatic skin. *Br J Dermatol* **114**: 279-283

Bernard BA, Asselineau D, Schaffar-Deshayes L, Damon MY (1988) Abnormal sequence of expression of differentiation markers in psoriatic epidermis: inversion of two steps in the differentiation program ? *J Invest Dermatol* **90**: 801-805

Bichakjian CK, Nair RP, Wu WW, Goldberg S, Elder JT (1998) Prenatal exclusion of lamellar ichthyosis based on identification of two new mutations in the transglutaminase I gene. *J Invest Dermatol* **110**: 179-182

Bitoun E, Bodemer c, Amiel J, de Prost Y, Stoll C, Calvas P, Hovnanian A (2002a) Prenatal diagnosis of a letal form of Netherton syndrom by SPINK 5 mutation analysis. *Prenat Diagn* **22**: 121-126

Bitoun E, Chavanas S, Irvine AD, Lonie L, Bodemer C, Paradisi M, Hamel-Teillac D, Ansai S, Mitsuhashi Y, Taieb A, de Prost Y, Zambruno G, Harper JI,

Hovnanian A (2002b) Netherton syndrom: disease expression and spectrum of SPINK 5 mutations in 21 families. *J Invest Dermatol* **118**: 352-361

Bodwell JE, Holbrook NJ, Munck A, (1985) Stabilization of Thymic Glucocorticoid-Receptor Complexes by the Calcium-activated Protease Inhibitor, Calpastatin. *J Biol Chem* **260**: 2601-2604

Candi E, Melino G, Mei G, Tarcsa E, Chung S, Marekov LN, Steinert PM (1995) Biochemical, structural, and transglutaminase substrate properties of human loricrin, the major epidermal cornified cell envelope protein. *J Biol Chem* **270**: 26382-26390

Cassel D, Glaser L (1982) Proteolytic cleavage of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **257**: 9845-9848

Chavanas S, Garner C, Bodemer C, Ali M, Hamel-Teillac D, Wilkinson J, Bonafe JL, Paradisi M, Kelsell P, Ansai SI, Mitsuhashi Y, Larregue M, Leigh I, Harper JJ, Taieb A, Prost Y, Cardon LR, Hovnanian A (2000a) Localization of the Netherton syndrome gene to chromosome 5q32, by linkage analysis and homozygosity mapping. *Am Hum Genet* **66**: 914-921

Chavanas S, Bodemer C, Rochat A, Hamel-Teillac D, Ali M, Irvine AD, Bonafe JL, Wilkinson J, Taieb A, Barrandon Y, Harper JJ, de Prost Y, Hovnanian A (2000b) Mutations in SPINK 5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrom. *Nat Genet* **25(2)**: 141-142

Chien AJ, Presland RB, Kuechle MK (2002) Processing of native caspase-14 occurs at an atypical cleavage site in normal epidermal differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **296(4)**: 911-1007

Choate KA, Williams ML, Khavari PA (1998) Abnormal transglutaminase 1 expression pattern in a subset of patients with erythrodermic autosomal recessive ichthyosis. *J Invest Dermatol* **110**: 8-12

Comel M (1949) Ichthyosis linearis circumflexa. *Dermatologica* **98**:133-136

Croall DE, Dermartio GN (1991) Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* **71**: 813-847

Cserhalmi-Friedmann PB, Milstone LM, Christiano AM (2001) Diagnosis of autosomal recessive lamellar ichthyosis with mutations in the TGM1 gene. *Br J Dermatol* **144**: 726-730

El Shabrawi-Caelen L, Smolle J, Metze D, Ginter-Hanselmayer G, Raghunath M, Traupe H, and Kerl H Generalized exfoliative erythroderma since birth. *Arch Dermatol* In press

Elias PM, Williams ML, Maloney ME, bonifas JA, Brown BE, Grayson S, Epstein EH Jr (1984) Stratum corneum lipids in disorders of cornification: steroid sulfatase and cholesterol sulfatase in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis. *J Clin Invest* **74**: 1414-1421

Esposito G, Auricchio L, Rescigno G, Paparo F, Rinaldi M, Salvatore F (2001) Transglutaminase 1 gene mutations in Italian patients with autosomal recessive lamellar ichthyosis. *J Invest Dermatol* **116**: 809-812

Eto A, Akita Y, Saido TC, Suzuki K, Seiichi K (1995) The role of the calpain-calpastatin system in thyrotropin-releasing hormone-induced selective down-regulation of a protein kinase C isoenzyme, nPKC in rat pituitary GPC cells. *J Biol Chem* **270**: 25115-25120

Fartasch M, Williams ML, Elias PM (1999) Altered lamellar body secretion and stratum corneum membrane structure in Netherton syndrom: differentiation from other infantile erythrodermas and pathogenic implications. *Arch Dermatol* **135(7)**: 823-832

Fesus L, Davies PJA, Piacentini M (1991) Apoptosis: molecular mechanisms in programmed celldeath. *Eur J Cell Biol* **56**: 170-177

Fischer J, Faure A, Bouadjar B, Blanchet-Bardon C, Karaduman A, Thomas I, Emre S, Cure S, Özgüc M, Wessenbach J, Prud`homme JF (2000) Two new loci for autosomal recessive ichthyosis on chromosomes 3p21 and 19p12-q12 and evidence for further genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* **66**: 904-913

Folk JE (1983) Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed ϵ -(γ -glutamyl) lysine bond formation. *Adv Enzymol* **54**: 1-56

Fritsch (1998) Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas, Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Funk SE, Sage EH (1991) The Ca^{2+} binding glycoprotein Sparc modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2648-2652

Funk SE, Sage Eh (1993) Differential effects of Sparc and cationic Sparc peptides on DNA synthesis by endothelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol* **154**: 53-63

Gassmann A (1904) Histologische und klinische Untersuchungen über Ichthyosis und ichthyosisähnliche Krankheiten. *Arch Dermatol Syph [Suppl]*

Ghadially R, Williams ML, Hou SY, Elias PM (1992) Membrane structural abnormalities in the stratum corneum of the autosomal recessive ichthyoses. *J Invest Dermatol* **99(6)**: 755-763

Gilmour DT, Lyon GJ, Carlton MB, Sane JR, Cunningham MJ, Anderson JR; Hogan BL, Evans MJ, Colledge WH (1998) Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J* **17**: 1860-1870

Greene SL, Muller SA (1985) Netherton`s syndrom. Report of a case and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* **13(2 Pt 2)**: 329-337

Greenberg CS, Brickbichler PJ, Rice RH (1991) Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *Faseb J* **5**: 3071-3077

Grenard P, Bates MK, Aeschlimann D (2001) Evolution of transglutaminase genes: Identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. *J Biol Chem* **276(35)**: 33066-35075

Hasselaar P, Loskutoff DJ, Sawdey M, Sage EH (1991) SPARC induces the expression of type I plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* **266**: 13178-13184

Hasselaar P, Sage EH (1992) SPARC antagonizes the effect of BFGF on the migration of bovine aortic endothelial cells. *J Cell Biochem* **49**: 272-283

Hausser I, Anton-Lamprecht I (1996) Severe congenital generalized exfoliative erythroderma in newborns and infants: a possible sign of Netherton syndrom. *Pediatr Dermatol* **13**: 183-199

Hazel M, Marks R, (1985) Clinical, histologic, and cell kinetic discriminants between lamellar ichthyosis and nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Arch Dermatol* **121(4)**: 489-493

Hennies HC, Raghunath M, Wiebe V, Vogel M, Velten F, Traupe H, Reis A (1998a) Genetic and immunohistochemical detection of mutations inactivating the keratinocyte transglutaminase in patients with lamellar ichthyosis. *Hum Genet* **102**: 314-318

Hennies HC, Küster W, Wiebe V, Krebsova A, Reis A (1998b) Genotype/phenotype correlation in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Am J Hum Genet* **62**: 1052-1061

Hitomi K, Kanehiro S, Ikura K, Maki M (1999) Characterization of recombinant mouse epidermal-type transglutaminase (TGase 3): regulation of its activity by proteolysis and guanine nucleotides. *J Biochem* **125(6)**: 1048-1054

Hohenadl C, Mann K, Mayer U, Timpl R, Paulsson M, Aeschlimann D (1995) The adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminase-catalyzed modification. *J Biol Chem* **270**: 23415-23420

Hohenester E, Maurer P, Timpl R, (1997) Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *EMBO J* **16**: 3778-3786

Hohl D, Mehrel T, Lichti U, Turner ML, Roop DR, Steinert PM, (1991) Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *J Biol Chem* **266**: 6626-6636

Hohl D, Huber M, Frenk E, (1993) Analysis of the cornified cell envelope in lamellar ichthyosis. *Arch Dermatol* **129**: 618-624

Huber M, Rettler I, Bernasconi K, Frenk E, Lavrijsen SPM, ponc M, Bon A, Lautenschlager S, Schoderet DF, Hohl D (1995a) Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* **267**: 525-528

Huber M, Rettler I, Bernasconi K, Wyss M, Hohl D (1995b) Lamellar ichthyosis is genetically heterogeneous cases with normal keratinocyte transglutaminase. *J Invest Dermatol* **105**: 653-654

Huber M, Yee VC, Burri N, Vikerfors E, Lavrijsen APM, Paller AS, Hohl D (1997) Consequences of seven novel mutations on the expression and structure of keratinocyte Transglutaminase. *J Biol Chem* **272**: 21018-21026

Hunzelmann N, Hafner M, Anders S, Krieg T, Nischt R (1998) BM-40 (osteonectin, SPARC) is expressed both in the epidermal and in the dermal compartment of adult human skin. *J Invest Dermatol* **110(2)**: 122-126

Jendraschak E, Sage EH, (1996) Regulation of angiogenesis by extracellular proteins: a recurring leitmotif. In von der Mark K, Goodmann S, eds. Seminars in Cancer Cell Biology: Extracellular Matrix and Integrins. *Sem Can Biol* **7**: 139-146

Jobard F, Lefevre C, Karaduman A, Blanchet-Bardon C, Emre S, Weissenbach J, Ozguc M, Lathrop M, Prud'homme JF, Fischer J (2002) Lipoyxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoyxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1. *Hum Mol Genet* **11(1)**: 107-113

Jones SK, Thomasson LM, Surbrugg SK, Weston WL (1986) Neonatal hypernatraemia in two siblings with Netherton's syndrom. *Br J Dermatol* **114**: 741-743

Judge Mr, Morgan G, Harper JI (1994) A clinical and immunological study of Netherton's syndrome. *Br Dermatol* **131**: 615-621

Kim IG, Wesley McBride O, Wang M, Kim S-Y, Idler WW, Steinert PM (1992) Structure and organization of the human transglutaminase 1 gene. *J Biol Chem* **267**: 7710-7717

Kim IG, Gormann JJ, Park SC, Chung SI, Steinert PM (1993) The deduced sequence of the novel protransglutaminase E (TGase 3) of human and mouse. *J Biol Chem* **268**: 12682-12690

Kim SY, Bae CD (1998) Calpain inhibitors reduce the cornified cell envelope formation by inhibiting proteolytic processing of transglutaminase 1. *Exp and Mol Med* **30(4)**: 257-262

Kishimoto A, Kajikawa N, Shiota M, Nishizuka Y (1983) Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J Biol Chem* **258**:1156-1164

Kolde G, Happel R, Traupe H (1985) Autosomal-dominant lamellar ichthyosis: ultrastructural characteristics of a new type of congenital ichthyosis. *Arch Dermatol Res* **278**: 1-5

Komatsu H, Takata M, Otsuki N, Ohka R, Amano O, Takehara K, and Saijoh K (2002) Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton Syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by *SPINK5*-derived peptides. *J Invest Dermatol* **118**:436-443

Krebsová A, Küster W, Lestringant GG, Schulze B, Hinz B, Frossard PM, Reis A, and Hennies HC (2001) Identification, by Homozygosity Mapping, of a Novel Locus for Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis on Chromosome 17p, and Evidence for Further Genetic Heterogeneity. *Am J Hum Genet* **69**: 216-222

Laiho E, Ignatius J, Mikkola H, Yee VC, Teller DC, Nieme KM, Saarialho-Kere U, et al (1997) Transglutaminase 1 mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: private and recurrent mutations in an isolated population. *Am J Hum Gene* **61**: 529-538

Lane TF, Sage EH (1990) Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca⁺⁺- binding sites modulate cell shape. *J Cell Biol* **111**: 3065-3076

Lane TF, Iruela-Arispe ML, Johnson RS, Sage EH (1994) SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J Cell Biol* **4**: 929-943

Le Beau MM, Espinosa III R, Neuman WL, Stock W, Roulston D, Larson RA, Keinanen M, Westbrook CA (1993) Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Nat Acad Sci USA* **90**: 5484-5488

Lee KN, Arnold SA, Bircckbichler PJ, Patterson MK, Jr, Fraij BM, Takeuchi Y, Carter HA (1993b) Site-directed mutagenesis of human tissue transglutaminase: Cys-277 is essential for transglutaminase activity but not for GTPase activity. *Biochim Biophys Acta* **1202**: 1-6

Löffler, Pedrides (1997) Biochemie und Pathobiochemie. Springer, Berlin, Heidelberg

Luderschmidt (1980) Kollodiumbaby und Harlekinfetus. *Der Hautarzt* **31**: 154-158

Mägert HJ, Ständker L, Kreutzmann P, Zucht HD, Reinecke M, Sommerhoff CP, Fritz H, and Forssmann WG (1999) LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* **274**:21499-21502

Mägert HJ, Kreutzmann P, Drögemüller K, Ständker L, Adermann K, Walden M, John HM, Korting HC, and Forssman WG (2002a) The 15-domain serine proteinase inhibitor LEKTI: biochemical properties, genomic organization, and pathophysiological role. *Eur Med Res* **7**: 49-56

Mägert HJ, Kreutzmann P, Ständker L, Walden M, Drögemüller K, and Forssman WG (2002b) LEKTI: a multidomain serine proteinase inhibitor with pathophysiological relevance. *Int J Biochem Cell Biol* **34**: 573-576

Maillard C, Malaval L, Delmas PD (1992) Immunological screening of SPARC/osteonectin in nonmineralized tissues. *Bone* **13**: 257-264

Mann K, Deutzmann R, Paulsson M, Timpl R (1987) Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelatin agents and evidence for its identity with steonectin an SPARC. *FASEB J* **218**: 167-172

Mason IJ, Taylor A, Williams JG, Sage H, Hogan BL (1986) Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial "culture shock" glycoprotein of Mr 43,000. *EMBO J* **5**: 1465-1472

Maurer P, Mayer U, Bruch M, Jenö P, Mann K, Landwehr R, Timpl R (1992) High-affinity and low-affinity calcium binding and stability of the multidomain extracellular 40-kDa basement membrane glycoprotein (BM-40/SPARC/osteonectin). *Eur J Biochem* **205**: 233-240

Mayer U, Aumailley M, Mann K, Timpl R, Engel J (1991) Calcium-dependent binding of basement membrane protein BM-40 (osteonectin, SPARC) to basement membrane collagen type IV. *Eur J Biochem* **198**: 141-150

Melnik B, Küster W, Hollmann J, Plewig G, Traupe H, (1989) Autosomal dominant lamellar ichthyosis exhibits an abnormal scale lipid pattern. *Clin Genet* **35**: 152-156

Michel M, Fleckmann P, Smith LT, and Dale BA (1999) The calcium-activated neutral protease calpain I is present in normal foetal skin and is decreased in neonatal harlequin ichthyosis. *Br J Dermatol* **141**: 1017-1026

Michel S, Dermarchez M (1988) Localization and in vivo activity of epidermal transglutaminase. *J Invest Dermatol* **90**: 472-474

Miyachi Y, Yoshimura N, Suzuki S, Hamakubo T, Kannagi R, Imamura S, Murachi T (1986) Biochemical demonstration and immunohistochemical localization of calpain in human skin. *J Invest Dermatol* **86**: 346-349

Müller, FB, Hausser, I, Berg, D, Casper, C, Maiwald, R, Jung, A, Jung, H, and Korge, BP (2002) Genetic analysis of a severe case of Netherton syndrome and application for prenatal testing. *Br J Dermatol* **146**:495-499.

Murphy-Ullrich JE, Lane TF, Pallero MA, Sage EH (1995) SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the calcium-binding EF-hand. *J Cell Biochem* **57**: 341-350

Netherton EW (1958) A unique case of trichorrhexis invaginata "bamboo hair". *Arch Dermatol* **78**: 483-487

Niemi K-M, Kanerva L, Kuokkanen K, (1991) Recessive ichthyosis congenita type II. *Arch Dermatol Res* **283**: 211-218

Ohno S, Minoshima S, Kudoh J, Fukujama R, Shimizu Y, Ohmi-Imajoh S, Shimizu N, Suzuki K (1990) Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **53**: 225-229

Ohno S, Emori Y, Sugihara H, Imajoh S, Suzuki K (1987) Cloning and evolution of calcium-dependent protease; cDNA cloning of a novel family of calcium-binding proteins. *Meth Enzym* **139**: 363-379

Ohno S, Emori Y, Suzuki K (1986) Nucleotide sequence of a cDNA coding for the small subunit of human calcium-dependent protease. *Nucl Acids Res* **14**: 5559-5559

Paller Amy S, (1994) Laboratory Tests for Ichthyosis. *Dermatol-Clin* **12(1)**: 99-107

Parmentier L, Blanchet-Bardon C, Nguyen S, Prud'homme JF, Dubertret L, Weissenbach J (1995) Autosomal recessive lamellar ichthyosis: identification of a new mutation in transglutaminase 1 and evidence for genetic heterogeneity. *Hum Mol Genet* **4**: 1391-1395

Parmentier L, Lakhdar H, Blanchet-Bardon C, Marchand S, Dubertret L, Weissenbach J (1996) Mapping of a second locus for lamellar ichthyosis to chromosome 2q33-35. *Hum Mol Genet* **5(4)**: 555-559

Patthy L (1991) Modular exchange principals in proteins. *Curr Opin Struct Biol* **1**: 1351-1361

Pena Penabad C, Perez Arellano JL, Becker E, Gutierrez de Diego J, Garcia Salgado MJ, Valle FJ, Unamuno Perez P, (1998) Differential patterns of filaggrin expression in lamellar ichthyosis. *Br J Dermatol* **139(6)**: 958-964

Penrose LS, Stern C, (1958) Reconsideration of the Lambert pedigree (ichthyosis hystrix gravior). *Ann Hum Genet* **22**: 258-283

Petit E, Huber M, Rochat A, Bodemer C, Teillac-Hamel D, Muh JP, Revuz J, Barrandon Y, Lathrop M, de Prost Y, Hohl D, Hovnanian A, (1997) Three novel

piont mutations in the keratinocyte transglutaminase (TGK) gene in lamellar ichthyosis : significance for mutant transcript level, TGK immunodetection and activity. *Eur J Hum Genet* **5(4)**: 218-228

Phillips MA, Stewart BE, Rice RH, (1992) Genomic structure of keratinocyte transglutaminase. Recruitment of a new exon for a modified function. *J Biol Chem* **267**: 2282-2286

Pigg M, Gedde-Dahl T Jr, Cox D, Hausser I, Anton-Lamprecht I, Dahl N, (1998) Strong founder effect for a transglutaminase 1 gene mutation in lamellar ichthyosis and congenital ichthyosiform erythroderma from Norway. *Eur J Hum Genet* **6(6)**: 589-596

Polakowska RR, Eddy RL, Shows TB, Goldsmith LA (1991) Epidermal type 1 transglutaminase (TGM1) is assigned to human chromosome 14. *Cytogene. Cell Genet* **56**: 105-107

Pottgiesser J, Maurer P, Mayer U, Nischt R, Mann K, Timpl R, Engel J (1994) Changes in calcium and collagen IV binding caused by mutations in the EF hand and other domains of extracellular matrix protein BM-40 (SPARC, osteonectin). *J Mol Biol* **238**: 563-574

Raghunath M, Höpfner B, Aeschlimann D, Lüthi U, Meuli M, Altermatt S, Gobet R, Bruckner-Tundermann L, Steinmann B (1996) Cross-linking of the dermo-epidermal junction of skin regenerating from keratinozyte Autografts. *J Clin Invest* **98**: 1174-1184

Raghunath M, Hennies C, Velten F, Wiebe V, Steinert PM, Reis A, Traupe H (1998) A novel in situ method for the detection of deficient transglutaminase activity in the skin. *Arch dermatol Res* **290**: 621-627

Raghunath M, Hennie HC, Ahvazi B, Vogel Melanie, Reis Andre, Steinert PM, and Traupe H (2003) Self-Healing collodion baby: a dynamic phenotype explained by a particular transglutaminase-1 mutation. *J Invest Dermatol* **120**: 224-228

Raghunath M, Tontsidou L, Oji V, Schürmeyer-Horst F, Jayakumar A, Beljan G, Ständer H, Smolle J, Clayman GL, Traupe H (2003) SPINK5 mutations: missing LEKTI and aberrant expression of elafin, transglutaminases and beta-defensin-2 in netherton syndrom (submitted)

Reed MJ, Sage EH (1996) SPARC and the extracellular matrix: Implications for cancer and wound repair. In: *Güthert U, Birchmeier W, eds. Attempts to Understand Metastasis Formation I. Current Topics in Microbiology and Immunology. Vol 231. Berlin, Springer-Verlag*, pp 81-94

Refsum S, (1946) Heredopathia atactica polyneuritiformis. *Acta Psychiatr Scand [Suppl]* **38**: 1-303

Reichert U, Michel S, Schmidt R, (1993) The cornified envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes. In: *Darmon M, Blumenberg M (eds) Molecular biology of the skin. Academic Press, San Diego*, pp 107-150

Resing KA, Al-Alawi N, Blomquist C, Fleckman P, Dale BA (1993) Independent regulation of two cytoplasmic processing stages of the intermediate filament-associated protein filaggrin and role of Ca²⁺ in the second stage. *J Biol Chem* **268**: 25139-25145

Rice RH, Green H, (1977) The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked envelope proteins. *Cell* **11**: 417-422

Richard I, Broux O, Allamand V, Fougerousse F, Chiannikulchai N, Bourg N, Brenguier L, Devaud C, Pasturaud P, Roudaut C, et al. (1997) Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* **81(1)**: 27-40

Robinson NA, Lopic S, Welter JF, Eckert RL (1997) S100A11, S100A10, annexin I, desmosomal proteins, plasminogen activator inhibitor-2, and involucrin are components of the cornified envelope of cultured human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* **272**: 12035-12046

Romberg RW, Werness PG, Lollar P, Riggs BL, Mann KG (1985) Isolation and characterization of native adult osteonectin. *J Biol Chem* **260**: 2728-2736

Roop Dennis (1995) Defects in the Barrier. *Science* **267**: 474-475

Rossmann-Ringdahl I, Anton-Lamprecht I, Swanbeck G, (1986) A mother and two children with nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Arch Dermatol* **122**: 559-564

Russel LJ, DiGiovanna JJ, Hashem N, Compton JG, Bale SJ (1994) Linkage of autosomal recessive lamellar ichthyosis to chromosome 14q. *Am J Genet* **55**: 1146-1152

Sage EH, Vernon R, Decker J, Funk S, Iruela-Arispe ML (1989a) Distribution of the calcium binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice. *J Histochem Cytochem* **37**: 819-829

Sage EH, Vernon R, Funk S, Everitt E, Angello J (1989b) SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca²⁺ dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol* **109**: 341-356

Sage EH, Bassuk J, Yost JC, Folkmann MJ, Lane TF (1995) Inhibition of endothelial cell proliferation by SPARC is mediated through a Ca⁺⁺-binding E/F-hand sequence. *J Cell Biochem* **57**: 127-140

Saido TC, Suzuki H, Yamazaki H, Tanoue K, Suzuki K (1993) In situ capture of mu-calpain activation in platelets. *J Biol Chem* **268**: 7422-7426

Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K (1994) Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J* **8**: 814-822

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T(1989): Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*: Cold Spring Harbor, NY

Sandler B, Hashimoto K (1998) Collodion baby and lamellar ichthyosis. *J Cutan Pathol* **25(2)**: 116-121

Schmidt R, Reichert U, Michel S, Shroot B, Bouclier M, (1985) Plasma membrane transglutaminase and cornified envelope competence in cultured human keratinocytes. *FEBS Lett* **186(2)**: 201-204

Schorderet DF, Huber M, Laurini RN, Von Moos G, Gianadda B, Deleze G, Hohl D (1997) Prenatal diagnosis of lamellar ichthyosis by direct mutational analysis of keratinocyte transglutaminase gene. *Prenat Diagn* **17(5)**: 483-486

Siemens HW, (1929) Die Vererbung in der Äthiologie der Hautkrankheiten. In: *Jadassohn J (ed) Handbuch der Haut- und Geschlechtskrankheiten, Vol 3. Springer, Berlin*, pp 1-165

Simon M, Green H, (1984) Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte. *Cell* **36(4)**: 827-834

Simon M, Green H, (1985) Enzymatic cross-linking of involucrin and other proteins by keratinocyte particulates in vitro. *Cell* **40(2)**: 677-683

Sjögren T, Larsson T, (1957) Oligophrenia in combination with congenital ichthyosis and spastic disorders. A clinical and genetic study. *Acta Psychiatr Scand [Suppl]* **32(113)**: 1-112

Sorimachi H, Imajoh S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y, Suzuki K (1989) A novel member of the large subunit of calcium activated neutral protease. *J Biol Chem* **264**: 20106-20119

Sorimachi H, Saido TC, Suzuki K (1994) New era of calpain research: Discovery of tissue-specific calpains, *FEBS Lett* **343**: 1-5

Sprecher E, Chavanas S, DiGiovanna JJ, Amin S, Nielsen K, Prendiville JS, Silverman R, Esterly NB, Spraker MK, Guelig E, de Luna ML, Williams ML, Buehler B, Siegfried EC, Van Maldergem L, Pfindner E, Bale SJ, Uitto J, Hovnanian A, and Richard G (2001) The spectrum of pathogenic mutations in *SPINK5* in 19 families with Netherton syndrome: implications for mutation detection and first case of prenatal diagnosis. *J Invest Dermatol* **117**:179-187

Steinert PM, Marekov LN (1995) The Proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments,loricrin, and small proline-rich proteins 1and 2 are isodi-peptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* **270**: 17702-17711

Stewart H, Smith PT, Gaunt L, Moore L, Tarpey P, Andrew S, Dady Rifkin R, Clayton-Smith J (2001) De novo deletion of chromosome 18q in a baby with harlequin ichthyosis. *Am J Med Genet* **102(4)**: 342-345

Suzuki K (1987) Calcium activated neutral protease: domain structure and activity regulation. *Trends Biochem Sci* **12**: 103-105

Sybert VP (1997) Disorders of the epidermis In: Sybert VP ed *Genetic skin disorders*. New York, Oxford: Oxford University Press pp 5-128

Tacher SM, Rice RH, (1985) Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells : relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* **40**: 685-695

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey MI, Martin GR (1981) Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* **26**: 99-105

Tok J, Garzon MC, Cserhalmi-Friedman P, Lam HM, Spitz JL, Christiano AM, (1999) Identification of mutations in the transglutaminase 1 gene in lamellar ichthyosis. *Exp Dermatol* **8(2)**: 128-133

Toribio J, Redondo VF, Peteiro C, Zulaica A, Fabeiro JM, (1986) Autosomal dominant lamellar ichthyosis. *Clin Genet* **30**: 122-126

Traupe H, Kolde G, Happle R (1984) Autosomal dominant lamellar ichthyosis : a new skin disorder. *Clin Genet* **26**: 457-461

Traupe H, Happle R (1983) Alopecia ichthyotica. A characteristic feature of congenital ichthyosis. *Dermatologica* **167**: 225-230

Traupe Heiko (1989) The Ichthyoses. A guide to clinical diagnosis, genetic counseling, and therapy. Springer, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong

Tremble PM, Lane TF, Sage EH, Werb Z (1993) SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of

metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J Cell Biol* **121**: 1433-1444

Van Hooijdonk CAEM, Steijlen PM, Bergers M, Mier PD, Traupe H, Happle R, (1991) Epidermal transglutaminase in the ichthyoses. *Acta Derm Venereol* **71**: 173-175

Virolainen E, Wessman M, Hovatta I, Niemi K-M, Ignatius J, Kere J, Peltonen L, Palotie A (2000) Assignment of a novel locus for autosomal recessive congenital ichthyosis to chromosome 19p13.1-p13.2. *Am J Hum Genet* **66**: 1132-1137

Wang M, Kim IG, Steinert PM, McBride OW (1994) Assignment of the human transglutaminase 2 (TGM2) and transglutaminase 3 (TGM3) genes to chromosome 20q11.2. *Genomics* **23**: 721-722

Webster D, France JT, Shapiro LJ, Weiss R (1978) X-linked ichthyosis due to steroid-sulfatase deficiency. *Lancet* **1**: 70-72

Williams ML, Elias PM, (1985a) Heterogeneity in autosomal recessive ichthyosis. Clinical and biochemical differentiation of lamellar ichthyosis and nonbullous congenital ichthyosiform erythroderma. *Arch Dermatol* **121(4)**: 477-488

Williams ML, Elias PM, (1985b) The ichthyosis. In: *Thiers BH, Dobs MRL (eds) Pathogenesis of skin disease. Churchill Livingstone, New York*, pp 519-551

Williams ML, Elias PM (1987) Disorders of cornification. In: *Alper JL (ed) Dermatologic clinics, Saunders, Philadelphia*, pp 155-178.

Yamanishi K, Inazawa J, Liew FM, Nonomura K, Ariyama T, Yas Abe T, Doi H, Hirano J, Fukushima S (1992) Structure of the gene for human transglutaminase 1. *J Biol Chem* **25**: 17858-17863

Yan Q und Sage EH (1999) Sparc, a matricellular Glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* **47**: 1495-1505

Zhang J, Guttman RP, Johnson GVW (1998) Tissue transglutaminase is an in situ substrate of calpain: regulation of activity. *J Neurochem* **71**: 240-247

Zina AM, Bundino S (1979) Ichthyosis linearis circumflexa Comel an Netherton's syndrome; an ultrastructural study. *Dermatologica* **158(6)**: 404-412

8 GLOSSAR

ADI	- autosomal dominante Ichthyosis vulgaris
ADLI	-autosomal dominante lamelläre Ichthyose
ARCI	-autosomal rezessive congenitale Ichthyose
ARLI	-autosomal rezessive lamelläre Ichthyose
CE	-cornified cell envelope
CIE	-cogenitale ichthyosiforme Erythrodermie
HI	-Harlekinichthyose
ILC	-Ichthyosis linearis circumflexa
NH	-Normalhaut
NK	-Negativkontrolle
NTS	-Netherton Syndrom
SHCB	-selbsteilendes Kollodiumbaby
Str	-stratum
TGase	-Transglutaminase
TI	-Trichorrhesis invaginata
TN	-Trichorrhesis nodosa
XRI	-X-chromosomal rezessive Ichthyose

9 ANHANG

9.1 Publikation

Raghunath M, Tontsidou L, Oji V, Schürmeyer-Horst F, Jajakumar A, Beljan G, Ständer H, Smolle J, Clayman GL, Traupe H (submitted) SPINK 5 Mutations: Missing LEKTI and aberrant expression of elafin, transglutaminases and beta-defensin-2 in Netherton syndrom.

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Histologischer Aufbau der Epidermis und ihre Bestandteile (Löffler, Pedrides 1997)	7
Abbildung 2:	Lokalisation verschiedener struktureller und/oder enzymatischer Defekte bei unterschiedlichen epidermalen Störungen (modifiziert nach Roop 1995)	8
Abbildung 3 a-b:	TGase 1 defiziente ARLI , CS	15
Abbildung 4 a-b:	Kollodiumbaby	16
Abbildung 5:	Harlekinichthyose bei TS	18
Abbildung 6 a-b:	Handflächen und die Handrücken bei Harlekinichthyose	19
Abbildung 7 a-d:	Netherton-Syndrom und seine klinischen Besonderheiten (Sprecher et al. 2001)	20
Abbildung 8 a-b:	a) Lympho-Epithelial Kazal Type Inhibitor; b) Mutationen des SPINK 5 (Sprecher et al. 2001, Raghunath et al. submitted).	22
Abbildung 9:	TGasen katalysieren die kalziumabhängige Acylreaktion zwischen γ -Carboxamid Gruppe von Glutaminresten und die primäre Aminogruppe von Lysin oder Polyaminen	23
Abbildung 10:	Struktur des Osteonectins	31
Abbildung 11 a-b:	TGase 1 Aktivität auf NH	57
Abbildung 12 a-c:	Darstellung der TGase 3 auf NH	61
Abbildung 13 a-b:	Darstellung der TGase 3 bei ARLI mit TGase 1 Defizienz (Pfeile).	62
Abbildung 14 a-c:	Darstellung der TGase 3 bei NH und Harlekinichthyose	64
Abbildung 15 a-b:	Darstellung der Epidermis bei Netherton-Syndrom.	65
Abbildung 16 a-f:	Darstellung der TGase 3 mittels Immunperoxidase	70
Abbildung 17 a-f:	Osteonectin Signal	73
Abbildung 18 a-b:	Darstellung des Calpains bei NH	74
Abbildung 19 a-b:	Darstellung des Calpains bei TGase 1 positiver ARLI mit reduziertem Signal in der Epidermis	78

Abbildung 20 a-b: Calpain-Signal ei TGase 1 defizienter ARLI	79
Abbildung 21 a-b: Darstellung des Calpains bei SHCB	80
Abbildung 22 a-c: Darstellung des Calpains bei Harlekinichthyose, TS	81

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Unterteilung der Ichthyosen nach Traupe mit Vererbungsmodus (Traupe 1989 S.10)	11
Tabelle 2:	Transglutaminase-Terminologie; die im Text verwendeten Bezeichnungen sind unterstrichen	24
Tabelle 3:	Genloci des Calpains mit verschiedenen Genen, die die Untereinheiten codieren (Ohno et al. 1990)	26
Tabelle 4:	Terminologie des Osteonectins	28
Tabelle 5:	Osteonectininteraktionen	29
Tabelle 6:	Einige SPINK 5 Mutationen	38
Tabelle 7:	Patientenkollektiv und die immunhistochemische Analyse unter Berücksichtigung von TGase 3	58
Tabelle 8:	Untersuchte Patienten bezüglich der TGase 3 mittels Immunperoxidase	69
Tabelle 9:	Patienten und die immunhistochemische Analyse unter Berücksichtigung von Osteonectin	72
Tabelle 10:	Patienten und die immunhistochemische Analyse unter Berücksichtigung von Calpain (Abkürzungen am Ende der Tabelle definiert)	75
Tab. 11:	Congenitale Ichthyosen und ihre genetische Ursachen/möglichen Ätiologien	84

9.3 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von 2000 bis 2003 in der Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten -Allgemeine Dermatologie und Venerologie- der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Michael Raghunath für die Überlassung des Themas und für die hervorragende Betreuung der Arbeit. Insbesondere danke ich ihm für die Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit.

Herrn Prof. Dr. med. Heiko Traupe möchte ich für die Unterstützung bei dem Kontakt mit Patienten und für die Bereitstellung der Patientendaten danken.

Ich danke Frau Cordula Focke für ihre Hilfestellung im immunhistochemischen Labor, Frau Andrea Wissel für die Hilfestellung im Immunfluoreszenz-Labor und Frau Margit Schubert für ihre Hilfe im klinischen Labor, vor allem für ihre Geduld bei allen technischen Fragen. Des Weiteren möchte ich mich herzlichst bei Frau Tatjana Walker für ihre phototechnische Hilfe bedanken.

Besonders dankbar bin ich meinem Mann und meinem Sohn für die computertechnische Hilfe, die sie mit viel Geduld geleistet haben.

Meinem Mann, Ansgar Schürmeyer, danke ich für die vielen Ratschläge durchzuhalten und Ruhe zu bewahren.

Letztendlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Kindern, Marcel Cem, Jascha Can und Ina bedanken. Sie gaben mir viel Kraft diese Arbeit zu beenden.

9.4 Curriculum Vitae

Name	Schürmeyer-Horst, geb. Dincer
Vorname	Funda
Adresse	Eintrachtstrasse 19a 59227 Ahlen
Geburtstag	28.11.1964
Geburtsort	Ödemis/Türkei
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung

06/86	Abitur, Städt. Gymnasium Ahlen
-------	--------------------------------

Studium

08/86-06 /89	Gymnastikstudium, Fachschule Dortmund
04/95-05/02	Humanmedizinstudium, WWU Münster

Berufsausbildung

06/89	Staatl. geprüfte Gymnastiklehrerin
08/97	Physikum
08/99	1. Staatsexamen
04/01	2. Staatsexamen
05/02	3. Staatsexamen

Berufserfahrung

07/88-09/89 Gymnastiklehrerin / Hammer Spielvereinigung
07/90-05/92 Gymnastiklehrerin / Seniorenheim / Liesborn
01/95-05/97 Gymnastiklehrerin / PBW Sozialstation Ahlen
10/00-12/01 studentische Hilfskraft / Uni-Münster
seit 09/2002 Ärztin im Praktikum, Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten,
Universitätsklinikum Münster

Münster, 14.07.2003