
Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
- Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf -

Direktorin: Frau Prof. Dr. med. I. Moll

Immunlokalisation von Tight Junction- Proteinen in der Psoriasis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Claudia Pötzl

aus Leipzig

Hamburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 02.11.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Ingrid Moll
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. Johanna Brandner
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Udo Schumancher

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Tight Junctions und Tight Junction-Proteine	1
1.1.1.	Transmembranproteine	2
1.1.1.1.	Mitglieder der Claudin-Familie	2
1.1.1.2.	Das Tight Junction-Protein Occludin	3
1.1.1.3.	Junctional adhesion molecules (JAMs)	5
1.1.2.	ZO-1, ein Plaqueprotein der Tight Junctions	6
1.1.3.	Funktionen der Tight Junctions	8
1.1.4.	Veränderungen von Tight Junction-assoziierten Proteinen bei verschiedenen Erkrankungen und ihre Interaktionen mit Entzündungszellen	9
1.2.	Adhärenzverbindungen	11
1.3.	Desmosomen	12
1.4.	Verteilung von Tight Junction-, Adherens Junction- und desmosomalen Proteinen in der Haut	13
1.5.	Psoriasis	14
1.5.1.	Definition	14
1.5.2.	Epidemiologie	15
1.5.3.	Pathogenese	15
1.5.4.	Histologie	16
1.5.5.	Pathologische Barrierefunktion der psoriatischen Haut	17
1.5.6.	Infektionen und antimikrobielle Peptide der Psoriasis	18
1.5.7.	Veränderte Expression von Tight Junction-assoziierten Proteinen in der Psoriasis	18
1.6.	Zielsetzung und Fragestellung	20
2.	Material	22
2.1.	Untersuchungsgut	22
2.2.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
2.3.	Chemikalien	23
2.4.	Puffer und Lösungen	25
2.5.	Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	26
2.5.1.	Primärantikörper	26
2.5.2.	Immunglobuline (Negativkontrollen)	27
2.5.3.	Sekundärantikörper	28
3.	Methodik	29
3.1.	Vorbereitung der Paraffinblöcke	29
3.1.1.	Schneiden der Paraffinblöcke	29
3.1.2.	Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte	29
3.1.3.	Demaskierung der Antigene	30
3.1.4.	Blocken unspezifischer Reaktionen	30
3.2.	Immunhistochemische Färbung (Indirekte Immunhistochemie)	31
3.2.1.	Doppelfärbung mit Primär- bzw. Sekundärantikörpermischung	31
3.2.2.	Sukzessive Doppelfärbung	31
3.2.3.	Einzelfärbung im Folgeschnitt	32
3.2.4.	Negativ- und Positivkontrolle	32
3.3.	Auswertung der Präparate	33
4.	Ergebnisse	34
4.1.	Histologische Merkmale der Frühform der Psoriasis und der Psoriasis pustulosa im Spätstadium der Erkrankung	34

4.2.	Immunlokalisation von Tight Junction-assoziierten Proteinen und Identifizierung von Entzündungszellen bei der Psoriasis.....	36
4.2.1.	Claudin 1 und CD43 bzw. CD15	36
4.2.2.	Claudin 4 und CD43 bzw. CD15	43
4.2.3.	Claudin 7 und CD43 bzw. CD15	47
4.2.4.	JAM-A und CD43 bzw. CD15.....	51
4.2.5.	Protein ZO-1 und CD43 bzw. CD15	56
4.3.	Immunlokalisation von Proteinen der Adhärensverbindungen bei der Psoriasis.....	60
4.3.1.	E-Cadherin und CD43 bzw. CD15	60
4.3.2.	β -Catenin und CD43 bzw. CD15.....	65
4.4.	Immunlokalisation des desmosomalen Proteins Desmoglein 1 bei der Psoriasis.....	70
5.	Diskussion.....	75
5.1.	Lokalisationsänderung der TJ-Proteine in der Haut im frühen und im fortgeschrittenen Stadium der Psoriasis.....	75
5.2.	Einfluß von Entzündungszellen und Zytokinen auf die Lokalisation von TJ-Proteinen in der psoriatischen Haut	79
5.3.	Immunlokalisation der Adhärenzverbindungs- und desmosomalen Proteine in der Psoriasis.....	83
6.	Literaturverzeichnis	86
7.	Abbildungsverzeichnis	97
8.	Tabellenverzeichnis.....	101
9.	Zusammenfassung	102
10.	Danksagung	104
11.	Lebenslauf	105
12.	Veröffentlichungen.....	106
13.	Eidesstattliche Versicherung	107

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AJ	Adherens Junction
Ak	Antikörper
aPKC	aktivierte Proteinkinase C
Aqua dest.	Aqua destillata
Ca ²⁺	Calciumion
CAR	Coxsackie and Adenovirus Receptor
CD	Cluster of Differentiation
Cl ⁻	Chloridion
COOH	Carboxylgruppe
Cy3	Cyanine 3
Da	Dalton
DAPI	(4',6-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochlorid)
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Ethylendiamintetraessigsäure)
ESAM	Endothelial Cell-selective Adhesions Molecule
GJ	Gap Junction
GUK	Guanylat Kinase-like
HaCaT	Human adult low Calcium Temperature keratinocytes
HBD-2	Humanes β -Defensin-2
HLA	Human Leukocyte Antigens
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon-gamma
JAM	Junctional Adhesion Molecule
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
Mg ²⁺	Magnesiumion
MAGUK	Membran assoziierte Guanylatkinase
MDKC	Mandin-Darby Kindney Cell
MUPP-1	Multi-PDZ-domain Protein 1
Na ⁺	Natriumion

NGS	Normal Goat Serum
NK-cells	Natural killer-cells
PAR-3	Partitioning defective protein-3
PASI-score	Psoriasis Area and Severity Index
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
SH3	Src-Homology 3
Tab.	Tabelle
TBST	Tris Buffered Saline
TER	Transepithelia Resistent
TEWL	Transepidermal water loss
TJ	Tight Junction
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZO	Zonula Occludens

1. Einleitung

1.1. Tight Junctions und Tight Junction-Proteine

Tight Junctions (TJs) gehören zu den abschließenden Zell-Zell-Verbindungen, die am apikalen Teil der lateralen Zellmembran lokalisiert sind und benachbarte Zellen miteinander verbinden. Sie sind vor allem in einfachen Epithelien und Endothelien gut untersucht (FARQUAR und PALADE, 1963; SCHNEEBERGER und LYNCH, 1992; STEVENSON und KEON, 1998; MITIC *et al.*, 2000; TSUKITA *et al.*, 1999a, 2000).

In der Gefrierbruchelektronenmikroskopie (Abb. 1) zeigen sich TJs als ein kontinuierliches Netzwerk intramembranal gelegener Partikel, die die Zelle gürtelförmig umschließen (STAEHELIN, 1973, 1974). Diese paarigen Fibrillen scheinen Polymere interagierender Transmembranmoleküle zu sein, die den extrazellulären Raum überspannen und gegenüberliegende Membranen miteinander verbinden („Protein-Modell“) (VAN MEER und SIMONS, 1986). In transmissions-elektronenmikroskopischen Untersuchungen stellen sich TJs als enge Verbindungen der Plasmamembranen benachbarter Zellen dar, ohne dass ein extrazellulärer Spalt zu erkennen ist (TSUKITA *et al.*, 2001). Die gegenüberliegenden Membranen scheinen sich fast zu berühren, deshalb ist die Bezeichnung dieser Region als „kissing points“ oder „sites of fusion“ treffend. Die molekulare Zusammensetzung des TJ-Komplexes ist sehr heterogen und bis heute nicht vollständig geklärt. Neben dem „Protein-Modell“ existiert zusätzlich das „Lipid-Modell“ von KACHAR und REESE. Dabei werden TJs als zylindrisch aufgereichte Lipidomänen beschrieben, die aus der Fusion der beiden exoplasmatischen Membranhälften gegenüberliegenden Zellen entstehen (KACHAR und REESE, 1982). Die Hypothese des „Protein-Modells“ wird aber durch die Entdeckung einer Reihe verschiedener Proteinkomponenten unterstützt. Innerhalb der TJs wird zwischen Transmembran- und Plaqueproteinen unterschieden, die je nach Zelltyp, dem Differenzierungsgrad der Zellen und äußeren Einflüssen in ihrer Zusammensetzung variieren können (SCHNEEBERGER *et al.*, 2004, MATTER *et al.*, 2005, AIJAZ *et al.*, 2006). Die Möglichkeit eines kombinierten „Lipid-Protein-Modells“ ist nicht vollkommen auszuschließen (WEGENER und GALLA, 1996).

1.1.1. Transmembranproteine

Die Transmembranproteine der TJs sind Eiweißmoleküle, die beide Blätter der Phospholipiddoppelschicht einer Membran durchqueren. Dazu zählen Occludin und Mitglieder der Claudin- und JAM-Familie (FURUSE *et al.*, 1998 a, b; TSUKITA *et al.*, 2001) (Abb. 3).

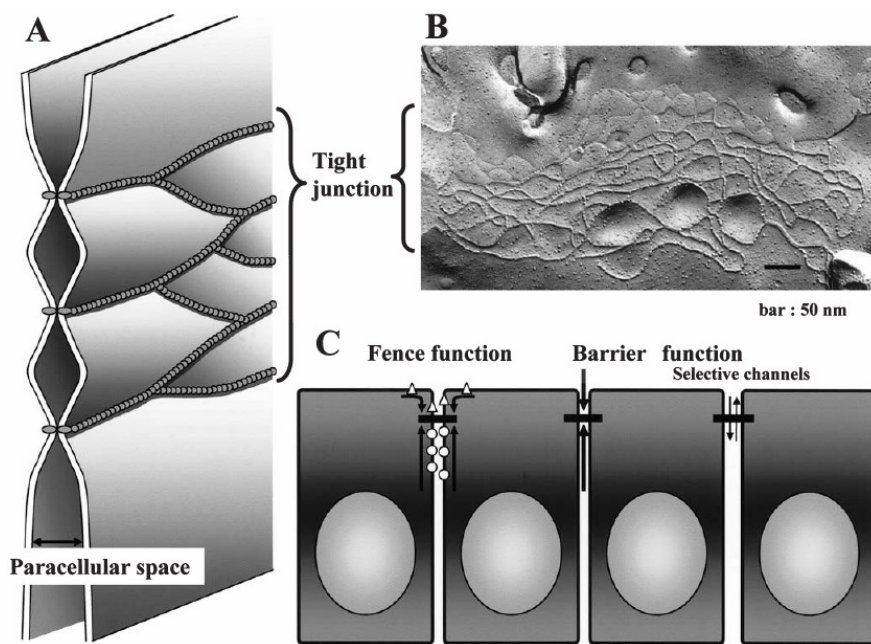


Abbildung 1: Morphologie und Funktion der Tight Junctions
(A) Schematische Darstellung der Abdichtung des parazellulären Raumes durch ein Netzwerk von TJ-Strängen. (B) TJ-Stränge in der Gefrierbruchelektronenmikroskopie. (C) Darstellung der Zaun-Funktion („fence function“) und der Barriere-Funktion („barrier function“) der TJs (SAWADA *et al.*, 2003).

1.1.1.1. Mitglieder der Claudin-Familie

Claudine sind Schlüsselkomponenten der TJs (FURUSE und TSUKITA, 2006). Studien belegen, dass das Vorhandensein von Claudinen eine wichtige Voraussetzung für die Bildung von funktionsfähigen TJs ist (FURUSE *et al.*, 1998 b, 2002). Die Expression einzelner Claudine in TJ-defizienten Fibroblasten (Maus) führt zu einem gut ausgebildeten Netzwerk von TJ-Strängen zwischen benachbarten Plasmamembranen (FURUSE *et al.*, 1998 b). Durch ihre homo- und heterophile Interaktion bilden sie das strukturelle und funktionelle Rückgrat der TJs (FURUSE *et al.*, 1998 b, 2002). Bis heute sind aufgrund der Sequenzhomologien 24 Mitglieder der Claudin-Familie identifiziert, deren Molekulargewicht von 22-27 kDa reicht (MORITA

et al., 1999a; TSUKITA und FURUSE, 1999b). Claudine bestehen aus vier Transmembranregionen und zwei unterschiedlich großen extrazellulären Schleifen (Abb. 2). Die Aminosäuren der ersten extrazellulären Schleife können in ihrer Position und Ladung innerhalb der Claudin-Familie variieren. Diese Schleifen sind in der Lage wässrige Poren bzw. Kanäle auszubilden, die die parazelluläre Diffusion von Ionen ermöglichen (TSUKITA *et al.*, 2000; FURUSE *et al.*, 2006). So besitzt Claudin 7 drei negativ geladene Aminosäuren innerhalb der ersten extrazellulären Schleife und kann Poren für Kationen ausbilden (ALEXANDRE *et al.*, 2005). Alle humanen Claudine besitzen eine PDZ-Bindungsstelle am COOH-Terminus, die für die Rekrutierung von zytoplasmatischen Plaqueproteinen („Gerüstproteine“) mit PDZ-Domänen (z.B. ZO-1, ZO-2, MUPP-1) an TJs von Bedeutung ist (ITHO *et al.*, 1999; HAMAZAKI *et al.*, 2002).

Claudine werden dynamisch reguliert, um die Permeabilitätsbarriere den Bedürfnissen des Gewebes anzupassen. Sie zeigen in den verschiedenen Zelltypen und Geweben ein heterogenes Expressionsmuster (FURUSE *et al.*, 1998 a; MORITA *et al.*, 1999a). Die Kombination der einzelnen Claudine bestimmt die Eigenschaften der Größen- und Ionenselektivität des Gewebes bzw. die Dichtigkeit der TJs (INAI *et al.*, 1999; COLEGIO *et al.*, 2003; VAN ITALLIE und ANDRESON 2004). Es gibt Claudine, die in fast allen Geweben vorkommen (z.B. Claudin 1) oder solche, die eine spezifische Gewebslokalisierung besitzen (FURUSE *et al.*, 1998 b). So wird Claudin 16 ausschließlich im aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife der Niere gefunden. Claudin 1 wird in einem hohen Maße von Epithelien mit undurchlässigen TJs exprimiert (z.B. Dickdarm und Epidermis). In der Haut ist Claudin 1 essentiell für die Aufrechterhaltung der epidermalen Barriere. Claudin 1 Knock-out Mäuse versterben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt aufgrund eines massiven Wasserverlustes über die Haut (FURUSE *et al.*, 2002). Claudin 2 wird vor allem im Gewebe mit durchlässigen TJs exprimiert (Dünndarm und proximaler Nierentubulus).

1.1.1.2. Das Tight Junction-Protein Occludin

Occludin war das erste Transmembranprotein, das als TJ-Bestandteil in Epithelzellen identifiziert wurde (FURUSE *et al.*, 1993; ANDO-AKATSUKA *et al.*, 1996). Das Molekulargewicht von Occludin beträgt ca. 65 kDa. Es existieren zwei Isoformen von

Occludin, über deren Verteilung und Funktion in den einzelnen Geweben bis jetzt keine klaren Aussagen zu treffen sind (MURESAN *et al.*, 2000). Die Lokalisation von Occludin wird über die Phosphorylierung geregelt (SAKAKIBARA *et al.*, 1997). Dabei scheint phosphoryliertes Occludin bevorzugt an TJs und nicht phosphoryliertes Occludin an der basolateralen Membran sowie in zytoplasmatischen Vesikeln vorhanden zu sein (SAKAGUCHI *et al.*, 2002). Das Protein besteht aus vier Transmembrandomänen und zwei annähernd gleich große extrazellulären Schleifen, die durch eine kurze zytoplasmatisch gelegene Schleife voneinander getrennt sind. Zusätzlich gibt es jeweils eine amino- und carboxylterminale Domäne, die ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert sind (FURUSE *et al.*, 1993) (Abb. 2 und 3). Letztere kann direkt an ZO-1 (Zonula Occludens-1), ZO-2 und ZO-3 binden (FURUSE *et al.*, 1994; HASKINS *et al.*, 1998; ITHO *et al.*, 1999). Trotz des prinzipiell gleichen Aufbaus bestehen keine Sequenzhomologien zwischen Occludin und den Claudinen. In vitro Studien zeigen, dass Occludin direkt mit F-Aktin interagieren kann (WITTCHEN *et al.*, 1999). Die Anlagerung des Aktinzytoskeletts an Occludin-positive Zell-Zell-Verbindungen kann darüberhinaus ZO-1 vermittelt werden, welches direkt mit den Aktinfilamenten und Occludin interagiert (FANNING *et al.*, 1998). Occludin ist somit ein wichtiger Bestandteil der TJs. Seine Überexpression führt in Epithelzellen zu einem Anstieg des transepithelialen Widerstands (TER) (BALDA *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 1996). Dennoch konnte experimentell nachgewiesen werden, dass TJ-Stänge auch in Abwesenheit von Occludin ausgebildet werden können, so dass das Protein keine Hauptkomponente der TJs darstellt (HIRASE *et al.*, 1997; MOROI *et al.*, 1998). Bei embryonalen Occludin-defizienten Stammzellen kommt es weder zum Verlust noch zu Bildungsstörungen der TJs (SAITOU *et al.*, 1998). In der Analyse von Gefrierschnitten zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl und Morphologie der TJ-Stränge zwischen Wildtypzellen und Knock-out Zellen. Studien an Occludin-defizienten Mäusen ergaben ebenfalls keine Veränderung der TJ-Morphologie und Barrierefunktion (SAITOU *et al.*, 2000). Jedoch bleibt der Verlust von Occludin nach der Geburt der Mäuse nicht völlig ohne Konsequenzen. So zeigen diese Mäuse eine postpartale Wachstumsverzögerung und Veränderungen in unterschiedlichen Geweben (z.B. Entzündung und Hyperplasie der Magenmukosa, Kalzifizierung des Zentralnervensystems und eine testikuläre Atrophie) (SAITOU *et al.*, 2000). Occludin ist somit eher eine regulatorische als eine strukturelle Komponente der TJs (SAITOU *et al.*, 1998). Das Protein ist in eine Reihe von Signaltransduktionvorgängen

involviert, hat Einfluss auf das Zellwachstum und ist an der Zelldifferenzierung beteiligt (SCHULZKE *et al.*, 2005; PARIS *et al.*, 2007).

1.1.1.3. Junctional adhesion molecules (JAMs)

Die einzelnen Mitglieder der JAM-Proteine (Junctional adhesion molecule) zählen zur Immunglobulin(Ig)-Superfamilie. Es handelt sich um integrale Membranproteine, die eine Transmembrandomäne, zwei variable extrazelluläre immunglobulinähnliche Domänen und ein kurzes carboxyterminales, zytoplasmatisches Ende aufweisen (Abb. 2). Die Familie der JAM-Proteine kann aufgrund ihrer Sequenzhomologien in zwei Untergruppen gegliedert werden. Zu der ersten Untergruppe werden JAM-A (=JAM-1; MARTIN-PADURA *et al.*, 1998), JAM-B (= JAM-2; PALMERI *et al.*, 2000) und JAM-C (= JAM-3; AURRAND-LIONS *et al.*, 2001) gezählt. Diese Proteine weisen ein PDZ-Bindemotiv der Klasse II auf, das am C-terminalen Ende lokalisiert ist und direkt mit ZO-1 (BAZZONI *et al.*, 2000), MUPP-1 (HAMAZAKI *et al.*, 2002) und PAR-3 (Partitioning defective protein-3) (ITHO *et al.*, 2001) interagieren kann. Im Gegensatz dazu besitzen die Mitglieder der zweiten Untergruppe, wie JAM-D (= JAM-4; HIRABAYASHI *et al.*, 2003), CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor) (COHEN *et al.*, 2001) und ESAM (Endothelial cell-selective adhesions molecule) (HIRATA *et al.*, 2001) ein PDZ-Bindemotiv der Klasse I am C-Terminus. Es wird angenommen, dass die einzelnen Mitglieder der JAM-Familie an der Rekrutierung von Leukozyten in das Entzündungsgebiet beteiligt sind, bei der Angiogenese und an der Bildung von Atheromen eine Rolle spielen (WEBER *et al.*, 2007).

Das Protein JAM-A hat eine Molekularmasse von 36-41 kDa. Es ist auf Epithel- und Endothelzellen verschiedener Gewebe lokalisiert (MARTIN-PADURA *et al.*, 1998; BAZZONI *et al.*, 2003). Zusätzlich kann es auf der Zelloberfläche von unterschiedlichen Zelltypen, wie Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen und antigenpräsentierenden Zellen (z.B. Makrophagen) gefunden werden (WEBER *et al.*, 2007). Eine ektopische Expression von JAM-A in Fibroblasten führt nicht zur Ausbildung von TJ-Strängen (ITHO *et al.*, 2001). Jedoch scheint die Interaktion mit membranassoziierten Proteinen und Integralmembranproteinen eine wichtige Voraussetzung für die regelrechte Organisation von TJs zu sein (Adhäsivität der Zellen) (THOMAS *et al.*, 2004). JAM-A kann homophile interzelluläre Verbindungen

mit benachbarten Zellen eingehen und ist neben der TJ-Integrität an der TJ-Permeabilität beteiligt (NAIK *et al.*, 2003).

JAMs fungieren nicht nur zwischen gleichartigen Zellen als Zelladhäsionsmolekül, sondern können auch zwischen unterschiedlichen Zelltypen Bindungen hervorrufen. So ist JAM-A bei der Transmigration von Monozyten durch das Gewebe involviert (MARTIN-PADURA *et al.*, 1998). JAM-A ist außerdem an der Entstehung der Membranpolarität beteiligt, indem es mit ASIP/PAR-3 interagieren kann. Dieser Komplex ist wiederum in der Lage aPKC (aktivierte Proteinkinase C) an TJs zu rekrutieren (ITHO *et al.*, 2001). In vitro Studien an Endothelzellen konnten den Einfluß von Zytokinen, wie TNF- α und INF- γ , auf die Verteilung von JAM-A zeigen. Dabei erfolgte eine Umverteilung von JAM-A von den Zell-Zell-Kontaktstellen auf die apikale Zelloberfläche, wo es die Adhäsion von Leukozyten unterstützen kann (OZAKI *et al.*, 1999). Die Proteine JAM-B und JAM-C werden auf der Oberfläche von Endothelzellen und lymphatischen Zellen gefunden. Zusätzlich wird JAM-C von Monozyten, NK-Zellen, Dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und von einigen Subtypen der T-Lymphozyten exprimiert. JAM-C wird sowohl in TJs als auch in Desmosomen gefunden (EBNET *et al.*, 2004; WEBER *et al.*, 2007).

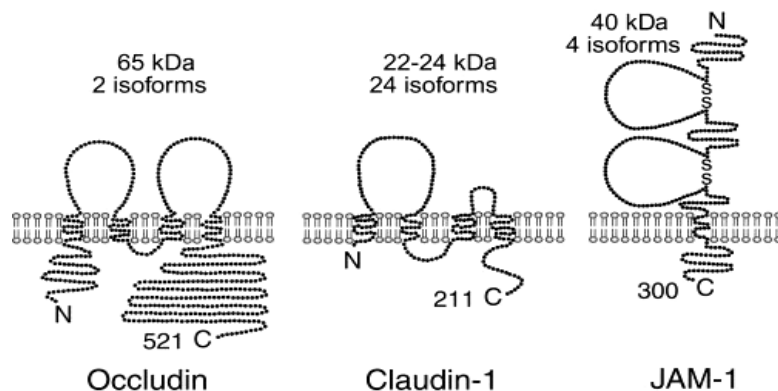


Abbildung 2: Integrale Membranproteine der Tight Junctions
Die TJ-Proteine Occludin und Claudin 1 weisen je vier Transmembrandomänen auf. Das TJ-Protein JAM-1 besitzt nur eine Transmembrandomäne (SCHNEEBERGER 2004).

1.1.2. ZO-1, ein Plaqueprotein der Tight Junctions

Die Plaqueproteine (=„Gerüstproteine“) spielen eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von spezifischen zytoplasmatischen Proteinen an TJs. Sie sind am Aufbau und der Aufrechterhaltung der TJs beteiligt, in eine Reihe von intrazellulären

Signalkaskaden und in den Vesikeltransport involviert. Zusätzlich verbinden sie die Transmembranproteine mit dem Aktinzytoskelett.

Das Zonula Occludens-1 Protein (=ZO-1) war das erste Plaqueprotein, das in einfachen Epithelien in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran an TJs lokalisiert werden konnte (STEVENSON *et al.*, 1986). Das Protein ist kein spezifischer TJ-Marker, denn es kommt auch in Zellen vor, die keine TJs ausbilden können (z.B. Fibroblasten und kardialen Myozyten). In diesen Zellen ist das Protein ZO-1 Hauptbestandteil der Adhärenzverbindungen (ITHO *et al.*, 1993). Das Protein ZO-1 ist ein intrazelluläres, membranständiges und phosphoryliertes Protein. Es ist ein Mitglied der MAGUK-Familie (Membran assoziierte Guanylatkinase), die sich durch bestimmte homologe Proteinbindungsdomänen ausweisen. Das Protein ZO-1 besitzt drei PDZ-Domänen, eine SH3- (Src-Homology 3) und eine GUK-Domäne (Guanylat Kinase-like) an seinem aminoterminalen Ende und eine prolinreiche Domäne am carboxyterminalen Ende. Seine molekulare Masse beträgt speziesspezifisch 210-225 kDa. Weitere Mitglieder der MAGUK-Familie sind das Protein ZO-2 (GUMBINER *et al.*, 1991) und ZO-3 (BALDA *et al.*, 1993). ZO-1 scheint ein wichtiger Faktor für eine regelrechte Organisation von Proteinen innerhalb der TJ-Plaques zu sein (ANDERSON *et al.*, 1995; STEVENSON *et al.*, 1998; TSUKITA *et al.*, 1999b), denn das Protein bindet über die PDZ-I-Domänen an das C-terminale Ende von Claudinen (ITHO *et al.*, 1999). Über die PDZ-II-Domäne interagiert es mit den Proteinen ZO-2, ZO-3 und mit dem Gap Junction-Protein Connexin43. Zusätzlich kann ZO-1 über sein COOH-Ende direkt mit dem Aktinzytoskelett assoziieren. Damit agiert ZO-1 als Verbindungsprotein zwischen Aktinfilamenten und dem Cadherin-Catenin-Komplex (Adherens Junctions) (ITHO *et al.*, 1997) bzw. Occludin (Tight Junctions) (FANNING *et al.*, 1998). Durch die Interaktionen mit verschiedenen TJ-assoziierten Proteinen ist ZO-1 ein wichtiges Gerüstprotein in der Zelle.

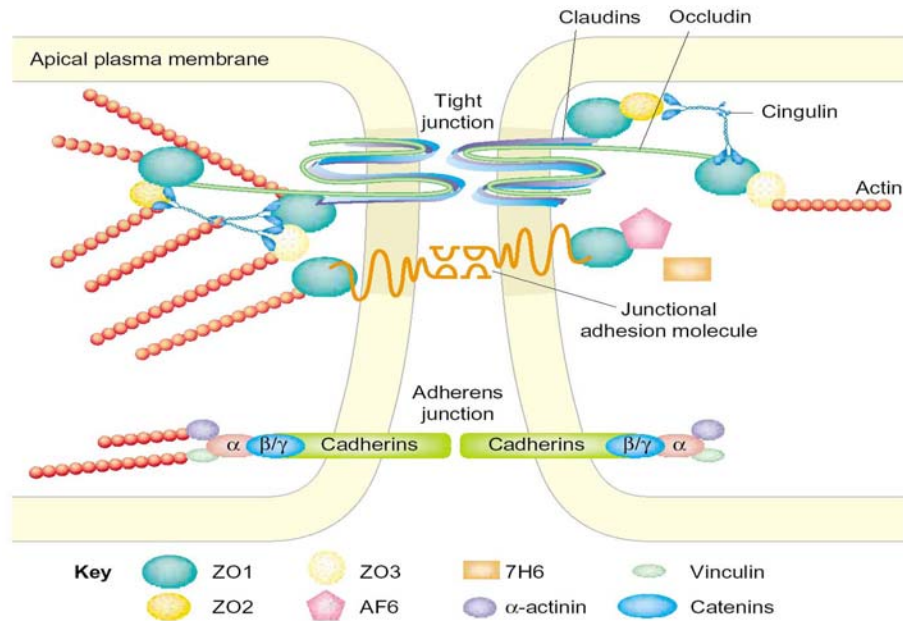


Abbildung 3: Proteine der Tight Junctions und Adherens Junctions
 Transmembranproteine (Occludin, Claudine, JAM) und intrazelluläre Proteine (ZO-1, ZO-2, ZO-3, Cingulin) der Tight Junctions sowie Cadherine und Catenine der Adherens Junctions (HUBER et al., 2001).

1.1.3. Funktionen der Tight Junctions

In Endothelien und einfachen Epithelien werden den TJs zwei wichtige Funktionen zugeschrieben. Einerseits bilden sie eine semipermeable Barriere aus, die den Fluss von Lösungen, Ionen oder potentiell toxischen Stoffen durch den parazellulären Raum kontrolliert („Barriere-Funktion“) (DRAGSTEN *et al.*, 1981; VAN MEER und SIMON, 1986), andererseits sind sie für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität zwischen apikaler und basolateraler Zellmembran verantwortlich („Zaun-Funktion“) (TSUKITA *et al.*, 1999) (Abb. 4). Die Dichtigkeit der TJ-Stränge, die durch den transepithelialen bzw. transendotelialen elektrischen Widerstand (TER) gemessen werden kann, variiert gewebsspezifisch und ist u. a. von dem Typ und dem Expressionslevel verschiedener Claudine abhängig (SCHNEEBERGER und LYNCH, 1992; INAI *et al.*, 1999, COLEGIO *et al.*, 2003). Untersuchungen an MDKC I bzw. II Zellen (Mandrin Darby Kindney Cell-line I and II) ergaben, dass der TER nicht von der Anzahl der TJ-Stränge, sondern vielmehr von deren qualitativer Zusammensetzung bestimmt wird (STEVENSON und KEON, 1998). Innerhalb der paarig in den Parazellularraum reichenden Fibrillen gibt es wässrige Poren oder Kanäle, die die Ionenselektivität von TJs erklären könnte. Die Durchlässigkeit der

wässrigen Poren wird durch die Kombination der Claudine innerhalb der TJ-Stränge bestimmt (TSUKITA und FURUSE, 2000).

TJs bzw. TJ-assoziierte Proteine sind darüber hinaus in eine Vielzahl von physiologischen Prozessen eingebunden. So sind sie an der Epitheldifferenzierung und Epithelproliferation, an Signalkaskaden der Zelle und am Vesikeltransport beteiligt. Zusätzlich können sie die Migration von Entzündungszellen in einfachen Epithelien regulieren (MALMINEN *et al.*, 2003). All diese Funktionen sind wichtige Voraussetzungen, um unterschiedliche Kompartimente im Gewebe bzw. im Organismus ausbilden zu können (SAWADA *et al.*, 2003). Jedoch limitiert das Vorhandensein von TJ-Strängen die Ausbreitung und damit die Wirksamkeit von therapeutisch eingesetzten Stoffen (z.B. parazelluläre Barriere der Blut-Hirn-Schranke). Viele endogene Substanzen, wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, die unter physiologischen und/oder pathologischen Bedingungen ausgeschüttet werden, regulieren die Dichtigkeit von TJs. Verschiedene Autoren berichteten von einer deutlichen Veränderung der TJ-Permeabilität nach Applikation von Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , Interferon γ), von vasoaktiven Substanzen wie Histamin (ABBOTT, 2000) sowie von Wachstumsfaktoren (VEGF und FGF-2) (WANG *et al.*, 2001). Dabei wurden sowohl ein Anstieg als auch ein Abfall der TJ-Permeabilität in Abhängigkeit vom Zelltyp beobachtet.

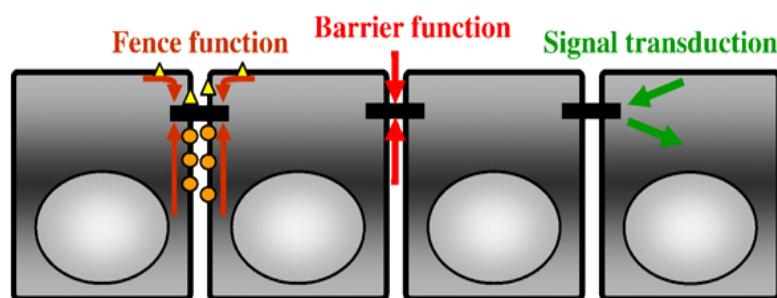


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Tight Junction-Funktionen (CHIBA *et al.*, 2007).

1.1.4. Veränderungen von Tight Junction-assoziierten Proteinen bei verschiedenen Erkrankungen und ihre Interaktionen mit Entzündungszellen

Die dynamische Regulation der TJs ist von großer Bedeutung für viele physiologische Prozesse in der Zelle. Die Zerstörung der TJ-Funktion führt zu einer drastischen Änderung der parazellulären Permeabilität und ist ein Merkmal vieler pathologischer Zustände, wie z.B. entzündliche Darmerkrankungen, Lungenödem

und Diarrhö. Entzündungen und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen sind mit verschiedenen Erkrankungen vergesellschaftet, die eine Störung der Barrierefunktion aufweisen. So wird im Kolonepithel der Colitis ulcerosa und in der entzündlichen Mukosa bei Morbus Crohn eine deutliche Herabregulation von Claudin 1 innerhalb der TJ-Stränge nahe der einwandernden Entzündungszellen beobachtet (KUCHARZIK *et al.*, 2001).

Durch die Lokalisation der TJs an der apikalen Seite der Plasmamembran von Endothel- und Epithelzellen sind sie einer Reihe von pathologischen Einflüssen ausgesetzt. So sind TJs oft Angriffspunkt für Bakterien, Viren oder Allergene (SAWADA *et al.*, 2003). Durch funktionelle Veränderung TJ-assoziiierter Proteine, durch Umbau am Aktinzyoskelett oder aber über noch unbekannte Mechanismen, können diese Agenzien die Barrierefunktion der TJs beeinflussen. In Keratinozytenkulturen und Hautproben, die mit *Staphylococcus aureus* infiziert wurden, konnte eine zunehmende Herabregulation von TJ-Proteinen und ein Verlust der TJ-Funktion demonstriert werden (OHNEMUS *et al.*, 2007). Weiterhin wurde Claudin 1 als Co-Rezeptor für das Hepatitis C Virus identifiziert. Somit könnte Claudin 1 anteilig für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle verantwortlich gemacht werden (EVANS *et al.*, 2007).

Das Wissen über Interaktionen von TJs mit dem Immunsystem und dessen Zellen ist gegenwärtig noch lückenhaft. Es ist bekannt, dass Neutrophile durch chemotaktische Stimulation über den normalerweise verschlossenen parazellulären Raum rasch durch Endothelien migrieren können. Dabei kommt es zu einer vorübergehenden Öffnung der Zellverbindungen, ohne eine morphologische Unterbrechung hervorzurufen (NUSRAT *et al.*, 1997). Bei der transendothelialen Diapedese mononukleärer Zellen scheinen Mitglieder der JAM-Familie und Occludin eine wichtige Rolle zu spielen, um minimale Effekte innerhalb des Gewebes und auf TJs auszuüben. So wird Occludin z.B. von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert. (ALEXANDER *et al.*, 1998). Des Weiteren ist Occludin an der transepithelialen Migration von Neutrophilen beteiligt (HUBER *et al.*, 2000). Einzelne Mitglieder der JAM-Familie sind Liganden für das Oberflächenmolekül LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1) und vermitteln darüber die transendotheliale Diapedese von T-Lymphozyten und Neutrophilen (OSTERMANN *et al.*, 2002). Bei chronisch aktiven, entzündlichen Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, konnten KUCHARZIK und Mitarbeiter eine globale Herabregulation von Occludin während der

transepithelialen Migration von Neutrophilen zwischen den Kolonzellen nachweisen. Im Gegensatz dazu, zeigte sich lediglich eine vorübergehende Reduktion der Expression von Claudin 1, JAM, ZO-1, E-Cadherin und β -Catenin in unmittelbarer Nachbarschaft der einwandernden Entzündungszellen. Die globale Herabregulation von Occludin könnte für die gesteigerte parazelluläre Permeabilität verantwortlich sein. Die Migration von Neutrophilen durch den parazellulären Raum scheint bei einigen Zellverbindungsproteinen eine vorübergehende und reversible Störung des TJ-Komplexes zu induzieren (KUCCHARZIK *et al.*, 2001). Dendritische Zellen können im Gastrointestinaltrakt TJs öffnen, indem sie ihre Fortsätze durch den parazellulären Raum der Kolonzellen aussenden, um mit Bakterien in Kontakt zutreten. Da sie Occludin, Claudin 1 und ZO-1 exprimieren können, wird jedoch die Integrität der epithelialen Barriere geschützt (RESCIGNO *et al.*, 2001).

1.2. Adhärenzverbindungen

Adhärenzverbindungen (=Adherens Junctions (AJs)) oder *Zonulae Adherentes* bilden um benachbarte Epithel- und Endothelzellen einen Adhäsionsgürtel aus, der an der apikalen Zellgrenze unmittelbar unter den TJs lokalisiert ist (Abb. 3). AJs vermitteln eine Ca^{2+} -abhängige Verbindung von Epithel- oder Endothelzellen, durch homophile Interaktion zwischen Mitgliedern der Cadherin-Familie benachbarter Zellen. Die Bildung der AJs geht dem Aufbau von TJs und Desmosomen voraus. Es wird angenommen, dass die initial vermittelte Zell-Zell-Verbindung von E-Cadherin eine Schlüsselkomponente in der Weiterentwicklung anderer Zellverbindung und der Zellpolarität spielt (TUNGGAL *et al.*, 2005).

Die Transmembranproteine der AJs sind die klassischen Cadherine, d.h. E-Cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin, R-Cadherin und B-Cadherin (GUMBINER *et al.*, 1996). Sie sind kalziumsensitive Komponenten. Sie besitzen eine Transmembrandomäne, fünf extrazelluläre Domänen und ein zytoplasmatisches Ende (GRUNWALD *et al.*, 1993). Der C-Terminus jeder extrazellulären Domäne enthält Ca^{2+} -Bindungsstellen, die stabilisierend wirken und die Strukturen der Zell-Zell-Adhäsion indirekt beeinflussen. Durch Interaktionen mit einer Vielzahl von Proteinen sind Cadherine an eine Reihe von biologischen Prozessen, wie Zelladhäsion, Zellwachstum, Kontrolle der Zellpolarität, Organisation des Zytoskeletts und Zellmigration beteiligt (CHRISTOFORI und SEMB, 1999).

β -Catenin ist ein multifunktionelles und zytoplasmatisches Protein, das eine molekulare Masse von 95 kDa aufweist. Das Protein ist bei der Kontrolle der Zelladhäsion, der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und Genexpression beteiligt. Die Verbindung von E-Cadherin mit dem Aktinzytoskelett wird durch α -Catenin vermittelt, das wiederum über β -Catenin mit E-Cadherin verbunden ist. Das Catenin p120 kann ebenfalls direkt an Cadherine binden und damit die Stabilität des Cadherin-Komplexes an der Zelloberfläche regulieren (ROCZNIAK-FERGUSON und REYNOLDA, 2003). Viele andere Gerüst-, Signal- und Zytoskelettproteine können mit AJs assoziiert sein. So kann das Protein ZO-1 direkt an α -Catenin binden, was ein wichtiger Schritt in der Bildung der TJs zu sein scheint (ITHO *et al.*, 1997).

1.3. Desmosomen

Desmosomen oder *Maculae adherentes* sind Verankerungspunkte für Intermediärfilamente, die im Zytoplasma ein Strukturgerüst ausbilden und mechanischem Stress Widerstand leisten können. Über die Desmosomen sind die Intermediärfilamente benachbarter Zellen direkt miteinander verbunden und bilden im gesamten Gewebe ein durchgehendes Geflecht aus. Desmosomen sind damit eine wichtige Voraussetzung für die Integrität des Gewebes. Sie sind dynamische Strukturen, deren Funktionen über reine adhäsive Interaktionen hinausgehen (CHIDGEY *et al.*, 2002). Zu den desmosomalen Proteinen können drei Proteinfamilien gezählt werden; die desmosomalen Cadherine, die Familie der Armadilloproteine und die Plaktinfamilie (GETSIOS *et al.*, 2004). Desmogleine (Dsgs) und Desmocolline (Dscs) gehören zu den desmosomalen Cadherinen. Es sind Transmembranproteine, von denen es mehrere Isoformen gibt (Dscs 1-3 und Dsgs 1-4) (CHENG und KOCH, 2004). Desmosomale Cadherine können Antigene bei Autoimmunerkrankungen sein. Die Symptome dieser Erkrankungen machen die Bedeutung der Proteine bei der Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen und der Aufrechterhaltung epithelialer Integrität deutlich. So verursachen Autoantikörper gegen Dsg 3 den Pemphigus vulgaris (AMAGAI *et al.*, 2000).

1.4. Verteilung von Tight Junction-, Adherens Junction- und desmosomalen Proteinen in der Haut

Die Haut erstreckt sich beim Erwachsenen über eine Fläche von 1,2 -2,3 m². Sie grenzt den Organismus zur Außenwelt ab und bildet damit eine Barriere gegen physikalische, chemische oder pathogene Einflüsse aus der Umwelt. Wird diese Barriere von fremden Substanzen oder Organismen durchbrochen, so tritt unter physiologischen Voraussetzungen das Immunsystem in Aktion, um das eindringende Agens zu prüfen und gegebenenfalls eine Immunreaktion auszulösen. Zusätzlich bildet die Haut eine (semipermeable) Barriere, um den Körper vor einem übermäßigen Wasserverlust aus der Dermis zu schützen.

TJ-assoziierte Proteine werden in verschiedenen Schichten der Epidermis gefunden. Die Zusammensetzung ist sehr heterogen. In der Immunfluoreszenzmikroskopie konnten Claudin 1, Claudin 4, Claudin 5 und Claudin 7, das Protein ZO-1, Occludin, JAM-A, Cingulin, MUPP-1 und Symplekin in der menschlichen Haut dargestellt werden. Weitere TJ-Moleküle, wie Claudin 8 und Claudin 17 konnten in Keratinozyten auf RNA Ebene identifiziert werden (BRANDNER *et al.*, 2006). Claudin 1 ist die Hauptkomponente der TJs in der Epidermis. Dem Protein wird ein großer Anteil an der Ausbildung der Barriere zugeschrieben (FURUSE *et al.*, 2002). Claudin 1 ist jedoch kein spezifischer Marker für TJs, da es an den Zell-Zell-Grenzen aller lebenden Schichten der Epidermis exprimiert wird, während typische TJ-Strukturen nur im *Stratum granulosum* vorhanden sind. Die TJ-Proteine MUPP-1, Claudin 7 und JAM-A werden ebenfalls in allen lebenden Schichten der Epidermis gefunden. Occludin und Cingulin sind auf die Zell-Zell-Grenzen des 2-3-schichtigen *Stratum granulosums* in der gesunden Epidermis beschränkt (BRANDNER *et al.*, 2006). Die Proteine ZO-1, Claudin 4 und Symplekin werden in mehreren suprabasalen Schichten exprimiert (FURUSE *et al.*, 2001; PUMMI *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2002; LANGBEIN *et al.*, 2002a). Die Lokalisation von Claudin 5 (MORITA *et al.*, 2003) und JAM-B galten auf das Endothel der Dermis beschränkt. Im Gegensatz dazu beschrieben PELTONEN und Mitarbeiter Claudin 5 als mögliche Komponente von epithelialen TJs, begründet in einer schwachen Immunreaktion im *Stratum granulosum* (PELTONEN *et al.*, 2007). Eine Kolokalisation aller epidermalen TJ-Proteine findet sich im *Stratum granulosum*. Die Hypothese, dass TJs einen direkten Anteil am Aufbau der (murinen) Hautbarriere haben, konnte durch Studien an Claudin 1 Knock-out Mäusen gefestigt werden. Die Mäuse versterben am ersten

Tag nach der Geburt durch einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust bei einer unzureichend ausgebildeten Hautbarriere (FURUSE *et al.*, 2002). Auch die Überexpression von Claudin 6 führt bei Mäusen zu einer veränderten Barrierefunktion. Durch den gesteigerten transepidermalen Wasserverlust versterben diese Mäuse ebenfalls innerhalb weniger Tage (TURKSEN und TROY, 2002).

Zwei klassische Cadherine werden in der Epidermis exprimiert. Neben P-Cadherin, das in der Basalschicht lokalisiert ist, wird E-Cadherin in allen lebenden Schichten der Epidermis gefunden (JENSEN *et al.*, 1997). Der Verlust von E-Cadherin in der Epidermis von Mäusen führt zur Fehllokalisierung wichtiger TJ-Proteine (z.B. Verlust von Claudin 1 im *Stratum granulosum*), weniger dicht abschließenden TJs und damit zu einem veränderten epidermalen Widerstand. Die Unfähigkeit eine funktionelle epidermale Barriere aufrechtzuerhalten mündet in dem frühzeitigen Tod der Mäuse. Die beiden Proteine Rac und aPKC, wichtige Komponenten für die Ausbildung der TJs, sind ebenfalls fehllokalisiert (TUNGGAL *et al.*, 2005). Auch das zytoplasmatische Protein β -Catenin wird in allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert, wobei es besonders intensiv im *Stratum basale* vertreten ist (FUKUMARU *et al.*, 2007).

Desmosomen werden ebenfalls in allen Schichten der Epidermis gefunden, aber die Zahl und Zusammensetzung der Proteine variiert in den einzelnen Zelllagen (GETSIOS *et al.*, 2004). Dsc 1 wird eher in den suprabasalen Schichten und im *Stratum granulosum* gefunden, jedoch nicht im *Stratum corneum*. Im Gegensatz dazu ist Dsg 1 in suprabasalen Schichten und zusätzlich im *Stratum corneum* vorhanden. Dsg 3 und Dsc 3 werden in allen Schichten der Epidermis gefunden, bevorzugt aber in den unteren Schichten. Dsc 2 und Dsg 2 werden lediglich basal exprimiert.

1.5. Psoriasis

1.5.1. Definition

Die Psoriasis ist eine genetisch verankerte, akut exanthemisch oder chronisch stationär verlaufende entzündliche Erkrankung der Haut. Das Krankheitsbild ist durch stark schuppene, entzündliche Plaques gekennzeichnet, die weite Bereiche der Haut überdecken können und meist mit einem erheblichen persönlichen Leidensdruck einhergehen. Die Psoriasis kann in ihrer erythrodermatischen,

pustolösen oder arthropatischen Erscheinungsform auch von extrakutanen Symptomen begleitet sein.

1.5.2. Epidemiologie

Die Psoriasis tritt weltweit mit einer Häufigkeit von 0,1 bis 3% in der gesamten Bevölkerung auf. Sie ist eine Erkrankung, die ausschließlich beim Menschen vorkommt und unter der weißen Bevölkerung Nordeuropas und Skandinaviens häufiger vertreten ist. Allein in Deutschland leiden 1,5 Millionen Menschen unter der Psoriasis vulgaris. Die Psoriasis ist mit bestimmten HLA-Typen assoziiert. So erkranken z.B. etwa 10% der HLA-(Human Leukocyte Antigen)-Cw6-positiven Individuen an Psoriasis. Über den Vererbungsmodus besteht keine Einigkeit.

1.5.3. Pathogenese

Das Verständnis über die Pathogenese der Psoriasis und die Richtung der pathogenetischen Forschung ist stark von therapeutischen Ansätzen geprägt worden (PRINZ, 2003). Die Psoriasis galt schon lange als eine Dermatose, deren scheinbar simples Erscheinungsbild auf eine Vielfalt von Pathomechanismen zurückzuführen ist. Ursprünglich ging man davon aus, dass es sich um eine genetisch verankerte Regulationsstörung der Keratinozytenproliferation handelt, da das Krankheitsbild eher von epidermalen Symptomen, als von dem Entzündungsprozess selbst geprägt ist. Unterstützt wurde diese These nicht zuletzt durch die Untersuchungen von ROTHBERG, der 1961 durch die Messung der Transitzeit von intravenös verabreichten Glycin-C¹⁴ zum erstmals den erhöhten epidermalen Umsatz in Psoriasisläsionen beschrieb (ROTHBERG *et al.*, 1961). Erst die zufällige Beobachtung der antipsoriatischen Wirksamkeit von Cyclosporin A bei Transplantatpatienten, gab Hinweise auf die Bedeutung immunologischer Mechanismen bei der Pathogenese der Psoriasis (MUELLER *et al.*, 1976, VAN JOOST *et al.*, 1988). Ein komplett pathogenetisches Konzept der Psoriasis ist bis heute noch nicht formuliert.

Bei der Manifestation der Psoriasis spielen neben der genetischen Prädisposition vor allem immunologische Mechanismen sowie exogene und endogene Triggerfaktoren eine entscheidende Rolle (PRINZ, 2004). Es kommt zur Aktivierung von speziellen, dendritischen Zellen, die in der Dermis und Epidermis lokalisiert sind und die über

eine Produktion von TNF- α und IL-23 die Entwicklung von T-Zell-Untergruppen (Th1 und Th17) fördern. Von diesen T-Zellen wiederum werden weitere Mediatoren/Zytokine ausgeschüttet, die für die epidermalen und vaskulären Veränderungen in der Psoriasis verantwortlich sind. So beeinflussen die Zytokine die Proliferation der Keratinozyten, induzieren die Chemotaxis von Neutrophilen und T-Zellen, fördern die Angiogenese, regulieren Adhäsionsmoleküle auf Entzündungszellen und stimulieren die Ausschüttung weiterer Zytokine. So wirkt z. B. eine vermehrte Produktion von IL-2 chemotaktisch und stellt einen starken Reiz zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen dar (WILKINSON und NEWMAN, 1994). Das Zytokin TNF- α , dessen Produktion in psoriatischen Hautläsionen erhöht ist, wirkt stimulierend auf die Expression einiger Mediatoren wie z.B. IL-1, IL-6 und Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 (GROVES *et al.*, 1993). Zytokine spielen damit bei der Aktivierung und Migration von T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Psoriasis.

1.5.4. Histologie

Im Vordergrund der Erkrankung steht das Bild der Entzündung. Die Infiltration der Dermis durch T-Lymphozyten, denen eine Schlüsselrolle in der Psoriasispathogenese zugesprochen wird, gehört zu den frühen histologisch nachweisbaren Veränderungen neu entstehender Psoriasisläsionen und geht der epidermalen Hyperproliferation voraus. Nur ein kleiner Anteil infiltriert die Epidermis. Während in der Dermis CD4⁺-T-Lymphozyten vorherrschen, besteht das epidermale Infiltrat vorwiegend aus CD8⁺-T-Lymphozyten. Die Hyperproliferation der Keratinozyten in der Psoriasisläsion zeigt sich histologisch in einer Akanthose mit einem stark verdickten *Stratum suprabasale*, dessen Keratinozyten einen von 310 auf 36 Stunden verkürzten Zellzyklus aufweisen (WEINSTEIN *et al.*, 1985). Die Epidermis über den Papillenspitzen besteht nur aus wenigen Keratinozytenschichten. Zusätzlich finden sich oft stark elongierte Reteleisten, die weit in das *Stratum papillare* hineinreichen. Weiterhin zeigt sich eine Verhornungsstörung im Sinne einer Hyperparakeratose. Das *Stratum granulosum* ist verschmälert oder fehlt komplett. Eingewanderte neutrophile Leukozyten zeigen sich innerhalb einer parakeratotischen Schicht (= Munro'sche Mikroabszesse) an der Grenze zum *Stratum spinosum*. Ansammlungen von Neutrophilen lassen sich auch im oberen *Stratum spinosum* als unilokuläre, spongiforme Pusteln finden (=Kogoj-Pusteln). Häufig lässt sich ein

perivaskuläres, chronisch-entzündliches Infiltrat aus Histiozyten, Lymphozyten, Mastzellen und vereinzelt polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten erkennen. Typisch sind geschlängelte und erweiterte Kapillaren in den Papillen (siehe auch Kapitel 4.1 und Abb. 5).

1.5.5. Pathologische Barrierefunktion der psoriatischen Haut

Die gesunde Haut besitzt unterschiedliche Barrierentypen. Neben der physikalischen Barriere, die vorwiegend durch das *Stratum corneum* gebildet wird, ist das kontinuierliche System der TJs des *Stratum granulosum* vermutlich eine wichtige Komponente der epidermalen Barriere. Zusätzlich existieren in der Haut die chemische Barriere, die durch Lipide, Säuren, Lysozymen und antimikrobiellen Peptiden aufgebaut wird sowie das humorale und zelluläre Immunsystem, das einen Schutz gegen Viren und Bakterien bildet.

Eine wichtige Voraussetzung für die physikalische Barriere des *Stratum corneum* ist eine Balance zwischen der Proliferation und Desquamation der Keratinozyten. So ist die Epidermis in der Lage sich innerhalb von 28 Tagen selbst zu erneuern. Die Psoriasis ist jedoch durch eine gesteigerte Proliferationsrate und eine Störung der Differenzierung gekennzeichnet, die die Barriereigenschaften der Haut verändern. Die gestörte Barrierefunktion der psoriatischen Haut zeigt sich besonders in der akuten Form, mit erhöhtem TEWL-Level (Transepidermal water loss) (bis zum 20-fachen des Normalwertes) und verminderten Hydrationswerten des *Stratum corneum*. Das Ergebnis der schnellen Transitzeit der Keratinozyten (3-4 Tage) führt zum histologischen Merkmal der Parakeratose in der Psoriasishaut. Der Wassergehalt der lebenden parakeratotischen Zellschichten ist erhöht und die Hautbarriere ist weniger kompakt im Vergleich zu den abgestorbenen Keratinozyten, die das gesunde *Stratum corneum* bilden. Dadurch ist die psoriatische Haut permeabler. Im psoriatischen *Stratum corneum* läßt sich eine veränderte interzelluläre Lipidzusammensetzung nachweisen. So zeigt sich eine deutliche Verminderung von Ceramid 1 (MOTTA *et al.*, 1994). Unter dem Elektronenmikroskop konnte zusätzlich eine Veränderung der interzellulären Lipidlamellen dargestellt werden (FARTASCH, 1997).

1.5.6. Infektionen und antimikrobielle Peptide der Psoriasis

Eine Besonderheit der psoriatischen Haut ist die relative Abwesenheit von Infektionen, insbesondere solche, die durch bakterielle Erreger verursacht werden. Während bei der atopischen Dermatitis, einer TH-2-vermittelten, chronisch-entzündlichen Hauterkrankung, ca. 30% der Patienten an einer erstzunehmenden Hautinfektion leiden, sind lediglich 6,7% der Psoriasispatienten von einer solchen Infektion betroffen, obwohl beide Erkrankungen durch eine Störung der Hautbarriere gekennzeichnet sind (GRICE *et al.*, 1975; CHRISTOPHERS *et al.*, 1987). Bei Entzündungsreaktionen (z.B. psoriatische Haut) oder Verletzungen produzieren Keratinozyten ein hohes Maß an antimikrobiellen Peptiden, die eine Schlüsselrolle in der angeborenen lokalen Immunantwort übernehmen und zur chemischen Barriere der Haut gezählt werden. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Ausschüttung von antimikrobiellen Peptiden essentiell für die Abwehr von Infektionen in der Haut ist (NIZET *et al.*, 2001). Für die Funktion der Hautbarriere beim Menschen sind vor allem die Untergruppen humane Defensine (α - und β -Defensin) und Cathelicidine von Bedeutung. Sie sind gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen wirksam (gramnegative und -positive Bakterien, Pilze und bestimmte Viren). Analysen von Hautschuppen von Psoriasispatienten führte zur Entdeckung von HBD-2 (=Humanes β -Defensin-2), das nicht ständig von der Haut gebildet wird, sondern nur nach selektiver Induktion (z.B. Kontakt mit gramnegativen Bakterien oder proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und IFN- γ). Bei der atopischen Dermatitis scheint eine verringerte Bildung von antimikrobiellen Peptiden eine Rolle bei der erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen zu spielen. Dies könnte ein Ergebnis der Produktion von TH-2-Zytokinen mit ihren Wechselwirkungen und der verminderten Ausschüttung von TNF- α und IFN- γ sein (NOMURA *et al.*, 2003).

1.5.7. Veränderte Expression von Tight Junction-assoziierten Proteinen in der Psoriasis

Bei verschiedenen Hauterkrankungen, die durch eine Störung der Barrierefunktion gekennzeichnet sind (z.B. Psoriasis oder Lichen ruber planus), zeigt sich eine zusätzliche Kolokalisation einiger TJ-Proteine (z.B. Occludin, ZO-1 und Claudin 4) im *Stratum spinosum* (PUMMI *et al.*, 2001; YOSHIDA, *et al.* 2001; BRANDNER *et al.*, 2006, PELTONEN *et al.*, 2007). Untersuchungen an psoriatischer Haut und in

hyperproliferativen Zonen an der Grenze heilender Läsionen demonstrieren, dass eine Störung der Keratinozytenproliferation mit einem veränderten Expressionsmuster von verschiedenen TJ-Proteinen verbunden ist (PELTONEN *et al.*, 2007). In der Epidermis aktiver Plaque-Psoriasis zeigt sich eine deutliche Reduktion von Claudin 1 in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung, im Western Blot- und in PCR-Analysen (BRANDNER *et al.*, 2006, PELTONEN *et al.*, 2007, WATSON *et al.*, 2007). Studien an konfluenten HaCaT-Zellen, die mit exogene Zytokinen für 48 h inkubiert wurden, aber auch Biopsien von freiwilligen Probanden zeigen eine Herabregulation von Claudin 1 durch den Einfluß von INF-1 β (WATSON *et al.*, 2007).

1.6. Zielsetzung und Fragestellung

Die immunologischen und genetischen Grundlagen der Psoriasis haben in den vergangenen Jahren große Fortschritte gemacht. Dennoch ist der Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt. Durch ihre histologischen Veränderungen ist besonders die aktive Psoriasis durch eine Störung der Hautbarriere gekennzeichnet. Studienergebnisse zeigen, dass neben dem *Stratum corneum* das kontinuierliche System der TJs und verschiedenen TJ-Proteine einen wesentlichen Anteil an der Ausbildung der Hautbarriere haben könnten. In Untersuchungen konnten Veränderungen im Expressionsmuster der unterschiedlichen TJ-assoziierten Proteine bei ausgeprägter Psoriasis vulgaris (Plaque-Typ) im Vergleich zur gesunden Haut festgestellt werden (PUMMI *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2006; PELTONEN *et al.*, 2007; WATSON *et al.*, 2007).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, verschiedene Transmembran- und Plaque-Proteine der Tight Junctions (TJs) sowie ausgewählte Proteine der Adhärenzverbindungen und Desmosomen in der Haut Psoriasis-erkrankter zu charakterisieren. Um herauszufinden, ob Veränderungen der unterschiedlichen Zell-Zell-Verbindungsproteine bereits in einer frühen Phase der Psoriasis auftreten oder diese ein Merkmal der fortgeschrittenen Erkrankung (Plaque-Typ Psoriasis) sind, werden in Paraffin eingebettete Hautschnitte von Patienten mit histologisch gesicherter Psoriasis in der Frühform und in der fortgeschrittenen Phase (hier beispielhaft: Psoriasis pustulosa) untersucht.

Um die Wechselwirkungen zwischen TJ-Proteinen und Entzündungszellen zu charakterisieren, stellen die verschiedenen Psoriasis-Formen mit ihren unterschiedlichen Entzündungszellspezies in der Dermis und Epidermis ideale Präparate dar. Deshalb soll der Einfluß verschiedener Entzündungszellspezies auf die Verteilung der TJ-, AJ- und desmosomalen Proteine in den beiden Psoriasisformen untersucht werden. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz werden Mitglieder der Claudin-Familie (Claudin 1, Claudin 4, Claudin 7), JAM-A, das Protein ZO-1, β -Catenin, E-Cadherin und Desmoglein 1 jeweils mit einem Antikörper gegen CD43 oder CD15 kombiniert. Der monoklonale Antikörper gegen CD43, der typischerweise in hohem Maß von fast allen Leukozyten (z.B. T-Lymphozyten, auf aktivierten B-Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen) exprimiert wird, soll

dabei einen Überblick über den allgemeinen Einfluß von Entzündungszellen auf die Lokalisation unterschiedlicher Zellverbindungsproteine in der psoriatisch veränderten Epidermis geben. Zur genauen Bestimmung des Einflusses von neutrophilen Granulozyten, die sowohl in der Frühform als auch in der Psoriasis pustulosa häufig in der Epidermis nachgewiesen werden können, wird zusätzlich der monoklonale Antikörper gegen CD15 bei der immunhistochemischen Färbung eingesetzt, der neben neutrophile Granulozyten auch Monozyten markiert.

2. Material

2.1. Untersuchungsgut

Für die Untersuchung wurden Hautproben verwendet, die im Rahmen von Gewebeentnahmen zur histologischen Diagnosesicherung in der Klinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums-Hamburg-Eppendorf (UKE) anfielen. Die Arbeit umfasst das in Paraffin eingebettete Material von 10 Patienten. In allen Fällen handelt es sich um histopathologisch gesicherte Psoriasis. Es wurden 5 Proben mit den Merkmalen eines frühen Stadiums der Psoriasis (eine männliche, vier weibliche im Alter zwischen 32-65 Jahren) und weitere 5 Proben der Psoriasis pustulosa (zwei männliche, drei weibliche im Alter zwischen 25-69 Jahren) verwendet. Der Einsatz der Proben wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (WF 08/08).

2.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Superior Marienfeld, 24 x 60 mm Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Koenigshofen
Digitalkamera	Olympus C-5050 Zoom Camedia, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Eppendorfgefäße	SAFTY CAP, 1,5 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Konische Röhrchen	BLUE MAX™ 15 ml, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex/Frankreich
Feinwaage	Satorius BP 210 D, Satorius AG, Göttingen
Feuchtkammer	KreaTech Diagnostics, Amsterdam/Niederlande
Kühlplatte	medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Magnetrührer	Heidolph MR 3001, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Makierungsstift	PAP Pen, Coulter-Immunotech Diagnostics, Krefeld

Material

Mikroskope	<u>Lichtmikroskop</u> : WILD MPS 52 Leica Benzheim <u>Fluoreszenzmikroskop</u> : Axiophot II Zeiss Göttingen; mit: <i>CCD-Kamera</i> C4742-95 Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrrsching <i>Software</i> : Openlab 2.0.4. Improvision, Coventry/UK
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Objektträger	72 SuperFrost/Plus Objektträger, Assistent® Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim
Paraffin-Streckbad	GFL® Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
pH-Meter	Knick 766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin
Pipetten	0,5 µl, 10 -100 µ-10, 100 -1000 µl Eppendorf AG, Hamburg
Rotationsmikrotom	Leica RM 2165, Benzheim
Tischzentrifuge	Biofuge 13 H, Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortexer	Scientific Industries, New York/ USA
Waage	Sartorius BL 3100, Satorius AG, Göttingen
Wärmeplatte	medax, GmbH und CO. KG, Olching
Wärmeschrank	Heraeus T6030, Hereus Holding GmbH, Hanau Memmert GmbH und CO. KG, Schwabach

2.3. Chemikalien

CaCl ₂ x H ₂ O	Merck KG aA, Darmstadt
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x 2H ₂ O	Merck KG aA, Darmstadt
DAPI (1:5000)	(4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DakoCytomation-Proteinblock	(serum free), DakoCytomation, Glostrup/Dänemark

Material

EDTA	Titriplex III; Ethylendiamintetraessigsäure Merck KG aA, Darmstadt
Ethanol absolut	Walter CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Fluoromount-G™	Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham/USA
KCl	Merck KG aA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck KG aA, Darmstadt
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg (Allgäu)
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck KG aA, Darmstadt
NaCl	Mallinckrodt + Baker B.V. Deventer/Niederlande
NGS	Normal Goat Serum, Dianova GmbH, Hamburg
Petroliumbenzin	Merck KG aA, Darmstadt
Salzsäure 25%	Merck KG aA, Darmstadt
Salzsäure 37%	Merck KG aA, Darmstadt
Triton X-100	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma® base	SIGMA®-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin (1:250)	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Polyoxiethylensorbitanmonolaurat Merck- Schuchardt, Hohenbrunnen
Xylolersatz XEM-200	Vogel GmbH & Co. KG, Medizinische Technik und Chemie, Giessen

2.4. Puffer und Lösungen

PBS (phosphate buffered saline) 10x

Stammlösung:

160,00 g NaCl

4,00 g KCl

23,20 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

2,00 g KH₂PO₄

ad 2000 ml Aqua dest., pH auf 6,9 einstellen

Gebrauchslösung: 1:10

TBST (tris buffered saline) 10x

Stammlösung:

121,10 g Tris-HCL

175,32 g NaCl

ad 1500 ml Aqua dest.

10 g Tween 20

113,30 ml HCl 25%; pH auf 7,4 einstellen und auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Gebrauchslösung: 1:10

Tris-HCl (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydrochloride)

60,57 g Trizma® base

500 ml Aqua dest.

pH auf 7,4 einstellen und auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

TEC-Puffer (Tris-EDTA-Citrat) 20x

Stammlösung:

5 g Trizma® base

10 g EDTA

6,4 g Tri-Natriumcitrat

950 ml Aqua dest., pH 7,8 einstellen und auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

Gebrauchslösung: 1:20

Magermilch 2 oder 5 %

0,2g (2%) bzw. 0,5g (5%) Magermilch in 10 ml PBS auflösen

Blocklösungen

10 µl Triton 10% in 990 µl der 2 oder 5% Magermilch

20 µl verwerfen und durch 20 µl NGS ersetzen

Trypsin

Stammlösung:

1 ml Tris-HCl 0,5 mol

9 ml Aqua dest.

0,010 g Trypsin

0,011 g CaCl₂ x H₂O

Gebrauchslösung: Trypsin 0,001%

1 ml Tris-HCl 0,5 mol

9 ml Aqua dest.

100 µl verwerfen und durch 100 µl aus Stammlösung ersetzen

2.5. Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

2.5.1. Primärantikörper

β-Catenin	polyklonal, anti-goat, IgG R & D System Inc., Minneapolis/USA Endverdünnung: 1:500
Claudin 1	polyklonal, anti-rabbit, IgG ZYMED Laboratories Inc., San Francisco/USA Endverdünnung: 1:150
Claudin 4	polyklonal, anti-rabbit, IgG ZYMED Laboratories Inc., San Francisco/USA Endverdünnung: 1:50
Claudin 7	polyklonal, anti-rabbit, IgG ZYMED Laboratories Inc., San Francisco/USA Endverdünnung: 1:50

Material

Desmoglein 1	monoklonal, Kulturüberstand, anti-mouse, IgG zur Verfügung gestellt Labor Prof. Dr. W.W. Franke, DKFZ, Heidelberg Endverdünnung: 1:10
E-Cadherin	monoklonal, Clone 36B5, anti-mouse, IgG1 Novocostra Laboratories Ltd, Benton Lane/UK Endverdünnung: 1:5
JAM-1	polyklonal, anti-goat, IgG R & D System, Inc., Minneapolis/USA Endverdünnung: 1:20
ZO-1	polyklonal, anti-rabbit, IgG ZYMED Laboratories Inc., San Francisco/USA Endverdünnung: 1:80
CD15	monoklonal, Clone C3D-1, anti-mouse, IgM DAKO Cytomation, Hamburg Endverdünnung: 1:50
CD43	monoklonal, Clone DF-T1 anti-mouse, IgG ₁ DAKO Cytomation, Hamburg Endverdünnung: 1:50

2.5.2. Immunglobuline (Negativkontrollen)

Mouse IgM	DakoCytomation, Glostrup/Dänemark
Mouse IgG1	DakoCytomation, Glostrup/Dänemark
Rabbit IgG	DakoCytomation, Glostrup/Dänemark
Goat IgG	R & D System, Inc., Minneapolis/USA

2.5.3. Sekundärantikörper

Cy [™] 3	donkey anti-goat IgG (H+L) Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. Dianova GmbH, Hamburg Endverdünnung: 1:500
Alexa Fluor [®] 488	goat anti-mouse IgG (H+L) Moleculare Probes, Inc., Leiden/ Niederlande Endverdünnung: 1:600
Alexa Fluor [®] 488	goat anti-mouse IgM invitrogen Moleculare Probes, Inc., Leiden/ Niederlande Endverdünnung: 1:600
Alexa Fluor [®] 594	F(ab') ₂ Fragment of goat anti-rabbit IgG (H + L) Moleculare Probes, Inc., Leiden/ Niederlande Endverdünnung: 1:1000
Alexa Fluor [®] 594	F(ab') ₂ fragment of goat anti-mouse IgG(H+L) Moleculare Probes, Inc., Leiden/ Niederlande Endverdünnung: 1:600

3. Methodik

3.1. Vorbereitung der Paraffinblöcke

3.1.1. Schneiden der Paraffinblöcke

Die Schnitte für die Immunfluoreszenzfärbung wurden aus Paraffinblöcken am Mikrotom angefertigt. Um eine bessere Schneidefähigkeit der Blöcke zu erreichen und die Dicke der einzelnen Schnitte zu wahren, wurden die Paraffinblöcke vor ihrer Bearbeitung für 30 min auf -8 °C heruntergekühlt. Dieser Vorgang wiederholte sich auch zwischen den einzelnen Schnittvorgängen. Anschließend konnten die Paraffinblöcke in einer Halterung am Mikrotom eingespannt werden, um 5 µm dicke Gewebsschnitte herzustellen. Die Schnitte wurden zur Entspannung zunächst in raumtemperaturwarmes Wasser gelegt und anschließend in ein mit 42 °C warmes Wasserbecken (Paraffin Streckbad) überführt, um die Oberfläche der Schnitte zu glätten. Dann wurden die Schnitte auf SuperFrost/Plus Objektträger, Assistent® gezogen, auf einem Objektträger-Strecktisch 30 min lang getrocknet und anschließend über Nacht bei 52 °C endgetrocknet. Um ein Abschwimmen der Schnitte während des später folgenden Kochvorgangs zu vermeiden, wurden beschichtete Objektträger verwendet. Bis zur Weiterverwendung der Gewebsschnitte wurden diese bei Raumtemperatur gelagert.

3.1.2. Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte

Alle nachfolgenden Reagenzien mußten für das optimale Gelingen bei Raumtemperatur verwendet werden. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst zweimal für je 20 min mit Xylol behandelt und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe überführt, die der Rehydrierung des Gewebes diene.

Die Paraffinschnitte wurden nach folgendem Schema behandelt:

1. Ethanol absolut 2 min
2. Ethanol absolut 5 min
3. Ethanol 96% kurz
4. Ethanol 80% kurz
5. Ethanol 70 % kurz
6. Aqua dest. 5 min

3.1.3. Demaskierung der Antigene

Die Formalinfixierung kann zu Quervernetzungen von Proteinen und damit zu Strukturveränderung im Gewebe führen (=Antigenmaskierung). Um eine ausreichende Antigenität der Proteine gewährleisten zu können, muss diese Antigenmaskierung aufgebrochen oder rückgängig gemacht werden, sodass die Zahl an immunreaktiven Epitopen nachträglich wieder erhöht wird. Dies ermöglicht eine optimale Antigen-Antikörper-Reaktion.

Zum Aufbrechen der Quervernetzungen, die durch die Fixierung entstanden waren, wurden die Schnitte zunächst einer Vorbehandlung mit feuchter Hitze unterzogen. Dabei wurden die Präparate für 4 x 5 min bei 600 Watt in der Mikrowelle in TEC-Puffer gekocht. In der sich anschließenden Abkühlungsphase (30 min) erfolgte die Renaturierung des Gewebes. Vor der Weiterbehandlung der Schnitte wurden diese für 2 x 5 min in PBS oder 2 x 3 min in TBST gespült. Dann erfolgt die proteolytische Demaskierung der Antigene mit Trypsin (0,001%) für 10 min bei 37 °C im Wärmeschrank. Anschließend wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. gespült und dann für 2 x 5 min in PBS oder 2 x 3 min in TBST überführt. Nachfolgend wurde die vorhandene Pufferflüssigkeit von den Objektträgern durch seitliches Abklopfen entfernt. Mit einem Markierungsstift (PAP-Pen) wurden die Präparate eingekreist, um den Reagenzienverbrauch zu reduzieren und eine optimale Inkubationssituation zu schaffen.

3.1.4. Blocken unspezifischer Reaktionen

Um unspezifische immunhistochemische Reaktionen des Primärantikörpers im Gewebe zu vermeiden, wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer bereits vor der Inkubation mit dem Primärantikörper für 20 min mit einer Blocklösung versetzt. Für Claudin 1 wurde dabei ein Reagenz bestehend aus Magermilch (2%) in PBS, Normal Goat Serum und Triton verwendet. Für alle anderen Antikörper kam der Proteinblock DakoCytomation (serum free) zum Einsatz. Die Blocklösung wurde dann vom Objektträger abgeklopft und vor der Inkubation mit dem Primärantikörper sorgfältig mit einem saugfähigen Papier getrocknet.

3.2. Immunhistochemische Färbung (Indirekte Immunhistochemie)

Nach den einzelnen Vorbehandlungsschritten erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung. Hierbei kam die Technik der immunhistochemischen Doppelfärbung zum Einsatz. Dazu wurden die Antikörper Claudin 1, Claudin 4, Claudin 7, JAM-A, β -Catenin und ZO-1 sowohl mit CD15 und als auch mit CD43 kombiniert. Es erfolgte die Detektion zweier Epitope auf demselben Gewebeschnitt mit zwei Primärantikörpern unterschiedlicher Tierspezies. Dabei wurden die Primärantikörper bzw. Sekundärantikörper entweder im Gemisch oder in einzelnen Schritten nacheinander auf die Präparate aufgetragen (siehe dazu 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3).

3.2.1. Doppelfärbung mit Primär- bzw. Sekundärantikörpergemisch

Die Inkubation mit dem Primärantikörpergemisch (Claudin 1/CD15 bzw. CD43, Claudin 7/CD15 bzw. CD43) in seiner geeigneten Verdünnung und Menge wurde in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur für 1 h durchgeführt. Danach erfolgte die Spülung der Schnitte für 3 x 10 min in PBS (Claudin 1) oder 3 x 3 min in TBST (Claudin 7). Die Präparate wurden dann seitlich abgeklopft, um den restlichen Puffer zu entfernen. Anschließend wurde ein Gemisch aus den für die beiden Primärantikörper spezifischen Sekundärantikörper in ihrer geeigneten Konzentration und Menge aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut für 5 min in PBS gespült und anschließend für die DNA-Färbung 1 min in dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI belassen. Es folgten weitere Waschriffe mit PBS (2 x 5 min) und Aqua dest. (2 x 3 min). Abschließend wurden die Schnitte mit Fluoromount G™ eingedeckelt, getrocknet und bei 4 °C gelagert.

3.2.2. Sukzessive Doppelfärbung

Die Inkubation mit dem 1. Primärantikörper (Claudin 4, β -Catenin, JAM-1 oder ZO-1) in seiner geeigneten Verdünnung und Konzentration erfolgte für 30 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte in TBST (3 x 3 min) gespült. Folgend wurde der 1. spezifischen Sekundärantikörper in geeigneter Konzentration und Menge aufgetragen und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Spülvorgang der Schnitte in TBST (3 x 3 min). Die Inkubation mit dem 2. Primärantikörper (CD15 bzw. CD43) in seiner geeigneten Verdünnung und Menge erfolgte für 45 min bei Raumtemperatur.

Auch hier schloß sich ein Waschvorgang in TBST (3 x 3 min) an. Dann wurde der 2. spezifische Sekundärantikörper in geeigneter Konzentration und Menge für 45 min inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut für 5 min in PBS gespült und anschließend für die DNA-Färbung 1 min in dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI belassen. Es folgten weitere Waschschrte mit PBS (2 x 5 min) und Aqua dest. (2 x 3 min). Abschließend wurden die Schnitte mit Fluoromount G™ eingedeckelt, getrocknet und bei 4 °C gelagert.

3.2.3. Einzelfärbung im Folgeschnitt

Bei den Antikörpern Desmoglein 1 und E-Cadherin wurden keine Doppelfärbungen angefertigt, da diese der gleichen Spezies (Maus) wie CD15 und CD43 angehörten. Daher wurden die Primärantikörper Desmoglein 1 bzw. E-Cadherin und im Folgeschnitt die Primärantikörper CD15 bzw. CD43 parallel aufgetragen und in ihrer geeigneten Verdünnung und Konzentration für 1 h in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein Spülvorgang in TBST (3 x 3 min). Danach wurden die spezifischen Sekundärantikörper in ihrer geeigneten Verdünnung und Konzentration nach dem gleichen Prinzip aufgetragen und bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer für 30 min inkubiert. Folgend wurden die Schnitte erneut für 5 min in PBS gespült und anschließend für die DNA-Färbung 1 min in dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI belassen. Es schlossen sich weitere Waschschrte mit PBS (2 x 5 min) und Aqua dest. (2 x 3 min) an. Abschließend wurden die Schnitte mit Fluoromount G™ eingedeckelt, getrocknet und bei 4 °C gelagert.

3.2.4. Negativ- und Positivkontrolle

Zur Überprüfung der Spezifität der Färbung mit dem Primär- und Sekundärantikörper wurden parallel zu jeder Färbung zwei Negativkontrollen mitgeführt. Bei der ersten Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers das spezifische Immunglobulin in der gleichen Konzentration verwendet und anschließend mit dem spezifischen Sekundärantikörper inkubiert. Bei der zweiten Negativkontrolle wurde nach der Inkubation des Primärantikörpers der Sekundärantikörper durch PBS oder TBST ersetzt. Bei der Positivkontrolle wurden parallel Gewebsschnitte mitgefärbt, die sicher das gesuchte Antigen exprimieren und spezifisch anfärben.

3.3. Auswertung der Präparate

Die Auswertung der Paraffinschnitte erfolgte unter dem Immunfluoreszenzmikroskop mit anschließender fotografischer Dokumentation. Dabei wurde das Verteilungsmuster der Zell-Zell-Verbindungsproteine innerhalb der psoriatische Epidermis beobachtet. Weiterhin wurde der Einfluß epidermal einwandernder Entzündungszellen auf die Verteilung der verschiedenen TJ-, AJ- und desmosomalen Proteine untersucht. Die Intensität der Immunreaktion wurde entsprechend der Stärke der Antikörperfärbung klassifiziert: sehr stark +++ , stark ++(+), mittel ++, schwach +, sehr schwach (+) oder keine 0 Immunreaktion vorhanden. Weiterhin wurde auf das Vorhandensein einer zytoplasmatischen Lokalisation der einzelnen Zell-Zell-Verbindungsproteine geachtet. War diese positiv bzw. vorhanden erfolgt die Dokumentation in der Tabelle mit folgendem Symbol: (*).

4. Ergebnisse

4.1. Histologische Merkmale der Frühform der Psoriasis und der Psoriasis pustulosa im Spätstadium der Erkrankung

In den histologischen Präparaten einer frühen Form der Psoriasis zeigen sich eine leichte, regelmäßige Akanthose und eine diskrete spongiotische Gefügelockerung der Epidermis, die in den unteren Abschnitten mäßig mit Lymphozyten durchsetzt ist. Weitere histologische Merkmale sind einige elongierte, meist gleichlange Reteleisten. Die suprapapilläre Epidermis zeigt deutlich weniger Keratinozytenschichten als in der gesunden Haut. Das *Stratum granulosum* präsentiert sich verschmälert oder fehlt komplett. Innerhalb der Epidermis gibt es nur an einzelnen Stellen intraepitheliale, neutrophile Granulozyten. Auch subcorneal können fokale kleine mit Neutrophilen gefüllte Pusteln angetroffen werden. In der mäßig ödematösen papillären Dermis sind dilatierte Kapillaren und ein perivaskuläres, lymphozytäres Infiltrat mit einzelnen neutrophilen Granulozyten zu erkennen (Abb. 5 A).

Eine stärkere Akkumulation von neutrophilen Granulozyten charakterisiert die Psoriasis pustulosa. Hier finden sich obligat höher gelegenen Pusteln zunächst subcorneal und später auch intracorneal, die mit neutrophilen Granulozyten angefüllt sind. Die spongioforme Pustel über der Papille ist eine Makropustel und gleichzeitig die typische Läsion. Eine komplette Zytolyse der Zellen im Zentrum führt zur großen Kavität. Am Wandbereich der Pustel finden sich oft spongiiforme Auflockerungen, in denen ebenfalls Neutrophile zu finden sind. Zusätzlich sind im Vollbild der Psoriasis pustulosa eine deutlich aufgelockerte Epidermis, plumpe Akanthose und weit elongierte, gleichlange Reteleisten zu erkennen, die auffallend dünn oder am unteren Ende kolbenartig aufgetrieben sein können. Manchmal erscheinen benachbarte Reteleisten an der Basis verschmolzen. Das *Stratum corneum* ist stark hyperkeratotisch verdickt. In der oberen Dermis finden sich ein perivaskuläres, lymphozytäres Infiltrat, neutrophile Granulozyten, besonders unterhalb der epithelialen Pusteln, ektatische Kapillaren und ein perikapilläres Ödem (Abb. 5 B).

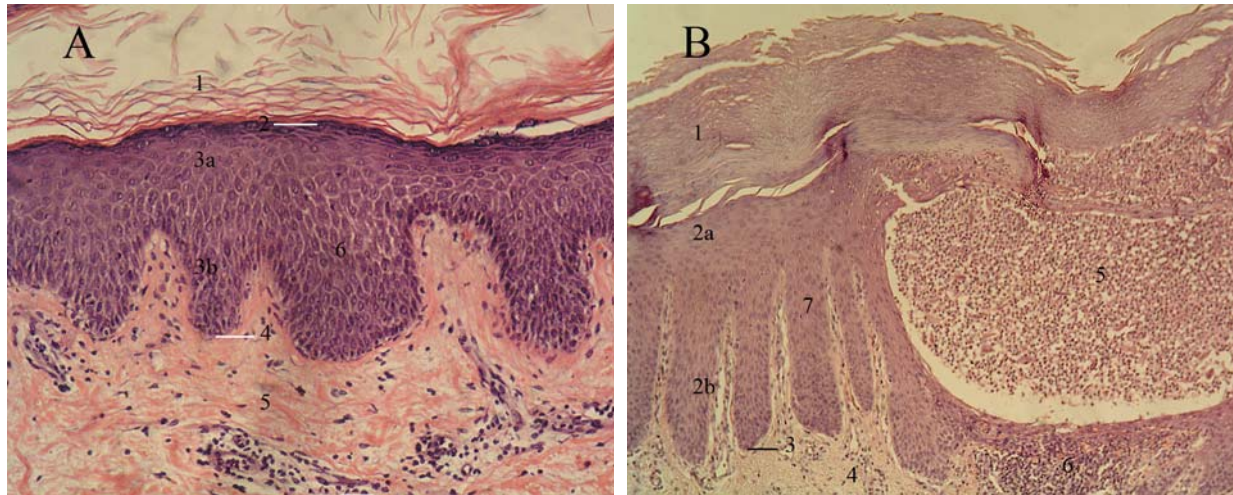


Abbildung 5: Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung der menschlichen Haut bei der Frühform der Psoriasis und bei der Psoriasis pustulosa.

A zeigt histologische Veränderungen der Epidermis bei einer frühen Form der Psoriasis: **1** Stratum corneum, **2** schmales und unvollständiges Stratum granulosum, **3a** oberer Anteil und **3b** unterer Anteil des verdickten Stratum spinosum, **4** Stratum basale, **5** Stratum papillare der Dermis und **6** elongierte Reteleiste

B zeigt histologische Veränderungen der Epidermis bei der Psoriasis pustulosa: **1** hyperkeratotisches Stratum corneum, **2a** oberer Anteil und **2b** unterer Anteil des verdickten Stratum spinosum, **3** Stratum basale, **4** Stratum papillare der Dermis, **5** intraepitheliale Pustel (Makropustel) mit massenhaft Entzündungszellen, **6** epithelial einwandernde Entzündungszellen und **7** elongierte Reteleiste

4.2. Immunlokalisation von Tight Junction-assoziierten Proteinen und Identifizierung von Entzündungszellen bei der Psoriasis

Um zu klären, ob die Veränderung der Expression unterschiedlicher TJ-Proteine, die in vorausgegangenen Experimenten bei der Plaque Psoriasis nachgewiesen werden konnten bereits in einem frühen Stadium der Psoriasisentwicklung auftritt, wurden die Expressionsmuster der verschiedenen TJ-Proteine in einer frühen Form der Psoriasis vulgaris untersucht und mit denen der voll ausgeprägten Form (beispielhaft: Psoriasis pustulosa) verglichen. In Hautproben von Psoriasis-erkrankten wurden die TJ-assoziierten Proteine Claudin 1, Claudin 4, Claudin 7, JAM-A und ZO-1 angefärbt. Da sich die Frage stellte, ob die TJ-assoziierten Proteine besonders in der Umgebung von Entzündungszellen verändert sind, wurden sie zunächst in Doppellokalisierung mit CD43 angefärbt. Dieser Antikörper wird auf fast allen Leukozyten (z.B. T-Lymphozyten, auf aktivierten B-Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen) exprimiert. Anschließend wurde speziell der Einfluß der neutrophilen Granulozyten (positiv für CD15) auf das Expressionsmuster der TJ-Proteine in der Epidermis untersucht. Auch hier erfolgte die Anfärbung der TJ-Proteine in Doppellokalisierung mit CD15.

4.2.1. Claudin 1 und CD43 bzw. CD15

In der gesunden Haut wird Claudin 1 von allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert (Abb. 6).

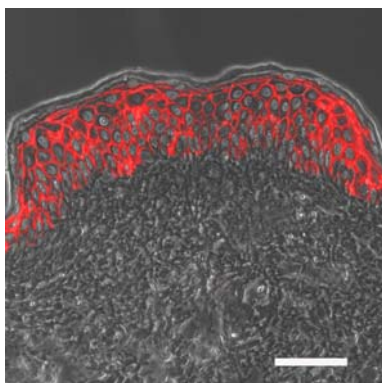


Abbildung 6: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 1 in gesunder menschlicher Haut.

Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); Claudin 1 wird in allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Frühform der Psoriasis

Die immunhistochemische Färbung für Claudin 1 war in der Frühform der Psoriasis besonders in den unteren Abschnitten der Epidermis deutlich vermindert. Während sich in den oberen Anteilen des *Stratum spinosum* eine weitgehend kontinuierliche und intensive Färbung darstellte, war in den basalen Bereichen meist nur eine fragmentarische und schwache Färbung zu erkennen. Das *Stratum granulosum* war in den Präparaten schmal und in seiner Kontinuität unterbrochen. Zusätzlich zeigte es eine weniger intensive Färbung im Vergleich zu oberem Anteil der Spinosuszellschicht (Tab. 1; Abb. 7-9).

Claudin 1	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	++	+++	+++	+++	0
FP 1	0	+	++	+	0
FP 2	0	++	++(+)	+(+)	0
FP 3	0	+	++	+(+)	0
FP 4	0	+	++	+(+)	0
FP 5	0	+	++(+)	+	0

Tabelle 1 Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 1 in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis (FP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+) stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

In der Umgebung epithelialer CD43-positiver Zellen konnte eine Intensitätsminderung in der Immunfärbung für Claudin 1 verzeichnet werden. Im Vergleich zu angrenzenden Epidermisabschnitten ohne CD43-positive Zellen war die immunhistochemische Färbung im Bereich der Entzündungszellen für Claudin 1 unterbrochen und lückenhaft (Abb. 7).

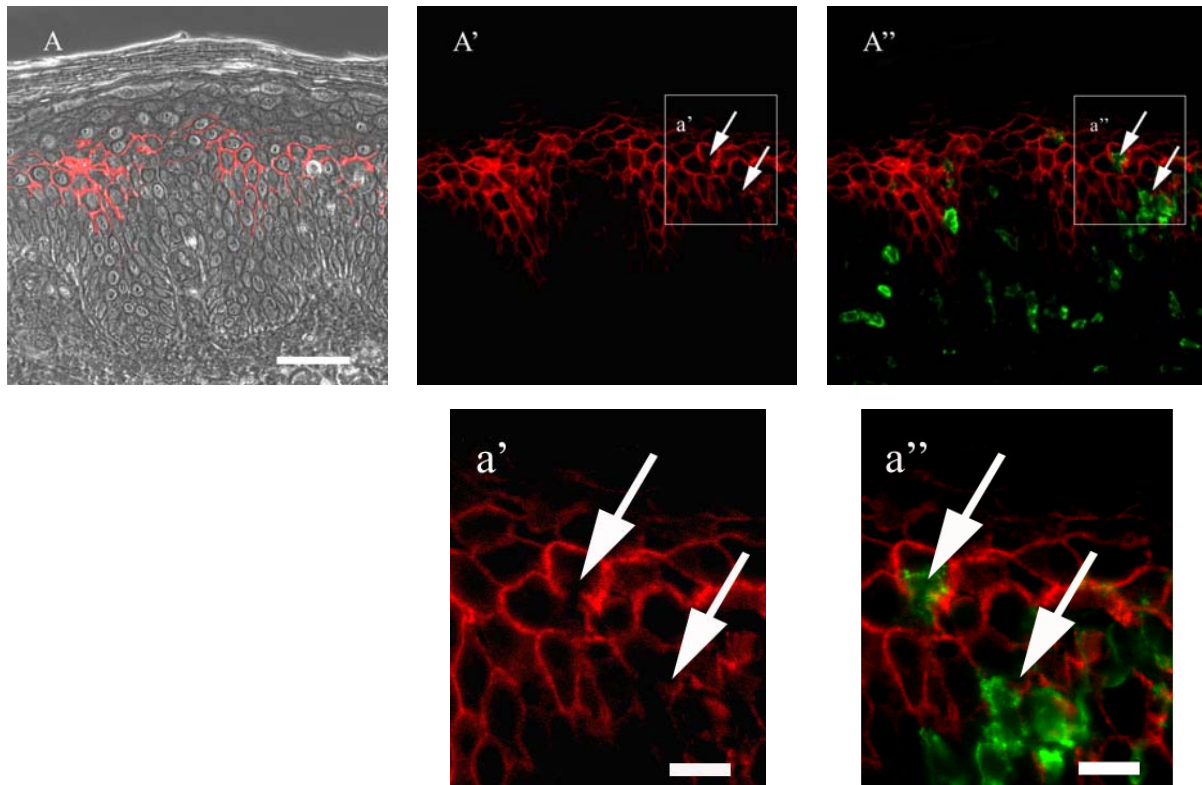


Abbildung 7: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 1 und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Claudin 1 (rot); **A''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und CD43 (grün); **a'** und **a''** sind Vergrößerungen aus **A'** und **A''**; **A-A''** zeigt den Verlust von Claudin 1 (rot) bei der epithelialen Infiltration von CD43-positiven Zellen (grün); Pfeile markieren in **A'** bzw. **a'** die Unterbrechung in der Claudin-1-Färbung (rot) und in **A''** bzw. **a''** die entsprechend einwandernde CD43-positive Entzündungszelle (grün); (Maßstab-Balken: 50 µm)

Bei der immunhistochemischen Doppelfärbung von Claudin 1 und CD43 zeigte sich interessanterweise, dass in der Epidermis ein geringer Teil der Zellen sowohl für Claudin 1 als auch für CD43 positiv war (Abb. 8).

Eine genaue Untersuchung zeigte, dass die Herabregulation von Claudin 1 besonders in der Umgebung von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) zu beobachten war. Die Färbung für Claudin 1 wirkte diskontinuierlich und durch den Einstrom der Entzündungszellen lückenhaft. Basal der eingewanderten Entzündungszellen blieb die Färbung für Claudin 1 unvollständig und unterbrochen (Abb. 9). Die für Claudin 1 positiven Entzündungszellen waren nicht CD15 positiv.

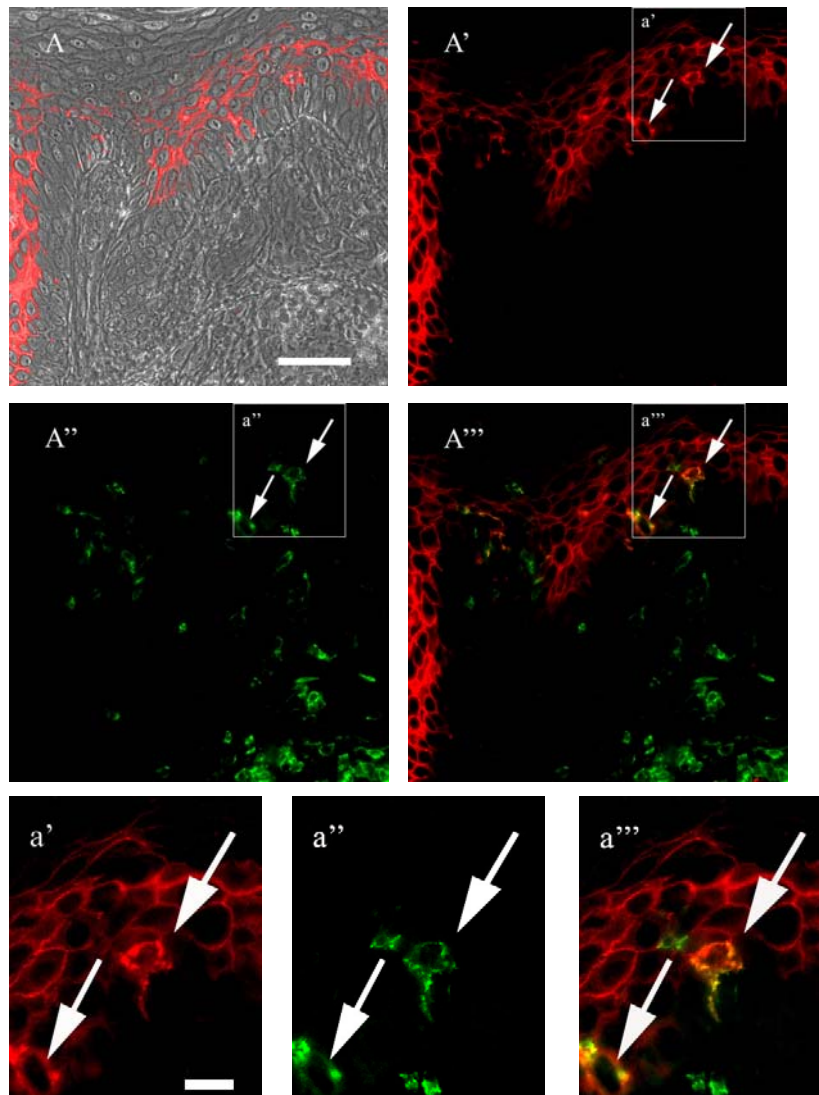


Abbildung 8: Kolokalisation von Claudin 1 und CD43 auf der Oberfläche von epithelial gelegenen Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Claudin 1 (rot); **A''** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A'''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und CD43 (grün); **a'**-**a'''** sind Vergrößerungen aus **A'**-**A'''**. Die Pfeile in den Abbildungen **A'**-**A'''** bzw. **a'**-**a'''** markieren zwei Zellen, die in **A'** bzw. **a'** für Claudin 1 (rot) und in **A''** bzw. **a''** für CD43 (grün) positiv sind; **A'''** bzw. **a'''** zeigt die Kolokalisation beider Antikörper in gelb; (Maßstab-Balken: 50 µm)

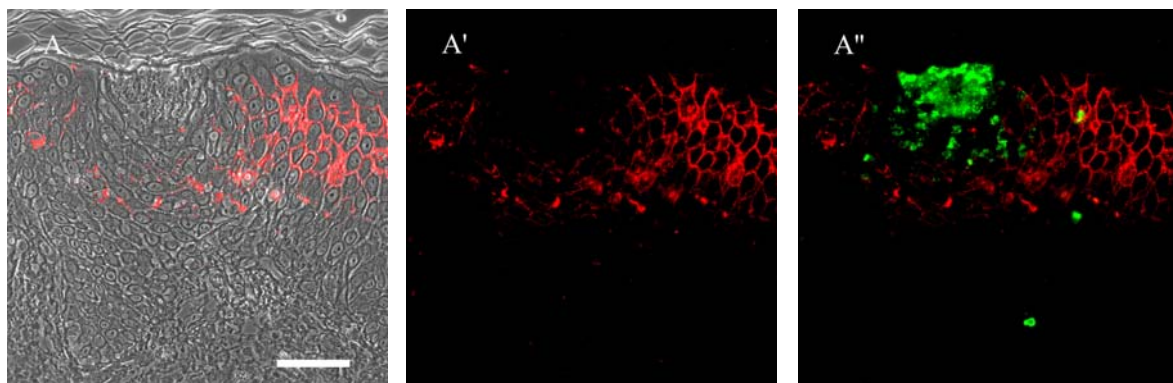


Abbildung 9: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 1 und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot); **A''** Überlagerungen der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und CD15 (grün); **A-A''** zeigt den Verlust von Claudin 1 (rot) in der Umgebung epithelial infiltrierender, neutrophiler Granulozyten (grün); **A''** zentral zeigt sich eine kleine epitheliale Pustel mit neutrophilen Granulozyten (grün); (Maßstab-Balken: 50 µm)

Psoriasis pustulosa

Bei der Psoriasis pustulosa war ebenfalls ein Verlust innerhalb der Färbung für Claudin 1 zu verzeichnen. Es zeigte sich eine deutliche Herabregulation in weiten Bereichen der Epidermis. Im *Stratum basale* und in den unteren Abschnitten des verbreiterten *Stratum spinosum* war meist keine oder nur eine sehr schwache Anfärbung zu erkennen. Im oberen Abschnitt der Spinosuszellschichten war die Färbung für Claudin 1 stärker ausgeprägt. Das *Stratum granulosum* zeigte sich zum Teil in seiner Kontinuität unterbrochen und die Färbung für Claudin 1 war weniger intensiv als in den oberen Spinosuszellschichten (Tab. 2; Abb. 10-12).

Claudin 1	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	++	+++	+++	+++	0
FP 1	0	0	++	+	0
FP 2	0	+	++	+	0
FP 3	0	+(+)	++	+	0
FP 4	0	+(+)	++	++	0
FP 5	0	+	++	+	0

Tabelle 2 Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 1 in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa (PP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+) stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

In der Umgebung von epithelial einwandernden CD43-positiven Zellen, war ein Verlust und eine Kontinuitätsunterbrechung in der Färbung für Claudin 1 zu verzeichnen (Abb. 10).

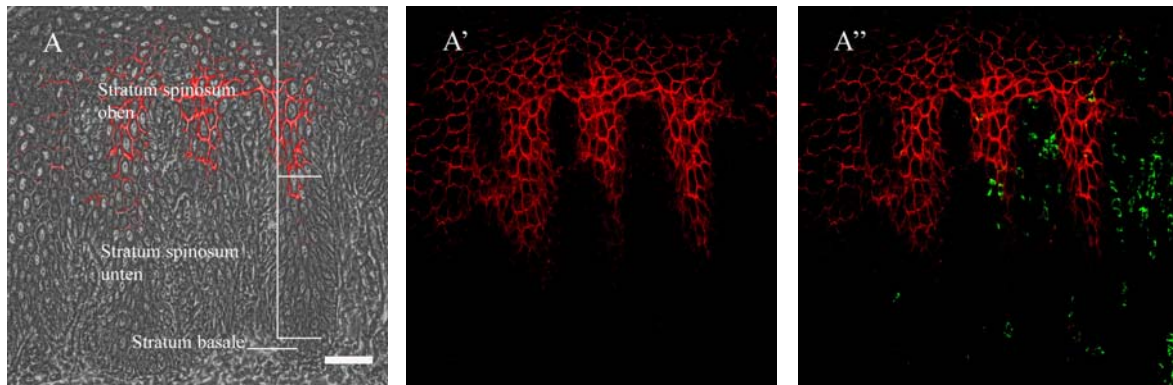


Abbildung 10: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 1 und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa; Übersichtsbild.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Claudin 1 (rot); **A''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und CD43 (grün); **A-A''** zeigte eine ausgedehnte Herabregulation von Claudin 1 (rot) besonders in den basalen Abschnitten der Epidermis und in der Umgebung epithelial einwandernder CD43-positiver Zellen (grün); (Maßstab-Balken: 50 µm)

Auch bei Psoriasis pustulosa zeigte sich in der immunhistochemische Doppelfärbung von Claudin 1 und CD43, dass in der Epidermis ein geringer Teil der Zellen sowohl für Claudin 1 als auch für CD43 positiv war (Abb. 11).

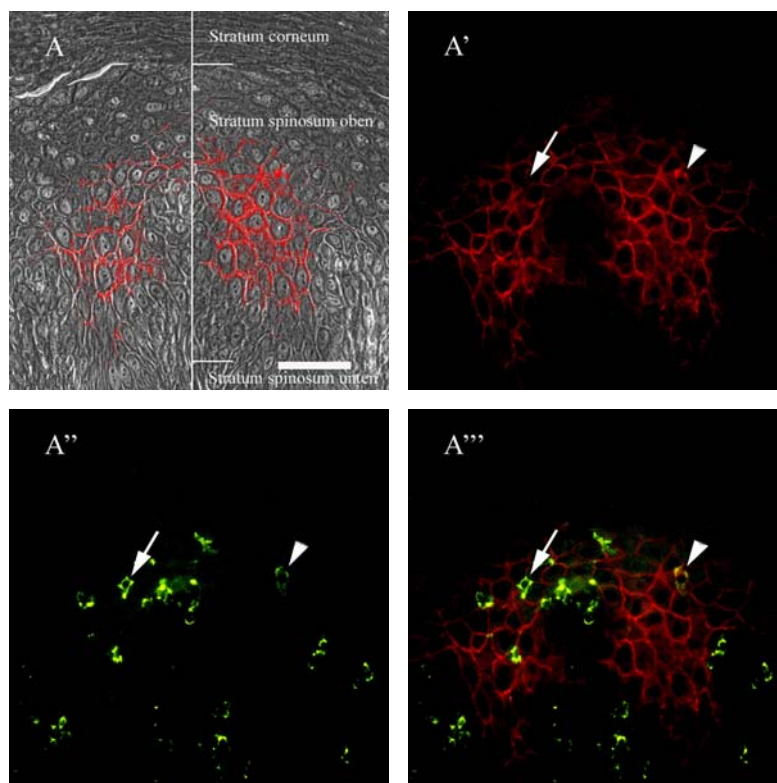


Abbildung 11: Kolokalisation von Claudin 1 und CD43 auf der Oberfläche epithelial gelegener Zellen in menschlicher Haut in der Psoriasis pustulosa; Detailansicht.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Claudin 1 (rot); **A''** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A'''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und CD43 (grün); **A-A'''** Herabregulation von Claudin 1 (rot) in der Umgebung von CD43-positiven Zellen (grün); Pfeil markiert in **A'** den Verlust von Claudin 1 (rot) und in **A''** die entsprechende CD43-positive Zelle (grün); in **A'** markiert die Pfeilspitzen eine Zelle, die für Claudin 1 (rot) und in **A''** für CD43 (grün) positiv ist; **A'''** zeigt die Kolokalisation beider Antikörper in gelb (Pfeilspitze) (D); (Maßstab-Balken: 50 µm)

Bei genauer Untersuchung zeigte sich vor allem bei der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) ein Verlust von Claudin 1. Besonders basal und lateral der Pusteln, die selbst ein massives Infiltrat an Neutrophilen aufwiesen, war die Kontinuität von Claudin 1 im Bereich des Entzündungszelleinstroms unterbrochen. Häufig wurde eine intrazelluläre Färbung beobachtet. Insgesamt wirkte das Gewebe im Umkreis der Entzündungszellen stark aufgelockert (Abb. 12).

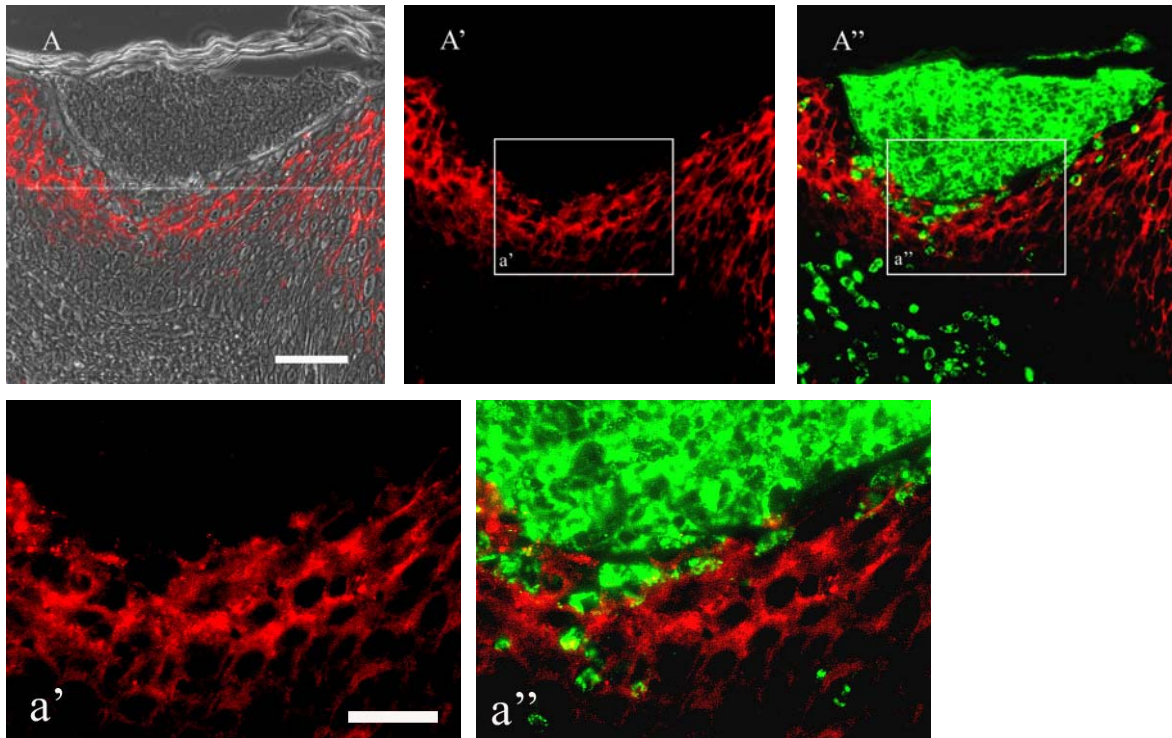


Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 1 und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Claudin 1 (rot); **A''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 1 (rot) und CD15 (grün); **a'** und **a''** sind Vergrößerungen aus **A'** und **A''**; **A-A''** Verlust und Auflockerung der Färbung für Claudin 1 (rot) in basalen Abschnitten der Epidermis und in der Umgebung von einwandernden, neutrophilen Granulozyten (grün); **A''** zentral zeigt sich eine Pustel mit neutrophilen Granulozyten (grün); **a'** und **a''** sind Vergrößerungen aus **A'** und **A''** und demonstrieren die Herabregulation von Claudin 1 (rot) während der Entzündungszellinfiltration; (Maßstab-Balken: 50 µm)

4.2.2. Claudin 4 und CD43 bzw. CD15

In der gesunden Haut wird Claudin 4 in mehreren suprabasalen Schichten exprimiert (Abb. 13).

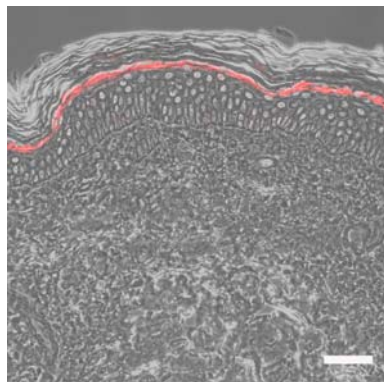


Abbildung 13: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 4 in gesunder menschlicher Haut.

Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 4 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); Claudin 4 ist in mehreren suprabasalen Epidermisschichten lokalisiert; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Frühform der Psoriasis

Bei der Frühform zeigte sich eine verbreiterte Lokalisation von Claudin 4 im verdickten *Stratum spinosum*. Dabei war die Färbung auf wenige Zelllagen der oberen Spinosuszelleschicht beschränkt. Zusätzlich konnte in den oberen Bereichen des *Stratum spinosum* eine Verlagerung der Färbung für Claudin 4 von den Zell-Zell-Grenzen in das Zytoplasma beobachtet werden. Das *Stratum granulosum* war schmal und fragmentarisch. Es zeigte oft eine weniger intensive Färbung für Claudin 4 im Vergleich zum oberen Teil des *Stratum spinosum* (Tab. 3; Abb. 14 und 15).

Claudin 4	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben		Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	0	0	0		+++	0
FP 1	0	0	+	*	++	0
FP 2	0	++	+(+)	*	+(+)	0
FP 3	0	0	++	*	+(+)	0
FP 4	0	0	++	*	++	0
FP 5	0	0	+	*	+	0

Tabelle 3

Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 4 in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis (FP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+) stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ, * zytoplasmatische Lokalisation vorhanden]

Die epitheliale Infiltration von CD43-positiven Zellen führte in den oberen Abschnitten des *Stratum spinosum* zu einer erkennbaren Herabregulation und Kontinuitätsunterbrechung der verbreiterten Färbung für Claudin 4. Lateral der infiltrierenden Zellen blieb die Färbung für Claudin 4 durchgehend und verbreitert (Abb. 14).

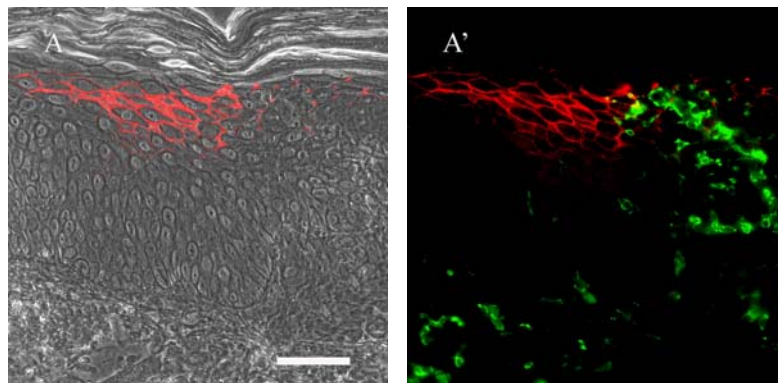


Abbildung 14: Immunfluoreszenz -Lokalisation von Claudin 4 und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 4 (rot) und des Phasekontrastbilds (grau); **A'** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 4 (rot) und CD43 (grün); **A** und **A'** zeigen die Unterbrechung der zum Teil verbreiterten Expression von Claudin 4 (rot) während der Infiltration von CD43-positiven Zellen (grün); (Maßstab-Balken: 50 µm)

Speziell in der Umgebung von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) konnte eine Herabregulation und Unterbrechung der Färbung für Claudin 4 lateral und basal der einwandernden Zellen beobachtet werden (Abb. 15 A und A'). Basal von Pusteln mit einem Infiltrat an neutrophilen Granulozyten war Claudin 4 deutlich schwächer angefärbt und überwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 15 B und B').

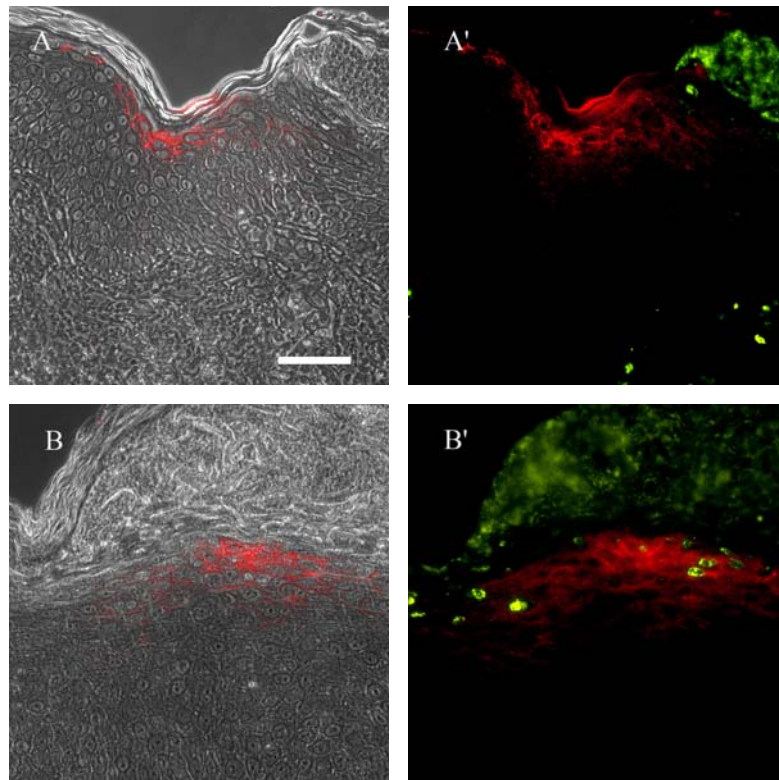


Abbildung 15: Immunfluoreszenz -Lokalisation von Claudin 4 und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A und **B** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 4 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** und **B'** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 4 (rot) und CD15 (grün); **A** und **A'** zeigen eine Pustel mit neutrophilen Granulozyten (grün), basal dieser Entzündungsansammlung zeigt sich eine deutliche Unterbrechung der zum Teil verbreiterten Expression von Claudin 4 (rot); **B** und **B'** zeigen eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation von Claudin 4 (rot) in oberen Schichten des Stratum spinosum; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Psoriasis pustulosa

Bei der Psoriasis pustulosa zeigte sich eine verbreiterte Lokalisation von Claudin 4 in den oberen Abschnitten des akanthotischen *Stratum spinosum*. Die Färbung war in den meisten Fällen wenig intensiv und kontinuierlich. Des Weiteren konnte vorwiegend eine intrazelluläre Anfärbung von Claudin 4 in der Spinosuszellschicht beobachtet werden (Tab. 4; Abb. 16 und 17).

Ergebnisse

Claudin 4	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben		Stratum granulosum		Stratum corneum
gesunde Haut	0	0	0		+++		0
PP 1	0	0	+	*	++	*	0
PP 2	0	0	+(+)	*	+	*	0
PP 3	0	0	+(+)	*	+	*	0
PP 4	0	0	+	*	+	*	0
PP 5	0	0	+	*	+	*	0

Tabelle 4 Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 4 in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa (PP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+ stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ, * zytoplasmatische Lokalisation vorhanden]

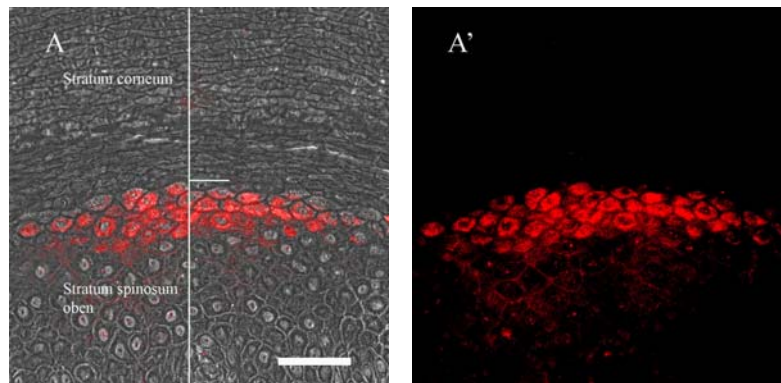


Abbildung 16: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 4 in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa ohne Entzündungszellinfiltration.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 4 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Claudin 4 (rot); **A** und **A'** zeigen eine verbreiterte Expression von Claudin 4 (rot) bis in obere Schichten des Stratum spinosum, dabei ist Claudin 4 im oberen Bereich vorwiegend zytoplasmatisch und basal zunehmend an den Zellgrenzen lokalisiert; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Entlang der Infiltrationsstrecke von CD43-positiven Zellen zeigte sich eine Intensitätsminderung innerhalb der Färbung für Claudin 4 (Daten nicht gezeigt). Besonders basal intracorneal gelegener Pusteln mit neutrophilen Granulozyten (CD15-positiv) konnte eine deutliche Unterbrechung der Färbung für Claudin 4 beobachtet werden (Abb. 17).

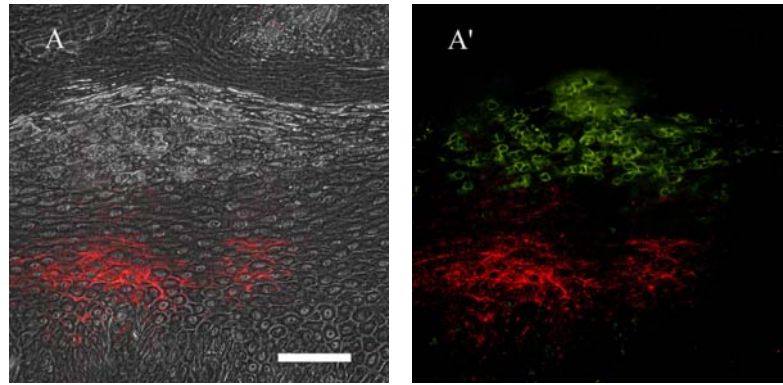


Abbildung 17: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 4 und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 4 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Überlagerung Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 4 (rot) und CD15 (grün); **A** und **A'** zeigen eine deutliche Unterbrechung der zum Teil verbreiterten Expression von Claudin 4 (rot) basal einer intracorneal gelegenen Pustel mit neutrophilen Granulozyten (grün); (Maßstab-Balken: 50 µm)

4.2.3. Claudin 7 und CD43 bzw. CD15

In gesunder Haut wird Claudin 7 von allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert, wobei die basalen Abschnitte deutlich weniger intensiv angefärbt sind (Abb. 18).

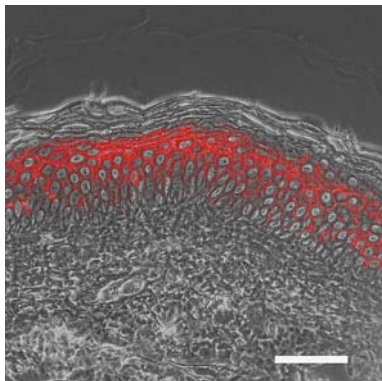


Abbildung 18: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 7 in gesunder menschlicher Haut.

Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 7 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); Claudin 7 wird in allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert, mit einer deutlich intensiveren Färbung in den oberen Epidermisschichten; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Frühform der Psoriasis

In der Frühform der Psoriasis zeigte sich besonders in den unteren Epidermisschichten ein Verlust von Claudin 7. Im *Stratum spinosum* präsentierte sich das Protein in unterschiedlicher Intensität. Dabei waren die oberen Schichten der Spinosuszellschicht deutlich intensiver für Claudin 7 angefärbt als die unteren Bereiche, in denen oft keine Färbung für Claudin 7 zu beobachten war. Die Färbung im oberen *Stratum spinosum* war ohne Entzündungszelleinstrom weitgehend kontinuierlich. Das *Stratum granulosum* war in den Präparaten verschmälert, in seiner Kontinuität unterbrochen und zeigte eine weniger intensive Färbung (Tab. 5; Abb. 19)

Ergebnisse

Claudin 7	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	0	++(+)	+++	+++	0
FP 1	0	0	+++	+(+)	0
FP 2	0	+(+)	++	+	0
FP 3	0	+	++	+	0
FP 4	0	0	++	+(+)	0
FP 5	0	+	++	+	0

Tabelle 5 Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 7 in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis (FP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+)
stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ,]

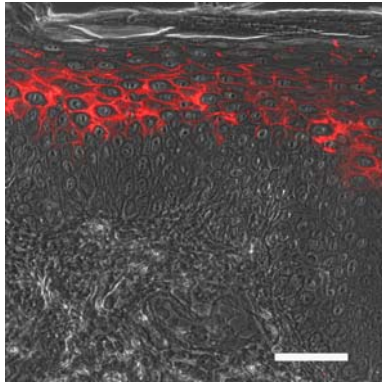


Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 7 bei einer Frühform der Psoriasis ohne Entzündungszellinfiltration.

Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 7 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); Claudin 7 ist besonders in den basalen Epidermisschicht herabreguliert; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Die Infiltration von CD43-positiven Zellen führte in dem jeweiligen Epidermisabschnitt zum sichtbaren Verlust der Immunlokalisierung von Claudin 7. Ein geringer Teil der epithelial einwandernden Entzündungszellen war sowohl für CD43 und als auch für Claudin 7 angefärbt (Abb. 20).

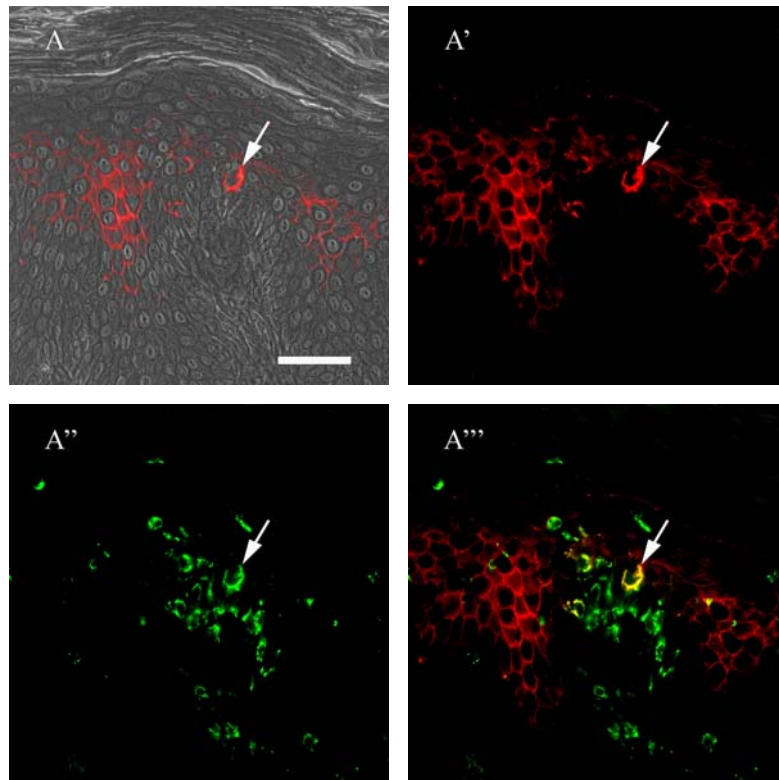


Abbildung 20: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 7 und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 7 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Claudin 7 (rot); **A''** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A'''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 7 (rot) und CD43 (grün); **A** und **A''** zeigen die Herabregulation von Claudin 7 (rot) bei der epithelialen Infiltration von CD43-positiven Zellen (grün); in **A-A'''** markiert der Pfeil eine Zelle, die in **A** und **A'** für Claudin 7 (rot) und in **A''** für CD43 (grün) positiv ist; **A'''** zeigt die Kolokalisation beider Antikörper in gelb; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Bei genauer Untersuchung erschien besonders in der Umgebung von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) die Färbung für Claudin 7 unvollständig. Basal epithelialer Pusteln mit neutrophilen Granulozyten blieb die Färbung für Claudin 7 lückenhaft (Abb. 21). Die für Claudin 7 positiven Entzündungszellen waren nicht CD15 positiv.

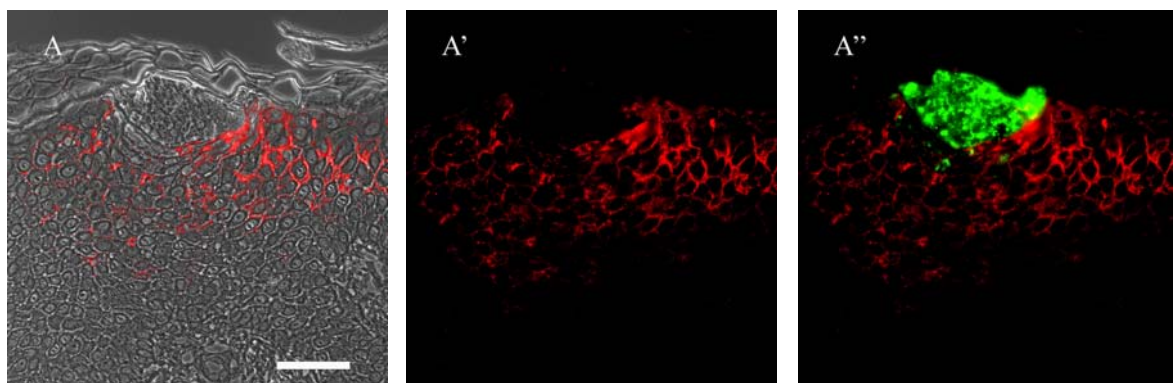


Abbildung 21: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 7 und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 7 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Claudin 7 (rot); **A''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 7 (rot) und CD15 (grün); **A-A''** zeigen den Verlust von Claudin 7 (rot) in weiten Teilen der Epidermis; besonders basal einer kleinen epithelialen Pustel mit neutrophilen Granulozyten (grün) erschien Claudin 7 (rot) lückenhaft; (Maßstab-Balken: 50µm)

Psoriasis pustulosa

In der Psoriasis pustulosa war in großen Bereichen der Epidermis eine Herabregulation der Färbung für Claudin 7 zu verzeichnen. Die unteren Schichten der Epidermis waren für Claudin 7 negativ. Erst in den oberen Bereichen des *Stratum spinosum* zeigte sich eine diskrete Anfärbung für Claudin 7. Diese war in den einzelnen Zellschichten sehr lückenhaft und wenig intensiv. In den oberen Epidermisschichten war vorwiegend eine zytoplasmatische Anfärbung von Claudin 7 zu erkennen (Tab. 6; Abb. 22 und 23).

Claudin 7	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben		Stratum granulosum		Stratum corneum
Gesunde Haut	0	++(+)	+++		+++		0
PP 1	0	0	++	*	+(+)	*	0
PP 2	0	0	++	*	+	*	0
PP 3	0	0	++	*	+	*	0
PP 4	0	0	+(+)	*	+(+)	*	0
PP 5	0	0	+(+)	*	+	*	0

Tabelle 6 Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 7 in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa (PP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+ stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ, * zytoplasmatische Lokalisation vorhanden]

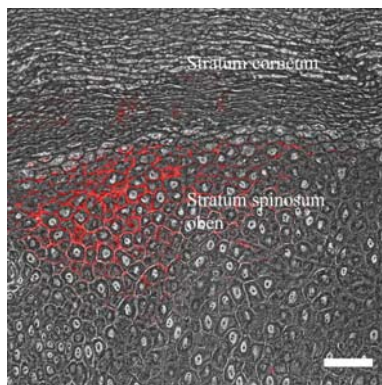


Abbildung 22: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 7 in der Psoriasis pustulosa ohne Entzündungszellinfiltration. Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 7 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); Claudin 7 wird nur in oberen Epidermisschichten exprimiert; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Bei der Infiltration von CD43- und CD15-positiven Zellen konnte in deren Umgebung eine Intensitätsminderung und eine Diskontinuität in der Färbung für Claudin 7 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ein Teil der epithelial einwandernden Entzündungszellen zeigte eine positive Färbung für CD43 und Claudin 7 (Abb. 23). Neutrophile Granulozyten waren nicht für Claudin 7 positiv.

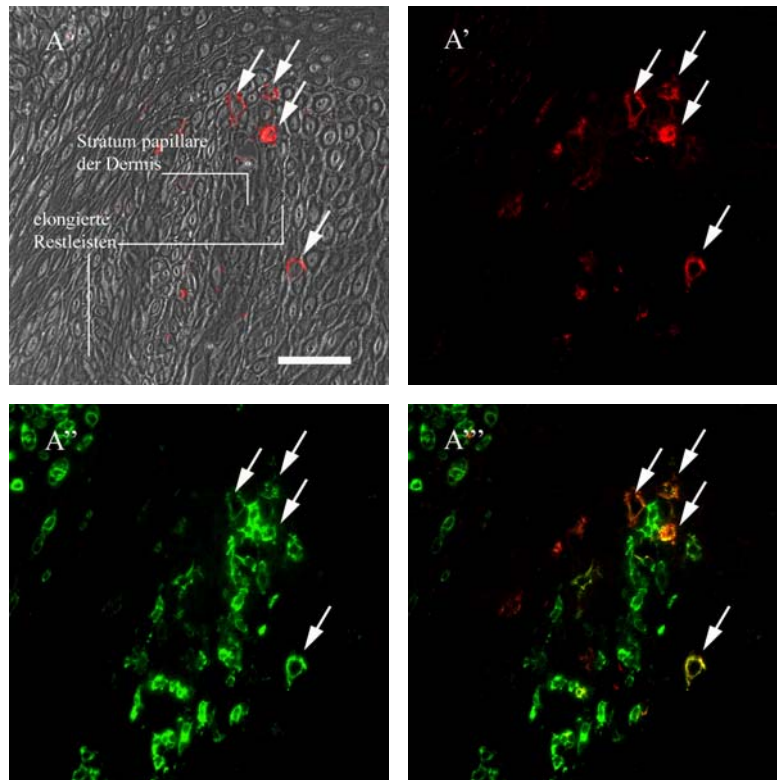


Abbildung 23: Kolokalisation von Claudin 7 und CD43 auf der Oberfläche von Entzündungszellen in menschlicher Haut bei Psoriasis pustulosa; Detailbild mit Ansicht zwischen elongierten Reteleisten.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 7 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Claudin 7 (rot); **A''** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A'''** Überlagerungen der Immunfluoreszenzfärbungen für Claudin 7 (rot) und CD43 (grün); **A-A'''** Pfeile markieren epitethial einwandernde Entzündungszellen, die in **A** und **A'** für Claudin 7 (rot) und in **A''** für CD43 (grün) positiv; **A'''** zeigt die Kolokalisation beider Antikörper in gelb; (Maßstab-Balken: 50 µm)

4.2.4. JAM-A und CD43 bzw. CD15

In gesunder Haut wird JAM-A von allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert (Abb. 24).

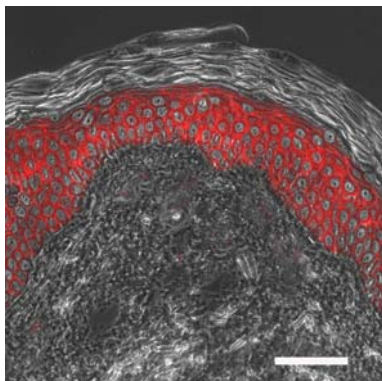


Abbildung 24: Immunfluoreszenz-Lokalisation von JAM-A in gesunder menschlicher Haut.

Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für JAM-A (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); JAM-A wird in allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Frühform der Psoriasis

Die immunhistochemische Färbung für JAM-A war in der Frühform der Psoriasis nur in den basalen Abschnitten der Epidermis leicht vermindert. Ohne die Infiltration von Entzündungszellen zeigte sich die Immunlokalisation von JAM-A weitgehend kontinuierlich. Das *Stratum granulosum* war in den Präparaten verschmälert und in seiner Kontinuität unterbrochen. Es zeigte meist eine weniger intensive Färbung als der obere Anteil der Spinosuszellschicht (Tab. 7; Abb. 25 und 26).

JAM-A	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	+++	+++	+++	+++	0
FP 1	++	++(+)	++	++	0
FP 2	++	++	++	++	0
FP 3	++	++(+)	++	+(+)	0
FP 4	++(+)	++(+)	++	++	0
FP 5	++	++	++(+)	+	0

Tabelle 7 Intensität der immunhistochemischen Färbung von JAM-A in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis (FP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+) stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ.]

Die epiteliale Einwanderung von CD43-positiven Zellen zeigte keine sichtbare Herabregulation von JAM-A, da die meisten der epithelialen und dermalen gelegenen CD43-positiven Zellen zusätzlich für JAM-A angefärbt waren (Abb. 25).

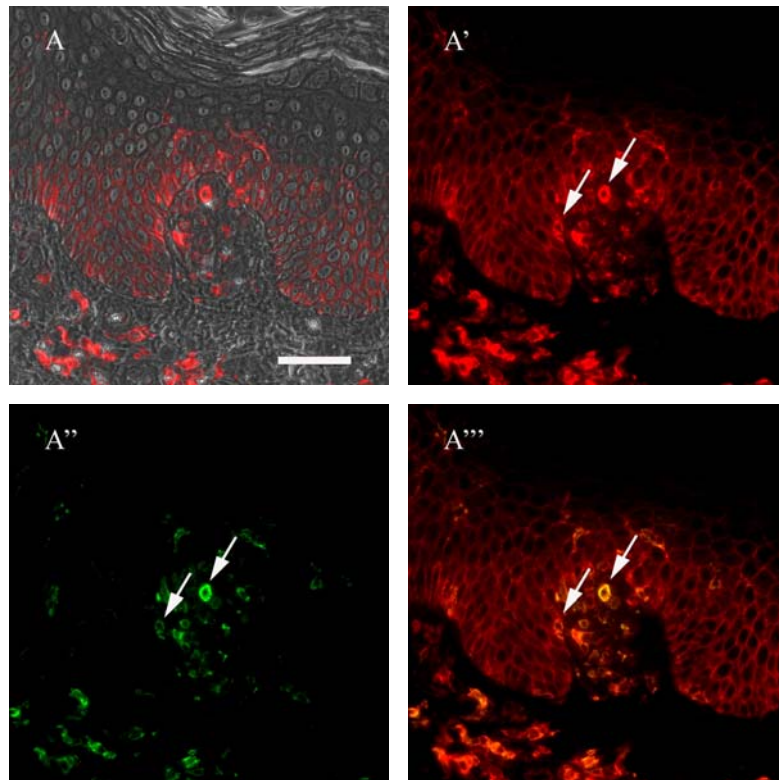


Abbildung 25: Kolokalisation von JAM-A und CD43 auf der Oberfläche von Entzündungszellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für JAM-A (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für JAM-A (rot); **A''** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A'''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für JAM-A (rot) und CD43 (grün); **A** und **A'** zeigen die Intensitätsminderung von JAM-A (rot) in oberen Abschnitten des Stratum spinosum, mittlere und untere Epidermisschichten zeigen dagegen kaum ein Verlust von JAM-A; Pfeile in **A'-A'''** markieren einige Entzündungszellen in Epidermis und Dermis, die in **A'** für JAM-A (rot) und in **A''** CD43 (grün) positiv sind; **A'''** zeigt die Kolokalisation beider Antikörper in gelb; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Basal epithelial oder intracorneal gelegener Pusteln mit neutrophilen Granulozyten zeigte sich eine Intensitätsminderung in der Färbung für JAM-A. Zusätzlich waren in der Dermis einzelne Zellen für JAM-A, jedoch nicht für CD15 positiv (Abb. 26).

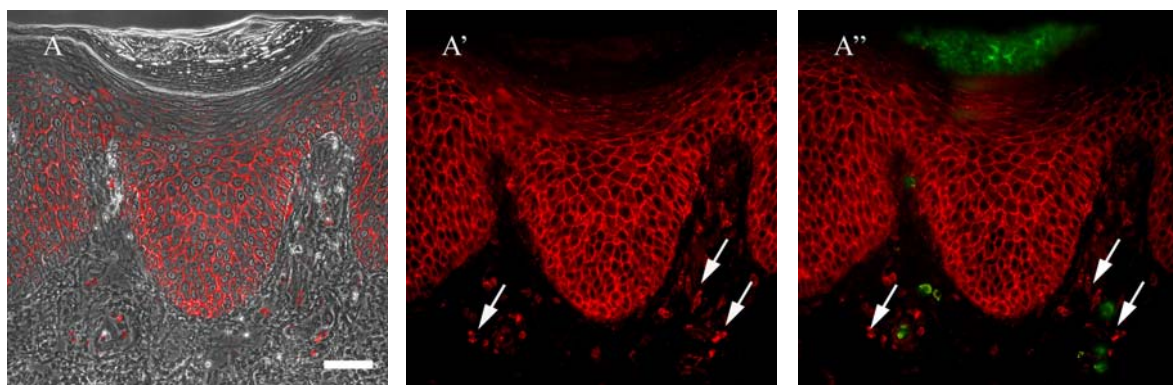


Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Lokalisation von JAM-A und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für JAM-A (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für JAM-A (rot); **A''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für JAM-A (rot) und CD15 (grün); **A-A''** ohne die Infiltration von Entzündungszellen zeigt sich eine nahezu kontinuierlich Anfärbung für JAM-A (rot) in allen Epidermisschichten; **A''** basal einer Pustel mit neutrophilen Granulozyten (grün) zeigt sich jedoch eine leichte Verminderung der JAM-A Färbung (rot); Pfeile in **A'** und **A''** zeigen einzelne Zellen in der Dermis, die für JAM-A (rot), jedoch nicht für CD15 (grün) positiv sind; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Psoriasis Postulosa

In der Psoriasis pustulosa war die immunhistochemische Färbung für JAM-A ohne die Infiltration von Entzündungszellen weitgehend kontinuierlich und zeigte lediglich in den basalen Abschnitten eine leichte Intensitätsminderung. Das *Stratum granulosum* stellte sich verschmälert und fragmentarische dar und war zum Teil weniger intensiv für JAM-A angefärbt als der obere Teil des *Stratum spinosum* (Tab. 8; Abb. 27 und 28).

JAM-A	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	+++	+++	+++	+++	0
PP 1	++	++	++(+)	++	0
PP 2	++	++	++	-	0
PP 3	++	++(+)	++(+)	-	0
PP 4	++	++	++(+)	++	0
PP 5	++	++(+)	++(+)	+	0

Tabelle 8 Intensität der immunhistochemischen Färbung von JAM-A in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa (PP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+) stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

Bei der Einwanderung von CD43-positiven Zellen konnte keine eindeutige Herabregulation der JAM-A Färbung beobachtet werden, da ein Teil der epithelial gelegenen Entzündungszellen sowohl für CD43 und als auch für JAM-A positiv war (Abb. 27).

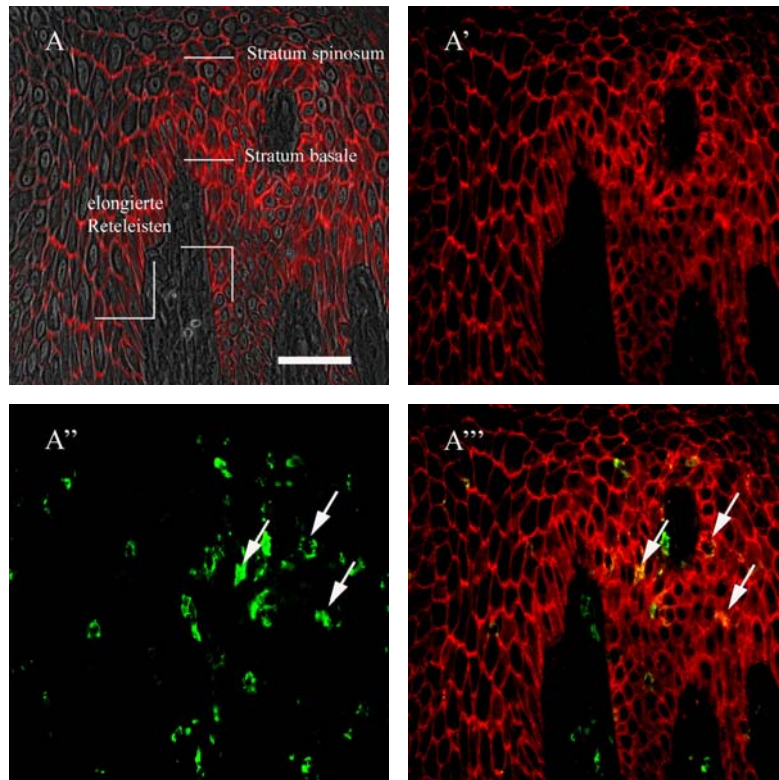


Abbildung 27: Kolokalisation von JAM-A und CD43 auf der Oberfläche von Entzündungszellen in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa (Ansicht auf elongierte Reteleisten).

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für JAM-A (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für JAM-A (rot); **A''** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A'''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für JAM-A (rot) und CD43 (grün); **A, A''** und **A'''** zeigen in basalen Epidermisabschnitten eine gleichmäßige Anfärbung für JAM-A (rot); Pfeile markieren Zellen, die in **A'** für JAM-A (rot) und in **A''** für CD43 (grün) positiv sind; **A'''** zeigt die Kolokalisation beider Antikörper in gelb; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Bei genauer Bestimmung der Infiltration von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) zeigte sich eine Intensitätsminderung in der JAM-A-Färbung der Epidermis. Besonders basal epithelial und corneal gelegener Pusteln mit Neutrophilen kam es zur Unterbrechung in der JAM-A Färbung (Abb. 28).

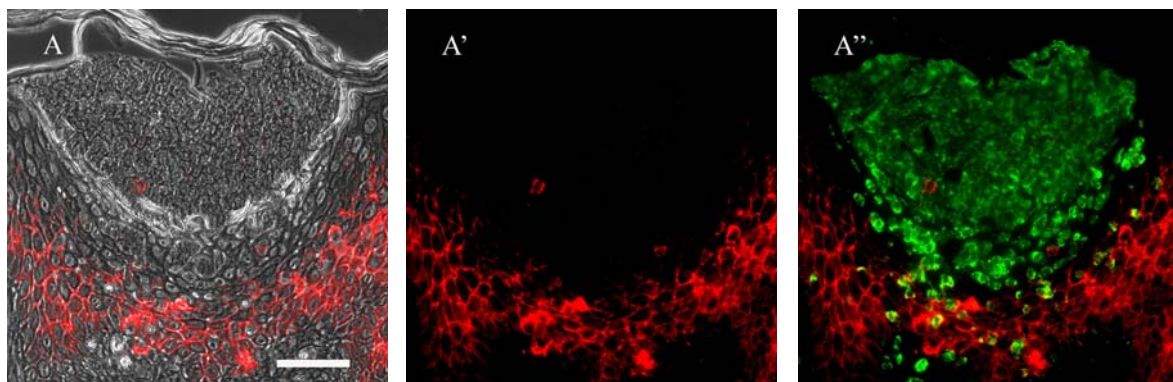


Abbildung 28: Immunfluoreszenz-Lokalisation von JAM-A und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für JAM-A (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für JAM-A (rot); **A''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für JAM-A (rot) und CD15 (grün); **A-A''** zeigen eine Auflockerung und Kontinuitätsunterbrechung der JAM-A Färbung (rot) bei der epithelialen Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (grün); **A''** zentral im Bild zeigt sich eine Pustel mit neutrophilen Granulozyten (grün); (Maßstab-Balken: 50 µm)

4.2.5. Protein ZO-1 und CD43 bzw. CD15

In der gesunden Haut wird das Protein ZO-1 in mehreren suprabasalen Epidermisschichten gefunden (Abb. 29).

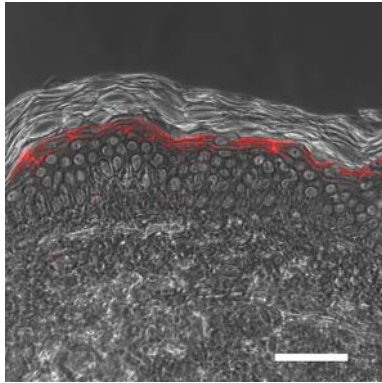


Abbildung 29 : Immunfluoreszenz-Lokalisation von ZO-1 in gesunder menschlicher Haut.
Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für ZO-1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); das Protein ZO-1 ist im Stratum granulosum und in den obersten Schichten des Stratum spinosum lokalisiert; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Frühform der Psoriasis

In allen untersuchten Präparaten der Frühform der Psoriasis zeigten sich ZO-1-Epitope in mehreren Schichten des verdickten *Stratum spinosum*. Dabei nahm die Färbung in den unteren Anteilen der Spinosuszelleschicht im Vergleich zu höher gelegenen Epidermisabschnitten ab. Das *Stratum granulosum* war in den Präparaten verschmälert und in seiner Kontinuität unterbrochen und zeigte eine weniger intensive Färbung als der obere Anteil der Spinosuszellschicht (Tab. 9; Abb. 30).

ZO-1	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	0	0	+(+)	+++	0
FP 1	0	++	++(+)	++	0
FP 2	0	+(+)	++	++	0
FP 3	0	++	+++	++	0
FP 4	0	++	++	++	0
FP 5	0	0	++	+	0

Tabelle 9 Intensität der immunhistochemischen Färbung von Protein ZO-1 in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis (FP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+ stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

Die transepitheliale Migration der CD43-positiven Zellen ließ das verbreiterte Expressionsmuster des Proteins ZO-1 in der Epidermis lückenhaft und unterbrochen erscheinen (Abb. 30 A-A''). Speziell bei der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) konnte eine Herabregulation von ZO-1 verzeichnet werden (Abb. 30 B-B'').

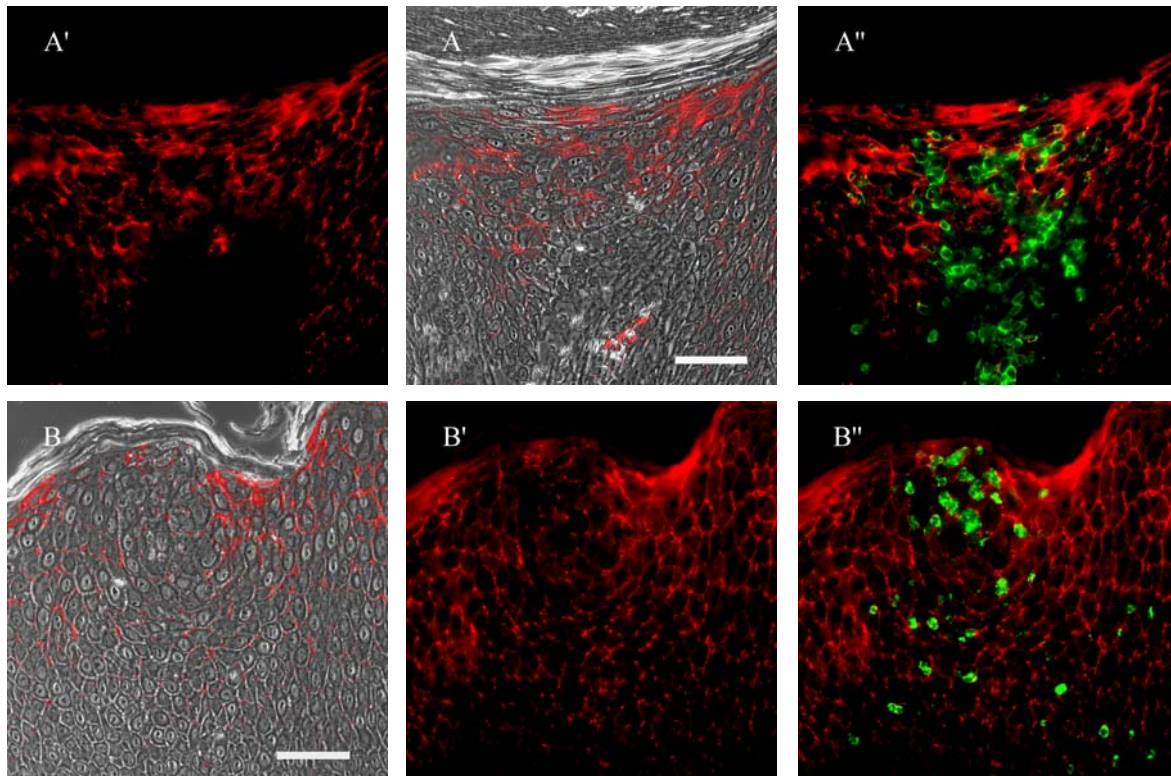


Abbildung 30: Immunfluoreszenz-Lokalisation von ZO-1 und CD43- bzw. CD15-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A und **B** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für ZO-1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** und **B'** Immunfluoreszenzfärbung für ZO-1 (rot); **A''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für ZO-1 (rot) und CD43 (grün); **B''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für ZO-1 (rot) und CD15 (grün); **A-A''** Unterbrechung des verbreiterten Expressionsmusters von ZO-1 (rot) in der Umgebung von epithelial einwandernden CD43-positiver Zellen (grün); **B-B''** Unterbrechung des verbreiterten Expressionsmusters von ZO-1 (rot) in der Umgebung von epithelial einwandernden neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) (grün); (Maßstab-Balken: 50 µm)

Psoriasis pustulosa

In der Psoriasis pustulosa war ebenfalls eine Verbreiterung der Färbung des Protein ZO-1 nachzuweisen. In allen Fällen konnte neben der physiologischen Lokalisation eine zusätzlich Färbung im verbreiterten *Stratum spinosum* detektiert werden. Dabei war die Intensität der Färbung im *Stratum granulosum* und in den oberen Epidermisabschnitten deutlich stärker, als in den unteren Anteilen der Spinosuszellschichten (Tab. 10; Abb. 31).

ZO-1	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	0	0	+(+)	+++	0
FP 1	0	+(+)	++	+	0
FP 2	0	+(+)	++	+	0
FP 3	0	++	++(+)	+	0
FP 4	0	+	+++	++	0
FP 5	0	+(+)	++	+	0

Tabelle 10 Intensität der immunhistochemischen Färbung von Protein ZO-1 in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa (PP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+ stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

Bei der transepithelialen Migration von CD43-positiven Zellen zeigte sich ein Verlust der Färbung für ZO-1. Das verbreiterte Expressionsmuster des Protein ZO-1 wirkte z.T. lückenhaft und durch den Einstrom der Zellen unterbrochen (Abb. 31 A-A''). Speziell in der Umgebung einwandernder neutrophiler Granulozyten (CD15 positiv) war eine Herabregulation innerhalb des verbreiterten Expressionsmusters von ZO-1 zu beobachten. Besonders basal und lateral großer epithelialer und cornealer Pusteln mit einem massiven Infiltrat an Neutrophilen kam es zur Unterbrechung innerhalb der Färbung für ZO-1 (Abb. 31 B-B'').

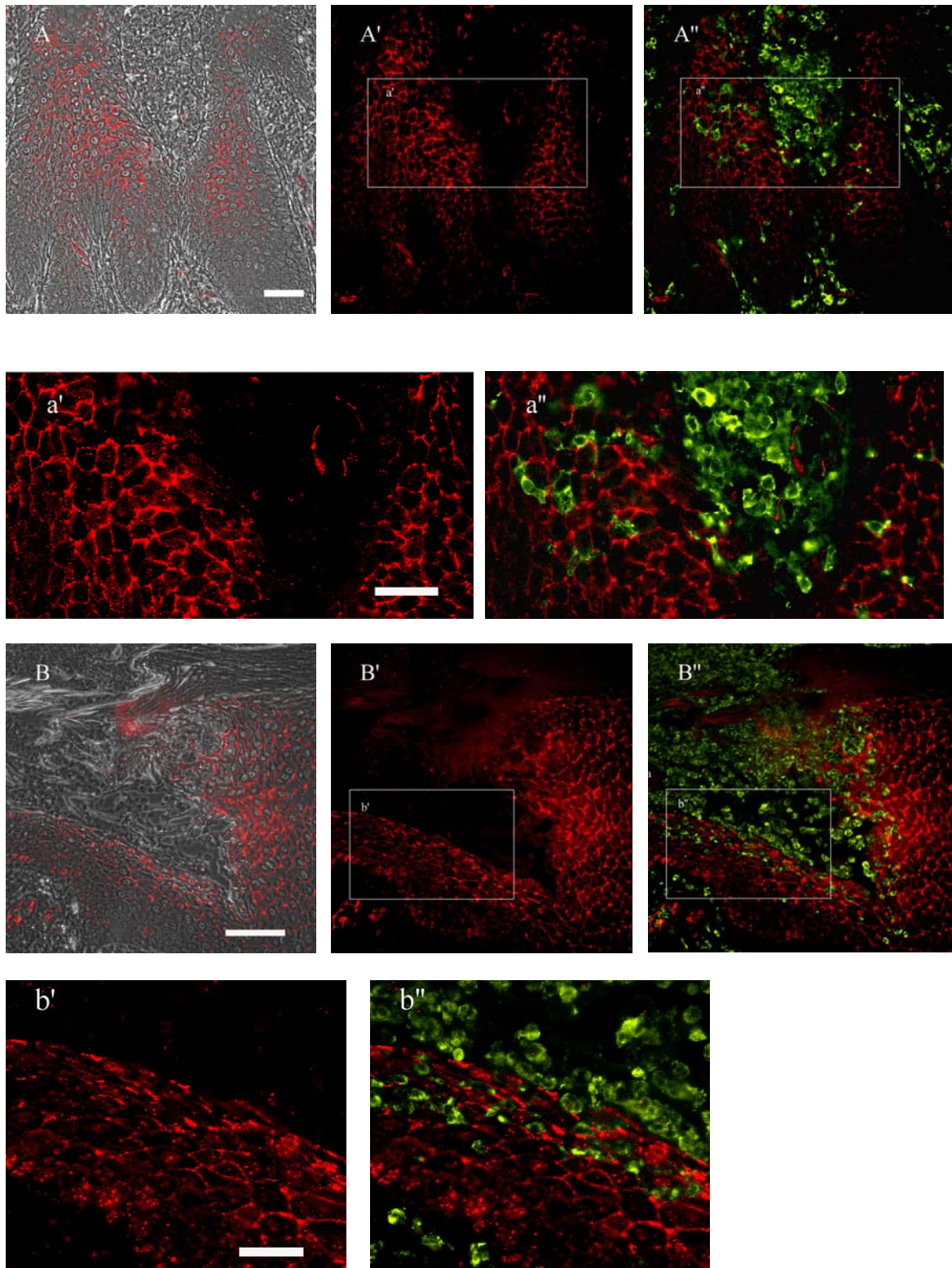


Abbildung 31: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Protein ZO-1 und CD43- bzw. CD15-positiven Zellen in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für ZO-1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für ZO-1 (rot); **A''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für ZO-1 (rot) und CD43 (grün); **A-A''** im Bereich von ausgezogene Rechtecke führt die epitheliale Infiltration von CD43-positiven Zellen (grün) zu einer leichten Herabregulation der verbreiterten Färbung für das Protein ZO-1 (rot); **a'** und **a''** zeigen Vergrößerungen aus **A'** und **A''**; (Maßstab-Balken: 50 µm).

B Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für ZO-1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **B'** Immunfluoreszenzfärbung für ZO-1 (rot); **B''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für ZO-1 (rot) und CD15 (grün), **B'- B''** zeigen eine Ausschnitt aus einer epithelialen Pustel mit neutrophilen Granulozyten (grün), hierbei führt die Infiltration von CD15-positiven Zellen (neutrophilen Granulozyten) (grün) zu einer Herabregulation der verbreiterten Färbung für das Protein ZO-1 (rot); (Maßstab-Balken: 50 µm)

4.3. Immunlokalisation von Proteinen der Adhärensverbindungen bei der Psoriasis

Zur Überprüfung, ob die beobachteten Herabregulation bzw. Veränderungen der TJ-assoziierten Proteine eine TJ-spezifische Erscheinung ist oder ob dies auch bei anderen Zell-Zell-Verbindungsproteinen gefunden wird, haben wir exemplarisch die AJ-Proteine E-Cadherin und β -Catenin bezüglich ihrer Verteilung in der psoriatischen Haut (Frühform und Psoriasis pustulosa) und in Gegenwart von Entzündungszellen untersucht.

4.3.1. E-Cadherin und CD43 bzw. CD15

E-Cadherin wird in allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert (Abb. 32).

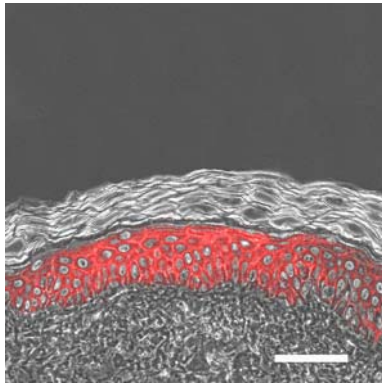


Abbildung 32: Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin in gesunder Haut.

Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für E-Cadherin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); E-Cadherin wird in allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert (Maßstab-Balken: 50 μ m)

Frühform der Psoriasis

In der Frühform der Psoriasis zeigte das Expressionsmuster von E-Cadherin kaum eine Veränderungen im Vergleich zur physiologischen Lokalisation des Proteins in der Haut. Ohne die Infiltration von Entzündungszellen war das Protein in weiten Bereichen der Epidermis mittel bis stark exprimiert (Tab. 11; Abb. 33).

Ergebnisse

E-Cadherin	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	+++	+++	+++	+++	0
FP 1	++	++(+)	++(+)	++(+)	0
FP 2	++	+++	+++	++	0
FP 3	++	+++	+++	++(+)	0
FP 4	++	+++	+++	++	0
FP 5	++	++(+)	++(+)	+	0

Tabelle 11 Intensität der immunhistochemischen Färbung von E-Cadherin in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis (FP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+) stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

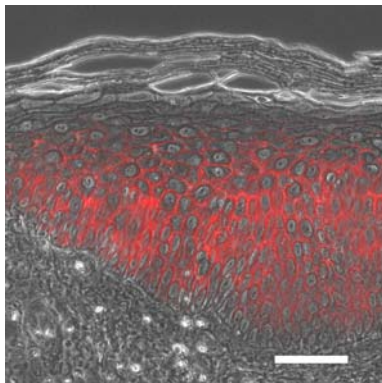


Abbildung 33: Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin in der Frühform der Psoriasis ohne Entzündungszellinfiltration. Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für E-Cadherin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); E-Cadherin ist im Stratum basale und im Stratum granulosum leicht herabreguliert; (Maßstab-Balken: 50 µm)

In der Umgebung von epithelial gelegenen CD43-positiven Zellen zeigte sich eine Herabregulation und Verminderung der Expression von E-Cadherin. Besonders in basalen Epidermisabschnitten konnte teilweise eine vollständige Unterbrechung der E-Cadherin-Färbung in der Umgebung von CD43-positiven Zellen erkannt werden (Abb. 34). Allerdings ist die Aussagekraft dieser Färbungen eingeschränkt, da jeweils einzeln in Folgeschnitten immunhistochemisch angefärbt werden musste, da die Primärantikörper aus der gleichen Tierspezies stammten.

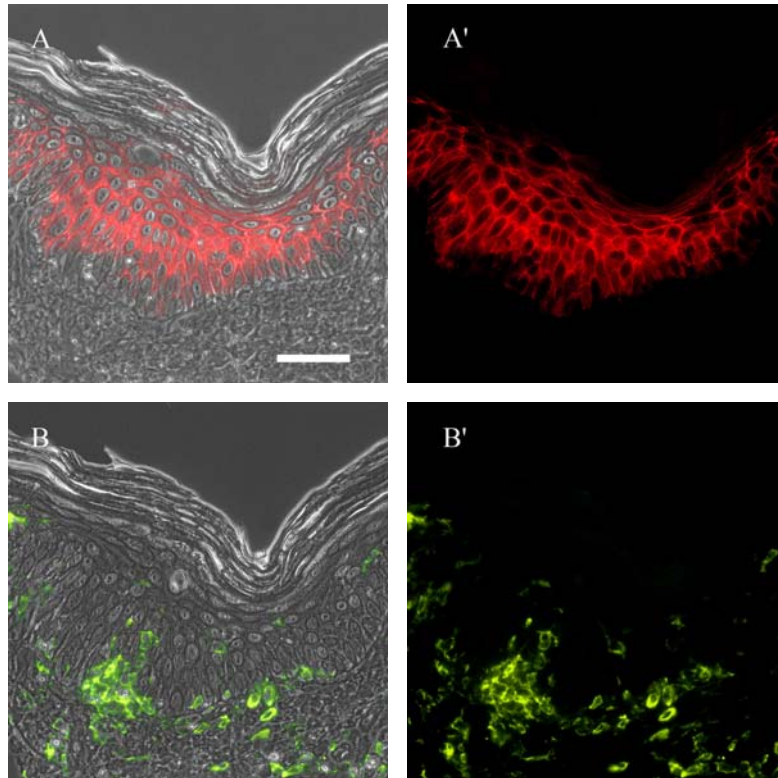


Abbildung 34: Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin und CD43-positiven Zellen in menschlichen Haut bei einer frühen Form der Psoriasis (Einzelfärbung im Folgeschnitt).

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für E-Cadherin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für E-Cadherin (rot); **B** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD43 (grün) und des Phasenkontrastbilds (grau); **B'** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A** und **A'** zeigen eine Herabregulation von E-Cadherin (rot) im Stratum basale und in den unteren Spinosuszellschichten; **B** und **B'** zeigen die entsprechend epithelial infiltrierenden CD43-positiven Zellen (grün) im Epidermisbereich mit einer deutlichen Herabregulation von E-Cadherin (rot); (Maßstab-Balken: 50 µm)

In der Umgebung von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) konnte eine aufgelockerte und weniger intensive Färbung für E-Cadherin beobachtet werden. Besonders basal kleiner epithelialer Pusteln mit Neutrophilen war die Färbung für das Protein lückenhaft und unterbrochen (Abb. 35).

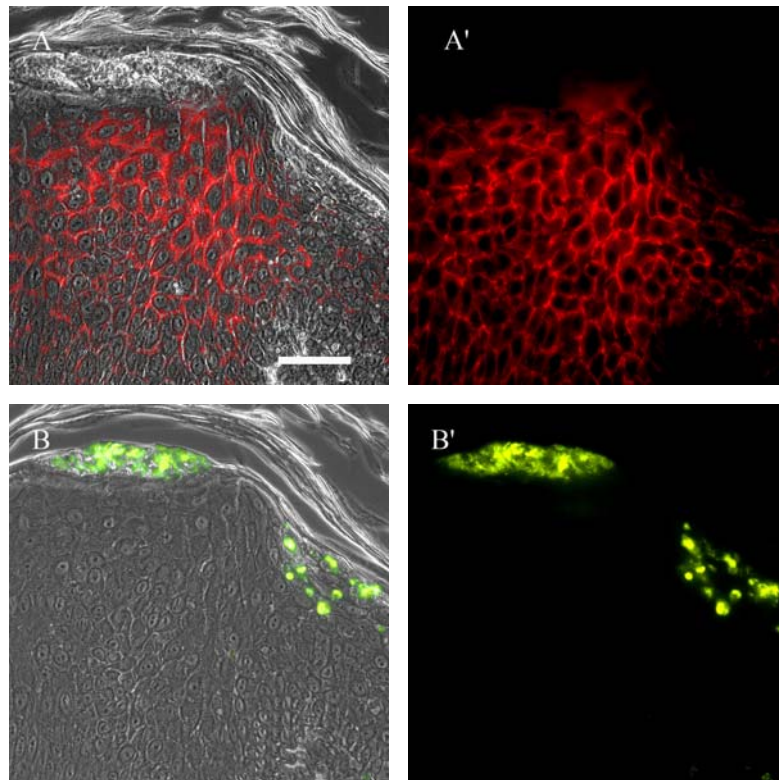


Abbildung 35: Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis (Einzelfärbung im Folgeschnitt).

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für E-Cadherin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für E-Cadherin (rot); **B** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD15 (grün) und des Phasenkontrastbilds (grau); **B'** Immunfluoreszenzfärbung für CD15 (grün), **A** und **A'** zeigen eine weitgehend kontinuierliche Färbung für E-Cadherin (rot) in der Epidermis; in einigen oberen Epidermisbereichen erscheint E-Cadherin (rot) jedoch weniger intensiv und z.T. unterbrochen; **B** und **B'** zeigen zwei kleine epitheliale Pusteln mit neutrophilen Granulozyten (CD15) (grün), die in dem Bereich mit einer weniger intensiven bzw. unterbrochenen Färbung für E-Cadherin liegen; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Psoriasis pustulosa

Das Expressionsmuster von E-Cadherin zeigte in der Psoriasis pustulosa ohne die Infiltration von Entzündungszellen eine weitgehend konstante und einheitliche Färbung. In vielen Epidermisabschnitten der untersuchten Präparate wurde das Protein mittel bis stark exprimiert (Tab. 12; Abb. 36 und 37).

In der Umgebung von epithelial gelegenen CD43-positiven Zellen zeigte sich eine Intensitätsminderung der E-Cadherin Färbung im Vergleich zu Epidermisschichten ohne CD43-positive Zellen. In einigen Epidermisabschnitten konnte ein vollständiger Verlust der E-Cadherin Färbung beobachtet werden (Abb. 36).

Ergebnisse

E-Cadherin	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	+++	+++	+++	+++	0
PP 1	++(+)	++(+)	++(+)	++	0
PP 2	++(+)	++	++	++	0
PP 3	++	++	+(+)	++	0
PP 4	+(+)	++	++	+(+)	0
PP 5	++	++	++	+	0

Tabelle 12 Intensität der immunhistochemischen Färbung von E-Cadherin in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa (PP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+ stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

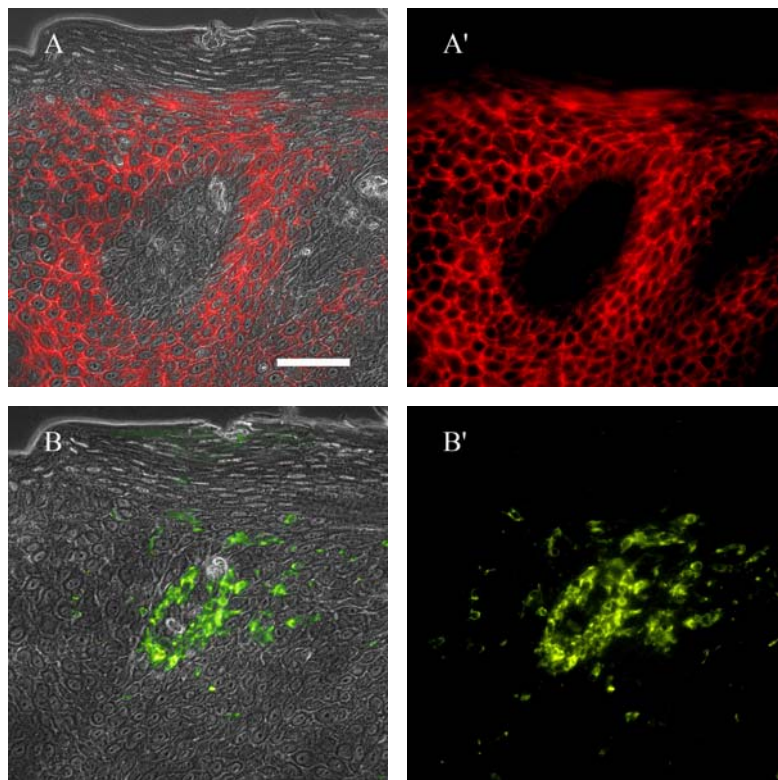


Abbildung 36: Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin und CD43-positiven Zellen in der menschlichen Haut bei der Psoriasis pustulosa (Einzelfärbung im Folgeschnitt).

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für E-Cadherin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für E-Cadherin (rot); **B** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD43 (grün) und des Phasenkontrastbilds (grau); **B'** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A** und **A'** zeigen eine weitgehend kontinuierliche Färbung für E-Cadherin (rot) in der Epidermis mit einem umschriebenen Verlust der Färbung in der Präparatmitte (Stratum spinosum); **B** und **B'** zeigen eine Ansammlung von CD43-positiven Entzündungszellen (grün), die in dem Epidermisabschnitt mit einer unterbrochenen E-Cadherin lokalisiert sind; (Maßstab-Balken: 50 µm)

In der Umgebung von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) zeigte sich besonders basal und lateral epithelialer Pusteln ein unterbrochenes und weniger intensives Expressionsmuster für E-Cadherin (Abb. 37).

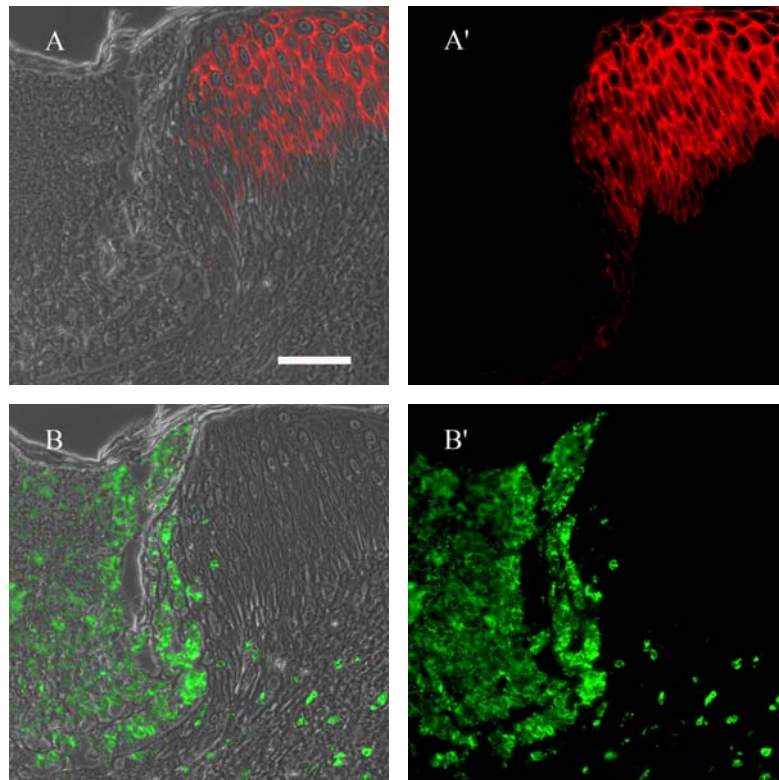


Abbildung 37: Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin und neutrophilen Granulozyten in der menschlichen Haut bei der Psoriasis pustulosa (Einzelfärbung im Folgeschnitt).

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für E-Cadherin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für E-Cadherin (rot); **B** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD15 (grün) und des Phasenkontrastbilds (grau); **B'** Immunfluoreszenzfärbung für CD15 (grün)

A und **A'** zeigen die Färbung für E-Cadherin (rot), die vorwiegend im basalen und lateralen Bereich einer epithelialen Pustel unterbrochen erscheint; **B** und **B'** zeigen eine Ansammlung von neutrophilen Granulozyten (grün), die in dem Bereich mit einer lückenhaften E-Cadherin-Färbung lokalisiert sind; (Maßstab-Balken: 50 μ m)

4.3.2. β -Catenin und CD43 bzw. CD15

In der gesunden Haut wird β -Catenin von allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert (Abb. 38).

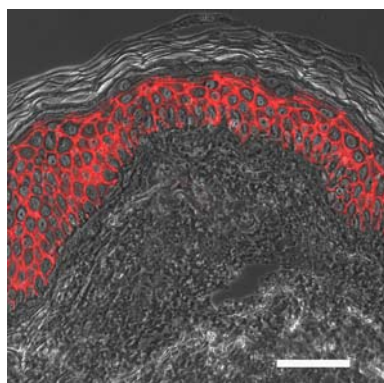


Abbildung 38: Immunfluoreszenz-Lokalisation von β -Catenin in gesunder menschlicher Haut.

Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für β -Catenin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); β -Catenin wird in allen lebenden Schichten der Epidermis exprimiert (Maßstab-Balken: 50 μ m)

Frühform der Psoriasis

Die immunhistochemische Färbung für β -Catenin war ohne die Infiltration von Entzündungszellen weitgehend kontinuierlich und gleichmäßig. Im *Stratum basale* zeigte sich die Färbung im Vergleich zu den übrigen Abschnitten der Epidermis weniger intensiv. Das *Stratum granulosum* war in den Präparaten verschmälert und in seiner Kontinuität unterbrochen. Es zeigte oft eine weniger intensive Färbung als der obere Anteil der Spinosuszellschicht (Tab. 13; Abb. 39 und 40).

β -Catenin	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	+++	+++	+++	+++	0
FP 1	++	++(+)	+++	+++	0
FP 2	++	++(+)	+++	++	0
FP 3	++(+)	+++	+++	++(+)	0
FP 4	++(+)	+++	+++	++(+)	0
FP 5	++	++(+)	+++	+	0

Tabelle 13 Intensität der immunhistochemischen Färbung von β -Catenin in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis (FP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+) stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

Die transepitheliale Migration von CD43-positiven Zellen zeigte keine eindeutige Herabregulation der Färbung für β -Catenin, da ein Großteil der epithelialen und dermalen Zellen für CD43 und für β -Catenin positiv war. Im oberen Abschnitt der Epidermis zeigten die CD43-positiven Zellen jedoch keine Anfärbung für β -Catenin auf ihrer Zelloberfläche. In der Umgebung dieser Zellen präsentierte sich das Expressionsmuster von β -Catenin lückenhaft und unterbrochen (Abb. 39).

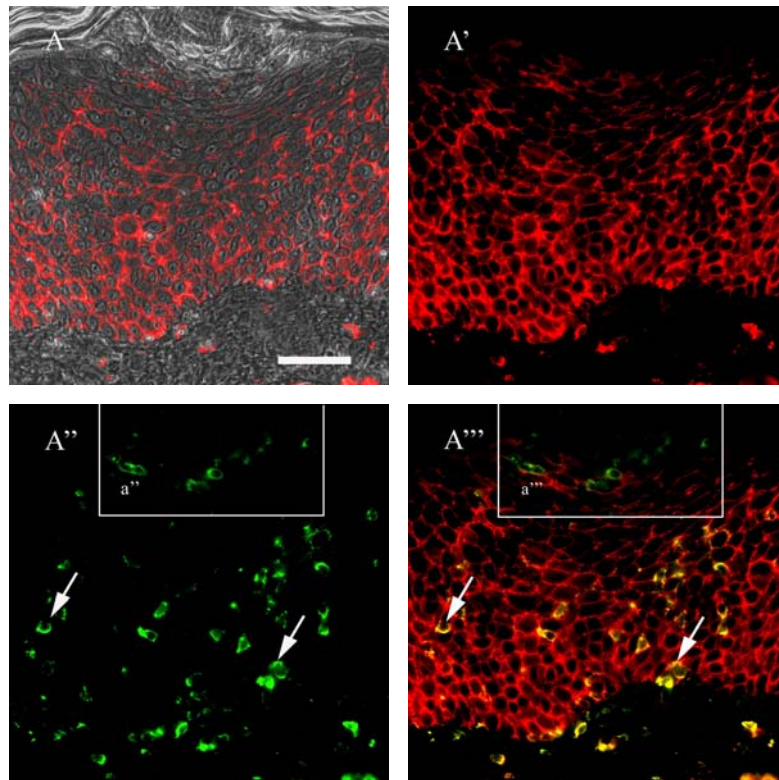


Abbildung 39: Immunfluoreszenz-Lokalisation von β -Catenin und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für β -Catenin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für β -Catenin (rot); **A''** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A'''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für β -Catenin (rot) und CD43 (grün); **A** und **A'** zeigen trotz der Entzündungszellinfiltration eine nahezu kontinuierliche Färbung von β -Catenin (rot) mit einer leichten Gefügelockerung im basalen Abschnitt der Epidermis und im oberen Stratum spinosum; weiterhin zeigen sich β -Catenin-positive Zellen (rot) in der Dermis und Epidermis; **A''** zeigt eine Anzahl an CD43-positiven Zellen (grün) in verschiedenen Abschnitten der Dermis und Epidermis (Pfeile markieren beispielhaft zwei Zellen); **A'''** zeigt eine Kolokalisation von beiden Antikörpern (β -Catenin (rot) und CD43 (grün)) in gelb; Bildausschnitt **a''** und **a'''** zeigen im oberen Bereich des Stratum spinosum CD43-positive Zellen (grün) ohne Kolokalisation mit β -Catenin (rot); die β -Catenin-Färbung ist in diesem Bereich deutlich unterbrochen; (Maßstab-Balken: 50 μ m)

Bei genauer Bestimmung von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) zeigte sich besonders basal kleiner epithelialer Pusteln eine Auflockerung der β -Catenin-Färbung. Die Immunlokalisation erschien durch den Einstrom der Entzündungszellen unterbrochen und lückenhaft (Abb. 40).

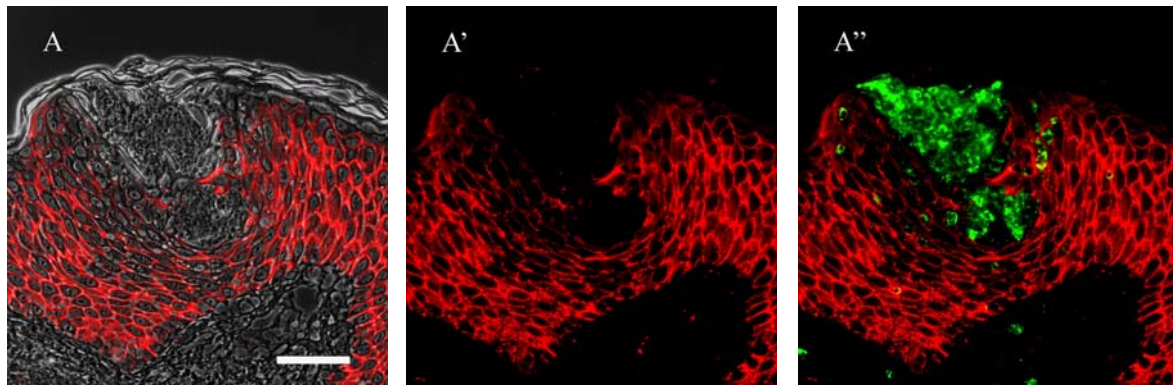


Abbildung 40: Immunfluoreszenz-Lokalisation von β -Catenin und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für β -Catenin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für β -Catenin (rot); **A''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für β -Catenin (rot) und CD15 (grün); **A-A''** Auflockerung und Unterbrechung der β -Catenin-Färbung (rot) basal einer kleinen epithelialen Pustel mit neutrophilen Granulozyten (grün) bzw. in der Umgebung infiltrierender neutrophiler Granulozyten; (Maßstab-Balken: 50 μ m)

Psoriasis pustulosa

Auch bei der Psoriasis pustulosa war die Färbung für β -Catenin ohne den epithelialen Einstrom von Entzündungszellen kontinuierlich und gleichmäßig in der Epidermis vertreten. Dennoch war die Immunlokalisation für das Protein weniger intensiv im Vergleich zur gesunden Haut (Tab. 14; Abb. 41 und 42).

β -Catenin	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	+++	+++	+++	+++	0
PP 1	++	++	++	++	0
PP 2	++	++	++	-	0
PP 3	++(+)	++(+)	++	-	0
PP 4	++	++	++	++	0
PP 5	++	++(+)	++(+)	+	0

Tabelle 14 Intensität der immunhistochemischen Färbung von β -Catenin in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa (PP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+) stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

Die Einwanderung von CD43-positiven Zellen ließ keine eindeutige Herabregulation der β -Catenin-Färbung erkennen, da der größte Teil der Entzündungszellen sowohl CD43 als auch β -Catenin auf ihrer Oberfläche exprimierten. Dennoch erschien die Färbung für β -Catenin besonders basal von Pusteln mit einem Entzündungszellinfiltrat aufgelockert und weniger intensiv (Abb. 41).

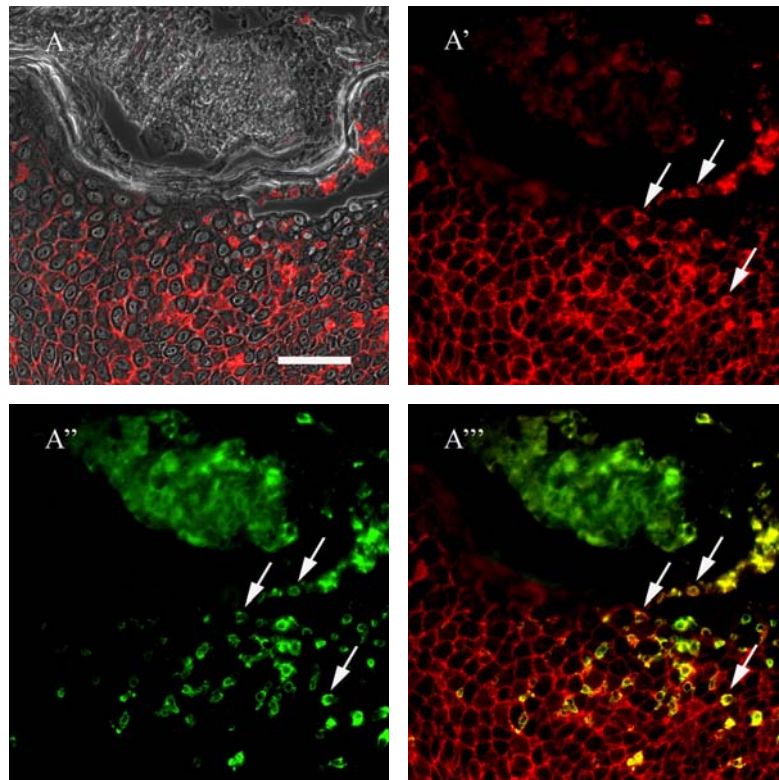


Abbildung 41: Immunfluoreszenz-Lokalisation von β -Catenin und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei Psoriasis pustulosa.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für β -Catenin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für β -Catenin (rot); **A''** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A'''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für β -Catenin (rot) und CD43 (grün); **A** und **A'** zeigen trotz Entzündungszellinfiltration eine fast kontinuierliche Färbung von der β -Catenin (rot) mit einer leichten Gefügelockerung im oberen Anteil des Stratum spinosum; **A''** zeigt eine Anzahl an CD43-positiven Zellen (grün) in der Epidermis; die Pfeile markieren beispielhaft Zellen, die in **A'** für β -Catenin (rot) und in **A''** für CD43 (grün) positiv sind; **A'''** zeigt Kolokalisation beider Antikörper in gelb; (Maßstab-Balken: 50 μ m)

Bei genauer Untersuchung der Entzündungszellen zeigte sich ein Verlust von β -Catenin bei der Infiltration von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv). Das Expressionsmuster des Proteins erschien aufgelockert und unterbrochen (Abb. 42). Die CD15 positiven Zellen waren nicht für β -Catenin positiv.

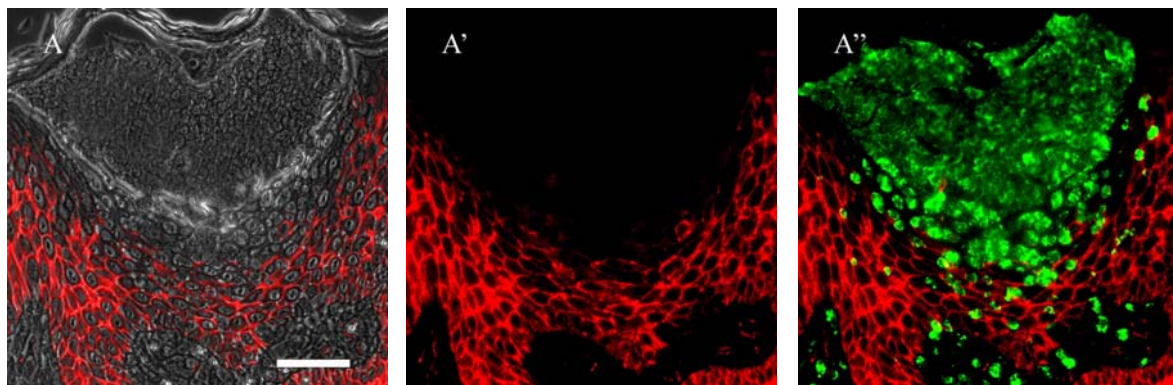


Abbildung 42: Immunfluoreszenz-Lokalisation von β -Catenin und neutrophilen Granulozyten in der menschlichen Haut bei der Psoriasis pustulosa.

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für β -Catenin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für β -Catenin (rot); **A''** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für β -Catenin (rot) und CD15 (grün); **A** und **A''** zeigen eine leichte Auflockerung und Unterbrechung der β -Catenin Färbung (rot) in der Umgebung einwandernder neutrophiler Granulozyten (grün); (Maßstab-Balken: 50 μ m)

4.4. Immunlokalisation des desmosomalen Proteins Desmoglein 1 bei der Psoriasis

Desmoglein 1 wird in der gesunden Haut in allen Schichten der Epidermis mit einer Betonung auf die oberen Schichten exprimiert (Abb. 43).

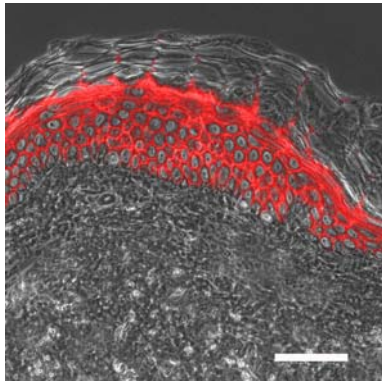


Abbildung 43: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Desmoglein 1 in gesunder Haut
Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbung für Desmoglein 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); Desmoglein 1 wird von allen Schichten der Epidermis exprimiert; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Frühform der Psoriasis

Das Expressionmuster für Desmoglein 1 zeigte in der Frühform der Psoriasis kaum eine Veränderung gegenüber der physiologischen Lokalisation. In den untersuchten Präparaten war Desmoglein 1 ohne die Infiltration von Entzündungszellen in allen Epidermisschichten von sehr stark bis stark vertreten (Tab. 15; Abb. 44 und 45).

Desmoglein 1	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	++	+++	+++	+++	+++
FP 1	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)
FP 2	+++	+++	+++	+++	+++
FP 3	++(+)	++(+)	+++	+++	+++
FP 4	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)
FP 5	++(+)	++(+)	+++	+++	+++

Tabelle 15 Intensität der immunhistochemischen Färbung von Desmoglein 1 in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis (FP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+ stark, ++ mittel, +(+ schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

In der Umgebung von epithelial gelegenen CD43-positiven Zellen zeigte sich eine Intensitätsminderung der Färbung für Desmoglein 1 im Vergleich zu Epidermisschichten ohne CD43-positive Zellen (Abb. 44). Auch hier ist allerdings die Aussagekraft der Färbungen eingeschränkt, da die einzelnen Antikörper (CD43 bzw.

CD15 und Desmoglein 1) aufgrund der gleichen Spezies in Folgeschnitten immunhistochemisch angefärbt werden mussten (siehe E-Cadherin).

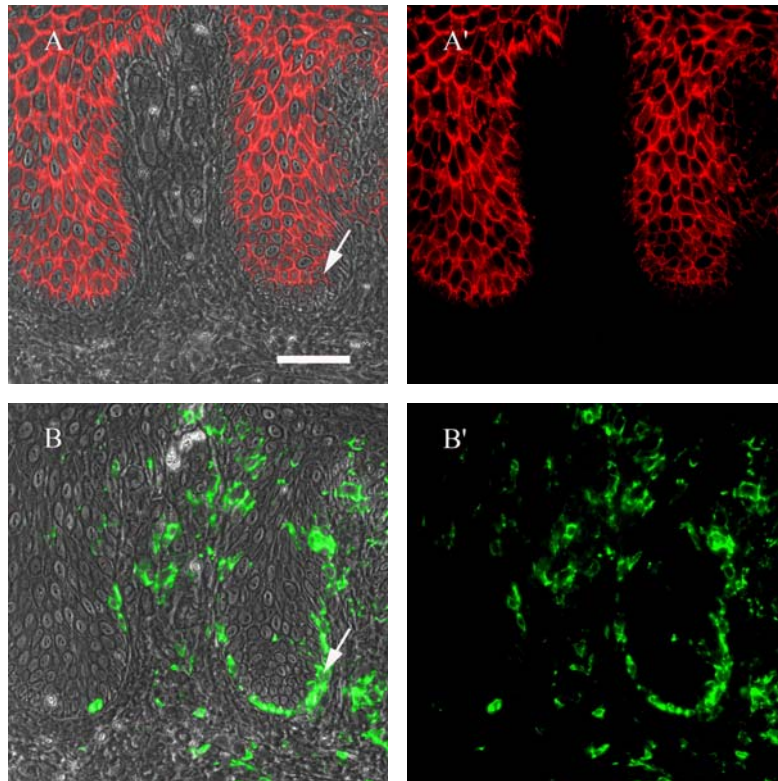


Abbildung 44: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Desmoglein 1 und CD43-positiven Zellen bei einer frühen Form der Psoriasis (Einzelfärbung im Folgeschnitt).

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Desmoglein 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Desmoglein 1 (rot); **B** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD43 (grün) und des Phasenkontrastbilds (grau); **B'** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A** und **A'** zeigen einen Verlust der Färbung für Desmoglein 1 im Stratum basale; **B** und **B'** zeigen die Infiltration von CD43-positiven Zellen (grün) die in einem Bereich mit einer lückenhaften Färbung für Desmoglein 1 lokalisiert sind; (Maßstab-Balken: 50 µm)

In der Umgebung epithelial einwandernder neutrophiler Granulozyten (CD15 positiv) konnte eine Unterbrechung der Färbung für Desmoglein 1 beobachtet werden. Basal kleiner epithelialer Pusteln mit neutrophilen Granulozyten erschien die Färbung für Desmoglein 1 aufgelockert und weniger homogen (Abb. 45).

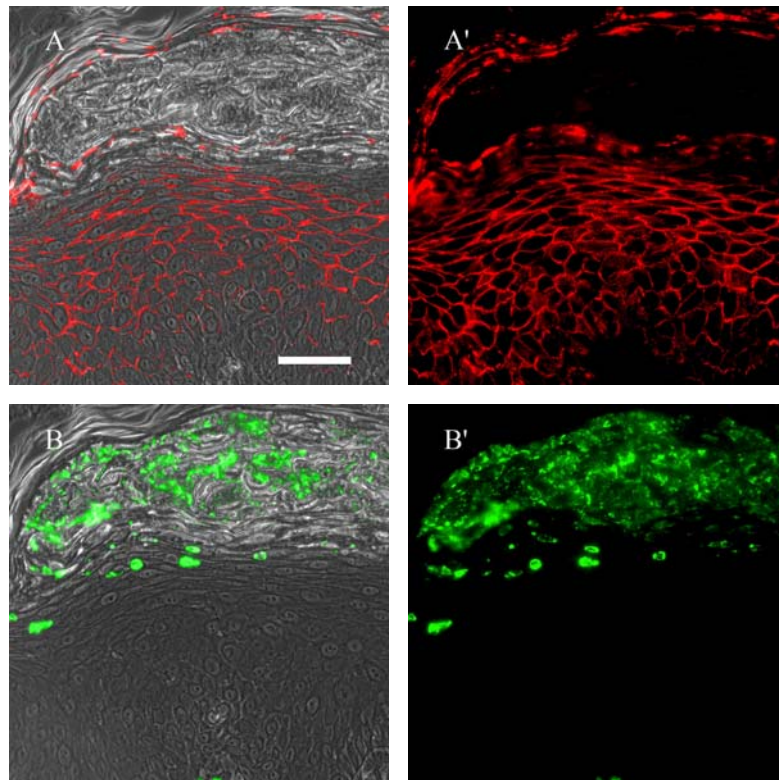


Abbildung 45: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Desmoglein 1 und neutrophilen Granulozyten bei einer frühen Form der Psoriasis (Einzelfärbung im Folgeschnitt).

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für β -Catenin (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für β -Catenin (rot); **B** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD43 (grün) und des Phasenkontrastbilds (grau); **B'** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A** und **A'** zeigen eine nahezu kontinuierliche Färbung für Desmoglein 1 (rot); lediglich im oberen Stratum spinosum und im Stratum granulosum zeigte sich eine leichte Auflockerung; **B** und **B'** zeigen eine Ansammlung von neutrophilen Granulozyten (grün) (Pustel), die in dem Bereich mit einer lückenhaften Färbung für Desmoglein 1 lokalisiert sind; (Maßstab-Balken: 50 μ m)

Psoriasis pustulosa

Die immunhistochemische Färbung für Desmoglein 1 zeigte in der Psoriasis pustulosa ohne die Infiltration von Entzündungszellen ebenfalls eine Homogenität und Kontinuität in der gesamten Epidermis. Dennoch war das Protein im Vergleich zur gesunden Haut weniger intensiv angefärbt (Tab. 16; Abb. 46 und 47).

Die Infiltration von CD43-positiven Zellen führte in den jeweiligen Epidermisabschnitten zu einer Intensitätsminderung und teilweise zum vollständigen Verlust in der Färbung für Desmoglein 1. Besonders basal epithelialer Pusteln erschien das Expressionsmuster für Desmoglein 1 aufgelockert und unterbrochen (Abb. 46).

Ergebnisse

Desmoglein 1	Stratum basale	Stratum spinosum unten	Stratum spinosum oben	Stratum granulosum	Stratum corneum
gesunde Haut	++	+++	+++	+++	+++
PP 1	++	++	++	++	0
PP 2	++	++	++	-	0
PP 3	+(+)	+(+)	++	-	0
PP 4	++	+(+)	++	++	0
PP 5	+(+)	++	++	-	0

Tabelle 16 Intensität der immunhistochemischen Färbung von Desmoglein 1 in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa (PP) in Bereichen ohne Entzündungszellinfiltration; [+++ sehr stark, ++(+) stark, ++ mittel, +(+) schwach, + sehr schwach, 0 negativ]

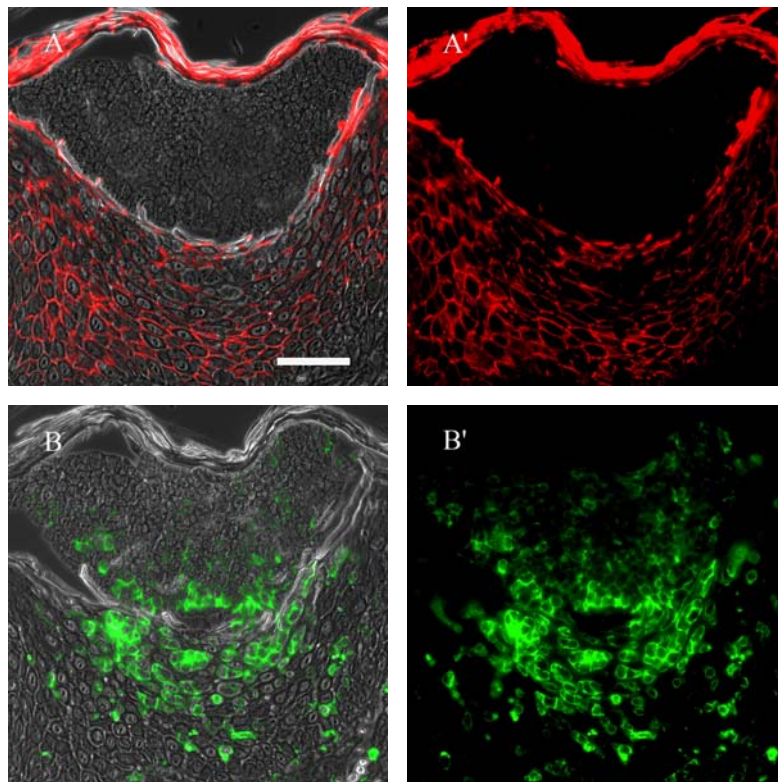


Abbildung 46: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Desmoglein 1 und CD43-positiven Zellen in der menschlichen Haut bei der Psoriasis pustulosa (Einzelfärbung im Folgeschnitt).

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Desmoglein 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Desmoglein 1 (rot); **B** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD43 (grün) und des Phasenkontrastbilds (grau); **B'** Immunfluoreszenzfärbung für CD43 (grün); **A** und **A'** zeigen eine Färbung für Desmoglein 1 (rot), die basal einer Pustel mit Entzündungszellen lückenhaft erscheint; **B** und **B'** zeigen die entsprechenden CD43-positiven Zellen (grün), die vorwiegend in dem Bereich mit einer lückenhaften Färbung für Desmoglein 1 lokalisiert sind; (Maßstab-Balken: 50 µm)

Bei der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (CD15 positiv) zeigte sich eine Auflockerung und Kontinuitätsunterbrechung der Färbung für Desmoglein 1 in der entsprechenden Epidermisschicht (Abb. 47).

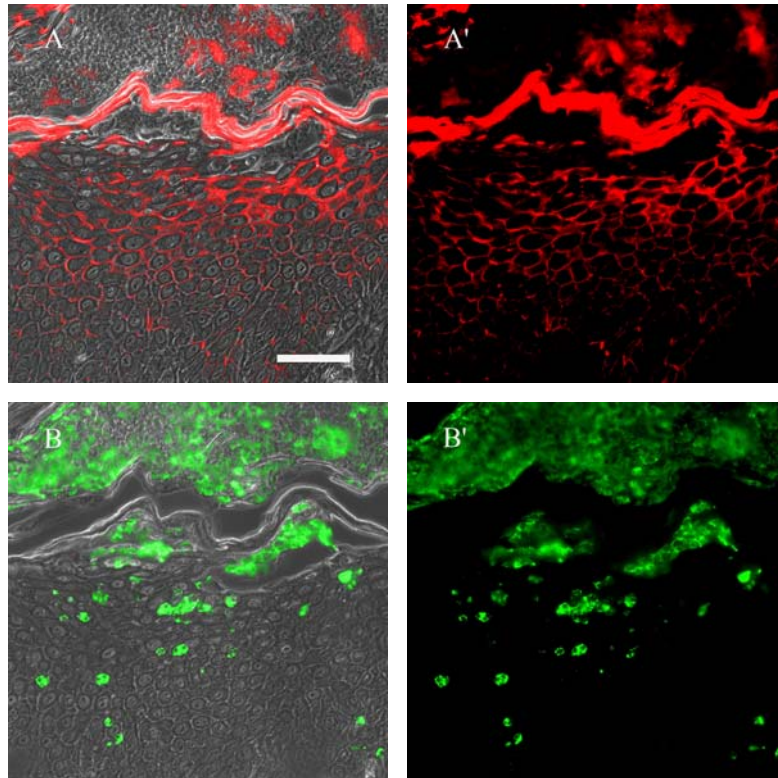


Abbildung 47: Immunfluoreszenz-Lokalisation von Desmoglein 1 und neutrophilen Granulozyten in der menschlichen Haut bei der Psoriasis pustulosa (Einzelfärbung im Folgeschnitt).

A Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für Desmoglein 1 (rot) und des Phasenkontrastbilds (grau); **A'** Immunfluoreszenzfärbung für Desmoglein 1 (rot); **B** Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbungen für CD15 (grün) und des Phasenkontrastbilds (grau); **B'** Immunfluoreszenzfärbung für CD15 (grün); **A** und **A'** zeigen die Färbung für Desmoglein 1 (rot), die basal einer Pustel und bei der epithelialen Infiltration von Neutrophilen aufgelockert und unterbrochen erscheint; **B** und **B'** zeigen CD15-positiven Zellen (grün), die vorwiegend in einem Bereich mit einer lückenhaften Färbung für Desmoglein 1 lokalisiert sind; (Maßstab-Balken: 50 µm)

5. Diskussion

TJs sind Zell-Zell-Verbindungen, die eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer semipermeablen Barriere zwischen Geweben spielen, indem sie die parazelluläre Diffusion von Metaboliten, Ionen oder toxischen Stoffen zwischen benachbarten Zellen kontrollieren („Barriere-Funktion“) (DRAGSTEN *et al.*, 1981; VAN MEER und SIMONS, 1986). Zusätzlich begrenzen sie die ungehinderte Diffusion von Membranproteinen und Lipiden zwischen apikaler und basolateraler Zellmembran. Sie tragen damit zur Bildung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität bei („Zaun-Funktion“) (TSUKITA *et al.*, 1999a). Weiterhin sind Einflüsse von TJ-Proteinen auf die Differenzierung und Proliferation von Zellen bekannt (MATTER *et al.*, 2005). Die Barriereigenschaften der TJs variieren stark zwischen den einzelnen Zelltypen und hängen von den physiologischen Anforderungen der Zellen ab. Für die Plaque-Typ-Psoriasis konnte in vorausgegangenen Studien eine veränderte Expression und Lokalisation verschiedener TJ-Proteine nachgewiesen werden. Dabei wurde für einige TJ-Proteine eine verbreiterte Expression, für andere jedoch eine Herabregulation dokumentiert (PUMMI *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2006; PELTONEN *et al.*, 2007; WATSON *et al.*, 2007). In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Veränderung der Expression bzw. Lokalisation für weitere TJ-Proteine untersucht und es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Veränderungen der TJ-Proteine in der psoriatischen Epidermis bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung auftreten.

5.1. Lokalisationsänderung der TJ-Proteine in der Haut im frühen und im fortgeschrittenen Stadium der Psoriasis

Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz konnte in dieser Arbeit an den untersuchten Präparaten der frühen Form der Psoriasis und besonders in denen der Psoriasis pustulosa eine deutliche Herabregulation von Claudin 1 und Claudin 7 in basalen sowie in den obersten Epidermisabschnitten beobachtet werden. Weiterhin kam es teilweise zu einer Verlagerung der Proteine von den Zell-Zell-Grenzen ins Zytoplasma. Diese Proteine sind in gesunder Haut in allen Schichten der Epidermis lokalisiert. Meine Ergebnisse sind mit Studien vereinbar, die während der Anfertigung meiner Doktorarbeit publiziert wurden. In diesen wurde mittels Western-Blot-Analyse, quantitativer PCR und Immunfluoreszenz-Untersuchungen eine signifikante Reduktion von Claudin 1 in aktiven Psoriasis-Plaques nachgewiesen (WATSON *et al.*,

2007; KIRSCHNER *et al.*, 2009). Hier konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation der Claudine bereits in einer frühen Phase der Krankheitsentwicklung auftritt. Je ausgeprägter jedoch die typisch histologischen Merkmale sind (z. B. Hyperkreatose, Akanthose), desto deutlicher scheinen insbesondere Claudin 1 und Claudin 7 in der Epidermis herabreguliert zu sein.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Änderungen im Claudin-Muster die Zellpermeabilität und die Barriereigenschaften der Haut von Mäusen beeinflussen (FURUSE *et al.*, 2002; TURKSEN und TROY, 2002; TROY *et al.*, 2005). Die Überexpression von Claudin 6 (TURKSEN und TROY, 2002) oder das Fehlen von Claudin 1 in der Epidermis (FURUSE *et al.*, 2002) bzw. im *Stratum granulosum* (TUNGALL *et al.*, 2005) führen zu einer Störung der TJ-Barriere im *Stratum granulosum* und zu einer gestörten epidermalen Barriere. Dieses spiegelt sich in einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust (TEWL) wider. Bei der Hautentwicklung von Mäusen während der Embryonalzeit fehlt hingegen Claudin 1 in den unteren Epidermisschichten bis zu dem Zeitpunkt, an dem sich das *Stratum corneum* als funktionstüchtige Komponente der Hautbarriere ausgebildet hat (TROY *et al.*, 2007). Untersuchungen von ARABZADEH und Mitarbeiter zeigten in Mäusen, dass Claudin-Veränderungen parallel zu Veränderungen der epidermalen Zellmorphologie und Differenzierung beobachtet werden. Sie untersuchten die Claudin-Expression in der Mausepidermis nach TPA- (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) induzierter Verletzung während der vorübergehenden Hyperproliferationsphase und nach der Wiederherstellung der Epidermis (ARABZADEH *et al.*, 2007). In der mit TPA behandelten Mäuseepidermis zeigte sich bis zu 72 h nach Applikation eine zunehmende zytoplasmatische Lokalisation von Claudin 1 besonders in den unteren Abschnitten der Epidermis. Sogar eine nukleäre Färbung für Claudin 1 war vorübergehend zu erkennen. Eine Rückverlagerung von Claudin 1 an die Zell-Zell-Grenzen stellte sich nach 96 h ein. Die Hypothese, dass undifferenzierte Zellen mit wenig stark ausgeprägter Barrierefunktion einen deutlichen intrazellulären Claudin-Pool aufweisen (DAUGHERTY *et al.*, 2004), wird durch die Ergebnisse von ARABZADEH und Mitarbeiter unterstützt. Die von mir beobachteten Veränderungen von Claudin 1 und Claudin 7 in den obersten epidermalen Schichten könnten bedeuten, dass sich dort keine TJ-Strukturen und funktionellen TJs mehr befinden. Da aber andere untersuchte TJ-Proteine, die normalerweise nur im *Stratum granulosum* vorhanden sind, in der psoriatischen Haut in tieferen Schichten

beobachtet werden, könnte sich eine funktionelle TJ-Barriere in tiefere Schichten, in der noch eine Kolokalisation aller TJ-Proteine vorhanden ist, verlagert haben (siehe dazu später). Die Herabregulation der Claudine in den untersten Schichten der Epidermis könnte analog zur Herabregulation während der TPA-Behandlung und der Abwesenheit von Claudin 1 während der Embryonalentwicklung stattfinden und auf eine Wechselwirkung zwischen der Expression von Claudin 1 und auf eine veränderte Proliferation und Differenzierung der Zellen in der Epidermis hinweisen. Auch ein Einfluss von Entzündungszellen, deren Anwesenheit man z.B. auch während der TPA-Behandlung beobachten kann, kann nicht ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 5.2).

Im Gegensatz zur Herabregulation von Claudin 1 und Claudin 7 in den obersten und untersten Epidermisschichten konnte eine verbreiterte Expression von ZO-1 und Claudin 4 beobachtet werden. Dabei zeigte sich in der psoriatischen Frühform, aber besonders in der Psoriasis pustulosa ein verbreitertes Expressionsmuster des Proteins ZO-1 bis in die tiefer gelegenen Spinosuszellschichten. Die Expression von Claudin 4 wies bei allen Psoriasisformen eine weniger starke Ausdehnung im akanthotischen *Stratum spinosum* auf. Dies bestätigten Ergebnisse, die für die Plaque-Typ-Psoriasis beschrieben wurden (PUMMI *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2006; PELTONEN *et al.*, 2007). Darüberhinaus wurde auch eine verbreiterte Expression von Occludin in den verschiedenen Psoriasisformen nachgewiesen (PUMMI *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2001; KIRSCHNER *et al.*, 2009). Die verbreiterte Expression der TJ-Proteine führt zu einer veränderten bzw. verlagerten (da in den obersten Epidermisschichten Claudin 1 und Claudin 7 herabreguliert werden) Kolokalisation mit Claudin 1 und Claudin 7. Ein kontinuierliches und funktionsfähiges TJ-System mit typischen TJ-Strukturen („kissing points“) ist in der gesunden humanen und murinen Epidermis ausschließlich im *Stratum granulosum* beobachtet worden. Es ist die Schicht der Epidermis, in der man eine Kolokalisation aller TJ-Proteine nachweisen konnte (MORITA *et al.*, 1998; PUMMI *et al.*, 2001; BRANDNER *et al.*, 2002; FURUSE *et al.*, 2002; TUNGGAL *et al.*, 2005). Deshalb könnte angenommen werden, dass eine verbreiterte Kolokalisation der TJ-Proteine bzw. eine Verlagerung der Kolokalisation in tiefere Schichten der Epidermis auch zu einem verbreiterten oder verlagerten Vorkommen von typischen TJs in der Epidermis führt. Darüberhinaus wäre es aber auch möglich, dass diese TJ-Proteine zusätzlich andere TJ-assoziierte Strukturen, wie beispielsweise

lamellated junctions oder *stud-junctions* (LANGBEIN *et al.*, 2002a; SCHLUETER *et al.*, 2007) bilden. Welche Strukturen tatsächlich gebildet werden, und inwieweit sie funktionelle TJs bilden, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Eine verbreiterte bzw. verstärkte Expression von normalerweise begrenzt vorkommenden TJ-Proteinen wird auch bei anderen Erkrankungen, die mit Veränderungen des *Stratum corneums* einhergehen, z.B. Ichthyosis vulgaris (PUMMI *et al.*, 2001), bei Abwesenheit der Hornschicht, z.B. in der regenerierenden Epidermis von Wunden (BRANDNER *et al.*, 2002) oder beim Angriff der Haut durch Bakterien (OHNEMUS *et al.*, 2007) beobachtet. Mehrschichtige Epithelien in feuchter Umgebung (z.B. Zunge oder Gingiva), die zum Teil ebenfalls über keine ausreichende Barriere durch ein verhorntes Epithel verfügen, zeigen eine physiologisch breite Lokalisation der TJ-Proteine Occludin und ZO-1. Das verbreiterte Vorkommen verschiedener TJ-Proteine, sei es unter pathologischen oder physiologischen Bedingungen, könnte eine Möglichkeit sein, das *Stratum corneum* als teilweise fehlenden Bestandteil der Hautbarriere zu kompensieren („Rettungssystem“). Da das verbreiterte Vorhandensein unterschiedlicher TJ-Proteine bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Psoriasis auftritt, könnte dies ein Kompensationsversuch sein, die gestörte (Stratum-corneum)-Barriereeigenschaft der Epidermis in dieser Erkrankungsphase auszugleichen. Interessanterweise konnte bei heilenden Psoriasis-Plaques, die eine wiederhergestellte Hautbarriere zeigen, eine Rückverlagerung der Proteine ZO-1 und Occludin beobachtet werden. Ihre Expression beschränkte sich dann wieder ausschließlich auf die Zell-Zell-Grenzen des *Stratum granulosums* (PELTONEN *et al.*, 2007). Die veränderte Lokalisation der TJ-Proteine könnte aber auch barriere-unabhängige Folgen haben. Von dem Protein ZO-1 ist bekannt, dass es Einfluss auf die Bildung von Gap Junctions und Adhärenzverbindungen hat. Weiterhin ist es an der Zelldifferenzierung und Zellproliferation beteiligt (SCHNEEBERGER und Lynch, 2004; MATTER *et al.*, 2005; AIJAZ *et al.*, 2006). Auch für Occludin wurden TJ-unabhängige Funktionen diskutiert (SAITOU *et al.*, 2000). Somit könnte die in der Psoriasis beobachtete Veränderung in der Differenzierung und Proliferation der Haut von diesen Molekülen beeinflusst werden. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass diese Veränderungen der TJ-Proteine bereits in der Frühform der Psoriasis gesehen werden kann. Darüberhinaus konnte die Arbeitsgruppe um BRANDNER zeigen, dass die kutane ex-vivo Injektion von IL-1 β und TNF- α , Zytokine, die in psoriatischer Haut in erhöhten

Mengen vorliegen, bereits sehr schnell zu einer verbreiteten Expression von Occludin und ZO-1 führen, während zu diesen Zeitpunkten keine Veränderung der Proliferation oder Differenzierung zu beobachten war (KIRSCHNER *et al.*, 2009). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Veränderung der TJ-Proteine den Veränderungen der Proliferation und Differenzierung vorausgeht.

5.2. Einfluß von Entzündungszellen und Zytokinen auf die Lokalisation von TJ-Proteinen in der psoriatischen Haut

Die Psoriasis ist durch die Infiltration von Entzündungszellen gekennzeichnet. Interessanterweise konnte in den untersuchten Präparaten beider Psoriasisformen entlang der Infiltrationsstrecke von CD43-positiven Entzündungszellen eine Auflockerung und zum Teil eine Unterbrechung der Immunlokalisation für Claudin 1, Claudin 4, Claudin 7 und ZO-1 in den jeweiligen Epidermisschichten beobachtet werden. Auch basal der eingewanderten CD43-positiven Entzündungszellen blieb die Färbung für das jeweilige TJ-Protein unvollständig. Eine Ausnahme bildete JAM-A. Hier konnte keine Herabregulation bei der Infiltration von Entzündungszellen erkannt werden (siehe dazu 5.3). Da sowohl in der Frühphase der Psoriasis als auch in der Psoriasis pustulosa häufig neutrophile Granulozyten in der Epidermis beobachtet werden, wurde überprüft, ob die Herabregulation der TJ-Proteine bei dieser Zellpopulation anzutreffen ist. Tatsächlich zeigte sich, dass in der Nähe von neutrophilen Granulozyten (CD15-positive Zellen) die TJ-Proteine herabreguliert waren. Ähnliches konnte bei chronischen Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, beobachtet werden. Hierbei zeigte sich eine Herabregulation für Claudin 1 in unmittelbarer Nachbarschaft zu den einwandernden Neutrophilen (KUCHARZIK *et al.*, 2001). Diese Veränderung in der Lokalisation von TJ-Proteinen scheint eine wichtige Voraussetzung für die epidermale Migration der Neutrophilen zu sein. Es ist jedoch unklar, welche Faktoren genau zur Herabregulation der TJ-Proteine führen. Verantwortlich könnten von Neutrophilen produzierte Proteasen oder unterschiedliche Zytokine sein (CASSATELLA, 1995).

Aber auch die generelle Herabregulation von Claudin 1 und Claudin 7 in den obersten und untersten epidermalen Schichten und die verbreiterte Expression von Occludin, ZO-1 und Claudin 4 in der psoriatischen Epidermis könnte durch Zytokine und Proteasen beeinflusst werden. Zytokine sind potente Mediatoren und Kommunikationsmoleküle bei einer Vielzahl von biologischen Funktionen (z.B.

Anregung der Zellteilung, Aktivierung des Immunsystems) (KELSO *et al.*, 2000). In Zylinderepithel- und Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass durch die Zytokine IL-1, IL-4, IL-10, IL-13, TNF- α und INF- γ die TJ-Integrität beeinflusst werden kann (YOUAKIM und AHDIEH, 1999; OSHIMA *et al.*, 2001). Die Inkubation von einschichtigen Epithelzellen mit INF- γ führte zu einer Umverteilung von Occludin, Claudin 1, Claudin 4 und JAM-A von den Zell-Zell-Grenzen in das Zytoplasma. Dagegen zeigte das Zytokin kaum einen Einfluß auf die Verteilung von ZO-1, E-Cadherin und β -Catenin (BRUEWER *et al.*, 2003). Die Produktion von INF- γ durch aktivierte T-Lymphozyten ist ebenfalls ein typisches Merkmal des Entzündungsprozesses der Psoriasis. Somit könnte die beobachtete zytoplasmatische Anfärbung von Claudinen in beiden Psoriasisformen auf die Einwirkung dieses Zytokins zurückzuführen sein. Auch in der Lunge konnte ein Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktion und Modifikation an TJ-Proteinen gezeigt werden. So ist die akute Entzündungsreaktion in der Lunge unter dem Einfluß von TNF- α mit Veränderungen in der Expression und Lokalisation von wichtigen TJ-Proteinen (Protein ZO-1, Claudin 2, Claudin 4, Claudin 5) vergesellschaftet (MAZZON *et al.*, 2007).

In den letzten Jahren wurde verstärkt die Rolle der Zytokine bei der Pathogenese der Psoriasis hervorgehoben. Sie sind eng mit den klinischen und morphologischen Veränderungen in der Psoriasis verbunden (z.B. eine gesteigerte Keratinozytenproliferation durch IL-3, IL-6 und INF- γ , Ansammlung neutrophiler Granulozyten in der Epidermis durch IL-8). Dabei ist nicht nur ein einzelnes Zytokin, sondern ein Netzwerk dieser Stoffe mit ihren unterschiedlichen Funktionen und Interaktionen an der Entzündungsreaktion der Haut beteiligt. Zytokine werden von verschiedenen Zellen produziert. Dabei spielen die T-Lymphozyten eine wichtige Rolle. Psoriatische T-Zellen sind durch die Produktion von IFN- γ und TNF- α dem T-Helfer-Zell-Typ TH1 zugeordnet, der eine effektive antibakterielle Immunabwehr und eine Autoimmunreaktion vermittelt (PRINZ, 2004). Zusätzlich sind Interleukine (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8) am Krankheitsbild der Psoriasis beteiligt. Gleichzeitig besteht wahrscheinlich ein Mangel an IL-10, ein TH2-Zytokin, das bei therapeutischer Gabe die TH1-Zytokine antagonisieren kann und zur Besserung der Psoriasisläsionen führt (ASADULLAH *et al.*, 1998). Einige Untersuchungen heben hervor, dass diese gestörte Balance zwischen TH1- und TH2-Zytokinen zur Entwicklung der Psoriasis beiträgt (Ungleichgewicht zwischen entzündungsfördernden und entzündungshemmenden

Mechanismen) (JACOB *et al.*, 2003). Wie groß jedoch der Einfluss der einzelnen Zytokine auf die verschiedenen Zell-Zell-Verbindungsproteine bei der Psoriasis ist muss in zukünftigen Experimenten noch geklärt werden.

Die Produktion von IL-1 β könnte eine Ursache für das veränderte Verteilungsmuster von TJ-Proteinen in den untersuchten Psoriasispräparaten sein. Dieses Zytokin wird in gesteigertem Maße in Psoriasisläsionen im Vergleich zu nicht involvierter Haut gefunden (YOSHINAGA *et al.*, 1995). Es wird vor allem von Keratinozyten und Makrophagen produziert (COOPER *et al.*, 1990; WATSON *et al.*, 2007). Durch IL-1 α und IL-1 β werden eine Reihe verschiedener pathologischer Veränderungen hervorgerufen. Das Zytokin hat Einfluß auf die dermale Angiogenese, Expression von Adhäsionsmolekülen (LAWLEY *et al.*, 1991), Aktivierung von T-Lymphozyten, Induktion der Entzündungszellkaskade und Synthese anderer Zytokine (TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-6 oder IL-8) sowie die Keratinozytendifferenzierung (HAMMERBERG *et al.*, 1998). WATSON und ihre Arbeitsgruppe konnten bei der Injektion von sehr hohen Dosen IL-1 β in klinisch normale Haut von Psoriasispatienten und in gesunder Haut einen Verlust der physiologischen Immunlokalisation von Claudin 1 und eine zunehmende Verlagerung des Proteins in das Zytoplasma beobachten (WATSON *et al.*, 2007). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Injektion von IL-1 β in Konzentrationen, die in psoriatischer Haut vorhanden sein könnten, zu einer Herabregulation von Claudin 1 in den obersten epidermalen Schichten und einer verbreiterten Lokalisation von Occludin und ZO-1, vergleichbar zur Frühform der Psoriasis, führt. Auch TNF- α zeigt ähnliche Effekte (KIRSCHNER *et al.*, 2009). Zellkulturexperimente zeigten, dass diese Zytokine zu einer Veränderung der Expression und Lokalisation von TJ-Proteinen und zu einer Modulation der TJ-Funktion in kultivierten primären humanen Keratinozyten führen (KIRSCHNER *et al.*, 2009).

In den untersuchten Präparaten war ein geringer Teil der epidermalen CD43-positiven Entzündungszellen zusätzlich für Claudin 1 und für Claudin 7 positiv. Die Expression von Claudin 1 bzw. Claudin 7 auf der Oberfläche der CD43-positiven Zellen könnte eine Möglichkeit der sanften transepidermalen Migration sein, um minimale Effekte an den Zell-Zell-Verbindungen (z.B. TJs) und deren Funktion zu bewirken. In Studien konnte ähnliches bei der Diapedese von aktivierten T-Lymphozyten beobachtet werden, die auf ihrer Oberfläche Occludin präsentierten und nur minimale Effekte an TJs und deren Funktion hervorriefen (ALEXANDER *et al.*,

1998). Es ist anzunehmen, dass die in der Doppelfärbung von Claudin 1 bzw. Claudin 7 und CD43 detektierten Zellen einem spezifischen Zelltyp angehören und nur in einem bestimmten Stadium der Erkrankung auftreten. Dies könnte möglicherweise erklären, warum nur ein kleiner Teil des meist großflächigen Infiltrats die Eigenschaft besitzt, TJ-Proteine auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Um welche Zellen es sich handelt und ob diese Zellen bevorzugt in die Epidermis einwandern ist noch unklar. Weiterhin ist unklar, warum keine der neutrophilen Entzündungszellen in den untersuchten Präparaten eine ähnliche Eigenschaft aufweist. Dabei infiltriert gerade dieser Entzündungszelltyp besonders bei der Psoriasis pustulosa in großen Mengen in die Epidermis und hat einen nicht unerheblichen Anteil an den beobachteten Veränderungen der Gewebemorphologie.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die immunhistochemische Färbung für JAM-A in beiden Psoriasisformen nur eine geringe Herabregulation, die sich vorwiegend auf die basalen Abschnitte der Epidermis beschränkte, erfährt. Ansonsten stellte sich in der gesamten Epidermis eine recht gleichmäßige Färbung dar, die im Vergleich zur gesunden Haut weniger intensiv wirkte und nur durch den Einstrom von neutrophilen Granulozyten in seiner Kontinuität eine leichte Unterbrechung zeigte. Bei der Infiltration der meisten CD43-positiven Zellen konnte keine eindeutige Unterbrechung der JAM-A Immunlokalisation beobachtet werden, da ein großer Teil dieser Entzündungszellen zusätzlich auf ihrer Zelloberfläche JAM-A exprimierten. Dies könnte dafür sprechen, dass JAM-A als Vermittler der Transmigration wichtig ist und für diesen Vorgang nicht herunterreguliert werden muss. Dies wurde bereits für die Leukozytenwanderung durch Endothelzellen beschrieben. Die Leukozytenwanderung aus den Blutgefäßen in entzündliches Gewebe ist ein hochkomplexer Vorgang, an dem eine Reihe von Zellsignalprozessen und Adhäsionsmolekülen beteiligt sind. Unter anderem wird die transendotheliale Migration durch verschiedene Komponenten von AJs und TJs unterstützt. Involviert sind dabei auch die Mitglieder der JAM-Familie, die durch ihre exponierte Lage an den Zell-Zell-Verbindungen eine ausgezeichnete Möglichkeit für die Passage von Leukozyten über die endotheliale Barriere bieten. JAM-A ist auf Endothel- und Epithelzellen in unterschiedlichen Geweben lokalisiert (BAZZONI *et al.*, 2003; MULLER *et al.*, 2003). Zusätzlich ist das Protein auf der Oberfläche von zirkulierenden Zellen, wie Monozyten, Lymphozyten, Neutrophilen und antigenpräsentierenden Zellen zu finden (WILLIAMS *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2000). In

Studien konnte gezeigt werden, dass einzelne Mitglieder der JAM-Familie an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt sind, indem die Proteine innerhalb der Zelle eine Umverteilung durchlaufen und unter entzündlichen und ischämischen Umständen hochreguliert werden (WEBER *et al.*, 2007). Stimulationsversuche mit einer Kombination aus TNF- α und INF- γ führten zu einer Verlagerung von JAM-A an die apikale Oberfläche von Endothelzellen (OZAKI *et al.*, 1999), so dass unter entzündlichen Bedingungen JAM-A die Adhäsion von Leukozyten unterstützen kann. OSTERMANN und Mitarbeiter konnten zeigen, dass LFA-1 auf der Leukozytenoberfläche an JAM-A von Endothelzellen binden kann. Die JAM-A-LFA-1 Interaktion unterstützt sowohl die Adhäsion von T-Zellen an das Endothel als auch die Bindung von Neutrophilen zur transendothelialen Migration (OSTERMANN *et al.*, 2002). JAM-A ist jedoch nicht in der Lage TJs aufzubauen (ITHO *et al.*, 2001). Dennoch unterstützt es in polarisierten Epithelien und Endothelien die regelrechte Organisation der einzelnen TJ-Komponenten (THOMAS *et al.*, 2004). Die homophilen Interaktionen zwischen den Mitgliedern der JAM-Familie beeinflussen die Permeabilität von Endothelzellen und Epithelzellenschichten und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion (MARTIN-PADURA *et al.*, 1998; NAIK *et al.*, 2003).

5.3. Immunlokalisation der Adhärenzverbindungs- und desmosomalen Proteine in der Psoriasis

Ursprünglich wurde von den Molekülen der Cadherin-Superfamilie angenommen, dass sie ausschließlich eine Rolle bei der Zelladhäsion spielen. Inzwischen ist aber bekannt, dass diese Moleküle bei zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt sind (z.B. Zellwachstum oder Zellmigration). Die AJs der Epidermis werden hauptsächlich durch die klassischen Cadherine (E-Cadherin und P-Cadherin) gebildet, die über ihren extrazellulären Abschnitt Ca^{2+} -abhängige, homophile Zell-Zell-Verbindungen zwischen benachbarten Zellen ausbilden (TAKEICHI, 1991; PEREZ-MORENO *et al.*, 2003). Der zytoplasmatische Teil der klassischen Cadherine kann an β -Catenin binden und so über dessen Bindungspartner α -Catenin eine stabile Verknüpfung mit dem Aktinzytoskelett ermöglichen (GOTTARDI *et al.*, 2002). Desmosomale Cadherine (Desmogleine, Desmocolline) führen zu einer Verknüpfung der Intermediärfilamente mit Desmosomen. Klassische und desmosomale Cadherine beeinflussen damit die

Festigkeit und die Morphologie von Zellen innerhalb eines Gewebes (TAKEICHI, 1991).

Die Modulation und Verminderung von E-Cadherin im Gewebe kann mit einer Gefügelockerung (Spongiose) in Verbindung gebracht werden, die es z.B. den Entzündungszellen ermöglicht leichter in das Gewebe einzuwandern und bis in die oberste Hautschicht vorzudringen. Verschiedene in vivo Untersuchungen bestätigen, dass eine veränderte Immunlokalisation für E-Cadherin in entzündlichen Epithelbereichen zu verzeichnen ist. So konnten HANBY und Mitarbeiter eine verminderte Expression von E-Cadherin zwischen Kolonepithelzellen bei Peptischen Ulzera und Morbus Crohn beobachten (HANBY *et al.*, 1996). Neben der membrangebunden Form von E-Cadherin gibt es zusätzlich eine lösliche Form. In Studien konnte gezeigt werden, dass diese Form im Serum von Psoriasispatienten erhöht ist und mit dem Schweregrad der Erkrankung (PASI-Score) korreliert (MATSUYOSHI *et al.*, 1995). Dies könnte ein Zeichen für eine gesteigerte Proteolyse von E-Cadherin an der Zelloberfläche sein und damit eine reduzierte Menge an funktionsfähigem E-Cadherin an der Keratinozytenoberfläche.

Im Vergleich zur gesunden Haut, bei der E-Cadherin von allen lebenden Epidermisschichten exprimiert wird (SHIMOYAMA *et al.*, 1989), zeigte sich bei der Untersuchung beider Psoriasisformen in dieser Arbeit eine Herabregulation von E-Cadherin, die besonders in der Basalzellschicht und im oberen *Stratum granulosum* zu beobachten war. In mittleren Abschnitten der Epidermis präsentierte sich eine zum Teil schwächere Immunlokalisation von E-Cadherin an den Zell-Zell-Grenzen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von CHUNG und Mitarbeitern überein (CHUNG *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu steht die Studie von ZHOU und Mitarbeitern, die in der immunhistochemischen Färbung von Psoriasispräparaten für E-Cadherin keinen signifikanten Unterschied zwischen gesunder und pathologisch veränderter Haut feststellen konnten. Hier zeigte sich eine intensive Färbung für E-Cadherin an den Zell-Zell-Grenzen der gesamten lebenden Epidermis (ZHOU *et al.*, 2003). Das desmosomale Protein Desmoglein 1 zeigt eine weitgehend homogene Färbung an den Zell-Zell-Grenzen. Diese war im Vergleich zur gesunden Haut intensitätsschwächer.

Bei der epithelialen Infiltration von neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten zeigte sich in der Umgebung bei beiden Psoriasisformen eine Intensitätsminderung

und zum Teil ein Verlust der E-Cadherin-Färbung. Im Vergleich zu Abschnitten ohne Entzündungszellinfiltration wirkte die Färbung diskontinuierlich und unterbrochen. Dasselbe gilt, wenn auch weniger ausgeprägt, für Desmoglein 1. Jedoch muß bei der Auswertung berücksichtigt werden, dass E-Cadherin ebenso wie Desmoglein 1 und die entsprechende Entzündungszellspezies in Folgeschnitten angefärbt wurden und so die exakte Kolo-kalisation nicht bestimmbar war. Zusammenfassend beobachtet man somit auch für Adhärenzverbindungs- und desmosomale Proteine eine Veränderung der Expression/Lokalisation in psoriatischer Haut. Die Veränderungen sind also nicht auf TJ-Proteine beschränkt. Allerdings sind sie in der Regel weniger stark ausgeprägt als bei den TJ-Proteinen.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von TJs von der kontinuierlichen Expression von E-Cadherin abhängig ist (GUMBINER *et al.*, 1988). In einfachen Epithelzellen konnte eine enge Wechselwirkung zwischen AJ- und TJ-assoziierten Proteinen gezeigt werden. So wurde in MDCK-Zellen beobachtet, dass dem Aufbau der TJs eine vorläufige Bildung von Zell-Zell-Verbindungen vorausgeht, die AJ- und TJ-Komponenten enthalten (MATTER und BALDA, 2003). Die parazelluläre Barriere von TJs wird durch die Integrität von AJs beeinflusst. Eine Zerstörung der AJs führt zu einer Steigerung der TJ-Permeabilität. Auch Untersuchungen an epidermalen E-Cadherin Knock-out Mäusen demonstrieren, dass dieses Protein zur Bildung von TJs beiträgt. Die Mäuse sind durch einen gesteigerten TEWL und einen frühzeitigen Tod (7-12 h nach der Geburt) gekennzeichnet. Eine detaillierte Untersuchung der Mäuse zeigte, dass die Ursache in einem Verlust von Claudin 1 im *Stratum granulosum* und einer Fehllokalisation verschiedener weiterer TJ-Komponenten in der Epidermis liegt (TUNGGAL *et al.*, 2005). Vermutlich beeinflusst E-Cadherin die Regulation der TJs über den Par3/aPKC/Par6- Komplex (YOUNG *et al.*, 2003; TUNGGAL *et al.*, 2005). Es stellt sich deshalb die Frage, ob auch in der Psoriasis eine Veränderung von E-Cadherin den Veränderungen der TJ-Proteine vorausgeht. Da in dieser Arbeit die beobachteten Veränderungen sowohl von E-Cadherin als auch von TJ-Proteinen bereits in der Frühform der Psoriasis zu sehen waren, kann daraus nicht geschlossen werden, dass die Veränderung von E-Cadherin der Veränderung von TJ-Proteinen vorausgeht. Die Tatsache, dass die Alterationen der TJ-Proteine meist stärker ausgeprägt sind als die von E-Cadherin macht dies eher unwahrscheinlich. Dies muss aber in zukünftigen Experimenten noch geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

- ABBOTT** NJ: Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol* 20:131-47, 2000
- AIJAZ** S, **BALDA** MS, and **MATTER** K: Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol* 248:261-298, 2006
- ALEXANDER** JS, **DAYTON** T, **DAVIS** C, **HILL** S, **JACKSON** TH, **BLASCHUK** O, **SYMOND** M, **OKAYAMA** N, **KEVIL** CG, **LAROUX** FS, **BERNEY** SM, and **KIMPEL** D: Activated T-lymphocytes express occludin, a component of tight junctions. *Inflammation* 22:573-582, 1998
- ALEXANDRE** MD, **LU** Q, and **CHEN** Y-H: Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. *J Cell Sci* 118:2683-2693, 2005
- AMAGAI** M, **MATSUYOSHI** N, **WANG** ZH, **ANDL** C, and **STANLEY** JR: Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med* 6:1275-1277, 2000
- ANDO-AKATSUKA** Y, **SAITOU** M, **HIRASE** T, **KISHI** M, **SAKAKIBARA** A, **ITHO** M, **YONEMEMURA** S, **FURUSE** M, **TSUKITA** S: Interspecies diversity of the occluding sequence: cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol (United States)* 133(1):43-47, 1996
- ANDERSON** JM and **VAN ITALLIE** CM: Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 269:G467-G475, 1995
- ARABZADEH** A, **TROY** TC, and **TURKESEN** K: Changes in the distribution pattern of claudin tight junction proteins during the progression of mouse skin tumorigenesis. *BMC Cancer* 7:196, 2007
- ASADULLAH** K, **STERRY** W, **STEPHANEK** K, **JASULAITIS** D, **LEUPOLD** M, **AUDRING** H, **VOLK** HD, and **DOCKE** WD: IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest* 101:783-794, 1998
- AURAND-LIONS** MA, **DUNCAN** L, **BALLESTREM** C, and **IMHOF** BA: JAM-2, a novel immunoglobulin super-family molecule, expressed by endothelial and lymphatic cells. *J Biol Chem* 276:2733-2741, 2001
- BALDA** MS and **ANDERSON** JM: Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *Am J Physiol Cell Physiol* 264:C918-C924, 1993
- BALDA** MS, **WHITNEY** JA, **FLORES** C, **GONZALEZ** S, **CEREIJIDO** M, and **MATTER** K: Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein: *J Cell Biol* 134:1031-1049, 1996
- BALDA** MS and **MATTER** K: Functional analysis of tight junctions. *Methods* 30:228-234, 2003
- BAZZONI** G, **MARTINEZ-ESTRADA** OM, **ORSENI**GO F, **CORDENONSI** M, **CITI** S, and **DEJANA** E: Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 275:20520-20526, 2000
- BAZZONI** G: The JAM-family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* 15 (5):525-530, 2003
- BRANDNER** JM, **KIEF** S, **GRUND** C, **RENDL** M, **HOUDEK** P, **KUHN** C, **TSCHACHLER** E, **FRANKE** WW, **MOLL** I: Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 81 (5):253-263, 2002

- BRANDNER JM**, McINTYRE M, KIEF S, WLADYKOWSKI E, and MOLL I: Expression and localization of tight junction-associated proteins in human hair follicles. *Arch Dermatol Res* 295:211-221, 2003
- BRANDNER JM**, KIEF S, WLADYKOWSKI E, HOUDECK P, and MOLL I: Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol Physiol* 19(2):71-77, 2006
- BRANDNER JM**: Pores in the epidermis: Aquaporins and tight junction. *Int J Cosmet Sci* 29:413-422, 2007 Review
- BRANDNER JM**, POETZL C, SCHMAGE P, HAUSWIRTH U, and MOLL I: A (leaky?) barrier: Tight junction proteins in skin diseases. *Drug Discovery Today* 5(1):e39-e45, 2008
- BRANDNER JM**: Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *Eur J Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 72: 289-294, 2009
- BRUEWER M**, LUEGERING A, KUCHARZIK T, PARKOS CA, MADARA JL, HOPKINS AM, and NUSRAT A: Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 171:6164-6172, 2003
- CASATELLA MA**: The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils: *Immunol Today* 16:21-26, 1995
- CHENG X**, and KOCH PJ: In vivo function of desmosomes. *J. Dermatol.* 31:171-187, 2004
- CHIBA H**, OSANAI M, MURATA M, KOIJMA T, and SAWADA N: Transmembran proteins of tight junction. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes* 1778: 588-600, 2007
- CHIDGEY M**: Desmosomes and disease: an update. *Histol Histopathol* 17:1179-1192, 2002
- CHRISTOFORI G**, and SEMB H: The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24(2):73-76, 1999
- CHRISTOPHERS E**, and HENSELER T: Contrasting disease patterns in psoriasis and atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 279:48, 1987
- CHUNG E**, COOK PW, PARKOS CA, PARK YK, PITTELKOW MR, and COFFEY RJ: Amphiregulin causes functional downregulation of adherens junctions in psoriasis. *J Invest Dermatol* 124:1134-1140, 2005
- COHEN CJ**, SHIEH JT, PICKLES RJ, OKEGAWA T, HSIEH JT, and BERGELSON JM: The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 98:15191-15196, 2001
- COLEGIO OR**, VAN ITALLIE CM, McCREA HJ, RAHNER, ANDERSON JM: Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Cell Physiol* 283:C142-C147, 2002
- COLEGIO OR**, VAN ITALLIE CM, RAHNER C, ANDERSON JM: Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(5):C1346-C1354, 2003
- COOPER KD**, HAMMERBERG C, BAADSGAARD O, ELDER JT, CHAN LS, TAYLOR RS, VOORHEES JJ, and FISHER G: Interleukin-1 in human skin. Dysregulation in psoriasis. *J Invest Dermatol* 95:24S-26S, 1990
- DAUGHERTY BL**, MATEESCU M, PATEL AS, WADE K, KIMURA S, GONZALES LW, GUTTENTAG S, BALLARD PL, and KOVAL M: Developmental regulation of claudin localization by fetal alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L1266-1273, 2004
- DRAGSTEN PR**, BLUMENTHAL R, HANDLER JS: Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature (England)* 294 (5843):718-722, 1981

- EBNET K, SUZUKI A, OHNO S, and VESTWEBER D:** Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 117 (Pt 1):19-29, 2004
- EVANS MJ, von HAHN T, TSCHERNE DM, SYDER AJ, PANIS M, WOELK B, HATZIOANNOU T, McKEATING JA; BIENIASZ PD, and RICE CM:** Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801-805, 2007
- FANNING AS, JAMESON BJ, JESAITIS LA, and ANDERSON JM:** The tight junction protein ZO-1 established a link between the transmembran protein Occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273:29745-29753, 1998
- FARQUHAR MG, and PALADE GE:** Junctional complex in various epithelia. *J Cell Biol* 17: 375-412, 1963
- FARTASCH M:** Epidermal barrier in disorders of the skin. *Microsc Res Tech* 38: 361–372, 1997
- FUKUMARU K, YOSHII N, KANZAKI T, and KANEKURA T:** Immunohistochemical comparison of β -catenin expression by human normal epidermis and epidermal tumors. *J Dermatol* 34:746-753, 2007
- FURUSE M, HIRASE T, ITHO M, NAGAFUCHI A, YONEMURA S, and TSUKITA S:** Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-1788, 1993
- FURUSE M, ITHO M, HIRASE T, NAGAFUCHI A, YONEMURA S, TSUKITA S, and TSUKITA S:** Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 127:1617–1626, 1994
- FURUSE M, FUJITA K, HIIRAGI T, FUJIMOTO K, and TSUKITA S:** Claudin-1 and -2: Novel integral membrnan proteins localizing at Tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550, 1998a
- FURUSE M, SASAKI H, FUJIMOTO K, and TSUKITA S:** A single gene product, claudin-1 or claudin-2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143:391-401, 1998b
- FURUSE M, FURUSE K, SASAKI H, TSUKITA S:** Conversion of zonula occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 in Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153:263-272, 2001
- FURUSE M, HATA M, FURUSE K, YOSHIDA Y, HARATAKE A, SUGITANI Y, NODA T, KUBO A, and TSUKITA S:** Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099-1111, 2002
- FURUSE M, and TSUKITA S:** Claudins in occluding junctions of human and flies. *Trends Cell Biol* 16 (4):181-188, 2006
- GETSIOS B, HUEN AC, and GREEN KJ:** Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:271-281, 2004
- GOTTARDI CJ, NIESSEN CM, GUMBINER BM:** The adherens junction. In *Cell Adhesion, The frontier in Molecular Biology Series*, HAMES BD, GLOVER DM, BECKERLE M (eds). Chap 8, Oxford University Press, 2002
- GRICE K, SATTAR H, BAKER H, and SHARRATT M:** The relationship of transepidermal water loss to skin temperature in psoriasis and eczema. *J Invest Dermatol* 64:313-315, 1975
- GROVES RW, ALLEN MH, ROSS EL, AHSAN G, BARKER JN, and MacDONALD DM:** Expression of selectin ligands by cutaneous squamous ceell carcinoma. *Am J Pathol* 143:1220-1225, 1993
- GRUNWALD GB:** The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol.* 5:797–805, 1993

- GUMBINER B, STEVENSON B, and GRIMALDI A:** The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol* 107:1575-1587, 1988
- GUMBINER B, LOEWENKOPF T, and APATIRA D:** Identification of 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3460-3464, 1991
- GUMBINER BM:** Breaking through the tight junction barrier. *J Cell Biol* 123:1631-1633, 1993
- GUMBINER BM:** Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357, 1996
- HAMAZAKI Y, ITHO M, SASAKI H, FURUSE M and TSUKITA S:** Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP-1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277:455-461, 2002
- HAMMERBERG C, BATA-CSORGO Z, VOORHEES JJ, and COOPER KD:** IL-1 and IL-1 receptor antagonist regulation during keratinocyte cell cycle and differentiation in normal and psoriatic epidermis. *Arch Dermatol Res* 290:367-374, 1998
- HANBY AM, CHINERY R, POULSOM R, PLAYFORD R, and PIGNATELLI M:** Downregulation of E-cadherin in the reparative epithelium of human gastrointestinal tract. *Am J Pathol* 148(3):723-729, 1996
- HASKINS J, GU L, WITTCHEN ES, HIBBARD J, and STEVENSON BR:** ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141: 199-208, 1998
- HIRABAYASHI S, TAJIMA M, YAO I, NISHIMURA W, MORI H, and HATA Y:** JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol Cell Biol* 23(12):4267-4282, 2003
- HIRASE T, STADDON JM, SAITOU M, ANDO-AKATSUKA Y, ITHO M, FURUSE M, FUJIMOTO K, TSUKITA S, and RUBIN LL:** Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110: 1603-1613, 1997
- HIRATA K, ISHIDA T, PENTA K, REZAEI M, YANG E, WOHLGEMUTH J, and QUERTERMOUS T:** Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* 276 (19):16223-16231, 2001
- HOEDE K:** Zur Frage der Erbllichkeit der Psoriasis. *Der Hautarzt* 8:433-438, 1957
- HUBER D, BALDA MS, and MATTER K:** Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils. *J Biol Chem* 275:5773-5778, 2000
- HUBER JD, EGLETON RD, and DAVIS TP:** Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences* 24:719-725, 2001
- HUBER O:** Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and diseases. *Cell Mol Life Sci* 60:1872-1890, 2003
- INAI T, KOBAYASHI J, and SHIBATA Y:** Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDKC cells. *Eur J Cell Biol* 78:849-855, 1999
- ITHO M, NAGAFUCHI A, YONEMURA S, KITANI-YASUDA T, TSUKITA S, and TSUKITA S:** The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol (United States)* 121(3): 491-502, 1993
- ITHO M, NAGAFUCHI A, MOROI S, and TSUKITA S:** Involvement of ZO-1 in cadherin-based adhesion through its direct binding to α -catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 138:181-192, 1997

- ITHO M, FURUSE M, MORITA K, KUBOTA K, SAITOU M, and TSUKITA S:** Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH-termini of claudins. *J Cell Biol* 147:1351-1361, 1999
- ITHO M, SASAKI H, FURUSE M, OZAKI H, KITA T, and TSUKITA S:** Junctional adhesions molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 154:1351-1363, 2001
- JACOB SE, NASSIRI M, KERDEL FA, and VINCEK V:** Simultaneous measurement of multiple Th1 and Th2 serum cytokines in psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm* 12(5): 309-313, 2003
- JENSEN PJ, TELEGAN B, LAVKER RM, and WHEELOCK MJ:** E-cadherin and P-cadherin have partially redundant roles in human epidermal stratification. *Cell Tissue Res* 288(2): 307-316, 1997
- KACHAR B, and REESE TS:** Evidence for the lipidic nature of tight junction strands. *Nature* 296:464-466, 1982
- KELSO A:** Cytokines and their receptors: An overview. *Ther Drug Monit* 22(1):40-43, 2000
- KIRSCHNER N, POETZL C, VON DEN DRIESCH P, WLADYKOWSKI E, MOLL I, BEHNE M, and BRANDNER JM:** Alteration of Tight Junction Proteins Is an Early Event in Psoriasis: Putative Involvement of Proinflammatory Cytokines. *Am J Pathol* , 175:1095-1106, 2009
- KUCHARZIK T, WALSH SV, CHEN J, PARKOS CA, and NUSRAT A:** Neutrophil transmigration in inflammatory bowel diseases is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol* 159(6):2001-2009, 2001
- LANGBEIN L, GRUND C, KUHN C, PRAETZEL S, KARTENBECK J, BRANDNER JM, MOLL I, and FRANKE WW:** Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur J Cell Biol* 81(8):419-435, 2002a
- LAWLEY TJ, and KUBOTA Y:** Cell adhesion molecules and cutaneous inflammation. *Semin Dermatol* 10:256-259, 1991
- LIU Y, NUSRAT A, SCHNELL FJ, RESVES TA, WALSH S, POCHET M, and PARKOS CA:** Human junctional adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelial. *J Cell Sci* 113:2363-2374, 2000
- MALMINEN M, KOIVUKANGAS V, PELTONEN J, KARVONEN SL, OIKARINEN A, and PELTONEN S:** Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. *Br J Dermatol* 149(2):255-260, 2003
- MARTIN-PADURA I, LOSTAGLIO S, SCHNEEMANN M, WILLIAMS L, ROMANO M, FRUSCELLA P, PANZERI C, STOPPACCIARO A, RUCO L, VILLA A, SIMMONS D, and DEJANA E:** Junctional adhesions molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117-127, 1998
- MATSUYOSHI N, TANAKA T, TODA K, OKAMOTO H, FURUKAWA F, and IMAMURA S:** Soluble Ecadherin: A novel cutaneous disease marker. *Br J Dermatol* 132:745-749, 1995
- MATTER K, and BALDA MS:** Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3):225-236, 2003
- MATTER K, AIJAZ S, TSAPARA A, and BALDA MS:** Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17(5):453-458, 2005
- MAZZON E, and CUZZOCREA S:** Role of TNF-alpha in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammatory. *Respir Res* 8:75, 2007

- McCARTHY** KM, SKARE IB, STANKEWICH MC, FURUSE M, TSUKITA S, ROGERS RA, LYNCH LD, and SCHNEEBERGER EE: Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109: 2287-2298, 1996
- MITIC** LL, VAN ITALLIE CM, and ANDERSON JM: Molecular physiology and pathophysiology of tight junction I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G-250-G254, 2000
- MORITA** K, ITHO M, SAITOU M, ANDO-AKATSUKA Y, FURUSE M, YONEDA K, IMAMURA S, FUJIMOTO K, and TSUKITA S: Subcellular distribution of tight junction-associated Proteins (occludin, ZO-1, ZO-2) in rodent skin. *J Invest Dermatol* 110:862-866, 1998
- MORITA** K, FURUSE M, FUJIMOTO K, and TSUKITA S: Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 96:511-516, 1999a
- MORITA** K, SASKI H, FURUSE M, and TSUKITA S: Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147:185-194, 1999b
- MORITA** K, SASAKI H, FURUSE K, FURUSE M, TSUKITA S, and MIYACHI Y: Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp Dermatol* 12(3):289-295, 2003
- MOROI** S, SAITOU M, FUJIMOTO K, SAKAKIBARA A, FURUSE M, YOSHIDA O, and TSUKITA S: Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig sertoli cells in testes. *Am J Physiol Cell Physiol* 274:C1708-1717, 1998
- MOTTA** S, MONTI S, SESANA L, MELLESI R, GHIDONI R, and CAPUTO R: Abnormality of water Barrier function in psoriasis. Role of ceramid fractions. *Arch Dermatol* 130(4): 452-460, 1994
- MUELLER** W, and Hermann B: Cyclosporin A for psoriasis. *N Engl J Med* 301:355, 1976
- MULLER**, WA: Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24:326-33, 2003
- MURESAN** Z, PAUL DL, and GOODENOUGH DA: Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell* 11(2):627-634, 2000
- NAIK** UP, and ECKFELD K: Junctional adhesion molecule 1 (JAM-1). *J Biol Regul Homeost Agents* 17: 341-347, 2003
- NICKOLOFF** BJ: Skin innate immune system in psoriasis: friends or foe?. *J Clinical Invest* 104:1181-1189, 1999
- NIESSEN** CM: Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127:2525-2532, 2007
- NIZET** V, OHTAKE T, LAUTH X, TROWBRIDGE J, RUDISILL J, DORSCHNER RA, PESTONJAMASP V, PIRAINO J, HUTTNER K, and GALLO RL: Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414 (6862):454-457, 2001
- NOMURA** I, GOLEVA E, HOWELL MD, HAMID QA, ONG PY, HALL CF, DARST M, GAO B, BOGUNIEWICZ M, TRAVERS JB, and LEUNG DYM: Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to Psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol* 171:3262-3269, 2003
- NUSRAT** A, PARKOS CA, LIANG TW, CAMES DK, and MADARA JL: Neutrophil migration across mode intestinal epithelia: monolayer dirruption and subsequent events in epithelial repair. *Gastroenterology* 113:1489-1500, 1997
- NUSRAT** A, TURNER JR, and MADARA JL: IV. Regulation of tight junction by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol* 279:G851-857, 2000

- OHNEMUS U**, KOHRMEYER K, HOUDEK P, ROHDE H, WLADYKOWSKI E, VIDAL S, HORSTKOTTE M, AEPFELBACHE M, KIRSCHNER N, BEHNE M, MOLL I, BRANDNER JM: Regulation of epidermal Tight Junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative staphylococcus strains. *J Invest Dermatol* 128:906-916, 2007
- OSHIMA T**, LAROUX FS, COE LL, MORISE Z, KAWACHI S, BAUER P, GRISHAM MB, SPECIAN RD, JENNINGS PS, GRANGER DN, JOH T, and ALEXANDER JS: Interferon-gamma and interleukin-10 reciprocally regulate endothelial junction integrity and barrier function. *Microvasc Res* 61:130-143, 2001
- OSTERMANN G**, WEBER KSC, ZERNECKE A, SCHROEDER A, and WEBER C: JAM-1 is a ligand of the $\beta 2$ integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nature Immunol* 3: 151-158, 2002
- OZAKI H.**, ISHII K, HORICHI H, ARAI H, KAWAMOTO T, OKAWA K, IWAMATSU A, and KITA T: Cutting edge: Combined treatment of TNF- α and IFN- γ causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *J Immunol* 163:553-557, 1999
- PALMERI D**, VAN ZANTE A, HUANG CC, HEMMERISCH S, and ROSEN SD: Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundary of endothelial cells. *J Biol Chem* 275:19139-19145, 2000
- PARIS L**, TONUTTI L, VANNINI C, and BAZZONI G: Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1778(3):646-659, 2007
- PELTONEN S**, RIEHOKAINEN J, PUMMI K, and PELTONEN J: Tight junction components occludin, ZO-1, and claudin-1, -4, and -5 in active and healing psoriasis. *Br J Dermatol* 156(3):466-472, 2007
- PEREZ-MORENO M**, JAMORA C, and FUCHS E: Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 112(4):535-548, 2003
- PRINZ JC**: Neueste Aspekte in der Pathogenese der Psoriasis. *Der Hautarzt* 54(3):209-214, 2003
- PUMMI K**, MALMINEN M, AHO H, KARVONEN SL, PELTONEN J, and PELTONEN S: Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol* 117:1050-1058, 2001
- RESCIGNO M**, URBANO M, VALZASINA B, FRANCOLINI M, ROTTA G, BONASIO R, GRANICCI F, KRAEHENBUHL JP, and RICCIARDI-CASTAGNOLI P: Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol* 2:361-367, 2001
- ROCZNIAK-FERGUSON A**, and REYNOLDS AB: Regulation of p120-catenin in nucleocytoplasmic shuttling activity. *J Cell Sci* 116:4201-4212, 2003
- ROTHBERG S**, CROUNSE G, and LEE JL: Glycin-C¹⁴ incorporation into the proteins of normal stratum corneum and abnormal stratum corneum of psoriasis. *J Invest Dermatol* 37:497-504, 1961
- SAITOU M**, FUJIMOTO K, DOI Y, ITHO M, FUJIMOTO T, FURUSE M, TAKANO H, NODA T, and TSUKITA S: Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141:397-408, 1998
- SAITOU M**, FURUSE M, SASAKI H, SCHULZKE JD, FROMM M, TAKANO H, NODA T, and TSUKITA S: Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11:4131-4142, 2000
- SAKAGUCHI T**, GU X, GOLDEN HM, SUH ER, RHOADS DB, and REINECKER HC: Cloning of the human claudin-2 5'-flanking region revealed a TATA-less promoter with conserved binding sites in mouse and human for caudal-related homeodomain proteins and hepatocyte nuclear factor-1 α . *J Biol Chem* 277:21361-21370, 2002

- SAKAKIBARA A**, FURUSE M, SAITOU M, ANDO-AKATSUKA Y, and TSUKITA Y: Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 137: 1393–1401, 1997
- SAWADA N**, MURATA M, KIKUCHI K, OSANAI M, TOBIOKA H, KOJIMA T, and CHIBA H: Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc* 36:147-156, 2003
- SCHLAAK JF**, BUSLAU M, JOCHUM W, HERMANN E, GRINDT M, GALLATI H, MEYER ZUM BUESCHENFELDE KH, and FLEISCHER B: T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset. *J Invest Dermatol* 102:145-149, 1994
- SCHLUETER H**, MOLL I, WOHLBURG H, and FRANKE WW: The different structures containing tight Junction proteins in epidermal and other stratified epithelial cells, including squamous cell metaplasia. *Eur J Cell Biol* 86(11-12):645-655, 2007
- SCHNEEBERGER EE**, and LYNCH RD: Structure, function, and regulation of cellular tight junction. *Am J Physiol* 262:L647-L661, 1992
- SCHNEEBERGER EE**, and LYNCH: RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C1213-C1228, 2004
- SCHOEN M**, BEHMENBURG C, DENZER D, and SCHOEN MP: Pathogenic function of IL-1 β in psoriasiform skin lesions of flaky skin (fsn/fsn) mice. *Clin Exp Immunol* 123:505-510, 2001
- SCHULZKE JD**, GITTER AH, MANKERTZ J, SPIEGEL S, SEIDEL U, AMASHEH S, SAITOU M, TSUKITA S, and FROMM M: Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice. *Biochi Biophys Acta (Netherlands)* 1669(1):34-42, 2005
- SHIMOYAMA Y**, HIROHASHI S, HIRANO S, NOGUCHI M, SHIMOSATO Y, TAKEICHI M, and ABE O: Cadherin cell adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 49: 2128-2136, 1989
- SIMON DB**, LU Y, CHOATE KA, and VELAZQUEZ H, AL-SABBAN E, PRAQA M, CASARI G, BETTINELLI A, COLUSSI G, RODRIQUEZ-SORIANO J, McCREDIE D, MILFORD D, SAJAD S, LIFTON RP: Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285:103-106, 1999
- SONODA N**, FURUSE M, SASAKI H, YONEMURA S, KATAHIRA J, HORIGUCHI Y, and TSUKITA S: Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 147:195–204, 1999
- STAEHELIN LA**: Further observations on the fine structure of freeze-cleaver tight junction. *J Cell Sci* 13:763-786, 1973
- STAEHELIN LA**: Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol* 39:191-282, 1974
- STEVENSON BR**, SILICIANO JD, MOOSEKER JD, and GOODENOUGH DA: Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103: 755-766, 1986
- STEVENSON BT**, and KEON BH: The tight junctions: Morphology to molecules. *Annu Rev Cell* 119:89-109, 1998
- TAKEICHI M**: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455, 1991
- THOMAS FC**, SHETH B, ECKERT JJ, BAZZONI G, DEJANA E, and FLEMING TP: Contribution of JAM-1 to epithelial differentiation and tight-junction biogenesis in the mouse preimplantation embryo. *J Cell Science* 117:5599-5608, 2004
- TINKLE CL**, LECHLER T, PASOLLI HA, and FUCHS E: Conditional targeting of E-cadherin in skin: Insights into hyperproliferative and degenerative responses. *PNAS* 101:552-557, 2004

- TROA TC, RAHBAR R, ARABZADEH A, CHEUNG RM, and TURKSEN K:** Delayed epidermal permeability barrier formation and hair follicle aberrations in *Inv-Cldn6* mice. *Mech Dev* 122(6):805-819, 2005
- TROY TC, LI Y, O'MALLEY L, and TURKSEN K:** The temporal and spatial expression of claudins in epidermal development and the accelerated program of epidermal differentiation in K14-CaSR transgenic mice. *Gene Expr Patterns* 7(4):423-430, 2007
- TSUKITA S, FURUSE M, and ITHO M:** Structural and signalling molecules come together at tight junction. *Curr Opin Cell Biol* 11: 628-633, 1999a
- TSUKITA S, and FURUSE M:** Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 9:268-273, 1999b
- TSUKITA S, and FURUSE M:** Pores in the wall: Claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149:13-16, 2000
- TSUKITA S, FURUSE M, and ITHO M:** Multifunctional strands in tight junction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293, 2001
- TSUKITA S, and FURUSE M:** Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol* 14:531-536, 2002
- TSURUTA D, GREEN KJ, GETSIOS S, and JONES JCR:** The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *TRENDS in Cell Biol* 12:355-357, 2002
- TUNGGAL JA, HELFRICH I, SCHMITZ A, SCHWARZ H, GUENZEL D, FROMM M, KEMLER R, KRIEG T, and NIESSEN CM:** E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junction. *EMBO J* 24(6):1146-1156, 2005
- TURKSEN K, and TROY TC:** Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* 129(7):1775-1784, 2002
- UMEDA K, IKENOUCI J, KATAHIRA-TAYAMA S, FURUSE K, SASAKI H, NAKAYAMA M, MATSUI T, TSUKITA S, FURUSE M, and TSUKITA S:** ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strands formation. *Cell* 126(4):741-754, 2006
- VAN ITALLIE C, RAHNER C, and ANDERSON JM:** Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Inves* 107:1319–1327, 2001
- VAN ITALLIE CM, and ANDERSON JM:** The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc Am Thorac Soc* 1(1):38-41, 2003
- VAN ITALLIE CM, and ANDERSON JM:** The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology* 19:331-338, 2004 Review
- VAN ITALLIE CM, and ANDERSON JM:** Claudins and epithelial paracellular transport. *Ann Rev Physiol* 68:403-429, 2006
- VAN JOOST T, BOS JD, HEULE F, and MEINARDI MM:** Low-dose cyclosporine A in severe psoriasis. A double-blind study. *Br J Dermatol* 11:183-190, 1988
- VAN MEER G, and SIMONS K:** The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J (England)* 5:1455-1464, 1986
- WANG W, DENTLER WL, and BORCHARDT RT:** VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H434-40, 2001
- WATSON RE, PODDAR R, WALKER JM, McGUILL I, HOARE LM, GRIFFITHS CE, and O'NEILL CA:** Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis. *J Pathol* 212(4):450-458, 2007

- WEBER C**, FRAEMOHS L, and DEJANA E: The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 7(6):467-477, 2007
- WEGNER J**, and GALLA HJ: The role of non-lamellar lipid structures in the formation of tight junctions. *Chem Phys Lipids* 81:229-255, 1996
- WEINSTEIN G**, and VAN SCOTT E: Autoradiographic analysis of turnover times of normal and psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 45: 257-262, 1965
- WEINSTEIN G**, McCULLOUGH J, and ROSS P: Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol* 85: 579-583, 1985
- WILLIAMS LA**, MARTIN-PADURA I, DEJANA E, HOGG N, and SIMMONS DL: Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecules (JAM). *Mol Immunol* 36:1175-1188, 1999
- WILKINSON PC**, and NEWMAN I: Chemoattractant activity of IL-2 for human lymphocytes: a requirement for IL-2 receptor beta-chain. *Immunology* 82(1):134-139, 1994
- WILCOX E**, BURTON Q, NAZ S, RIAZUDDIN S, SMITH T, PLOPLIS B, BELYANTSEVA I, BEN-YOSEF T, LIBURD N, and MORELL RJ: Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104:165-172, 2001
- WILKE K**, WEPF R, KEIL FJ, WITTERN KP, WENCK H, and BIEL SS: Are sweat glands an alternate penetration pathway? Understanding the morphology complexity of the axillary sweat gland apparatus. *Skin Pharmacol Physiol* 19(1):38-49, 2006
- WITTCHEN ES**, HASKINS J, and STEVENSON BR: Protein interactions at tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 274:35179-35185, 1999
- WOLFF K**, GOLDSMITH LA, KATZ S, GILCHREST BA, PALLER AS, LEFFELL DJ: FITZPATRICK'S Dermatology in General Medicine, McGraw-Hill, New York, 6 Auflage, 2003.
- YOSHIDA Y**, MORITA M, MIZOGUCHI A, IDE C, and MIYACHI Y: Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 293:239-244, 2001
- YOSHINAGA Y**, HIGAKI M, TERAJIMA S, OHKUBO E, NOGITA T, MIYASAKA N, and KAWASHIMA M: Detection of inflammatory cytokines in psoriatic skin. *Archives of Dermatological Research* 287:2:158-164, 1995
- YOUAKIM A**, and AHDIEH M: Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol* 276:G1279-G1288, 1999
- YOUNG P**, BOUSSADIA O, HALFTER H, GROSE R, BERGER P, LEONE DP, ROBENEK H, CHARNAY P, KEMLER R, and SUTER U: E-cadherin controls adherens junctions in the epidermis and the renewal of hair follicles. *EMBO J* 22(21):5723-5733, 2003
- YUKI T**, HARATAKE A, KOISHIKAWA H, MORITA K, MIYACHI Y, and INOUE S: Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Expe Dermatol* 16(4):324-330, 2007
- ZHONG T**, SAITOU T, MINASE T, SAWADA N, ENOMOTO K, and MORI M: Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J Cell Biol* 120: 477-483, 1993
- ZHOU S**, MATSUYOSHI N, TAKEUCHI T, OHTSUKI Y, and MIYACHI Y: Reciprocal altered expression of T-cadherin and P-cadherin in psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol* 149:268-273, 2003
- ZIMMERLI SC**, and HAUSER C: Langerhans cells and lymph node dendritic cells express the tight junction component claudin-1. *J Invest Dermatol* 127(10):2381-2390, 2007

ZIMMERLI SC, KERL K, HADJ-RABIA S, HOHL D, and HAUSER C: Human epidermal Langerhans cells express the tight junction protein claudin-1 and are present in human genetic claudin-1 deficiency (NISCH-syndrom). *Exp Dermatol* 17(1):20-23, 2008

7. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Morphologie und Funktion der Tight Junctions
- Abb. 2** Integrale Membranproteine der Tight Junctions
- Abb. 3** Proteine der Tight Junctions und Adherens Junctions
- Abb. 4** Schematische Darstellung der Tight Junction-Funktionen
- Abb. 5** Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung der menschlichen Haut bei der Frühform der Psoriasis und bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 6** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 1 in gesunder menschlicher Haut
- Abb. 7** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 1 und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 8** Kolokalisation von Claudin 1 und CD43 auf der Oberfläche von epithelial gelegenen Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 9** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 1 und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 10** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 1 und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 11** Kolokalisation von Claudin 1 und CD43 auf der Oberfläche epithelial gelegener Zellen in menschlicher Haut in der Psoriasis pustulosa
- Abb. 12** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 1 und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 13** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 4 in gesunder menschlicher Haut
- Abb. 14** Immunfluoreszenz -Lokalisation von Claudin 4 und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 15** Immunfluoreszenz -Lokalisation von Claudin 4 und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis

- Abb. 16** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 4 in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa ohne Entzündungszellinfiltration
- Abb. 17** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 4 und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 18** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 7 in gesunder menschlicher Haut
- Abb. 19** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 7 der Frühform der Psoriasis ohne Entzündungszellinfiltration
- Abb. 20** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 7 und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 21** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 7 und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 22** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Claudin 7 in der Psoriasis pustulosa ohne Entzündungszellinfiltration
- Abb. 23** Kolo­kalisierung von Claudin 7 und CD43 auf der Oberfläche von Entzündungszellen in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 24** Immunfluoreszenz-Lokalisation von JAM-A in gesunder menschlicher Haut
- Abb. 25** Kolo­kalisierung von JAM-A und CD43 auf der Oberfläche von Entzündungszellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 26** Immunfluoreszenz-Lokalisation von JAM-A und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 27** Kolo­kalisierung von JAM-A und CD43 auf der Oberfläche von Entzündungszellen in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 28** Immunfluoreszenz-Lokalisation von JAM-A und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 29** Immunfluoreszenz-Lokalisation von ZO-1 in gesunder menschlicher Haut

- Abb. 30** Immunfluoreszenz-Lokalisation von ZO-1 und CD43- bzw. CD15-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 31** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Protein ZO-1 und CD43- bzw. CD15-positiven Zellen in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 32** Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin in gesunder menschlicher Haut
- Abb. 33** Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin in der Frühform der Psoriasis ohne Entzündungszellinfiltration
- Abb. 34** Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 35** Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 36** Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin und CD43-positiven Zellen in der menschlichen Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 37** Immunfluoreszenz-Lokalisation von E-Cadherin und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 38** Immunfluoreszenz-Lokalisation von β -Catenin in gesunder menschlicher Haut
- Abb. 39** Immunfluoreszenz-Lokalisation von β -Catenin und CD43-positiven Zellen in der menschlichen Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 40** Immunfluoreszenz-Lokalisation von β -Catenin und neutrophilen Granulozyten in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 41** Immunfluoreszenz-Lokalisation von β -Catenin und CD43-positiven Zellen in der menschlichen Haut bei der Psoriasis pustulosa

- Abb. 42** Immunfluoreszenz-Lokalisation von β -Catenin und neutrophilen Granulozyten in der menschlichen Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 43** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Desmoglein 1 in gesunder Haut
- Abb. 44** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Desmoglein 1 und CD43-positiven Zellen in menschlicher Haut bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 45** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Desmoglein 1 und neutrophilen Granulozyten bei einer frühen Form der Psoriasis
- Abb. 46** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Desmoglein 1 und CD43-positiven Zellen in der menschlichen Haut bei der Psoriasis pustulosa
- Abb. 47** Immunfluoreszenz-Lokalisation von Desmoglein 1 und neutrophilen Granulozyten in der menschlichen Haut bei der Psoriasis pustulosa

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 1 in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis
Tabelle 2	Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 1 in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa
Tabelle 3	Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 4 in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis
Tabelle 4	Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 4 in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa
Tabelle 5	Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 7 in Haut und in der Frühform der Psoriasis
Tabelle 6	Intensität der immunhistochemischen Färbung von Claudin 7 in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa
Tabelle 7	Intensität der immunhistochemischen Färbung von JAM-A in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis
Tabelle 8	Intensität der immunhistochemischen Färbung von JAM-A in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa
Tabelle 9	Intensität der immunhistochemischen Färbung von ZO-1 in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis
Tabelle 10	Intensität der immunhistochemischen Färbung von ZO-1 in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa
Tabelle 11	Intensität der immunhistochemischen Färbung von E-Cadherin in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis
Tabelle 12	Intensität der immunhistochemischen Färbung von E-Cadherin in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa
Tabelle 13	Intensität der immunhistochemischen Färbung von β -Catenin in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis
Tabelle 14	Intensität der immunhistochemischen Färbung von β -Catenin in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa
Tabelle 15	Intensität der immunhistochemischen Färbung von Desmoglein 1 in gesunder Haut und in der Frühform der Psoriasis
Tabelle 16	Intensität der immunhistochemischen Färbung von Desmoglein 1 in gesunder Haut und in der Psoriasis pustulosa

9. Zusammenfassung

Tight Junctions (TJs) sind Zell-Zell-Verbindungen, die am apikalen Teil der lateralen Zellmembran lokalisiert sind und benachbarte Zellen miteinander verbinden. Sie setzen sich aus verschiedenen Transmembran- und Plaqueproteinen zusammen. TJs bilden eine semipermeable Barriere aus, die den Fluss von Lösungen, Ionen oder potentiell toxischen Stoffen durch den parazellulären Raum kontrollieren. Die gesunde Epidermis ist durch ein definiertes und differenzierungsabhängiges Muster von Tight Junction-Proteinen charakterisiert. In der humanen Epidermis sind TJs jedoch ausschließlich auf das *Stratum granulosum* beschränkt.

Die Psoriasis ist eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung, die durch eine Hyperplasie sowie Parakeratose der Epidermis, einer ausgeprägten Infiltration von Entzündungszellen und eine gestörte Barrierefunktion gekennzeichnet ist. Für die Plaque-Typ-Psoriasis konnten mittels der Immunhistochemie Veränderungen in der Lokalisation verschiedener TJ-Proteine in der Epidermis dargestellt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es mit Hilfe der Immunhistochemie weitere Transmembran- und Plaque-Proteine der TJs sowie ausgewählte Proteine der Adhärenzverbindungen und Desmosomen in der Psoriasis-Haut in der frühen und in der fortgeschrittenen Phase der Krankheit zu charakterisieren. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass die Lokalisationsveränderung der TJ-Proteine bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung auftritt. In der Frühform der Psoriasis waren die Proteine ZO-1 und Claudin 4 im Vergleich zur gesunden Haut in mehreren oberen Zellschichten der Epidermis lokalisiert. Im Gegensatz dazu waren Claudin 1 und Claudin 7 in den oberen und unteren Schichten der Epidermis herunterreguliert. In der fortgeschrittenen Phase der Erkrankung (beispielhaft hier: Psoriasis pustulosa) konnte ein ähnliches Expressionsmuster für ZO-1 und Claudin 4 dargestellt werden. Die Proteine Claudin 1 und Claudin 7 zeigten in der Psoriasis pustulosa eine zusätzliche Herabregulation bis in mittlere Epidermisschichten. Je ausgeprägter also die typisch histologischen Merkmale (z. B. Akanthose) waren, desto deutlicher war der Verlust von Claudin 1 und Claudin 7 erkennbar. Bei der Expression von JAM-A konnte kaum eine Veränderung im Vergleich zur gesunden Haut erkannt werden. Auch innerhalb der beiden Psoriasis-Typen zeigte sich ein ähnliches

Expressionsmuster. Bei den Proteinen der Adhärenzverbindungen (β -Catenin und E-Cadherin) sowie bei dem desmosomalen Proteine (Desmoglein 1) zeigte sich ebenfalls nur eine leichte Veränderung der Expression/Lokalisation in beiden Psoriasisformen im Vergleich zur gesunden Epidermis. Dabei wies E-Cadherin in beiden Psoriasisformen lediglich eine leichte Herabregulation in den basalen Epidermisschichten auf. Für Desmoglein 1 konnte ebenfalls keine eindeutige Herabregulation beobachtet werden. Das Expressionsmuster stellte sich in beiden Psoriasisformen im Vergleich zur gesunden Epidermis lediglich intensitätsschwächer dar.

Weiterhin wurden der Einfluß von Entzündungszellen auf das Verteilungsmuster der einzelnen TJ-, AJ und desmosomalen Proteine untersucht. Hierbei wurden die verschiedenen Zell-Zell-Verbindungs-Proteine mit CD43 bzw. CD15 in Doppellokalisierung oder in Folgeschnitten immunhistochemisch angefärbt. Dabei ließ sich eine Herabregulation für alle TJ-, AJ und desmosomalen Proteine mit Ausnahme von JAM-A bei der epidermalen Infiltration von neutrophilen Granulozyten darstellen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Veränderungen in der Lokalisation der verschiedenen TJ-Proteine bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Psoriasisentwicklung auftreten. Sie sind somit nicht die Konsequenz ausgedehnter histologischer Veränderungen, wie sie in der Epidermis der Plaque-Psoriasis vorgefunden werden. Entzündungszellen haben einen Einfluß auf die Lokalisation von Zell-Zell-Verbindungsproteinen. Weiterhin sind die Veränderungen nicht nur auf TJ-Proteine beschränkt, sondern betreffen, wenn auch in einer deutlich geringeren Ausprägung, die Proteine der AJs und Desmosomen.

10. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ingrid Moll und bei Frau PD Dr. Johanna Brandner für die Bereitstellung des Themas, die Ermöglichung der Anfertigung der Dissertation im Zellbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie und für die außerordentlich engagierte und freundliche Betreuung bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank den medizinisch technischen Assistentinnen des Labors Pia Houdek, Ewa Wladykowski und Sabine Vidal, die mich bei der Einarbeitung im Labor und auch jederzeit in den folgenden Monaten unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich auch bei vielen Leuten aus meinem privaten Umfeld bedanken, die mich immer wieder unterstützt, ermutigt und motiviert haben. Dazu zählen insbesondere meine Eltern, meinen Großeltern, meine Schwester Teresa, mein Freund Julian Holler sowie Jens und Petra Holler.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Claudia Pötzl
Geburtstag: 29.04.1981
Geburtsort: Leipzig

Universität

04/2000-10/2007 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen

04/2002 Physikum

04/2003 1. Staatsexamen

09/2004-03/2005 Auslandsemester: Università degli Studi di Padova, Italien

09/2005 2. Staatsexamen

10/2005-09/2006 Wissenschaftliche Tätigkeit im Labor der Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum-Hamburg-Eppendorf (Promotion)

10/2006-10/2007 Praktisches Jahr

1. Tertial: Chirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Tertial: HNO-Heilkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen

3. Tertial: Innere Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen

10/2007 3. Staatsexamen

11/2007 Approbation als Ärztin

Facharztausbildung

Seit 08/2008 wissenschaftliche Angestellte am Universitätsklinikum Giessen-Marburg Standort Giessen (Fachabteilung: HNO)

12. Veröffentlichungen

BRANDNER JM, POETZL C, SCHMAGE P, HAUSWIRTH U, MOLL I: A (leaky?) barrier: Tight junction proteins in skin diseases. *Drug Discovery Today* 5(1):e39-e452008

KIRSCHNER N, POETZL C, VON DEN DRIESCH P, WLADYKOWSKI E, MOLL I, BEHNE M, and BRANDNER JM: Alteration of Tight Junction Proteins Is an Early Event in Psoriasis: Putative Involvement of Proinflammatory Cytokines. *Am J Pathol* 175:1095-1106, 2009

13. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: