

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

Untersuchungen zur Expression und Bedeutung von SPINK9 beim spinozellulären Karzinom der Haut

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

vorgelegt von

Lisa Maria Redelfs
aus Bremen
Kiel, 2016

Erster Gutachter: Priv. Doz. Dr. Dr. med. Ulf Meyer-Hoffert

Zweiter Gutachter: Priv. Doz. Dr. med Martin Laudien

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2017

Zum Druck genehmigt

gez.

,Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Einleitung	1
1. Der Aufbau der Haut.....	1
2. Hyperkeratotische Hauterkrankungen	2
2.1 Lichen simplex chronicus.....	2
2.2. Aktinische Keratose	2
2.3. Plattenepithelkarzinom.....	3
2.4. Cornu cutaneum.....	4
3. Kallikrein-verwandte Peptidasen.....	4
3.1 Regulation.....	5
4. SPINK9 (LEKTI-2)	6
5. Fragestellung der Arbeit.....	7
Material und Methoden.....	9
1. Material	9
1.1 Geräte	9
1.2 Einwegmaterialien	9
1.3 Chemikalien und Reagenzien	9
1.4 Antikörper.....	10
1.5 Puffer und Lösungen.....	10
1.6 Histologisches Material.....	11
1.6.1 Proben.....	11
2. Methoden.....	12
2.1. Grundlagen der Immunhistochemie.....	12
2.1.1 Prinzip.....	12
2.1.2 ABC-Methode	12
2.1.3 Antigen-Demaskierung.....	13

Inhaltsverzeichnis

2.2 Antikörper-Isolierung	14
2.3. Immunhistochemie	15
2.3.1 Verwendete Antikörper	15
2.3.2 Bestimmung der Primärantikörper-Konzentration.....	15
2.3.3 Vorbereitung des histologischen Materials	16
2.3.4 Färbeprotokoll SPINK9.....	16
Ergebnisse	18
1. Palmoplantare Haut.....	18
2. Lichen simplex chronicus	19
3. Aktinische Keratose	20
4. Plattenepithelkarzinom	22
5. Cornu cutaneum.....	23
Diskussion.....	24
Zusammenfassung	30
Literaturverzeichnis	32
Anhang.....	37
Proben	37
1. Lichen simplex chronicus.....	37
2. Aktinische Keratose	37
3. Plattenepithelkarzinom.....	40
4. Cornu cutaneum.....	42
Danksagung	
Lebenslauf	
Eidesstattliche Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Complex-Methode
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
AK	Aktinische Keratose
BSA	Bovine serum antigen
FPLC	Fast protein liquid chromatography
H ₂ O dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
IgG	Immunglobulin G
KLK	Kallikrein-verwandte Peptidasen
LSC	Lichen simplex chronicus
LEKTI	Lymphoepithelial Kazal-type related inhibitor
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PAR-2	Proteinase-activated receptor 2
PBS	Phosphate buffered saline
PEK	Plattenepithelkarzinom
SPINK	Serine protease inhibitor of Kazal-type
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TBS	Tris-buffered saline

Einleitung

1. *Der Aufbau der Haut*

Die Haut ist mit ca. 2 m² eines der größten Organe des menschlichen Körpers. Als Barriere zwischen Mensch und Umwelt erfüllt sie wichtige Aufgaben: Schutz vor Wasserverlust durch enge Zellkontakte, mechanischer Schutz in Form einer derben Hornschicht und chemischer Schutz durch Abwehrstoffe und die hauteigene Flora (Plewig et al. 2012).

Die Haut wird in drei Schichten eingeteilt: Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Epidermis als oberste Schicht ist ein verhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel, welches die Barrierefunktionen übernimmt. Die darunter liegende bindegewebige Dermis ist für die mechanische Widerstandskraft und Versorgung der gefäßfreien Epidermis zuständig. Die tiefer liegende Subkutis dient als Verschiebeschicht und Druckpolster. Sie besteht aus lockerem Binde- und Fettgewebe und verbindet die Kutis – bestehend aus Epidermis und Dermis – mit den tiefer liegenden Strukturen (Lüllmann-Rauch 2006).

Die Epidermis lässt sich in verschiedene Schichten einteilen. Das einschichtige *Stratum basale* liegt direkt der Basallamina an und sorgt durch epidermale Stammzellen für einen kontinuierlichen Nachschub an postmitotischen Keratinozyten (Rzepka et al. 2005). Das darauf folgende *Stratum spinosum* schützt die Haut durch die festen Zellkontakte vor Wasserverlust. Im weiter apikal gelegenen *Stratum granulosum* entstehen in den Zellen Keratohyalin granula, die durch die Aggregation von Zytokeratinfilamenten eine Vorstufe der Verhornung darstellen. Die oberste Schicht ist das *Stratum corneum* bestehend aus kernlosen Hornzellen, den Korneozyten. Die Dicke dieser Schicht variiert abhängig von Beanspruchung und Lokalisation stark. Die einzelnen verhornten Keratinozyten im *Stratum corneum* verlieren durch proteolytische Prozesse ihre Kohärenz und schuppen ab, auch Desquamation genannt. Diese kann durch Störungen der proteolytischen Regulierung verändert sein, sodass es zum Auftreten einer verdickten Hornschicht kommen kann, einer Hyperkeratose (Lüllmann-Rauch 2006).

Der größte Teil der menschlichen Haut ist mit Haaren, Schweiß- und Talgdrüsen ausgestattet und wird als Felderhaut bezeichnet. Nur an Handflächen und Fußsohlen findet sich eine unbehaarte Haut mit einer dickeren Hornschicht, die Leistenhaut (Lüllmann-Rauch 2006).

2. Hyperkeratotische Hauterkrankungen

2.1 Lichen simplex chronicus

Synonyme: Lichen Vidal, Vidalsche Krankheit

Als Lichen simplex chronicus (LSC) bezeichnet man eine Hautläsion, die durch permanentes Scheuern und Kratzen hervorgerufen wird (Lotti et al. n.d.). Typische Lokalisationen sind Nacken, Ellenbogen, Schienbein, Anogenitalregion, Gesicht und Augenlider (Liao et al. 2014; Martín-Brufau et al. 2015).

Aufgrund der chronischen, mechanischen Reizung zeichnet sich der LSC histopathologisch durch eine Hyperkeratose und Verlängerung der Reteleisten aus (Deshmukh et al. 2013). Außerdem kann eine Lichenifikation der Haut, also eine Verdickung der Epidermis mit einer vergrößerten Felderzeichnung, beobachtet werden (Potter et al. 2013). Somit ähnelt der LCS histopathologisch der Leistenhaut an Handflächen und Fußsohlen.

2.2 Aktinische Keratose

Synonyme: solare Keratose, Keratosis actinica

Als aktinische Keratose (AK) wird ein Plattenepithelkarzinom *in situ* der Haut bezeichnet. Es handelt sich um eine Proliferation transformierter Keratinozyten, welche sich allein auf die Epidermis beschränkt, die Basalmembran nicht durchbricht und somit auch keine Metastasen bildet. Die Keratinozyten zeichnen sich durch eine hohe Mutationsrate (Fu & Cockerell 2003) und Expression veränderter Oberflächenmoleküle aus (Steinkraus 2004). Es können sich chromosomale Aberrationen zeigen, die typischerweise auch beim invasiven Plattenepithelkarzinom vorkommen (Ashton et al. 2003).

AK treten einzeln oder multipel an Hautarealen auf, welche chronisch lichtexponiert sind, z.B. Stirn, unbehaarte Kopfhaut, Nasenrücken und Handrücken. Männer entwickeln häufiger eine aktinische Keratose als Frauen. Die Prävalenz liegt bei 15,4% bei Männern und 5,9% bei Frauen, wobei sie im Alter deutlich zunimmt (Memon et al. 2000). Als Risikogruppe werden hellhäutige Menschen mit einem Hauttyp I und Menschen bezeichnet, die über lange Zeit UV-Strahlung ausgesetzt sind, wie z.B. Landwirte, Seeleute und Gärtner. Auch Immunsupprimierte haben ein deutlich erhöhtes Risiko (Ulrich et al. 2003). Es besteht für die AK die Tendenz, in ein invasives Plattenepithelkarzinom überzugehen. Das Risiko dafür liegt bei etwa 10% (6-16%). Bei Immunsupprimierten liegt das Risiko bei etwa 30% (Glogau 2000).

Das Ausmaß der Atypien der Keratinozyten wird in 3 Schweregrade eingeteilt: mild (AK I, frühes in-situ-Karzinom), moderat (AK II, frühes in-situ-Karzinom) oder schwer (AK III, in-situ-Karzinom). Bei aktinischen Keratosen Grad I finden sich atypische Keratinozyten in der basalen und suprabasalen Schicht, also im unteren Drittel der Epidermis. Bei aktinischen Keratosen Grad II finden sich diese Atypien auch im mittleren Drittel, wohingegen bei der aktinischen Keratose Grad III die gesamte Epidermis von Atypien durchsetzt ist (Plewig et al. 2012; Röwert-Huber et al. 2007).

Weitere Kriterien zur histopathologischen Einteilung sind eine wechselnde Ortho- und Hyperkeratose, Dyskeratosen, aufgehobene Architektur der Epidermis (Polarisationsverlust), Atypien der Keratinozyten und eine aktinische Elastose (Röwert-Huber et al. 2007).

2.3 Plattenepithelkarzinom

Synonyme: Spinaliom, spinozelluläres Karzinom, Stachelzellkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom (PEK) ist ein maligner Tumor der Haut, welcher infiltrierend und lokal destruierend wächst, aber nur selten metastasiert. Typischerweise zeichnet es sich durch einen derben, schmerzlosen, exophytisch wachsenden, oft entzündlichen Tumor aus, der eine zentrale Ulzeration besitzt. Eine Hornschicht ist nicht obligat (Plewig et al. 2012).

Das PEK ist der zweithäufigste Hauttumor nach dem Basalzellkarzinom und verzeichnet eine stetige und schnelle Inzidenzzunahme (Gray et al. 1997). Die Inzidenz in Schleswig-Holstein beträgt 62 (♂) bzw. 41 (♀) pro 100 000 Einwohner pro Jahr (Pritzkeleit et al. 2014). Zu den Risikofaktoren für ein Entstehen eines Plattenepithelkarzinoms zählen aktinische Keratosen, hohes Alter, kumulative Sonnenexposition und helle Pigmentierung (Harvey et al. 1996).

Als wichtigster ätiologischer Faktor gilt die chronische UV-Exposition, insbesondere bei UV-empfindlichen Menschen (Harvey et al. 1996). Daher tritt das PEK auch gehäuft im Gesicht und auf der Kopfhaut auf. Weitere Risikofaktoren für die Entstehung sind ionisierende Strahlung, Hitze, chronische Entzündungen mit Narbenbildung, chemische Karzinogene, Immunsuppression und onkogene Viren wie der kutane Humane Papillomavirus-Typ 16 (Zhang et al. 2014). Es können chromosomale Aberrationen vorliegen, bei denen vor allem der Genverlust auf Chromosom 18q zu einer Progression in ein invasives Plattenepithelkarzinom beiträgt (Ashton et al. 2003).

Histopathologisch besteht ein Plattenepithelkarzinom aus einer Proliferation atypischer Keratinozyten aus dem *Stratum spinosum*, daher der Begriff Spinaliom (Schmoll et al. 2005).

Die Entstehung zeichnet sich durch eine Aufhebung der regulären Architektur aus (Polarisationsverlust). Die Keratinozyten durchbrechen die Basalmembran, infiltrieren die Dermis und gegebenenfalls auch tiefer liegende Gewebe durch Metastasen (Breuninger et al. 2006). Wichtige prognostische Faktoren sind die Lokalisation, die Größe, die Eindringtiefe des Tumors sowie der Differenzierungsgrad der Keratinozyten (Plewig et al. 2012).

2.4 Cornu cutaneum

Synonym: Hauthorn

Das Cornu cutaneum ist eine Hyperkeratose der Epidermis, welche zu einer Hornbildung führt. Klinisch manifestiert es sich als krustige Auflagerung, welche sich zu einem hornartigen Auswuchs entwickeln kann (Plewig et al. 2012). Es kommt vor allem bei Hauterkrankungen vor, die durch eine Hyperkeratose geprägt sind, wie z.B. eine aktinische Keratose, ein Plattenepithelkarzinom oder eine Verruca vulgaris (Szeimies, Rolf-Markus Hauschild & Garbe 2010). Aber auch entzündliche Erkrankungen wie ein diskoider Lupus erythematoses oder eine Tinea amiantacea können zugrunde liegende Erkrankungen sein (Plewig et al. 2012).

Histopathologisch ist das Cornu cutaneum durch eine starke Hornbildung im *Stratum corneum* gekennzeichnet. Der übrige Teil der Epidermis zeigt histologische Veränderungen, die der zugrunde liegenden Erkrankung entsprechen (Plewig et al. 2012).

3. Kallikrein-verwandte Peptidasen

Kallikrein-verwandte Peptidasen (KLK), beim Menschen auch human tissue kallikreins genannt, stellen die größte Familie der Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen dar. Sie sind im menschlichen Genom auf 15 Genen auf dem langen Arm des Chromosoms 19 (19q13.4) kodiert (Lundwall & Brattsand 2008). Im aktiven Zentrum befinden sich drei Aminosäuren, die auch als katalytische Triade bezeichnet werden: Histidin-57, Aspartat-102 und Serin-195 (Müller-Esterl 2011).

Die ersten erfolgreichen Versuche, Proteasen in der Haut zu isolieren, gelangen Brattsand und Egelrud im Jahr 1999 (Brattsand & Egelrud 1999). Sie untersuchten das *Stratum corneum* der menschlichen Haut, den Ort der Desquamation, und konnten zwei Proteasen identifizieren: KLK5 und KLK7, damals noch unter dem Namen „*stratum corneum* tryptic enzyme“ (KLK5) (Ekholm et al. 2000) und „*stratum corneum* chymotryptic enzyme“ (KLK7) (Lundström & Egelrud 1991). Egelrud konnte im Jahr 2000 nachweisen, dass beide Proteasen an der

Desquamation beteiligt sind (Egelrud 2000). In den folgenden Jahren konnten noch weitere KLKs in der Haut nachgewiesen werden. So identifizierte Stefansson et al. im Jahr 2006 KLK14 (Stefansson et al. 2006) und Eissa et al. im Jahr 2011 KLK8 (Eissa et al. 2011). Beide Proteasen besitzen Trypsin-ähnliche Eigenschaften und konnten aus dem *Stratum corneum* extrahiert werden. Bis heute sind noch mehrere weitere KLKs in der menschlichen Haut identifiziert worden (Lundwall & Brattsand 2008).

KLKs zeichnen sich durch eine Gewebe-spezifische Expression aus und können so auch als Tumormarker fungieren; KLK3 (Prostata-spezifisches Antigen) ist soweit die bekannteste KLK (Avgeris et al. 2010). Auch die Pathogenese verschiedener Signalmoleküle kann durch KLKs beeinflusst werden. So aktivieren sie beispielsweise protease-activated receptor 2 (PAR-2), einen Regulator der epidermalen Barrierefunktion und der Entzündung (Hachem et al. 2006). Die Aktivierung von PAR-2 führt in der Haut zu einer erhöhten Expression von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen (Gratio et al. 2011).

Ihre proteolytische Aktivität entfalten die KLKs, nachdem sie als Proformen in den Extrazellularraum sezerniert und proteolytisch aktiviert wurden. Dort sind sie einerseits verantwortlich für die Regulation der Aktivität der Cathelicidine und deren antimikrobiellen Effekten, welche wichtig sind für die Abwehr von Infektionen (Yamasaki et al. 2006). Andererseits spielen sie eine wichtige Rolle bei der Spaltung der Korneodesmosomen, der Zell-Zell-Kontakte zwischen den Korneozyten (Egelrud 2000). Dies resultiert in der Abschuppung der Haut, der Desquamation.

3.1 Regulation

KLKs werden auf unterschiedlichen Ebenen reguliert, da sie in vielen physiologischen, aber auch pathophysiologischen Prozessen eine Rolle spielen. Die Regulation der Transkription ist noch nicht auf molekularer Ebene verstanden, allerdings scheinen Entzündungen der Haut wie Psoriasis oder Atopische Dermatitis die Transkription bestimmter KLKs zu verstärken (Komatsu et al. 2005).

Da KLKs als inaktive Proform sezerniert werden, müssen sie extrazellulär vorerst proteolytisch aktiviert werden, um ihre Funktionen ausführen zu können. Einerseits werden sie von Matrix-Metalloproteasen, der Transmembran-Serinprotease Matriptase (Sales et al. 2010) und der Serinprotease Plasmin aktiviert (Blaber et al. 2010), andererseits aktivieren sich die KLKs auch gegenseitig (Yoon et al. 2007). Vor allem KLK5 spielt eine Schlüsselrolle in diesem Prozess. Sie kann nicht nur die eigene Proform aktivieren, sondern auch viele andere

Proformen der KLK-Familie. Außerdem ist allein KLK5 in der Lage, die Proform der KLK7 zu aktivieren (Brattsand et al. 2005; Yoon et al. 2007).

Allerdings können sich KLKs auch gegenseitig inaktivieren (Beaufort et al. 2010). Auch Autolyse spielt eine Rolle, wie bei KLK12 (Memari et al. 2007). Außerdem sorgen der niedrige pH-Wert der Haut und Zn^{2+} -Ionen für eine Inaktivierung (Goettig et al. 2010). Spezifischer sind allerdings die irreversiblen und reversiblen Inhibitoren.

Serpine zählen zu den irreversiblen Inhibitoren für KLKs. Sie binden kovalent durch eine Elektronenpaarbindung an die KLKs und sorgen so für eine Rotation innerhalb der Protease. Nach dieser Reaktion können sowohl Inhibitor als auch Protease nicht reaktiviert werden (Kaiserman et al. 2006).

Zu den reversiblen Inhibitoren zählen serine protease inhibitor of Kazal-type 5 (SPINK5), auch bekannt als lymphoepithelial Kazal-type related inhibitor (LEKTI), SPINK6 und SPINK9 (LEKTI-2) (Goettig et al. 2010), auf welchen im Folgenden näher eingegangen werden soll.

4. SPINK9 (LEKTI-2)

SPINK9 wird durch das gleichnamige Gen *Spink9* auf Chromosom 5 (5p33.1) kodiert und vor allem im *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* von palmoplantarer Haut exprimiert (Meyer-Hoffert et al. 2009; Brattsand et al. 2009). Eine moderate Expression wurde außerdem in Thymus, Pankreas, Leber und Gehirn festgestellt (Brattsand et al. 2009). SPINK9 ist ein spezifischer Inhibitor allein für KLK5, kein weiteres Substrat konnte bis heute gefunden werden (Fischer & Meyer-Hoffert 2013).

Die Kalziumkonzentration im Extrazellularraum beeinflusst die Proliferation und Differenzierung der epidermalen Zellen: eine niedrige Konzentration sorgt für ein schnelles Wachstum der Korneozyten, aber nicht für eine Differenzierung von vitalen epidermalen Zellen zu toten Hornzellen. Eine hohe Kalziumkonzentration allerdings, wie sie auch physiologisch im Extrazellularraum der äußeren Hautschichten vorliegt, sorgt für eine Differenzierung und Ausreifung der Zellen (Hennings et al. 1980). Auch die SPINK9-Expression steigt im Verlauf der Kalzium-induzierten Differenzierung, was die Vermutung zulässt, dass SPINK9 nur von den epidermalen Zellen synthetisiert wird, die durch äußere Einflüsse wie Kalzium weiter in ihrem Differenzierungsprozess vorangeschritten sind (Meyer-Hoffert et al. 2009). Jedoch müssen auch andere Faktoren auf die SPINK9-Expression

eine Auswirkung haben, da SPINK9 physiologisch nur in Handflächen und Fußsohlen nachweisbar ist. Als weitere Faktoren konnten mechanischer Stress und Druck identifiziert werden. Auch atypische Zelldifferenzierung während der Karzinogenese scheint eine wichtige Rolle in der Induktion der SPINK9-Expression zu spielen (Meyer-Hoffert et al. 2009).

Der inhibitorische Effekt von SPINK9 auf KLK5 ist pH-abhängig. Der pH-Wert in der menschlichen Haut variiert von neutral in den tieferen epidermalen Schichten zu einem sauren pH-Wert im *Stratum corneum* (Ohman & Vahlquist 1994). Unter diesen Bedingungen erhöht sich die Stabilität des SPINK9-KLK5-Komplexes in den äußeren Schichten der Haut um ein Vielfaches (Brännström et al. 2012). Dies erklärt sich durch die Protonierung der SPINK9-Seitenkette und damit durch eine stärkere elektrostatische Interaktion zwischen SPINK9 und KLK5 (Brattsand et al. 2009; Meyer-Hoffert et al. 2009). Das Expressionsmuster von SPINK9 ähnelt dem von KLK5, eine klare Kolo-kalisation konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Meyer-Hoffert et al. 2009).

5. Fragestellung der Arbeit

Eine intakte Haut schützt den Menschen vor vielen lebensbedrohlichen äußeren und inneren Reizen: vor Wasserverlust, biologischen und chemischen Noxen, Verletzungen, ultravioletter Strahlung und immunologischen Schäden (Kypriotou et al. 2012). Durch starke mechanische Beanspruchung ist das *Stratum corneum* der Epidermis an Handflächen und Fußsohlen verdickt. Einen wichtigen Mediator dieser Verhornung stellt die Kallikrein-verwandte Peptidase 5 dar (Fischer & Meyer-Hoffert 2013), eine Protease, die kutane Adhäsionsproteine wie Desmogleine oder Korneodesmosomen spaltet und somit direkt an der Desquamation beteiligt ist (Egelrud 2000). Reguliert wird sie vor allem von einem für KLK5 spezifischen Serine Protease Inhibitor of Kazal-Type (SPINK9). Es konnte gezeigt werden, dass SPINK9 in gesunder Haut nur palmoplantar exprimiert wird (Meyer-Hoffert et al. 2009; Brattsand et al. 2009).

Es sind jedoch auch Hauterkrankungen bekannt, die mit einer starken Verhornung weit entfernt von Handflächen und Fußsohlen einhergehen (Plewig et al. 2012). Mittels immunhistochemischer Untersuchungen soll in dieser Dissertation der Frage nachgegangen werden, ob SPINK9 auch in erkrankter, hyperkeratotischer Haut mit nicht palmoplantarer Lokalisation nachgewiesen werden kann. Einen weiteren Schwerpunkt stellt die Charakterisierung des Expressionsmusters, beispielsweise nach der Lokalisation oder der Differenzierung des Tumors dar. Außerdem soll untersucht werden, ob SPINK9 als

Tumormarker für die Charakterisierung eines spinozellulären Karzinoms oder einer Vorstufe des weißen Hautkrebses von Bedeutung sein könnte.

Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

Dampfgarer	Braun, Kronberg
Fettstift	Dako, Glostrup, Dänemark
FPLC	ÄKTApurifier, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg
Kamera	Olympus, Hamburg
Mikroskop	Olympus, Hamburg
Objektiv	Olympus, Hamburg
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Plattformschüttler	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotom	Microm, Walldorf
Magnetrührer	Ika, Staufen
Stoppuhr	Carl Roth, Karlsruhe
Trockenschrank	Medite, Burgdorf
Wasserbad Medax	Nagel, Rendsburg
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

1.2 Einwegmaterialien

Deckgläser	Th. Geyer, Renningen
Einmalhandschuhe	Ansell LTD, Tamworth, U.K.
Silanisierte Objektträger	Th. Geyer, Renningen
Pippettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Tubes	Eppendorf, Hamburg

1.3 Chemikalien und Reagenzien

BSA	Sigma, Steinheim
Ethanol	BÜFA, Hude-Altmoorhausen
Eukitt	Kindler, Freiburg
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Merck, Darmstadt

Histo-Clear	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	Carl Roth, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4 mit H_2O)	Merck, Darmstadt
Roti®-ImmunoBlock	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Sigma, Steinheim
VECTASTAIN® ABC Kit	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Tris ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ mit 2 H_2O)	Merck, Darmstadt
Tris/HCL	Sigma, Steinheim
Tween® 20	Sigma, Steinheim
Vector® NovaRED -Substrat	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt
Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	Merck, Darmstadt

1.4 Antikörper

Primärantikörper	Affinitätsgereinigter Antikörper gegen rekombinantes SPINK9 in voller Länge aus Ziegenserum Verdünnung 666 ng/ml mit freundlicher Unterstützung von Dr. rer. nat. Zhihong Wu und Dr. rer. nat. Jan Fischer zur Verfügung gestellt
Sekundärantikörper	Anti-Ziege-Antikörper Verdünnung 3 µg/ml Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

1.5 Puffer und Lösungen

Citratpuffer	Stammlösung A	21,01 g 0,1 M Zitronensäure aufgefüllt mit H_2O dest. auf 1000 ml
	Stammlösung B	29,4 g 0,1 M Natrium-Citrat aufgefüllt mit H_2O dest. auf 1000 ml
	27 ml A + 123 ml B + 1350 ml H_2O dest. pH=6,0 (ggf. Korrektur mit HCl oder NaOH)	
Glycin-Puffer	0,755 g Glycin + 0,585 g NaCl aufgefüllt mit H_2O dest. auf 200 ml, einstellen eines pH=2,75 mit HCl	

NaCl-Puffer	aus 20 mM NaP + 1 M NaCl einen Puffer mit pH=7,4 herstellen
NaP-Puffer	aus 20 mM Na ₂ HPO ₄ (2,84g/1000 ml H ₂ O dest.)+ NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O (7,79 g/1000 ml H ₂ O dest.) einen Puffer mit dem pH=7,4 herstellen
PBS-Puffer	8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,42 g Na ² HPO ₄ , + 0,27 g KH ₂ PO ₄
Roti®-ImmunoBlock	nach Angaben des Herstellers
TBS-Puffer	8,763 g NaCl + 7,88 g Tris/HCL + 6,5 ml NaOH (1M) aufgefüllt mit H ₂ O dest. auf 1000 ml pH=7,4-7,6 (ggf. Korrektur mit HCl oder NaOH)
TBS/Tween	0,5 ml Tween/1000 ml TBS
TBS/12% BSA	12 g BSA/100 ml TBS
TBS/1% BSA	1 g BSA/100 ml TBS
VECTASTAIN® ABC Kit	nach Anleitung des Herstellers
Vector® NovaRED Substrat	nach Anleitung des Herstellers
Peroxidase-Block	10 ml H ₂ O ₂ + 90 ml H ₂ O dest. 3% iger Peroxidase-Block

1.6 Histologisches Material

Das Gewebe (Lichen simplex chronicus, Aktinische Keratosen, Plattenepithelkarzinom, Cornu cutaneum, palmoplantare Kontrollen) stammt aus dem histologischen Archiv der Universitäts-Hautklinik Kiel. Die Proben wurden zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken nach schriftlicher Aufklärung der Patienten entnommen. Es wurden 10 Gewebeproben von Lichen simplex chronicus aus den Jahren 2009 und 2013, 100 Gewebeproben von Aktinischen Keratosen aus den Jahren 2011 und 2013, 99 Gewebeproben vom Plattenepithelkarzinom aus den Jahren 2009, 2010, 2011 und 2013 und 9 Gewebeproben von Cornua cutanea aus den Jahren 2009, 2010 und 2011 für die Färbungen verwendet. Es wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Proben verwendet, die in Anteilen noch eine intakte Epidermis aufwiesen.

1.6.1 Proben

Für die genauen Charakterisierungen der Proben kann der Anhang zu Rate gezogen werden. Dort können die Informationen Alter des Patienten, Geschlecht, Entnahmestelle der Biopsie, das Ergebnis der SPINK9-Färbung und bei den Aktinischen Keratosen der Schweregrad (AK I-III) entnommen werden.

2. Methoden

2.1. Grundlagen der Immunhistochemie

2.1.1 Prinzip

In dieser Dissertation wurde auf die Prinzipien der Immunhistochemie zurückgegriffen. Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit welcher molekulare Strukturen in histologischen Gewebeschnitten dargestellt werden können. An diese Strukturen, auch Antigene genannt, kann ein Antikörper binden. An diesen Antikörper ist ein Farbstoff oder Enzym gekoppelt, welches ein farbloses Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt. So sorgt nach erfolgreicher Bindung des Antikörpers an das Antigen entweder der Farbstoff oder das farbige Substrat für eine Anfärbung des Antigens. Zusätzlich können verschiedene Teilschritte (Sekundär-, Tertiärantikörper) in den Färbeprozess eingeschaltet werden, die an den ersten (Primär-) Antikörper binden (Noll & Schraub-Kuhnen 2000).

Eine Vielzahl von Methoden kann angewendet werden, um ein Antigen anzufärben. Dazu gehören u.a. die PAP-Methode (Peroxidase-Anti-Peroxidase), die APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) und die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex) (Noll & Schraub-Kuhnen 2000).

Im Folgenden wird auf die ABC-Methode eingegangen, welche in der SPINK9-Färbung angewendet wurde.

2.1.2 ABC-Methode

Bei der ABC-Methode macht man sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Avidin, welches aus Hühnereiweiß gewonnen werden kann, ist ein Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin. Es besitzt ein Molekulargewicht von 68 kDa (Hendrickson et al. 1989). Da Streptavidin, ein reineres Produkt aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*, spezifischere Reaktionen erzielt, wird es dem Avidin vorgezogen. Es wird gentechnisch hergestellt (Laitinen et al. 2006).

Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin (Vitamin B7), welches an einen Antikörper gekoppelt werden kann. Im Färbeprozess wird solch ein biotinylierter Antikörper als Brückenantikörper (Sekundärantikörper) verwendet, er stellt also eine Verbindung zwischen dem Primärantikörper und dem AB-Komplex her. Der AB-Komplex besteht aus einem Molekül Avidin mit vier Bindungsstellen. An drei dieser Bindungsstellen ist ein Molekül Biotin gebunden. Außerdem ist an den Komplex ein Enzym gekoppelt, beispielsweise eine

Peroxidase oder alkalische Phosphatase (Noll & Schraub-Kuhnen 2000). Bei der im Färbedurchgang für SPINK9 verwendeten ABC-Methode wurde eine Peroxidase verwendet.

Nach aufeinanderfolgender Zugabe von passendem Primärantikörper, Sekundärantikörper, AB-Komplex und Enzymsubstrat auf eine Antigenstruktur, kann bei erfolgreicher Bindung das durch das Enzym umgesetzte Substrat als farbiges Produkt erkannt werden (Noll & Schraub-Kuhnen 2000).

Der Vorteil der ABC-Methode ist die hohe Sensitivität. Der Antigennachweis mit dieser Methode ist 4-8-fach sensitiver als bei der PAP- und APAAP-Methode. Allerdings muss darauf geachtet werden, endogenes Biotin im Gewebe zu blockieren, da sonst das Ergebnis als falsch positiv gewertet werden kann (Noll & Schraub-Kuhnen 2000).

2.1.3 Antigen-Demaskierung

Die Antigen-Demaskierung ist eine wichtige Methode, um die durch die Einbettung verloren gegangene Immunreaktivität der Antigene zumindest teilweise wieder herzustellen.

Mit Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Proben gewährleisten hohe Qualität bezüglich ihrer Haltbarkeit und dem Erhalt ihrer Strukturen. Jedoch sind Konformationsänderungen des Antigens möglich, sog. „cross-links“, die bis zum Verlust der Reaktivität führen können (Werner et al. 2000). Als cross-links bezeichnet man eine Verknüpfung von mindestens zwei Makromolekülen. Diese Verknüpfung geschieht durch kovalente Bindungen (Elektronenpaarbindungen) oder ionische Bindungen (elektrostatische Anziehung positiv und negativ geladener Ionen) (Müller-Esterl 2011). Durch die Verbindungen können einige Epitope ihre Eigenschaften verlieren, sodass sie von den zugehörigen Antikörpern nicht mehr erkannt werden (Werner et al. 2000). Das Ergebnis einer Färbung könnte somit fälschlicherweise negativ ausfallen.

Durch die Demaskierung kann in der Regel die Verdünnung eines Antikörpers, welcher auch ohne jegliche Vorbehandlung reagiert, um ein Vielfaches gesteigert werden und so die benötigte Antikörpermenge reduziert werden (Noll & Schraub-Kuhnen 2000).

Für die Demaskierung gibt es hauptsächlich zwei Methoden, die die Reaktivität verbessern oder sogar komplett wiederherstellen können:

Zum einen kann die hitzeinduzierte Demaskierung verwendet werden. In einem angewärmten Puffer, meist Tris-HCl- oder Citrat-Puffer, werden die durch Formalinfixierung verursachten Proteinvernetzungen wieder aufgehoben, sodass der Antikörper das Antigen wieder erkennen

kann. Erhitzt werden können die Gewebeschnitte in verschiedenen Geräten, wie beispielsweise einer Mikrowelle, einem Dampfdruckkochtopf, einem Dampfgarer oder einem Autoklaven. Fehlerquellen sind zu lange oder kurze Inkubationszeiten und von der Empfehlung abweichende pH-Werte oder Pufferkonzentrationen (Noll & Schraub-Kuhnen 2000).

Zum anderen gibt es die enzymatische Demaskierung. Hier trennen Enzyme die während der Fixierung und Lagerung entstandenen Verknüpfungen wieder und legen so das Antigen wieder frei. Folgende Enzyme können zum Einsatz kommen: Neuraminidase, Protease, Pronase, Pepsin, Trypsin. Fehlerquellen sind die zu lange oder kurze Inkubation der Enzymlösung auf dem Gewebeschnitt (Noll & Schraub-Kuhnen 2000).

Es können auch beide Verfahren kombiniert werden, wenn der Verdacht besteht, dass die Demaskierung mit einer alleinigen Methode nicht ausreicht. In diesem Fall sollte allerdings vorerst die hitzeinduzierte Demaskierung erfolgen, da enzymatisch aufgebrochene Proteinstrukturen durch Hitze schneller zerstört werden können. Allerdings kann die Morphologie des Gewebes auch durch die zweifache Demaskierung geschädigt werden (Noll & Schraub-Kuhnen 2000).

2.2 Antikörper-Isolierung

Der Antikörper gegen humanes SPINK 9 wurde aus dem Serum einer Ziege isoliert, welche zuvor mehrfach mit dem rekombinant hergestellten Antigen (SPINK9) immunisiert wurde. Das Serum wurde bereitgestellt von Dr. rer. nat. Zhihong Wu und Dr. rer. nat. Jan Fischer.

Die Isolation wurde in einer FPLC- (Fast protein liquid chromatography) Anlage (Äkta, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) durchgeführt. In mehreren Durchläufen wurden Immunglobulin G (IgG)- Antikörper gegen humanes SPINK 9 aus dem Serum isoliert.

Der erste Durchlauf diente der IgG-Isolation mit Hilfe einer Protein-G-Säule. Nach einem Spüldurchgang mit 20 mM Natrium-Phosphat-Puffer (NaP-Puffer) mit einem pH-Wert von 7,4 wurde die Probe, bestehend aus 50% Ziegenserum und 50% NaP-Puffer, in die Anlage gegeben. Die IgG-Moleküle hafteten an der Säule. Zur IgG-Elution wurde 0,1 M Glycin-Salzsäure (Glycin-HCl) mit einem pH-Wert von 2,75 eingesetzt. Tris-Puffer (pH 7,6) diente dem Abpuffern des sauren Milieus.

Im zweiten Durchlauf kam eine SPINK9-Säule zum Einsatz. Das Vorgehen entsprach dem ersten Durchlauf, allerdings mit einem zusätzlichen Schritt. Vor der Elution sorgte ein Spüldurchgang mit einem 20 mM NaP und 1 M Natrium-Chlorid-(NaCl-) Puffer (pH 7,4)

durch ionische Wechselwirkungen dafür, dass hauptsächlich SPINK9-Antikörper an der Säule haften blieben und andere SPINK-Moleküle abgelöst wurden.

Im dritten Lauf wurden die SUMO-Protein (Small Ubiquitin-like Modifier) affinen Antikörper entfernt. Das SUMO-Protein kann posttranslational an intrazelluläre Proteine kovalent geknüpft werden und somit deren Funktion verändern. Dieser Prozess spielt eine Rolle bei Transportmechanismen, Apoptose, Zellzyklus und der Regulation der Transkription. Um einen positiven Farbumschlag aufgrund der SUMO-Antikörper zu vermeiden, wurden diese mit einer pET32a und einer rpET-His-Tag antigen - Säule abgefangen. Das weitere Vorgehen dieses Durchlaufs entsprach dem ersten Durchlauf.

Nach dem letzten Durchlauf wurden die Proben mit einem Filter mit einer Größe von 50kDa abzentrifugiert. Nach zwei weiteren Zentrifugationen mit je 10 ml PBS konnten die isolierten Antikörper in PBS-Puffer gelagert werden.

2.3. Immunhistochemie

2.3.1 Verwendete Antikörper

Für die Darstellung von SPINK9 wurde ein aus der Ziege stammender und gegen humanes Gewebe gerichteter Antikörper gegen SPINK9 in einer Endkonzentration von 666 ng/ml verwendet.

Der Sekundärantikörper war ein anti-Ziege gerichteter biotinylierter Antikörper der Firma Jackson ImmunoResearch. Die für die Färbung verwendete Konzentration betrug 3 µg/ml.

2.3.2 Bestimmung der Primärantikörper-Konzentration

Der Antikörper wurde mit TBS-Puffer (Tris-gepufferte Saline, siehe unten) und BSA (bovine serum albumin, Rinderserumalbumin) verdünnt. Die Konzentration betrug 1 g BSA/100 ml TBS-Puffer (TBS/1% BSA). BSA wird eingesetzt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verringern (Jeyachandran et al. 2010).

In mehreren Verdünnungsreihen wurden Gewebeschnitte mit unterschiedlichen Konzentrationsstufen des SPINK9-Antikörpers zwischen 10 µg/ml und 0,1429 µg/ml angefärbt, um die Konzentration mit den deutlichsten Ergebnissen zu ermitteln. Als Gewebeproben wurden sowohl palmoplantare Haut als auch Aktinische Keratosen verwendet. Das beste Ergebnis zeigt sich bei einer SPINK9-Antikörper-Konzentration von 666 ng/ml verdünnt mit TBS/1% BSA.

2.3.3 Vorbereitung des histologischen Materials

Vom Paraffinblock mit in Formalin fixiertem Gewebe wurden mit dem Mikrotom 6 µm dicke Schnitte auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Durch eine Silanisierung wird die Oberfläche des Objektträgers mit einer positiven Ladung versehen, die der verbesserten Haftung der Präparate auf dem Objektträger dient. Die Objektträger lagerten für eine Stunde im Trockenschrank bei 63 °C, um das im Schnitt verbliebene Wasser vollständig zu entfernen und die Haftung des Präparates am Objektträger zu erhöhen. Die Entparaffinierung erfolgte für 2 x 10 Minuten in einem Bad mit Histo-Clear, einem Orangendestillat, welches als Ersatz für das toxische Xylol zur Vorbereitung der Schnitte verwendet wurde. Die Rehydrierung der Gewebeschnitte erfolgte über eine absteigende Alkoholreihe: 2 x 2 Minuten in 100%igem Ethanol, 2 x 2 Minuten in 96%igem Ethanol, 1 x 2 Minuten in 80%igem und 1 x 2 Minuten in 70%igem Ethanol, sowie 5 Minuten in H₂O dest. Im weiteren Verlauf wurden die Schnitte in einem mit Citratpuffer gefüllten Dampfgerät für 20 Minuten erhitzt und daraufhin 45 Minuten abgekühlt.

2.3.4 Färbeprotokoll SPINK9

Als Vorbereitung wurden die Schnitte getrocknet, entparaffiniert, rehydriert, in H₂O dest. gewaschen, im Dampfgerät gekocht und abgekühlt.

Vor der eigentlichen Färbung mussten die Schnitte zur Erhöhung der Spezifität blockiert werden. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase verweilten die Schnitte für 10 Minuten in einem Peroxidase-Block (10 ml H₂O₂ (30%) + 90 ml H₂O dest.). Als Waschlösungen wurden H₂O dest. und für 5 Minuten TBS/Tween verwendet.

Als weitere Blockierungen wurden ein TBS/12% BSA-Block und ein Roti ImmunoBlock (in einer Konzentration 1:10 mit H₂O dest.) verwendet, welche nacheinander für 20 Minuten auf die Schnitte gegeben wurden. Sie dienen zur Absättigung freier Bindungsstellen an proteinbindenden Oberflächen und somit zur Reduzierung von unspezifischen Bindungen an der Oberfläche. Zwischen diesen Schritten wurden die Lösungen durch leichtes Abklopfen entfernt. Diese und alle folgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

Im ersten Färbeschritt wurde der Primärantikörper in einer Konzentration von 666 ng/ml in TBS/1% BSA aufgetragen und für eine Nacht im Kühlschrank bei 7,5 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde nach einem Waschgang (2 x 3 Minuten mit TBS/Tween), bei dem die Negativkontrolle getrennt gewaschen wurde, um Kontakt mit dem SPINK9-Antikörper zu

vermeiden, der biotinylierte Sekundärantikörper in einer Konzentration von 3 µg/ml mit TBS/1% BSA für 30 Minuten auf alle Schnitte gegeben. Währenddessen wurde der AB-Komplex angesetzt, welcher eine Inkubationszeit von 30 Minuten benötigt. Die Schnitte wurden 2 x 3 Minuten in TBS/Tween gewaschen, für 30 Minuten mit dem AB-Komplex inkubiert, weitere 3 x 5 Minuten in TBS/Tween gewaschen und letztendlich 4 Minuten mit dem Vector Nova Red-Substrat inkubiert, welches als Substrat für die im AB-Komplex enthaltene Peroxidase fungiert.

Nach weiterem 10-minütigem Waschen in TBS/Tween und kurzem Spülen in H₂O dest. wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Die Schnitte wurden für 30 Sekunden in ein Gemisch aus 30 ml Hämalaun und 60 ml Wasser gegeben, danach in H₂O dest. überführt und für 7 Minuten unter fließendes Wasser gegeben.

Zur Dehydrierung wurden die Schnitte kurz in einer aufsteigenden Alkoholreihe geschwenkt (1 x 70%iger, 1 x 80%iger, 2 x 96%iger und 2 x 100%iger Ethanol). Nach 5 Minuten im Histo-Clear wurden die Objektträger mit Eukitt, einem schnell festwerdenden Klebmedium, und einem Deckgläschen eingedeckt.

Zur Kontrolle des Färbeergebnisses wurden immer eine Positiv- und Negativkontrolle bestehend aus palmoplantarem Kontrollgewebe mitgefärbt. Statt des Primärantikörpers wurde die Negativkontrolle mit Roti ImmunoBlock benetzt.

Ergebnisse

1. Palmoplantare Haut

SPINK9 ist vor allem exprimiert in der Haut von Handflächen und Fußsohlen. Dort fungiert es als Protease-Inhibitor und sorgt für eine ausgeprägte Hornschicht. Diese dient unter anderem als mechanische und chemische Barriere (Meyer-Hoffert et al. 2009).

Alle palmoplantaren Schnitte, welche von sechs verschiedenen Patienten stammten, zeigten in unterschiedlichen Färbedurchgängen immer eine bräunliche Färbung, vor allem in den interzellulären Räumen des *Stratum granulosum* und um die Schweißdrüsenausführungsgänge, wie in Abbildung 1 zu sehen ist. Auch das *Stratum spinosum* war teilweise sehr leicht braun angefärbt.

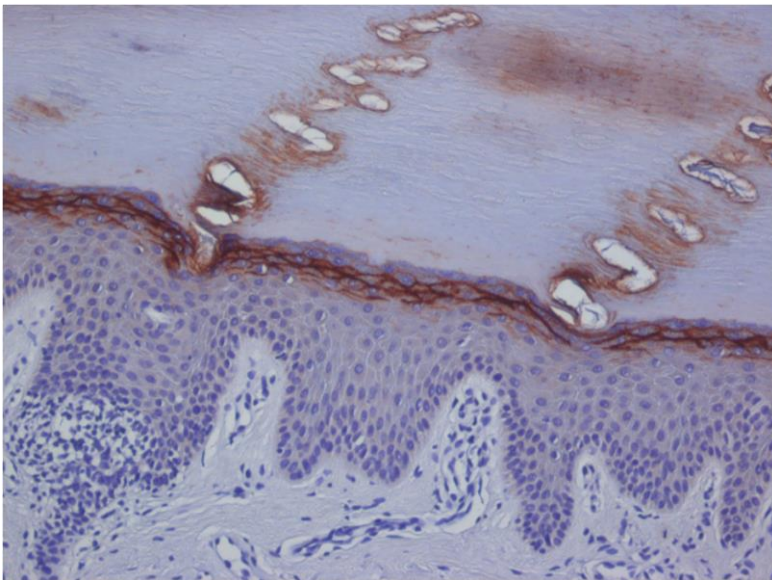


Abbildung 1: Immunhistochemische Darstellung SPINK9-positiver Haut der Fußsohle

100-fache Vergrößerung

SPINK9 ist braun gefärbt.

Alle palmoplantaren Schnitte zeigten eine positive Färbung bei einer Konzentration des Primärantikörpers von 666 ng/ml.

2. Lichen simplex chronicus

Als Lichen simplex chronicus wird eine Differenzierungsstörung der Haut bezeichnet, welche durch chronisches Kratzen und Scheuern hervorgerufen werden kann (Plewig et al. 2012). Histologisch ähnelt der LSC dem Bild gesunder Haut an Handflächen und Fußsohlen. Daher wurde untersucht, ob die palmoplantar typische Expression von SPINK9 auch in Hautläsionen des LSC wiedergefunden werden kann.

10 Gewebeschnitte von verschiedenen Patienten aus den Jahren 2009 und 2013 wurden analog des Färbeprotokolls für SPINK9 angefärbt. Es wurden Biopsien von sowohl männlichen als auch weiblichen Patienten (6 Proben männlich, 4 Proben weiblich) ausgewertet. Alle zeigten eine diffuse, positiv bräunliche Färbung der Epidermis, teilweise mit verstärkter Anfärbung des *Stratum granulosum* oder fokalen starken Anfärbungen des Extrazellularraumes, siehe Abbildung 2.

Es stellten sich keine Unterschiede der Färbeintensität bezüglich des Geschlechts oder der Entnahmestelle dar.

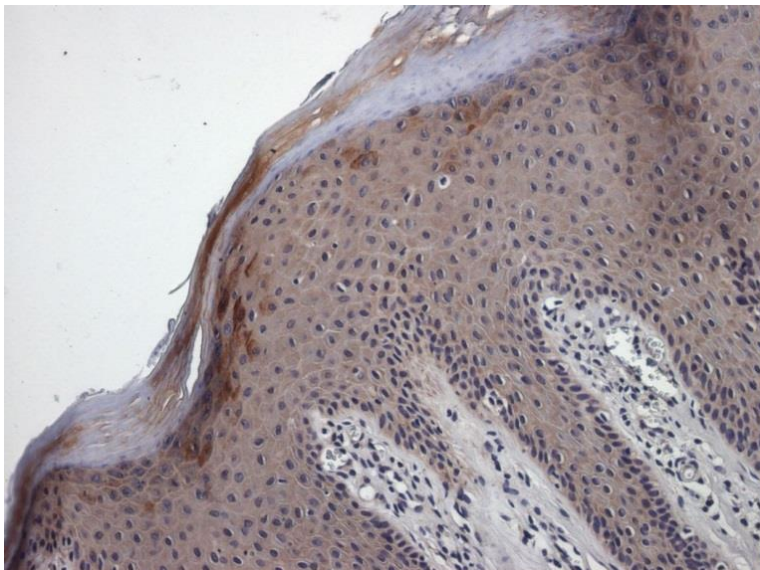


Abbildung 2: Immunhistochemische Darstellung SPINK9-positiver Haut beim Lichen simplex chronicus.

100-fache Vergrößerung

SPINK9 ist braun angefärbt.

Alle zehn angefärbten Schnitte zeigten ein positives Färbeergebnis.

3. Aktinische Keratose

Auch die Aktinische Keratose ist eine Differenzierungsstörung gesunder Haut. Sie wird als Plattenepithelkarzinom in situ bezeichnet, als Vorstufe des weißen Hautkrebses. Die transformierten Keratinozyten haben die Basalmembran noch nicht in Richtung der Dermis durchbrochen.

100 Gewebeschnitte von verschiedenen Patienten aus den Jahren 2011 und 2013 wurden analog des Färbeprotokolls für SPINK9 angefärbt. Es wurden Biopsien von sowohl männlichen als auch weiblichen Patienten (64 Proben männlich, 36 Proben weiblich) ausgewertet. Von den 100 Präparaten waren 51 positiv gefärbt und 49 negativ, wie in Abbildung 3 veranschaulicht wird.

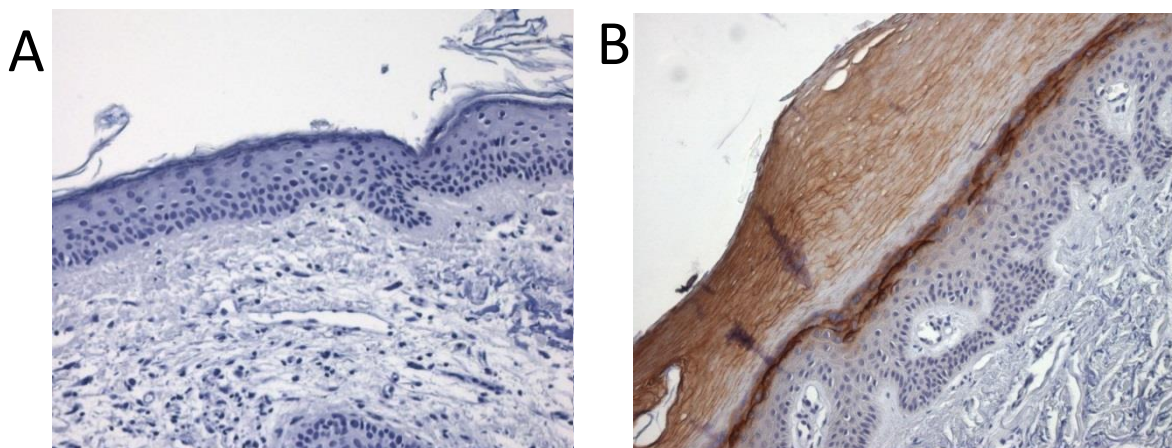


Abbildung 3: Immunhistochemische Darstellung der SPINK9-Färbung bei Aktinischen Keratosen

100-fache Vergrößerung

SPINK9 ist braun angefärbt.

A) SPINK9-negative Haut bei der AK. 49 Schnitte von 100 zeigten ein negatives Ergebnis.

B) SPINK9-positive Haut bei der AK. 51 Schnitte von 100 zeigten ein positives Ergebnis.

Sowohl Hautbiopsien von Männern als auch von Frauen wiesen eine positive Färbung auf. Es gab keine Korrelation zwischen Biopsien bestimmter Körperteile und einer positiven Färbung. Auch die negativen Färbeargebnisse waren weder abhängig von dem Geschlecht noch von der Lokalisation.

Die Anteile der positiv und negativ gefärbten Präparate waren in den unterschiedlichen Schweregraden verschieden verteilt, siehe Abbildung 4: Anteil der positiv (dunkelgrau) und negativ (hellgrau) gefärbten Biopsien in den verschiedenen Schweregraden der Aktinischen Keratose: AK I (4 Schnitte), AK II (46 Schnitte), AK III (50 Schnitte), Angaben in Prozent. Während in den Schweregraden AK I und AK II der Anteil der negativ gefärbten Präparate mit 75% bzw. 52% noch überwiegt, liegt dieser im Schweregrad AK III nur noch bei 44%.

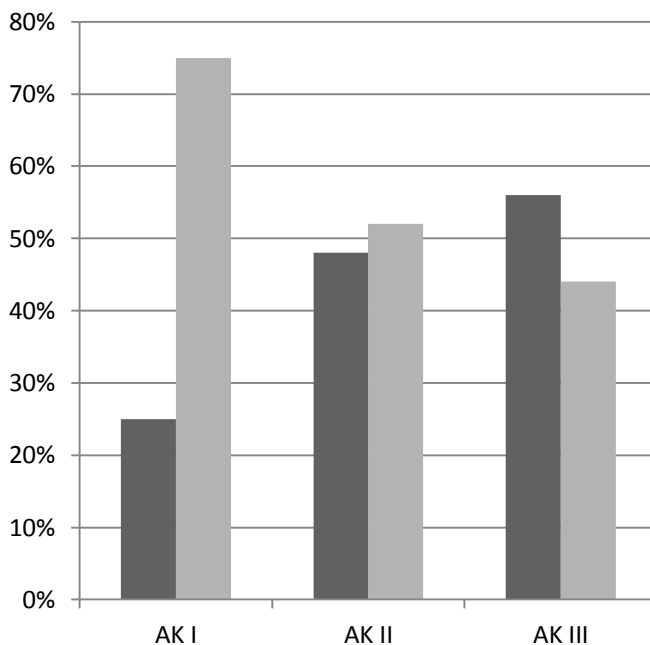


Abbildung 4: Anteil der positiv (dunkelgrau) und negativ (hellgrau) gefärbten Biopsien in den verschiedenen Schweregraden der Aktinischen Keratose: AK I (4 Schnitte), AK II (46 Schnitte), AK III (50 Schnitte), Angaben in Prozent

4. Plattenepithelkarzinom

Das Plattenepithelkarzinom ist der zweithäufigste bösartige Hauttumor. Es handelt sich um einen infiltrierend und lokal destruierend wachsenden Tumor.

99 Gewebeschnitte von verschiedenen Präparaten aus den Jahren 2009, 2010, 2011 und 2013 wurden analog des Färbeprotokolls für SPINK9 angefärbt. Es wurden Hautbiopsien von Männern und Frauen (62 Proben männlich, 37 Proben weiblich) ausgewertet. Von den 99 Präparaten waren 76 positiv gefärbt und 23 negativ, siehe Abbildung 5.

Biopsien von beiden Geschlechtern wiesen eine positive Färbung auf. Es gab keine Korrelation zwischen Biopsien von bestimmten Körperarealen und einer positiven Färbung. Auch die negativen Färbegergebnisse waren weder geschlechts- noch lokalisationsabhängig. Bei positiver SPINK9-Immunreaktivität war diese im Bereich des *Stratum granulosum* lokalisiert. Tumorzellen in tieferen Arealen selbst zeigten keine intensive SPINK9 Färbung.

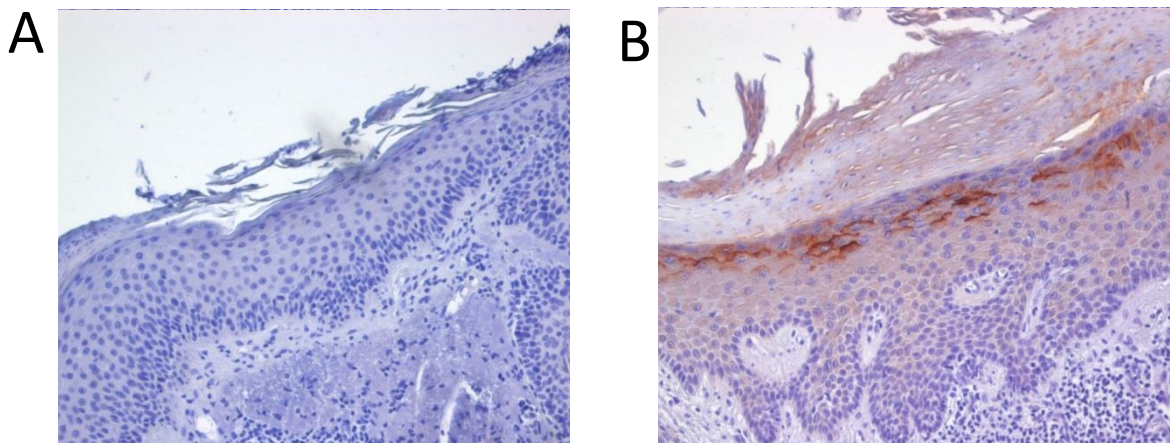


Abbildung 5: Immunhistochemische Darstellung der SPINK9-Färbung bei Plattenepithelkarzinomen

100-fache Vergrößerung

SPINK9 ist braun angefärbt.

A) SPINK9-negative Haut beim PEK 23 Schnitte von 99 zeigten ein negatives Ergebnis.

B) SPINK9-positive Haut beim PEK 76 Schnitte von 99 zeigten ein positives Ergebnis.

5. *Cornu cutaneum*

Das *Cornu cutaneum* ist eine stark ausgeprägte, in der Umgebung isoliert vorkommende Hyperkeratose des *Stratum corneum*. Es kommt vor allem bei Hauterkrankungen vor, die zur Verhornung neigen (Plewig et al. 2012).

Neun Gewebeschnitte von verschiedenen Präparaten aus den Jahren 2009, 2010 und 2011 wurden analog des Färbeprotokolls für SPINK9 angefärbt. Es wurden Hautbiopsien von Männern und Frauen ausgewertet (6 Proben männlich, 3 Proben weiblich).

Die ausgewählten Präparate wurden aus unterschiedlichen Körperregionen entnommen. Von den neun Präparaten waren sieben positiv gefärbt, die anderen zwei negativ, siehe Abbildung 6: Immunhistochemische Darstellung.

Biopsien beider Geschlechter wiesen eine positive Färbung auf. Es gab keine Korrelation zwischen Biopsien von bestimmten Körperarealen und einer positiven Färbung. Die beiden negativen Färbeergebnisse stammten von männlichen Patienten, jedoch von unterschiedlichen Körperstellen.

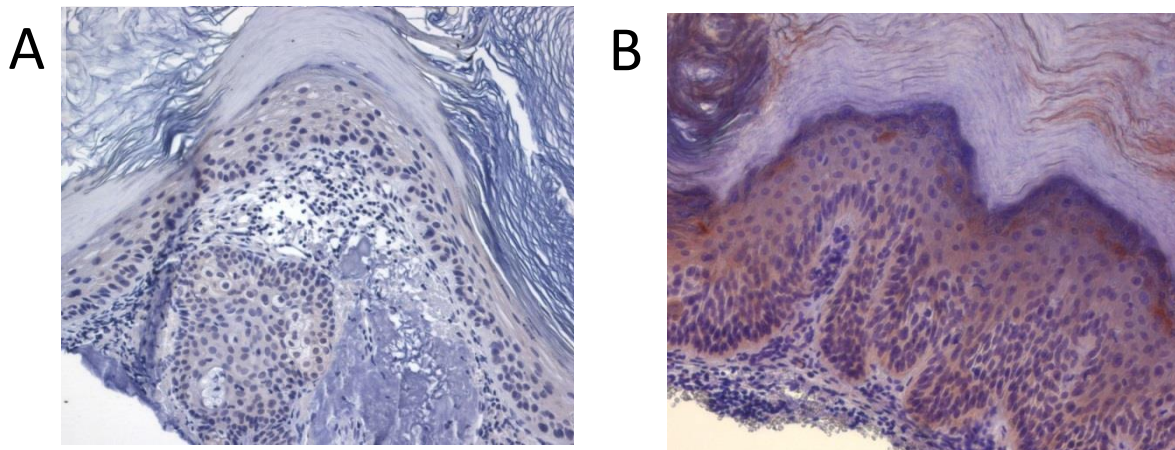


Abbildung 6: Immunhistochemische Darstellung der SPINK9-Färbung bei *Cornua cutanea*. SPINK9 ist braun angefärbt.

100-fache Vergrößerung

A) SPINK9-negative Haut beim *Cornu cutaneum*. 2 Schnitte von 9 sind negativ gefärbt.

B) SPINK9-positive Haut beim *Cornu cutaneum*. 7 Schnitte von 9 sind positiv gefärbt.

Diskussion

Die Haut, als Barriere des Körpers zur Außenwelt, schützt diesen vor lebensbedrohlichen Zuständen wie Wasserverlust, pathogenen Keimen, ultravioletter Strahlung, physischen und chemischen Reizen (Fischer et al. 2013). Das Zusammenspiel aus Kerneozyten und antimikrobiellen Peptiden und Proteinen sorgt für einen ausgedehnten Schutz gegenüber diesen Noxen. Die Epidermis ist ein sich stets erneuerndes Epithel. Daher unterliegen die Kerneozyten einem spezifischen Differenzierungsprozess, beginnend im *Stratum spinosum* als vitale Zellen bis zu kernlosen toten Hornzellen, die im *Stratum corneum* abschilfern (Lüllmann-Rauch 2006).

Schon im Jahr 2000 konnten Egelrud et al. zeigen, dass Kallikrein-verwandte Peptidasen einen großen Einfluss auf den Desquamationsprozess ausüben. KLKs konnten in der obersten Schicht der Epidermis, dem *Stratum corneum*, nachgewiesen werden, wo sie sowohl am Lösen der Zell-Zell-Kontakte als auch an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Nacheinander wurden verschiedene Proteasen in der Epidermis entdeckt, welche alle in die Gruppe der KLKs einzuordnen sind. Es werden mindestens 8 KLKs in der Haut exprimiert, von denen KLK5, KLK7, KLK8 und KLK14 die wichtigsten Funktionen zugeschrieben werden (Komatsu et al. 2003; Komatsu et al. 2005; Komatsu et al. 2006).

Proteolytische Enzyme, welche sowohl physiologische als auch pathologische Auswirkungen haben können, müssen auf mehreren Ebenen reguliert und kontrolliert werden. Da KLKs als inaktive Proformen in den extrazellulären Raum sezerniert werden, müssen sie vorerst durch gegenseitige Aktivierung oder Aktivierung durch weitere Proteasen in einen aktiven Zustand versetzt werden (Yoon et al. 2007; Yoon et al. 2013). Die Inaktivierung erfolgt sowohl unspezifisch durch Serpine, den niedrigen pH-Wert der Epidermis und Zn^{2+} -Ionen als auch durch spezifische Inhibitoren (Goettig et al. 2010; Kaiserman et al. 2006). Zu den spezifischen, reversiblen Inhibitoren zählt die Familie der serine protease inhibitor of Kazal-type: SPINK5, SPINK6 und SPINK9 (Goettig et al. 2010).

SPINK5, auch bekannt als LEKTI, wurde bereits im Jahr 1999 von Brattsand und Egelrud entdeckt (Brattsand & Egelrud 1999). Es ist ein Inhibitor, der in der Haut vor allem im *Stratum granulosum* und der inneren Haarwurzel vorkommt (Chavanas et al. 2000). Zielstrukturen sind verschiedene Peptidasen, beispielsweise KLK5-7, 13, 14, Plasmin, Cathepsin G oder Trypsin (Fischer & Meyer-Hoffert 2013). Auch SPINK6 wird als spezifischer Inhibitor in der Haut exprimiert. Allerdings werden nur KLKs (KLK4-6, 12-14)

als Zielstrukturen erkannt. Andere Peptidasen werden nicht in ihrer Aktivität beeinflusst (Fischer & Meyer-Hoffert 2013).

SPINK9 konnte im Jahr 2009 von Brattsand et al. und Meyer-Hoffert et al. in der Epidermis nachgewiesen werden (Brattsand et al. 2009; Meyer-Hoffert et al. 2009). Es unterscheidet sich insofern von SPINK5 und SPINK6, da es nur in Handflächen und Fußsohlen exprimiert wird (Brattsand et al. 2009; Meyer-Hoffert et al. 2009) und dort seine inhibitorische Funktion ausschließlich auf KLK5 ausübt (Fischer & Meyer-Hoffert 2013). Da KLK5 eine wichtige Rolle in der Desquamation spielt, hat seine Inaktivierung durch SPINK9 gravierende Folgen: ein hyperkeratotisches *Stratum corneum*. Physiologisch findet sich dieses an den mechanisch beanspruchten Handflächen und Fußsohlen, zum Schutz der Haut vor Überlastung. Eine erheblich erhöhte Konzentration konnte auch in hyperkeratotischen Clavi nachgewiesen werden (Brattsand et al. 2009; Meyer-Hoffert et al. 2009). Doch auch einige Hauterkrankungen gehen typischerweise mit einem verdickten *Stratum corneum* einher. Daher ist es interessant zu wissen, ob SPINK9 auch in hyperkeratotischen Hautläsionen exprimiert wird, welche nicht an Handflächen oder Fußsohlen lokalisiert sind.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Hauterkrankungen analysiert, um zu untersuchen, ob auch in nicht palmoplantaren, hyperkeratotischen Körperarealen eine SPINK9-Expression nachgewiesen werden kann. Hierzu wurden vier Hauterkrankungen ausgewählt, die durch Hyperkeratosen charakterisiert sind, welche auch im histologischen Schnitt nachweisbar sind: Lichen simplex chronicus, Aktinische Keratose, Plattenepithelkarzinom und Cornu cutaneum. Durch immunhistochemische Färbungen konnte gezeigt werden, dass SPINK9 auch in diesen Läsionen außerhalb von Handfläche und Fußsohle aktiv war.

Beim Lichen simplex chronicus waren alle Biopsien positiv gefärbt. Dies deutet auf eine Korrelation zwischen dem positiven Färbeergebnis und der hyperkeratotischen Läsion hin. Aufgrund der geringen Anzahl von zehn Proben kann allerdings nicht die Aussage getroffen werden, dass sich ein Lichen simplex chronicus immer durch eine verstärkte SPINK9-Expression auszeichnet.

Von der Aktinischen Keratose wurden 100 Gewebeschnitte verschiedener Patienten mit dem Antikörper gegen SPINK9 angefärbt. 51 Präparate wiesen eine positive Färbung auf. Weiterhin konnten die Aktinischen Keratosen auf ihren Schweregrad untersucht werden, welcher sich auf die Verteilung der Kernatypien innerhalb der Epidermis bezieht. Auffällig war, dass bei der Aktinischen Keratose Grad I 25% der Präparate positiv angefärbt waren,

während es bei Grad III 55% waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass mit höherem Atypie-Grad die Expression von SPINK9 zunimmt, welches in gesunder Haut – außer an Handflächen und Fußsohlen – physiologisch nicht vorkommt. Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass vom Grad AK I nur vier Präparate angefärbt werden konnten. Dies verringert die Aussagekraft über die Expression von SPINK9 bei diesem Schweregrad. Auch wurden die Präparate von verschiedenen Ärzten in die drei Schweregrade eingeteilt, sodass hier von einer zwar geringen, aber trotzdem vorhandenen interindividuellen Variabilität ausgegangen werden muss.

Bei der Anfärbung von 99 Gewebeschnitten des Plattenepithelkarzinoms zeigten sich 76 positiv angefärbte Präparate. Auch beim Cornu cutaneum liegt die Rate der positiven Anfärbungen bei sieben Präparaten von neun. Sowohl das Plattenepithelkarzinom als auch das Cornu cutaneum weisen eine stärkere Verhornung auf als die Aktinische Keratose. Dies spiegelt sich auch in dem Anteil der positiv gefärbten Präparate und damit in der SPINK9-Expression wider. Waren bei der Aktinischen Keratose lediglich 51% der Gewebeschnitte mit einer positiven Färbung versehen, waren es bei dem Plattenepithelkarzinom schon 77% und bei dem Cornu cutaneum 78 %. Auffällig ist diese Korrelation der SPINK9-Expression mit der Stärke der Verhornung, siehe Abbildung 7. Dies trifft allerdings nicht auf den Lichen simplex chronicus zu. Er weist zwar eine 100%ige SPINK9-Expression auf, zeigt aber nicht ein vergleichbar dickes *Stratum corneum*.

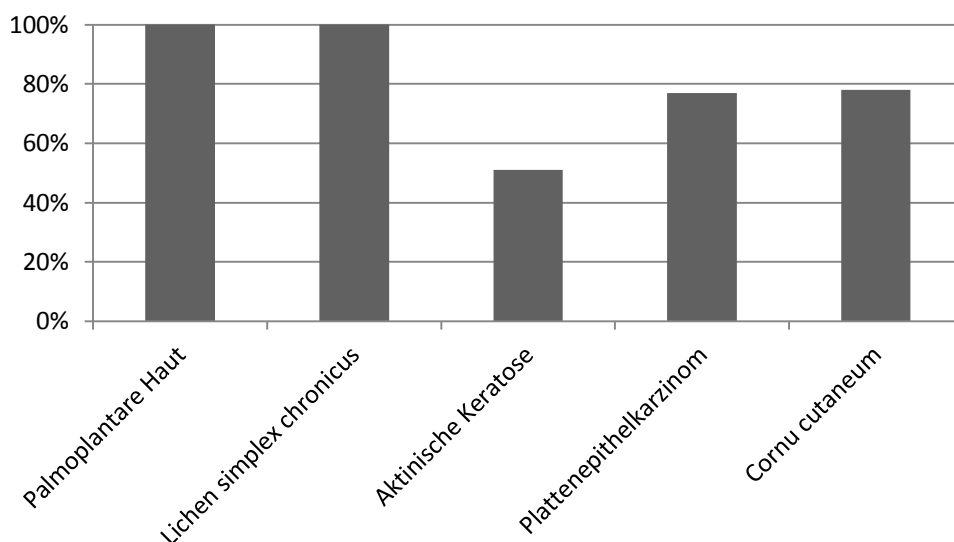


Abbildung 7: Anteil der positiven Ergebnisse bezogen auf die Gesamtanzahl der in dieser Hauterkrankung gefärbten Präparate bei den verschiedenen Hauterkrankungen. Angaben in Prozent

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass SPINK9 nicht geschlechtsspezifisch exprimiert wird. Es war sowohl in Hautläsionen von weiblichen als auch von männlichen Patienten gleichermaßen vorhanden. Auch spielte die Lokalisation der Hautläsion für die SPINK9-Expression keine Rolle. Es konnten Färbeargebnisse von Gesicht bis Unterschenkel ausgewertet werden, bei denen sich keine lokalisationsbezogenen Positiv- oder Negativergebnisse zeigten.

Allerdings konnte bei einigen stark verhornten Präparaten in der immunhistochemischen Färbung keine SPINK9-Expression nachgewiesen werden, obwohl andere, im gleichen Durchgang gefärbte Präparate, positiv angefärbt wurden. Der Grund kann nur vermutet werden: Andere Protease-Inhibitoren wie SPINK5 oder SPINK6 könnten die Funktion von SPINK9 übernehmen und durch die Inhibition von KLK5 eine Verdickung der Hornschicht bewirken. Auch die Bindung zwischen SPINK9 und KLK5 könnte eine Schwächung der Färbung zur Folge haben, da der Enzym-Substrat-Komplex möglicherweise nicht durch den Antikörper angefärbt werden kann. Hier sind weitere Forschungen notwendig, um die weiteren Vorgänge der pathologischen Verhornung zu untersuchen und zu verstehen.

Als Mausomolog zu humanem SPINK9 (hSPINK9) konnten Reiss et al. im Jahr 2011 murines SPINK12 (mSPINK12) identifizieren (Reiss et al. 2011). Eine Analyse der Expression wies starke Ähnlichkeiten zwischen dem Expressionsmuster von mSPINK12 zu hSPINK9 auf. So konnte auch bei mSPINK12 ein verstärktes Signal in Arealen mit physiologisch verdickter Epidermis, wie beispielsweise den Pfoten der Maus, nachgewiesen werden. Es zeigte sich auch eine moderate mSPINK12-Expression in Thymus, Hoden, Magenschleimhaut, Niere und Uterus (Reiss et al. 2011). Im Unterschied dazu ließ sich hSPINK9 in Thymus, Pankreas, Leber und Gehirn nachweisen (Brännström et al. 2012). Da mSPINK12 nicht humanes KLK5 inhibiert, weist dies auf weitere Unterschiede zwischen Mensch und Maus bezüglich der Substratspezifitäten der KLKs hin (Reiss et al. 2011).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mSPINK12 auch in erhöhter Konzentration in den Krallen von Mäusen vorliegt (Meyer-Hoffert 2012). Diese Tatsache wirft die Frage auf, ob auch in menschlichen Nägeln eine erhöhte SPINK9-Konzentration nachweisbar sein könnte. In dieser Dissertation lag der Schwerpunkt allerdings auf hyperkeratotischen Erkrankungen der Haut. Menschliche Nägel wurden nicht angefärbt und analysiert, sodass diese Frage bislang nicht beantwortet werden konnte.

In heutiger Zeit wird viel Gewicht auf die Prävention und Früherkennung gelegt, um Erkrankungen zu verhindern beziehungsweise im Frühstadium kurativ therapieren zu können. Auch in der Dermatologie wird der Früherkennung des Hautkrebses viel Aufmerksamkeit geschenkt. In dieser Dissertation wurde unter anderem der Frage auf den Grund gegangen, in wie weit sich SPINK9 im Rahmen der Früherkennung als Tumormarker für das Plattenepithelkarzinom nutzen lässt.

Ein Tumormarker zeigt das Vorhandensein und eventuell auch das Stadium eines Tumors an und wird von den Krebszellen selbst oder als Reaktion des Körpers von anderen Geweben gebildet. SPINK9 wird von epidermalen Zellen, die eine Differenzierungsstörung aufweisen, gebildet und zeigt dadurch eine maligne Entartung, eine Vorstufe dessen oder eine benigne Hyperkeratose an. Diese Voraussetzung für einen Tumormarker wird also erfüllt. Allerdings weisen auch gutartige Veränderungen der Haut mit einer Rate von 51-100% eine SPINK9-Expression in der Epidermis auf. Dies bedeutet, dass ein SPINK9-Screening zur Detektion eines Plattenepithelkarzinoms so nicht eingesetzt werden kann, da es zu einer zu hohen Anzahl an falsch positiven Ergebnissen führen würde, weil auch viele benigne Hautveränderungen eine SPINK9-Expression aufweisen und somit positiv angefärbt werden. Außerdem wird SPINK9 im Gewebe exprimiert und kann so nur mit einer invasiven Maßnahme, einer Biopsie, und einer darauffolgenden immunhistochemischen Färbung bestimmt werden. Da der Pathologe ein Karzinom in dem aufgearbeiteten histologischen Schnitt aus der Biopsie ohnehin nachweisen kann, ist eine anschließende immunhistochemische Färbung auf SPINK9 als Tumormarker für ein Karzinom überflüssig. Der Aufwand, die Kosten der Färbung und vor allem die große Anzahl falsch positiver Ergebnisse schließen eine Verwendung als Tumormarker für das Plattenepithelkarzinom momentan noch aus. Die SPINK9-Expression kann eher als Marker einer Hyperkeratose fungieren, die nicht zwingend mit einer malignen Transformation einhergeht.

Aktuelle Ergebnisse von Fernández-Figueras et al. konnten zudem zeigen, dass die Tumorprogression der Aktinischen Keratose zum Plattenepithelkarzinom nicht nur durch den klassischen Verlauf gekennzeichnet wird (Fernández-Figueras et al. 2015). Als klassischer Verlauf wird die Progression von AK I über AK II und AK III bis zum PEK bezeichnet, wie sie typischerweise beim Zervixkarzinom beschrieben wird. Fernández-Figueras et al. konnten zeigen, dass ein großer Teil der PEK der Haut aus atypischen basalen Zellen in der Epidermis (AK I) entspringt. Dies wird auch als differenzierter Verlauf bezeichnet, welcher typisch ist für Plattenepithelkarzinome der Vulva und der Mundhöhle (Fernández-Figueras et al. 2015).

Im Stadium AK I wiesen in dieser Arbeit jedoch nur 25% der Schnitte eine SPINK9-Expression auf. Dies bedeutet, dass vermutlich auch PEK aus Aktinischen Keratosen entstehen, welche sich nicht durch eine SPINK9-Expression und somit durch eine negative Färbung auszeichnen. Somit sollte SPINK9 auch in diesen Fällen nicht als Tumormarker verwendet werden. Allerdings ist hier wieder zu bedenken, dass nur vier Schnitte mit dem Schweregrad AK I angefärbt werden konnten. Bei einer höheren Anzahl von Biopsien mit dem Schweregrad AK I könnte sich der Anteil der SPINK9-positiven erheblich ändern. Dennoch betonen diese neuen Erkenntnisse die Wichtigkeit der Früherkennung und Therapie der Präkanzerosen, da alle Läsionen ungeachtet des Schweregrades in ein invasives PEK übergehen können. Der Schweregrad ist dabei kein Indikator für die Progression einer Aktinischen Keratose in einen invasiven Tumor.

Doch nicht nur im Bereich der malignen Erkrankungen ist das Zusammenspiel von Proteasen und ihren Inhibitoren in der Haut von Bedeutung. Auch entzündliche Veränderungen der Haut und Erkrankungen, welche die Barrierefunktion betreffen, können sich durch eine erhöhte Protease-Aktivität auszeichnen, wie Rosazea, Atopische Dermatitis und das Netherton Syndrom (Yamasaki et al. 2007; Cork et al. 2009; Descargues et al. 2006; Komatsu et al. 2002). Bis heute werden diese Erkrankungen mit einer symptomatischen Therapie, mit all ihren Nebenwirkungen, und nicht mit einer ursächlichen Therapie behandelt. Eine Regulation vor allem von KLK5, dem Schlüsselenzym in der proteolytischen Kaskade der Haut, könnte daher eine therapeutische Option bei inflammatorischen Erkrankungen darstellen, die durch eine Überaktivität von Proteasen hervorgerufen werden. Hier könnte sich die Beeinflussung der SPINK9-Aktivität und dadurch die hoch wirksame Inhibition von KLK5 zu einem wichtigen therapeutischen Mittel entwickeln bei sowohl entzündlichen als auch hyperkeratotischen Prozessen – eine Richtung, in die es sich lohnt weiter zu forschen, da Erkrankungen wie Atopische Dermatitis und das Plattenepithelkarzinom eine hohe Prävalenz aufweisen. Eine erfolgreiche Beeinflussung der SPINK9-Aktivität und dadurch der Proteaseaktivität in der Haut wäre ein Durchbruch in der Therapie dieser Hauterkrankungen und ein Lichtblick für Millionen Patienten.

Zusammenfassung

Der Desquamationsprozess der Haut wird durch das Zusammenspiel von Proteasen und deren Inhibitoren reguliert. KLKs gehören zu den wichtigsten Proteasen, die die Abschilferung der obersten Hornzellen durch Spaltung der Zell-Zell-Kontakte ermöglichen. KLK5 ist eine der aktivsten Proteasen. Sie wird vor allem durch SPINK9 reguliert, welches hochspezifisch für KLK5 ist. Keine weitere KLK oder andere Protease wird von SPINK9 als Substrat erkannt. Eine starke Aktivität der KLKs sorgt für eine Schädigung der Hautbarriere und kann somit Entzündungen verursachen. Auch eine abgeschwächte Aktivität hat Auswirkungen auf das Hautmilieu. So kommt es bei niedriger Aktivität zu einer Verdickung der Haut, vor allem des *Stratum corneum*.

Es war bekannt, dass SPINK9 in den verdickten Hornschichten an Handflächen und Fußsohlen exprimiert wird und dort Auswirkungen auf die Desquamation ausübt. Allerdings wurde die SPINK9-Expression noch nicht bei Hauterkrankungen analysiert, die mit einer Hyperkeratose einhergehen. Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von hyperkeratotischen Hauterkrankungen, vor allem des Plattenepithelkarzinoms, auf das Vorhandensein und die Rolle von SPINK9.

Mit einem Antikörper, der gegen SPINK9 gerichtet war, konnten immunhistochemische Färbungen angefertigt, analysiert und bewertet werden. Es wurden vier hyperkeratotische Hauterkrankungen ausgewählt: Lichen simplex chronicus, Aktinische Keratose, Plattenepithelkarzinom und Cornum cutaneum. Die Färbeargebnisse konnten zeigen, dass SPINK9 auch an pathologisch verhornten Körperarealen weit entfernt von Hand und Fuß exprimiert und somit nicht auf eine palmoplantare Expression beschränkt werden kann. Es konnte beobachtet werden, dass die SPINK9-Expression mit dem Verhornungsgrad der Hauterkrankung zunahm. Bei der Aktinischen Keratose wiesen 51% der Präparate immunhistochemisch eine SPINK9-Expression auf, bei dem Plattenepithelkarzinom waren es 77% und beim Cornu cutaneum sogar 78%. Nur der Lichen simplex chronicus mit 100% positiv angefärbten Präparaten stellte eine Ausnahme dar, da er histologisch nicht mit der größten Hyperkeratose einhergeht. Die Färbeargebnisse demonstrierten auch, dass die SPINK9-Expression weder abhängig vom Geschlecht noch von der Lokalisation der Probenentnahme ist.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Verhornung mit molekularen Mechanismen in Verbindung gebracht werden kann, bei denen SPINK9 eine große Rolle spielt. Die Expression

von SPINK9 war bislang nur an Handflächen und Fußsohlen bekannt. Hier konnte nun aber gezeigt werden, dass SPINK9 auch an pathologisch veränderten hyperkeratotischen Hautarealen vorkommt und somit die Expression nicht – wie bisher bekannt – auf die palmoplantaren Areale beschränkt ist. Diese neue Erkenntnis könnte ein Anstoß sein für die Erforschung der Bedeutung von SPINK9 nicht nur in hyperkeratotischer Haut, sondern auch in entzündlich veränderter Haut am gesamten Körper. Denn die Idee, das Schlüsselenzym der proteolytischen Kaskade der Haut regulieren und somit die Verhornung und die Entzündungsreaktion der Haut beeinflussen zu können, eröffnet ungeahnte neue Möglichkeiten. Dies könnte die Zukunft sein in der Therapie der proteolytischen und hyperkeratotischen Hauterkrankungen.

Literaturverzeichnis

- Ashton, K.J. et al., 2003. Chromosomal aberrations in squamous cell carcinoma and solar keratoses revealed by comparative genomic hybridization. *Archives of dermatology*, 139(7), pp.876–82. Available at: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=479413> [Accessed April 29, 2014].
- Avgeris, M., Mavridis, K. & Scorilas, A., 2010. Kallikrein-related peptidase genes as promising biomarkers for prognosis and monitoring of human malignancies. *Biological chemistry*, 391(5), pp.505–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20302518> [Accessed April 29, 2014].
- Beaufort, N. et al., 2010. Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks. *Biological chemistry*, 391(5), pp.581–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20302517> [Accessed April 29, 2014].
- Blaber, M. et al., 2010. Functional intersection of the kallikrein-related peptidases (KLKs) and thrombostasis axis. *Biological chemistry*, 391(4), pp.311–20. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3047482&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2014].
- Brännström, K. et al., 2012. Characterization of SPINK9, a KLK5-specific inhibitor expressed in palmo-plantar epidermis. *Biological chemistry*, 393(5), pp.369–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505519> [Accessed April 29, 2014].
- Brattsand, M. et al., 2005. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *The Journal of investigative dermatology*, 124(1), pp.198–203. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15654974> [Accessed May 7, 2015].
- Brattsand, M. et al., 2009. SPINK9: a selective, skin-specific Kazal-type serine protease inhibitor. *The Journal of investigative dermatology*, 129(7), pp.1656–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194479> [Accessed April 29, 2014].
- Brattsand, M. & Egelrud, T., 1999. Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *The Journal of biological chemistry*, 274(42), pp.30033–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10514489> [Accessed November 23, 2014].
- Breuninger, H. et al., 2006. [Brief guidelines: Basal cell carcinoma of the skin]. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 4(5), pp.441–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16686614> [Accessed May 4, 2014].
- Chavanas, S. et al., 2000. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nature genetics*, 25(2), pp.141–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835624> [Accessed June 9, 2014].
- Cork, M.J. et al., 2009. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, 129(8), pp.1892–908. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494826> [Accessed March 30, 2015].
- Descargues, P. et al., 2006. Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *The Journal of investigative dermatology*, 126(7), pp.1622–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16628198> [Accessed May 8, 2015].
- Deshmukh, P. et al., 2013. Multiple squamous cell carcinoma over lichen simplex chronicus: a rare entity. *Indian journal of dermatology*, 58(4), p.329. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3726914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2014].
- Egelrud, T., 2000. Desquamation in the stratum corneum. *Acta dermato-venereologica. Supplementum*, 208, pp.44–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10884939> [Accessed May 4, 2014].
- Eissa, A. et al., 2011. Kallikrein-related peptidase-8 (KLK8) is an active serine protease in human epidermis and sweat and is involved in a skin barrier proteolytic cascade. *The Journal of biological chemistry*, 286(1), pp.687–706. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3013028&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2015].
- Ekhholm, I.E., Brattsand, M. & Egelrud, T., 2000. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *The Journal of investigative dermatology*, 114(1), pp.56–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10620116> [Accessed May 4, 2015].
- Fernández-Figueras, M.T. et al., 2015. Actinic keratosis with atypical basal cells (AK I) is the most common lesion associated with invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, 29(5), pp.991–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428612> [Accessed May 12, 2015].
- Fischer, J. et al., 2013. Cross-linking of SPINK6 by transglutaminases protects from epidermal proteases. *The Journal of investigative dermatology*, 133(5), pp.1170–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303447> [Accessed April 29, 2014].
- Fischer, J. & Meyer-Hoffert, U., 2013. Regulation of kallikrein-related peptidases in the skin - from physiology to diseases to therapeutic options. *Thrombosis and haemostasis*, 110(3), pp.442–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23446429> [Accessed April 29, 2014].
- Fu, W. & Cockerell, C.J., 2003. The Actinic (Solar) Keratosis. *Archives of Dermatology*, 139(1), pp.66–70. Available at: <http://archderm.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=479142> [Accessed May 4, 2014].
- Glogau, R.G., 2000. The risk of progression to invasive disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(1 Pt 2), pp.23–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10607353> [Accessed May 4, 2014].
- Goettig, P., Magdolen, V. & Brandstetter, H., 2010. Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie*, 92(11), pp.1546–67. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3014083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2014].
- Gratio, V. et al., 2011. Kallikrein-related peptidase 14 acts on proteinase-activated receptor 2 to induce signaling pathway in colon cancer cells. *The American journal of pathology*, 179(5), pp.2625–36. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3204030&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2014].
- Gray, D.T. et al., 1997. Trends in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992. *Archives of dermatology*, 133(6), pp.735–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197827> [Accessed May 4, 2014].
- Hachem, J.-P. et al., 2006. Serine protease signaling of epidermal permeability barrier homeostasis. *The Journal of investigative dermatology*, 126(9), pp.2074–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16691196> [Accessed May 4, 2014].
- Harvey, I. et al., 1996. Non-melanoma skin cancer and solar keratoses II analytical results of the South Wales Skin Cancer Study. *British journal of cancer*, 74(8), pp.1308–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2075911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2014].

- Hendrickson, W.A. et al., 1989. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), pp.2190–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=286877&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2014].
- Hennings, H. et al., 1980. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, 19(1), pp.245–254. Available at: <http://www.cell.com/article/0092867480904067/fulltext> [Accessed May 8, 2015].
- Jeyachandran, Y.L. et al., 2010. Efficiency of blocking of non-specific interaction of different proteins by BSA adsorbed on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Journal of colloid and interface science*, 341(1), pp.136–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19818963> [Accessed May 4, 2014].
- Kaiserman, D., Whisstock, J.C. & Bird, P.I., 2006. Mechanisms of serpin dysfunction in disease. *Expert reviews in molecular medicine*, 8(31), pp.1–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17156576> [Accessed May 4, 2014].
- Komatsu, N. et al., 2006. Elevated human tissue kallikrein levels in the stratum corneum and serum of peeling skin syndrome-type B patients suggests an over-desquamation of corneocytes. *The Journal of investigative dermatology*, 126(10), pp.2338–42. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700379> [Accessed May 4, 2014].
- Komatsu, N. et al., 2002. Elevated stratum corneum hydrolytic activity in Netherton syndrome suggests an inhibitory regulation of desquamation by SPINK5-derived peptides. *The Journal of investigative dermatology*, 118(3), pp.436–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874482> [Accessed May 8, 2015].
- Komatsu, N. et al., 2003. Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. *The Journal of investigative dermatology*, 121(3), pp.542–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12363.x> [Accessed May 4, 2014].
- Komatsu, N. et al., 2005. Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *The British journal of dermatology*, 153(2), pp.274–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16086736> [Accessed May 4, 2014].
- Kypriotou, M., Huber, M. & Hohl, D., 2012. The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the “fused genes” family. *Experimental dermatology*, 21(9), pp.643–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507538> [Accessed June 6, 2014].
- Laitinen, O.H. et al., 2006. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(24), pp.2992–3017. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17086379> [Accessed April 30, 2014].
- Liao, Y.-H. et al., 2014. Increased risk of lichen simplex chronicus in people with anxiety disorder: a nationwide population-based retrospective cohort study. *The British journal of dermatology*, 170(4), pp.890–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24372057> [Accessed May 4, 2014].
- Lotti, T., Buggiani, G. & Prignano, F., Prurigo nodularis and lichen simplex chronicus. *Dermatologic therapy*, 21(1), pp.42–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18318884> [Accessed May 4, 2014].
- Lüllmann-Rauch, R., 2006. *Taschenlehrbuch Histologie 2*. Auflage. G. T. Verlag, ed., Stuttgart.
- Lundström, A. & Egelrud, T., 1991. Stratum corneum chymotryptic enzyme: a proteinase which may be generally present in the stratum corneum and with a possible involvement in desquamation. *Acta dermato-venereologica*, 71(6), pp.471–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1685827> [Accessed May 4, 2015].

- Lundwall, A. & Brattsand, M., 2008. Kallikrein-related peptidases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(13), pp.2019–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18344018> [Accessed May 4, 2014].
- Martín-Brufau, R. et al., 2015. Personality differences between patients with lichen simplex chronicus and normal population: A study of pruritus. *European journal of dermatology : EJD*, 20(3), pp.359–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20388609> [Accessed May 4, 2014].
- Memari, N. et al., 2007. Enzymatic properties of human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12). *Biological chemistry*, 388(4), pp.427–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17391064> [Accessed May 4, 2014].
- Memon, A.A. et al., 2000. Prevalence of solar damage and actinic keratosis in a Merseyside population. *The British journal of dermatology*, 142(6), pp.1154–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10848739> [Accessed May 4, 2014].
- Meyer-Hoffert, U., 2012. Inhibition of Kallikrein-related peptidases in the stratum corneum. *International Journal of Cosmetic Science*, 34(4), pp.375–375.
- Meyer-Hoffert, U., Wu, Z. & Schröder, J.-M., 2009. Identification of lympho-epithelial Kazal-type inhibitor 2 in human skin as a kallikrein-related peptidase 5-specific protease inhibitor. *PLoS one*, 4(2), p.e4372. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2631147&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2014].
- Müller-Esterl, W., 2011. *Biochemie Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler* 2. Auflage., Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Noll, S. & Schraub-Kuhnen, S., 2000. *Praxis der Immunhistochemie* 1. Auflage. H. Höfler & K.-M. Müller, eds., München: Urban & Fischer Verlag.
- Ohman, H. & Vahlquist, A., 1994. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta dermato-venereologica*, 74(5), pp.375–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7817676> [Accessed May 7, 2015].
- Plewig, G. et al., 2012. *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie, Allergologie* 6. Auflage., Heidelberg, Berlin: Springer Verlag.
- Potter, H.D. et al., 2013. Lichen simplex chronicus of the conjunctiva. *JAMA ophthalmology*, 131(6), pp.816–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3943845&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2014].
- Pritzkeleit, R. et al., 2014. Krebs in Schleswig-Holstein, Band 10, Inzidenz und Mortalität in den Jahren 2009 bis 2011. *Schmidt-Römhild, Lübeck*, p.164. Available at: http://www.krebsregister-sh.de/berichte/kish2014_web.pdf [Accessed November 10, 2014].
- Reiss, K. et al., 2011. Expression and regulation of murine SPINK12, a potential orthologue of human LEKTI2. *Experimental dermatology*, 20(11), pp.905–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21899598> [Accessed November 10, 2014].
- Röwert-Huber, J. et al., 2007. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *The British journal of dermatology*, 156 Suppl , pp.8–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488400> [Accessed May 4, 2014].

- Rzepka, K. et al., 2005. [Epidermal stem cells]. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 3(12), pp.962–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16405712> [Accessed May 4, 2014].
- Sales, K.U. et al., 2010. Matriptase initiates activation of epidermal pro-kallikrein and disease onset in a mouse model of Netherton syndrome. *Nature genetics*, 42(8), pp.676–83. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3081165&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2014].
- Schmoll, H.-J., Höffken, K. & Possinger, K., 2005. *Kompandium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie* 4. Auflage., Heidelberg: Springer Verlag.
- Stefansson, K. et al., 2006. Kallikrein-related peptidase 14 may be a major contributor to trypsin-like proteolytic activity in human stratum corneum. *Biological chemistry*, 387(6), pp.761–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16800737> [Accessed May 4, 2015].
- Steinkraus, V., 2004. *Aktinische Keratosen (Carcinomata in situ)* 1. Auflage., Heidelberg: Springer Verlag.
- Szeimies, Rolf-Markus Hauschild, A. & Garbe, C., 2010. *Tumoren der Haut* 1. Auflage., Stuttgart, New York, Delhi, Rio: Thieme Verlagsgruppe.
- Ulrich, C. et al., 2003. Cutaneous precancers in organ transplant recipients: an old enemy in a new surrounding. *The British journal of dermatology*, 149 Suppl , pp.40–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14616348> [Accessed May 4, 2014].
- Werner, M. et al., 2000. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American journal of surgical pathology*, 24(7), pp.1016–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10895825> [Accessed May 4, 2014].
- Yamasaki, K. et al., 2007. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nature medicine*, 13(8), pp.975–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17676051> [Accessed May 8, 2015].
- Yamasaki, K. et al., 2006. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(12), pp.2068–80. Available at: <http://www.fasebj.org/content/20/12/2068.long> [Accessed May 4, 2014].
- Yoon, H. et al., 2007. Activation profiles and regulatory cascades of the human kallikrein-related peptidases. *The Journal of biological chemistry*, 282(44), pp.31852–64. Available at: <http://www.jbc.org/content/282/44/31852.long> [Accessed May 4, 2014].
- Yoon, H. et al., 2013. Activation profiles of human kallikrein-related peptidases by matrix metalloproteinases. *Biological chemistry*, 394(1), pp.137–47. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3709557&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 4, 2014].
- Zhang, M. et al., 2014. Elevated intrinsic cancer stem cell population in human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 120(7), pp.992–1001. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24382806> [Accessed May 4, 2014].

Anhang

Proben

Alle hier aufgelisteten Proben entstammen dem histologischen Archiv der Universitäts-Hautklinik zu Kiel. Die Proben wurden zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken nach schriftlicher Aufklärung der Patienten entnommen.

1. Lichen simplex chronicus

Alter	Geschlecht		Entnahmestelle	SPINK9
	männlich	weiblich		
10		+	Zeigefinger re	+
73	+		Unterschenkel re	+
73	+		Kinn	+
88	+		Rücken	+
25		+	Unterarm	+
58	+		Unterarm re	+
67		+	Unterschenkel re	+
58	+		Fußrücken li	+
28		+	Unterschenkel	+
60	+		Unterschenkel li	+

2. Aktinische Keratose

Alter	Geschlecht		Entnahmestelle	AK	SPINK9
	männlich	weiblich			
66	+		li Nasenflügel	1	
54	+		Stirn re	2	
63	+		Schläfe re	2	
82		+	Nase	3	+
71		+	Stirn re caudal	2	+
74	+		Capilitium	2	+
67		+	Wange re	3	+
74	+		Ohr-Apex re	3	+
73	+		Capilitium	2	+
71		+	Nasenwurzel	3	
67	+		Hals li	2	+
71	+		Stirn re	3	
73		+	Wange re	3	+
78		+	Oberarm re	2	+
71	+		Stirn re	3	
65		+	Unterschenkel re distal	2	+

Alter	Geschlecht		Entnahmestelle	AK	SPINK9
	männlich	weiblich			
74		+	Decollete re kaudal	2	+
85	+		Stirnmitte	3	+
77	+		temporal li	2	
74		+	Gesicht	2	
70	+		Handrücken re	3	+
79		+	Unterschenkel re medial	3	+
77	+		Nasenrücken	2	
64		+	Unterschenkel li	2	
75		+	Nasenabhang re	3	
64		+	Schläfe re	2	
76		+	Nase	3	
71	+		Capilitium	2	
81		+	Wange re	3	+
83	+		Nasenwurzel	3	
60	+		Schläfe li	2	+
70	+		Augenbraue re	2	
72	+		Oberschenkel re	2	
80	+		Stirn Mitte	3	
51		+	Decollete	2	
63	+		Augenunterlid re	3	
64		+	Unterschenkel li distal	3	
69	+		Mandibula li	1	+
91	+		Capilitium Mitte	3	
72	+		Stirn re	2	
72	+		Mundwinkel li	2	
63	+		Schläfe li	2	
82		+	Nasenflügel li	3	
82	+		Capilitium	3	+
77	+		Hals li	2	+
68		+	Augenbraue re	2	
78		+	Wange li	2	
89	+		Stirn	3	
73	+		Rücken	3	+
82	+		Schläfe li	2	+
72	+		Unterarm li	3	+
76	+		Ohrhelix re	3	
80	+		Capillitium	3	+
71		+	Stirn	3	+
72		+	Nasenwurzel	2	+
88	+		Capilitium	2	+
45	+		Unterarm li	3	+
73		+	Stirn li	2	+
69	+		Ohrhelix re	2	
76	+		Unterschenkel re	3	
69	+		Ohr li	2	+
68	+		Wange re	3	+

Alter	Geschlecht		Entnahmestelle	AK	SPINK9
	männlich	weiblich			
74	+		Ohrhelix li	3	+
75	+		Wange re	3	
78	+		Unterarm re	3	+
77		+	Handrücken li	2	
79	+		Handrücken li	3	+
78		+	Handrücken li	3	
74	+		Wange re	3	
73	+		Schläfe	3	+
66	+		Schläfe li	2	
78	+		Ohr re	1	
77	+		Oberlippe li	2	+
87	+		temporal li	3	
80	+		Handrücken li	3	
85		+	infraorbital re	3	+
77	+		präaurikulär li	1	
77	+		Stirn	3	+
63	+		Capilitium	3	+
79		+	Nasenabhang re	2	
73		+	Stirn	2	
75	+		Nase	3	+
68		+	Unterarm li distal	3	+
81	+		Oberbauch	3	+
85	+		Ohrläppchen li	3	
85		+	Abdomen re	3	+
73	+		Oberarm re	2	
81	+		Capilitium Mitte	2	+
71	+		Stirn li	2	+
74	+		Unterarm re	2	+
37	+		Wange re	3	
78		+	Unterschenkel re	2	+
74		+	Nasenrücken	2	+
43		+	Nacken li	2	+
86		+	Unterschenkel re	2	+
83		+	Unterschenkel li	3	+
75	+		Ohrhelix li	2	
77	+		Schläfe li	3	
97		+	claviculär re	3	+
75	+		Hand re	3	

3. Plattenepithelkarzinom

Alter	Geschlecht		Entnahmestelle	SPINK9
	männlich	weiblich		
74	+		temporal re	+
63	+		Augenbraue li	+
54	+		Fuß li	+
64	+		Sternum re cranial	+
68	+		Stirn Mitte	+
68		+	Capilitium	+
79	+		Stirn	+
54	+		Unterschenkel distal li	+
82		+	Unterschenkel re	+
92		+	Stirn	
70	+		Oberarm re	
84	+		Stirn li	+
83		+	Stirn	+
90		+	Wange re	+
76	+		Ellenbogen re	+
72	+		Stirn li	+
82		+	Wange li	+
82		+	Wange li	+
85	+		Capilitium	+
64	+		Stirnmitte	+
69	+		Capilitium re okzipital	
79		+	Oberarm li distal	+
77		+	Sitrn	
96	+		Capilitium	
74		+	Unterarm re	+
82	+		Brust links	+
80		+	Unterschenkel li	+
73	+		Capilitium re parietal	+
80		+	Unterschenkel re	+
79	+		Unterlippe	+
99		+	Wange re	+
87		+	Schläfe li	+
74	+		Oberschenkel li lateral	+
79	+		Unterarm re	+
65		+	Nasenflügel re	+
88	+		Ohrhelix re	+
68		+	Unterschenkel re	
67	+		Unterschenkel re	+
82	+		Nase	
77		+	Stirn li	+
55	+		Zeigefinger li	+
85		+	Sternum	+

Alter	Geschlecht		Entnahmestelle	SPINK9
	männlich	weiblich		
92		+	Stirn re	+
92		+	Nasenabhang li	
90		+	Schläfe re	+
79	+		Nase	
71	+		Stirn Mitte	+
63	+		Decollete	+
76		+	Augenbraue li	
80		+	Oberarm	
71		+	Unterlippe	+
62	+		Capilitium	+
80	+		Brust re	+
60	+		Wange re	
71	+		Stirn	+
83	+		Handrücken re medial	+
79	+		Oberschenkel re	+
70	+		Unterarm re	+
78	+		Capilitium occipital li	+
82	+		präaurikulär li	+
87		+	Wange re	+
78		+	Unterschenkel re	+
62	+		Schläfe li	
74	+		Brust li subclaviculär	
81	+		Ohrhelix li	
74	+		Unterarm li	+
51	+		Jochbein li	
76	+		Capilitium	+
66		+	Unterschenkel li	+
80	+		Nase	+
78		+	Unterschenkel re	+
73	+		Wange re	+
71	+		Ohrhelix re	+
80	+		Unterlippe	+
73	+		Brust Mitte	
74	+		Handrücken re lateral	
78		+	Stirn re	+
89	+		Brust re	+
81	+		Wange re	+
85	+		Ohr li	+
90		+	Stirn	
73		+	Kinn	
90		+	Stirn	+
93	+		Ohrhelix li	
54	+		Malleolus re medial	+
83	+		Capilitium Mitte	+
50	+		Oberarm li	+
64	+		Nasenabhang li	+

Alter	Geschlecht		Entnahmestelle	SPINK9
	männlich	weiblich		
73	+		Unterarm re	+
66	+		Sternum	+
78		+	Unterschenkel li	+
65		+	Decollete	+
81		+	Stirn Mitte	+
62		+	Wange li	+
81	+		Capilitium	+
79	+		Hand li	+
89	+		Ohrhelix li	+
79	+		Ohrhelix re	+
88		+	Nasenabhang li	+
75	+		Hals li lateral	
85		+	Sternum	+

4. Cornu cutaneum

Alter	Geschlecht		Entnahmestelle	SPINK9
	männlich	weiblich		
75	+		Kopf li lateral	+
87	+		Capilitium	+
75		+	Handrücken re	
71	+		Wange re	+
83	+		Sternum	
85		+	Rücken	+
71		+	Kopf	+
66	+		Capilitium	+
54	+		Hals li dorsal	+

Veröffentlichungen

Veröffentlichungen

The serine protease inhibitor of Kazal-type 9 (SPINK9) is expressed in lichen simplex chronicus, actinic keratosis and squamous cell carcinoma.

Redelfs L, Fischer J, Weber C, Wu Z, Meyer-Hoffert U.

Arch Dermatol Res. 2016 Mar;308(2):133-7. doi: 10.1007/s00403-015-1616-5. Epub 2016 Jan 8

Expression of the serine protease inhibitor of Kazal-type 9 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis

Redelfs, L.; Fischer, J.; Weber, C.; Meyer-Hoffert, U

Exp. Dermatol. Volume: 23. Pages: E18-E18 Published: MAR 2014

Characterization of the protease inhibitor SPINK7 in human skin

Weber, C.; Fischer, J.; Redelfs, L.; Meyer-Hoffert, U

Exp. Dermatol. Volume: 23. Pages: E4-E4 Published: MAR 2014

Danksagung

Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich unterstützt und zu dem Entstehen und Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank PD Dr. Dr. med. Ulf Meyer-Hoffert, der mich für dieses Thema begeistern konnte und mein Augenmerk immer auf das Wesentliche gerichtet hat. Bei Fragen und Problemen konnte ich mich zu jeder Tageszeit an ihn wenden, eine Antwort kam nach maximal ein paar Stunden. Danke für eine tolle Betreuung, die großartige Motivation und ein stets offenes Ohr!

Vielen Dank auch an Dr. rer. nat. Jan Fischer. Er nahm mich gleich ab dem ersten Tag mit und integrierte mich in den Laborablauf. Ohne ihn hätte ich die Funktionsweise eines FPLCs nie verstanden. Auch später konnte ich mich immer an ihn wenden und er war sich auch zum Korrekturlesen der ersten Versionen meiner Doktorarbeit nicht zu schade.

Ich möchte mich bei Dr. Yulia Koblyakova bedanken, die mir das Prinzip und die Vorgehensweise der immunhistochemischen Färbung erläuterte und mich bei meinen ersten Färbeversuchen anleitete.

Vielen Dank auch an Sandra und Christel! Durch ihre freundliche Art habe ich mich im Labor immer wohl gefühlt und ihre Tipps haben mir das Leben sehr erleichtert. Sie konnten mir durch ihre Erfahrung immer helfen, z.B. wenn ich mit dem Mikrotom mal einen Paraffinblock zerstört hatte. Er wurde neu eingebettet und die Arbeit konnte weitergehen.

Clemens und ich waren zwar selten gleichzeitig im Labor, doch wir konnten uns trotzdem immer über unsere Erfolge und Misserfolge austauschen und uns gegenseitig unterstützen. Es war schön, dieses große neue Thema „Labor- und Doktorarbeit“ gemeinsam mit einem Freund beginnen zu können.

Ein großer Dank außerhalb des Labors gilt meiner Familie und meinen Freunden – für ihr Verständnis, ihre Unterstützung, die große Hilfe beim Korrekturlesen und auch für die Ablenkung, wenn es mal nötig war.

Ganz besonders danke ich Simon! Für sein Bemühen, mir auch bei widrigen Verhältnissen einen Internetzugang bereitzustellen, für Motivation zum richtigen Zeitpunkt und für seine Unterstützung und sein Verständnis.

„Dankbarkeit ist das Gedächtnis des Herzens“ (Jean-Baptiste Massillon).

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lisa Maria Redelfs
Anschrift	Waitzstraße 80, 24118 Kiel
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Geburtsdatum und -ort:	16.06.1990 in Bremen

Ausbildung und Werdegang

2010-2016	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Abschluss mit der Note „gut“ Mai 2013-Juli 2016 Dissertation zum Thema: „Untersuchungen zur Expression und Bedeutung von SPINK9 beim spinozellulären Karzinom der Haut“ an der Universitätshautklinik zu Kiel
2008-2010	Oberstufe der Alexander-von-Humboldt-Schule, Wittmund Abschluss: Abitur (1,3)
2007-2008	11. Klasse der Ripon Christian High School, Ripon, Kalifornien, USA
2003-2007	Sekundarstufe I der Alexander-von-Humboldt-Schule, Wittmund
2001-2003	Orientierungsstufe der Alexander-von-Humboldt-Schule, Wittmund
1997-2001	Grundschule Finkenburgschule, Wittmund

Erklärung

Erklärung

Hiermit bestätige ich, Lisa Maria Redelfs, dass die vorliegende Arbeit abgesehen von der Beratung durch die Betreuer nach Inhalt und Form selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasst wurde. Diese Arbeit oder Teile daraus haben bisher noch nicht an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen. Die Arbeit wurde unter Einhaltung der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Dies ist mein erster Promotionsversuch.

Auszüge dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation eingereicht (siehe oben).

Kiel, den 08. Juni 2017

Lisa Maria Redelfs