

DISSERTATION

In vivo Analyse molekularer Parameter der Hautbarriere im Stratum corneum bei Psoriasis und atopischer Dermatitis mittels konfokaler Raman-Mikrospektroskopie.

In vivo analysis of molecular parameters of the skin barrier in the stratum corneum of psoriasis and atopic dermatitis using confocal Raman microspectroscopy.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Zolotas

Erstbetreuung: Prof. Dr. Dr.-Ing. Jürgen Lademann

Datum der Promotion: 28.02.2025

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1. Konfokale Raman-Mikrospektroskopie (CRM)	5
1.2 Stratum Corneum (SC) und Hautbarrierefunktion (SBF)	5
1.3. Erkrankungen mit gestörter Hautbarriere	7
1.3.1 Atopische Dermatitis (AD)	7
1.3.1.1 Definition und Pathophysiologie	7
1.3.1.2. Das SC und die SBF in AD.....	8
1.3.1.3. Untersuchung des atopischen SC mit CRM und anderen Methoden	9
1.3.2 Psoriasis	9
1.3.2.1 Definition und Pathophysiologie	9
1.3.2.2. Das SC und die SBF in Psoriasis	10
1.3.2.3 Untersuchung des psoriatischen SC mit CRM und anderen Methoden	11
1.4 Ziele der Dissertation	11
2 Methodik	12
2.1 Patienten	12
2.2 Konfokale Raman-Mikrospektroskopie.....	12
2.3 Messungen und Datenauswertung.....	13
3. Ergebnisse	15
3.1 Stratum Corneum (SC) Dicke	15
3.2 Interzelluläre Lipide (ICL).....	17
3.2.1 ICL-Konzentration	17

3.2.2 Lamellare ICL-Anordnung	18
3.2.3 Laterale ICL-Anordnung	19
3.2.4 Carotenoide.....	20
3.3 Natural Moisturizing Factor (NMF)	21
3.4 Keratin	22
3.4.1 Sekundäre Keratinstruktur	22
3.4.2 Tertiäre Keratinstruktur.....	24
3.5 Wasser	28
3.5.1 Wasserkonzentration.....	28
3.5.2 Wasserbindungszustände	29
3.5.3 Gesamtbindungszustand des Wassers	33
4. Diskussion und Schlussfolgerungen.....	35
4.1 Zusammenfassung der Arbeit	35
4.2 Stratum Corneum (SC) Dicke	35
4.3 Interzelluläre Lipide (ICL).....	36
4.3.1 ICL-Konzentration	36
4.3.2 Lamellare ICL-Anordnung	37
4.3.3 Laterale ICL-Anordnung	38
4.3.4 Carotenoidkonzentration	39
4.4 Natural Moisturizing Factor (NMF)	40
4.5 Keratin	41
4.5.1 Sekundäre Keratinstruktur	41
4.5.2 Tertiäre Keratinstruktur.....	42
4.6 Wasser	43
4.6.1 Wasserkonzentration.....	43
4.6.2. Wasserbindungszustände	44
4.7 Stärken und Schwächen der Arbeit.....	45

4.7.1 Schwächen.....	45
4.7.2. Stärken.....	46
4.8. Klinische Relevanz und Implikationen für zukünftige Forschung	47
Literaturverzeichnis	49
Eidesstattliche Versicherung	62
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	63
Druckexemplare der Publikationen.....	64
Lebenslauf	92
Komplette Publikationsliste.....	94
Danksagung.....	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Psoriasis-Patienten: demographische Daten, Läsionen, local PASI und gemessene/ausgewertete Profile	15
Tabelle 2: AD-Patienten: demographische Daten, Läsionen, local EASI und gemessene/ausgewertete Profile	16

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tiefenprofile der ICL-Konzentration	18
Abbildung 2: Tiefenprofile der lamellaren ICL-Anordnung.....	19
Abbildung 3: Tiefenprofile der lateralen ICL-Anordnung	20
Abbildung 4: Tiefenprofile der Carotenoid-Konzentration	21
Abbildung 5: Tiefenprofile der NMF-Konzentration	22
Abbildung 6: Tiefenprofile der sekundären Keratinstruktur	23
Abbildung 7: Tiefenprofile der sekundären Keratinstruktur.....	24
Abbildung 8: Tiefenprofile der Menge an Cystein in Disulfidbrückenbindungen.....	25
Abbildung 9: Tiefenprofile der Stabilität der Disulfidbrückenbindungen	26
Abbildung 10: Tiefenprofile des Verhältnisses von verborgenem zu exponiertem Tyrosin	27
Abbildung 11: Tiefenprofile des Faltungszustands von Keratin.....	28
Abbildung 12: Tiefenprofile der Wasserkonzentration.....	29
Abbildung 13: Tiefenprofile der Menge an sehr stark gebundenem Wasser	30
Abbildung 14: Tiefenprofile der Menge an stark gebundenem Wasser	31
Abbildung 15: Tiefenprofile der Menge an schwach gebundenem Wasser.....	32
Abbildung 16: Tiefenprofile der Menge an ungebundenem Wasser.....	33
Abbildung 17: Tiefenprofile des Verhältnisses von schwach zu stark gebundenem Wasser.....	34

Abkürzungsverzeichnis

AD	atopische Dermatitis
CRM	konfokale Raman Mikrospektroskopie
DA	Donor-Akzeptor (schwach gebundene Wassermoleküle)
DAA	Donor-Akzeptor-Akzeptor (sehr stark gebundene Wassermoleküle)
DDA	Donor-Donor-Akzeptor (sehr schwach gebundene Wassermoleküle)
DDAA	Donor-Donor-Akzeptor-Akzeptor (stark gebundene Wassermoleküle)
EASI	„Eczema Area and Severity Index“
FFA	Freie Fettsäure(n) (free fatty acids)
FP	„fingerprint“ Bereich des Raman Spektrums (400–2000 cm^{-1})
HWN	„high wavenumber“ Bereich des Raman Spektrums (2000–4000 cm^{-1})
HS	gesunde Haut (healthy skin)
I _x	Raman-Intensität bei der Wellenzahl “x” (in cm^{-1})
IL	Interleukin
ICL(s)	interzelluläre Lipid(e)
K _x	Keratin vom Typ “x”
(n)LAS	(nicht-)läsionale atopische Haut ((non-)lesional atopic skin)
(n)LPS	(nicht-)läsionale psoriatische Haut ((non-)lesional psoriatic skin)
NMF	„natural moisturizing factor(s)“
PASI	„Psoriasis Area and Severity Index“
SC	Stratum corneum
SBF	Hautbarrierefunktion (skin barrier function)
SP	Serinprotease(n)
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust (transepidermal water loss)
TH2	T-Helfer-Zellen vom Typ 2

Zusammenfassung

Psoriasis und atopische Dermatitis (AD) stellen zwei der weltweit häufigsten chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen dar. Obwohl sich die Pathogenese der beiden Erkrankungen voneinander unterscheidet, gehen beide mit einer gestörten Hautbarrierefunktion (SBF) einher. Die SBF beruht physiologisch größtenteils auf ein intaktes Stratum corneum (SC) als äußerste Hautschicht.

Die konfokale Raman-Mikrospektroskopie (CRM) eignet sich als sehr präzises Verfahren für die Untersuchung des SC. Die SBF von psoriatischem und atopischem SC wurde bislang hauptsächlich mittels transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) als SBF-definierenden Parameter untersucht. TEWL ist zwar ein etabliertes Verfahren, es ist jedoch fehleranfällig und bietet keine spezifische molekulare Tiefeninformation. Daher wurden 19 Psoriasis- und 21 AD-Patienten rekrutiert, um SBF-relevante molekulare Parameter nicht-invasiv und *in vivo* mittels konfokaler Raman-Mikrospektroskopie zwischen läsionaler und nicht-läsionaler Haut zu vergleichen. Die Analyse der Parameter erfolgte zum ersten Mal über die gesamte SC-Dicke und als tiefenabhängige Funktionen, um die Feinstruktur des SC darzulegen.

Unsere Ergebnisse für die Psoriasis zeigen eine niedrigere Gesamtkonzentration interzellulärer Lipide (ICL), eine Verschiebung der lamellaren ICL-Anordnung in Richtung *gauche*-Konformation und eine Abnahme der dichteren orthorhombischen lateralen ICL-Anordnung im läsionalen SC. Darüber hinaus wird eine niedrigere Konzentration von „natural moisturizing factor“ (NMF) und von Wassermolekülen sowie u.a. eine starke Tendenz zu schwächer-gebundenen Wassermolekülen im läsionalen SC beobachtet. Des Weiteren zeigt das läsionale SC eine weniger stabile sekundäre Keratinstruktur mit verminderter α -Helices und eine veränderte tertiäre Keratinstruktur mit höherem Faltungsgrad. Unsere Ergebnisse für die AD zeigen eine niedrigere ICL- und Carotenoidkonzentration sowie eine verringerte orthorhombische laterale ICL-Anordnung im läsionalen SC. Weiterhin werden eine niedrigere NMF-Konzentration, veränderte sekundäre und tertiäre Keratinstruktur und eine Tendenz zu vermehrt stark-gebundenen Wassermolekülen im läsionalen SC beobachtet.

Diese Befunde offenbaren eindeutige strukturelle Unterschiede, die auf eine gestörte SBF im läsionalen im Vergleich zum nicht-läsionalen SC der psoriatischen und atopischen Haut hinweisen. Die Ergebnisse werden kritisch im Vergleich zu anderen Studien

über die psoriatische und atopische Haut sowie auch zu Ergebnissen, die mit derselben CRM-Methode über die gesunde Haut erzielt wurden, diskutiert. Ungeklärte Sachverhalte, die weitere Erforschung benötigen, werden angesprochen. Ein gründliches Verständnis der molekularen Veränderungen zwischen läsionaler und nicht-läsionaler Haut ist nicht nur aus pathophysiologischer Sicht interessant, sondern auch wichtig für die Entwicklung gezielter topischer und systemischer Therapien für diese Erkrankungen. Deren Effektivität könnte gut im Sinne interventioneller Studien mit unserer CRM-Methode kontrolliert werden.

Abstract

Psoriasis and atopic dermatitis (AD) represent two of the world's most common chronic inflammatory skin diseases. Although the pathogenesis of these conditions differs, both are associated with an impaired skin barrier function (SBF). The SBF is predominantly based on an intact stratum corneum (SC) as the outermost layer of the skin.

Confocal Raman microspectroscopy (CRM) proves to be a highly precise method for the SC investigation. So far, the SBF of psoriatic and atopic SC have mainly been analysed using the transepidermal water loss (TEWL) as an SBF-defining parameter. Although TEWL is a widely used method, it is prone to artefacts and contains no specific molecular depth information. Therefore, we recruited 19 psoriasis and 21 AD patients to compare SBF-relevant molecular parameters between lesional and non-lesional skin non-invasively and *in vivo* using CRM. The analysis of the parameters was carried out for the first time over the entire SC thickness and as depth-dependent functions to elucidate the fine structure of the SC.

Our results for psoriasis reveal a lower total concentration of intercellular lipids (ICL), a shift in lamellar ICL organization towards *gauche* conformation, and a decrease in the denser orthorhombic lateral ICL organisation in the lesional SC. Additionally, we observe a lower concentration of the natural moisturizing factor (NMF) and water molecules, along with a strong tendency towards less tightly-bound water molecules in the lesional SC. Furthermore, lesional SC exhibits a less stable secondary keratin structure with reduced α -helices and an altered tertiary keratin structure with a higher degree of folding. Our results for AD show a lower ICL and carotenoid concentration, as well as a reduced orthorhombic lateral ICL organization in the lesional SC. We also observe a lower NMF concentration, altered secondary and tertiary keratin structure, and a tendency towards increased strongly-bound water molecules in the lesional SC.

These findings reveal clear structural alterations, indicating an impaired SBF in lesional compared to non-lesional SC of psoriatic and atopic skin. The results are critically discussed in comparison to other studies on psoriatic and atopic skin, as well as results obtained with the same CRM method on healthy skin. Unresolved issues requiring further investigation are addressed. A thorough understanding of molecular alterations between lesional and non-lesional skin is not only interesting from a pathophysiological perspective, but is also crucial for the development of targeted topical and systemic therapies for

these conditions. Their effectiveness could be well monitored through interventional studies using our CRM method.

1 Einleitung

1.1. Konfokale Raman-Mikrospektroskopie (CRM)

Die unelastische Streuung von monochromatischem Licht über unterschiedliche Vibrations- und Rotationszustände der streuenden Moleküle resultiert in gestreutem Licht mit veränderter Wellenzahl (*Stokes* und *anti-Stokes shift*). Dieses sogenannte Raman-Phänomen [1] erlaubt mittels monochromatischer Bestrahlung (z.B. mit Laser) von Materie, Informationen über die Polarisierbarkeit und Vibrationszustände der Moleküle in dieser Probe zu gewinnen. Durch eine spektrale Analyse können somit Rückschlüsse auf die Art von Molekülen und deren Bindungen und Anordnung in der Probe gezogen werden. Insbesondere für homogene Materialien hat sich die Raman-Spektroskopie zur Identifizierung etabliert. Inhomogene biologische Proben sind durch ihre Zusammensetzung von vielen verschiedenartigen Molekülen und daher überlagernden Raman-Signaturen charakterisiert, was aufwändigere Auswertverfahren erfordert.

Mit der konfokalen Mikroskopie ist die axiale, tiefenabhängige Untersuchung einer Probe möglich. Somit ermöglicht die Kombination von konfokaler Mikroskopie mit der Raman-Spektroskopie in Form von konfokaler Raman-Mikrospektroskopie (CRM) die nicht-invasive *in vitro* und *in vivo* Bestimmung von der molekularen Struktur und Zusammensetzung der Haut in sequentiellen Tiefenniveaus mit sehr guter spektraler und axialer Auflösung [2–4]. Daher hat sich CRM als eine sehr wertvolle Methode für die Untersuchung sowohl der Epidermis der gesunden Haut (HS) [3,5–7], als auch der veränderten Haut durch Alterung [8] oder Erkrankungen [9,10] etabliert.

1.2 Stratum Corneum (SC) und Hautbarrierefunktion (SBF)

Das Stratum corneum (SC) ist die oberste Schicht der Epidermis und damit die oberflächlichste Hautschicht. Dadurch ist das SC mit seinen strukturellen Bestandteilen maßgeblich an der Hautbarrierefunktion (SBF) beteiligt [11–13]. Im Rahmen des als „*brick-and-mortar*“ beschriebenen Modells besteht das SC aus Corneozyten, die in einer Wasser-Lipid-Matrix eingebettet sind [11,14].

Die Corneozyten sind differenzierte Keratinozyten oberhalb des Stratum granulosum, die ihren Zellkern verloren haben und miteinander über Corneodesmosomen vernetzt sind

[13,15]. Weiter beteiligt an ihrer Vernetzung sind das Zytoskelett, bestehend aus Keratinfilamenten, und die sie umgebenden verhornten Lipid- und Protein-Hüllen (bestehend u.a. aus den Proteinen Filaggrin, Loricrin und Involucrin), die zusammen mit Keratin Verknüpfungen bilden [16]. Dieses Netz aus verknüpften Keratinozyten stellt die wichtigste Hautbarriere gegen mechanische und chemische Reize dar [17]. Die Keratinfilamente innerhalb der Corneozyten sind hauptsächlich vom Typ K1/10 [18] mit hoher mechanischer Stabilität und befinden sich in variablen Faltungszuständen abhängig von ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur [19].

Die interzellulären Lipide (ICL) bestehen hauptsächlich aus Ceramiden (ca. 50% der gesamten Lipid-Masse), freien Fettsäuren (FFA, ca. 10–20% der gesamten Lipid-Masse) und Cholesterin (ca. 25% der gesamten Lipid-Masse) [20,21]. Sie sind in Form von Doppelmembranen innerhalb von Lamellen angeordnet und weisen teils *trans*- und teils *gauche*-Konformationen auf. Das Verhältnis dieser Konformationen steht auch mit der lateralen ICL-Anordnung in Verbindung, die von orthorhombisch (mit sehr dicht geordneter, schwer permeabler Lipidanordnung) bis hexagonal (weniger dicht geordnete, besser permeable Lipidanordnung) variiert und sich in unterschiedlichen SC-Tiefen inhomogen verteilt [22,23]. Die ICL und ihre Anordnung sind maßgeblich an der Hautbarriere gegen Wasserdiffusion und hydrophile Moleküle beteiligt [3,17,24].

Ein weiterer wichtiger Akteur der SBF ist der „*natural moisturizing factor*“ (NMF), der aus verschiedenen Aminosäuren (z.B. Serin, Alanin, Glycin, Histidin, Ornithin, Prolin und Pyrrolidon-Carbonsäure) mit potenten hygroskopischen Eigenschaften besteht, die sich aus dem Abbau von Filaggrin herleiten [25]. Die NMF-Konzentration und der Faltungszustand der Keratinfilamente in den Corneozyten sind primär verantwortlich für die Bindung von Wassermolekülen und dadurch für die Erhaltung der physiologischen Hautfeuchtigkeit, die auch als Funktion der SC-Tiefe variiert [19]. Weitere SBF-relevante Funktionen, an denen der NMF beteiligt ist, sind die Aufrechterhaltung des physiologischen sauren pHs, Reifungsprozesses und mikrobiellen Milieus (z.B. durch Reduktion der Kolonisation mit *Staphylococcus aureus*) vom SC [26,27]. Sowohl der transepidermale Wasserverlust (TEWL) als auch der pH-Wert korrelieren invers mit der NMF-Konzentration [28].

Wassermoleküle befinden sich sowohl intra- als auch extrazellulär in der Epidermis und sind an ihren umgebenden Molekülen (z.B. ICL, Keratin, NMF) unterschiedlich stark gebunden. Je nach Menge und Art der Wasserstoffbrückenbindungen, die sie eingehen, unterscheidet man von sehr stark gebundenen bis freien Wassermolekülen [29]. Ihre Verteilung hängt von der SC-Tiefe, dem Alter, sowie weiteren Faktoren ab [8,19,30,31] und

bestimmt die SC-Feuchtigkeit. Die Wasserdiffusion wird hauptsächlich von der SBF des SC kontrolliert [5] und der TEWL ist einer der am häufigsten untersuchten *in vivo* Parameter der SBF, der auch mit der orthorhombischen lateralen ICL-Anordnung [32] korreliert. Allerdings wird vermutet, dass der TEWL insbesondere bei erkrankter oder topisch behandelter Haut nicht immer ein verlässlicher Parameter für die Innen-Außen-Barriere ist [11].

1.3. Erkrankungen mit gestörter Hautbarriere

1.3.1 Atopische Dermatitis (AD)

1.3.1.1 Definition und Pathophysiologie

Die atopische Dermatitis (AD), früher Neurodermitis benannt, ist eine nicht-infektiöse, chronisch-rezidivierende, entzündliche Hauterkrankung, die etwa 15–30% der kindlichen und 14% der erwachsenen Population betrifft [33,34]. Sie stellt eine deutliche Einschränkung für die Lebensqualität dar [35] und gehört zusammen mit bronchialem Asthma, Typ-I Allergien und allergischer Rhinokonjunktivitis zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreises [17]. Das klinische Bild von Patienten mit AD ist durch eine trockene Haut mit altersspezifischen Hautveränderungen geprägt, die sich z.B. bei Erwachsenen bevorzugt an den Beugeseiten manifestieren und sich in Form von ekzematösen Läsionen mit Erythemen, Induration und Papeln zeigen, die starken Juckreiz mit resultierenden Exkoriationen und langfristig Lichenifikation aufweisen [17,36,37].

Während der genaue Pathomechanismus hinter der Erkrankung noch nicht eindeutig geklärt ist, wird das Zusammenspiel von mehreren Faktoren diskutiert. Diese beinhalten genetische und epigenetische (z.B. Filaggrin-Mutationen), immunologische (T_H2-vermittelte Inflammation mit erhöhten IL-4/13 und IgE-Antikörpern) sowie exogene Faktoren, wie z.B. Exposition zu Allergenen, Sekundärinfektionen der Haut, ein verändertes Hautmikrobiom, übermäßige Hygienemaßnahmen, Klima usw. [26,37–41]. Definierend für die AD ist weiterhin eine gestörte Hautbarriere, die sogar mit dem Ausmaß der Erkrankung korreliert [37,42]. Die gestörte SBF in der AD kann teils auf genetische Faktoren zurückgeführt werden und bewirkt in Wechselwirkung mit der Immundysregulation eine inadäquate Reaktion auf exogene Reize, höheres Potential für Allergensensibilisierung und Wundheilungsstörungen [26,39,43–45].

1.3.1.2. Das SC und die SBF in AD

Die eingeschränkte SBF der atopischen Haut betrifft nicht nur läsionale (LAS), sondern auch nicht-läsionale Hautareale (nLAS) und ist auf strukturelle und funktionelle Veränderungen im SC zurückzuführen [26,39]. So ist z.B. nachgewiesen, dass die gesamte atopische Haut eine erhöhte Permeabilität sowohl für hydrophile als auch für lipophile Chemikalien im Vergleich zur gesunden Haut aufweist [46]. In der LAS ist ein dünneres SC als in der HS bekannt [47]. Der TEWL, als Maß der SBF [11], ist erhöht bei der AD [36,39] und die Unterschiede sind sowohl zwischen LAS und nLAS als auch nLAS und HS nachgewiesen [48,49]. Es wurden sogar Unterschiede zwischen läsionaler, periläsionaler, nicht-läsionaler atopischer Haut und HS in Bezug auf die Werte von SC-pH (LAS am höchsten) und SC-Feuchtigkeit (geringste Feuchtigkeit in LAS) beschrieben [50]. Die Schwere der Erkrankung korreliert mit der TEWL-Erhöhung und SC-Feuchtigkeit [51] sowie auch mit der SC-pH-Erhöhung [52]. Letztere beeinflusst vermutlich den Lipidmetabolismus, die Infektanfälligkeit und die Aktivität von Serinproteasen (SP) [26]. Eine erhöhte Aktivität von SP steht in Zusammenhang mit reduzierter SC-Feuchtigkeit [47] und beeinträchtigt die SBF [45,47]. Die diskutierten zugrundeliegenden Mechanismen sind ein gestörter Lipidmetabolismus (mit beispielsweise resultierender reduzierter Lipidkonzentration), gestörtes Proteingleichgewicht [26,39] und Förderung der T_H2-Inflammation durch erhöhte Spiegel von IL-1 α und IL-1 β [43].

Einen weiteren Faktor für die gestörte Hautbarriere stellen Filaggrin-*loss-of-function*-Mutationen dar. Filaggrin produziert physiologisch NMF, mit erheblichem Einfluss auf die physiologische Einstellung von Feuchtigkeit, saurem pH, SP-Aktivitätsregulation und antimikrobiellen Eigenschaften des SC [17,45]. Dadurch wird ersichtlich, warum verminderte Filaggrin-Spiegel in AD reduzierte NMF-Konzentration, höheren TEWL, Hauttrockenheit [17,53] und höhere Kolonisation mit *Staphylococcus aureus* [27] verursachen. Allerdings sind weder alle AD-Patienten von Filaggrin-Mutationen betroffen (sondern ungefähr die Hälfte), noch kommt es immer zu einem AD-Phänotyp bei Präsenz von Filaggrin-Mutationen (sondern in ca. 60% der Fälle) [26,54,55]. Abgesehen von genetischen Ursachen könnten auch die erhöhten proinflammatorischen Zytokine IL-4 und -13 eine verminderte Filaggrin-Expression verursachen [28].

Außer Filaggrin sind auch weitere wichtige strukturelle Proteine in der atopischen Haut reduziert, wie z.B. Hornerin, Loricrin und Involucrin, was genetisch und/oder inflammatorisch bedingt sein kann [28]. Weitere relevante Faktoren für die Hautbarrierestörung der

AD sind dysfunktionelle *tight junctions* [56], reduzierte antimikrobielle Peptide [17] und ein gestörtes mikrobielles Milieu von Kommensalen. Die physiologisch vorkommenden Spezies Cutibacterium, Streptococcus, Corynebacterium und Proteobacteria werden in atopischer Haut vermehrt von der Staphylokokken-Kolonisation verdrängt [57]. Interessanterweise wird eine Korrelation zwischen Staphylokokken-Kolonisation und höherem TEWL beschrieben [58]. Zuletzt werden strukturelle Veränderungen des atopischen SC in Bezug auf die ICL beobachtet. So sind z.B. die Gesamtkonzentration von ICL, die Konzentration von Ceramiden (besonders 1 und 3) und die Kettenlänge der FFA reduziert im Vergleich zur HS [48,59] mit signifikanten Folgen für die SBF [39].

1.3.1.3. Untersuchung des atopischen SC mit CRM und anderen Methoden

Zahlreiche unterschiedliche Methoden wurden für die Untersuchung der SC-Struktur und SBF der atopischen Haut verwendet, wie z.B. TEWL-Messung, Bestimmung der Leitfähigkeit, Reflexionsspektroskopie, optische Kohärenztomographie oder diverse Untersuchungen der Lipide [60]. CRM ist bisher auch für einige Fragestellungen in Bezug auf die atopische Haut eingesetzt worden, wie z.B. für die Untersuchung der Filaggrinmutation-Auswirkungen [61–63], den Vergleich zwischen atopischer, sensibler und nicht-sensibler Haut [64] oder die objektive Klassifizierung der AD [65]. Des Weiteren wurden mittels CRM Lipidanalysen [66] und eine Untersuchung von unterschiedlichen strukturellen Parametern der oberflächlichen 12,5 µm des atopischen SCs [67] durchgeführt.

1.3.2 Psoriasis

1.3.2.1 Definition und Pathophysiologie

Die Psoriasis vulgaris ist eine nicht-infektiöse, chronische, inflammatorische Hauterkrankung, die geschlechts- und altersunabhängig etwa 1,5% der Zentraleuropäischen und 2–3% der Weltbevölkerung betrifft [68,69]. Wie bei der AD ist die Pathophysiologie der Erkrankung ist noch nicht abschließend geklärt und beruht auf genetische, immunologische und exogene Faktoren [70,71], während epigenetische Dysregulation [72] und ein verändertes Mikrobiom auch eine Rolle spielen [73]. Die typischen psoriatischen Hautveränderungen imponieren als indurierte, scharf begrenzte erythemosquamöse Plaques meis-

tens im Bereich der Streckseiten der Extremitäten. Histologisch zeigen sich zugrundeliegende Proliferations- und Differenzierungsstörungen der Keratinozyten als Akanthose, Parakeratose und Hyperkeratose der Epidermis [68,74–76].

Eine gestörte SBF ist auch bei der Psoriasis bekannt, wobei es nicht eindeutig geklärt ist, ob sie pathogenetisch primär und/oder sekundär bedingt ist [11,24,42,77]. Dementsprechend ist einerseits die im Rahmen der Psoriasis auftretende Inflammation eine Ursache für die gestörte SBF (sekundär bedingt), indem z.B. die physiologische Produktion von SBF-fördernden Bestandteilen des SC beeinträchtigt wird [78]. Andererseits betreffen genetische Veränderungen bei der Psoriasis direkt die Struktur der Epidermis (primär bedingte SBF-Störung), z.B. bezüglich der Cholesterol- oder Ceramidsynthese, mit resultierender Inflammation, erhöhter Vulnerabilität gegenüber exogenen Reizen (z.B. mikrobiellen Antigenen) und gegebenenfalls Induktion des psoriatischen Phänotyps [77,79]. In Anbetracht des wichtigen Stellenwerts der Hautbarrierestörung in der Pathophysiologie der Erkrankung sind daher Erkenntnisse über die molekulare Struktur des psoriatischen SC sehr wertvoll.

1.3.2.2. Das SC und die SBF in Psoriasis

Läsionale psoriatische Haut (LPS) weist eine weniger geordnete SC-Struktur bezüglich der Lipid-Anordnung auf [24,80,81]. Eine potentielle Ursache dafür stellt die Veränderung in der Ceramidzusammensetzung [81,82] mit reduzierten langkettigen Ceramiden im Vergleich zur HS [83] dar. Außerdem ist die Konzentration von FFA in LPS niedriger als in nicht-läsionaler psoriatischer Haut (nLPS) [84]. Darüber hinaus wurden durch Raster-elektronenmikroskopie eine aberrante lamellare ICL-Anordnung und die Präsenz von Lipidtröpfchen im psoriatischen SC nachgewiesen [85].

Die Konzentration von NMF erscheint vergleichbar zwischen nLPS und HS, aber reduziert in LPS im Vergleich zu nLPS. [84]. Weiterhin werden Unterschiede in der Sekundärstruktur von Keratin beschrieben. LPS scheint ein höheres Verhältnis von β -Faltblättern zu α -Helices als nLPS oder HS aufzuweisen [84]. Als klarer Indikator für die SBF, ist TEWL in LPS höher als in nLPS [84,86]. Das Ausmaß der TEWL-Erhöhung scheint mit der Schwere der Erkrankung zu korrelieren [87]. In Zustimmung mit diesen Ergebnissen ist die SC-Feuchtigkeit, die ebenfalls ein Maß für die SBF darstellt [25,88,89], niedriger in LPS im Vergleich zu nLPS [84,90].

Bezüglich der Frage, ob die SBF von nLPS der HS entspricht, würden einige Studien dafürsprechen, z.B. bezüglich Lipid-Zusammensetzung, TEWL oder SC-Feuchtigkeit

[84,91,92], im Gegensatz zu anderen Studien, die eine Mittelstellung von nLPS zwischen LPS und HS [93–95] nahe legen.

1.3.2.3 Untersuchung des psoriatischen SC mit CRM und anderen Methoden

Wie bei der AD sind auch bei der Psoriasis zahlreiche Methoden eingesetzt worden, um die Hautstruktur zu untersuchen. So sind beispielweise Untersuchungen mittels TEWL-Messung, Korneometrie, “*attenuated total reflectance – Fourier-transform infrared spectroscopy*” [84,96], *tape-stripping* [97], *multiphoton-CARS tomography* [98], OCT [99], *diffuse reflectance spectroscopy* [100], Rasterelektronenmikroskopie [85] und Laser-Scanning-Mikroskopie [80,101] erfolgt. Mittels CRM und *near-infrared*-Spektroskopie wurden bis jetzt nLPS-Areale *in vivo* [9], LPS-Areale verstorbener Psoriasis-Patienten *ex vivo* [102], psoriatische Schuppen *in vitro* [103], ein psoriatisches Hautmodell *in vitro* [104] und spezifische SC-Komponenten im Rahmen einer Pilotstudie *in vivo* [10] untersucht. Darüber hinaus ist Raman-Spektroskopie für die Therapiebeobachtung von psoriatischer Haut eingesetzt worden [105]. Eine neuere Studie hat mittels eines beweglichen konfokalen Raman-Mikroskops atopische, psoriatische und gesunde Haut bezüglich Wasserkonzentration und bestimmter Lipidparameter verglichen [106].

1.4 Ziele der Dissertation

Ziel dieser Dissertation ist eine tiefenabhängige Untersuchung SBF-assoziiierter molekularer struktureller Parameter des SC von Patienten mit Psoriasis und AD mittels nicht invasiver *in vivo* CRM und den analytischen Methoden, die in unserer Forschungsgruppe etabliert worden sind [19,22,30]. Ein detailliertes Verständnis der molekularen Feinstruktur vom SC erlaubt wertvolle Erkenntnisse über die SBF, die wiederum wichtig für das Verständnis der Pathophysiologie und für die Therapieoptimierung dieser zwei Erkrankungen sind, die mit einer gestörten Hautbarriere einhergehen. Insbesondere wird im Rahmen dieser explorativen Analyse tiefenabhängig im gesamten SC untersucht, inwiefern sich jeweils LAS von nLAS und LPS von nLPS in Bezug auf ICL-Konzentration und -Anordnung, Carotenoid-, NMF-Konzentration, Sekundär- und Tertiärstruktur von Keratin und Wassermolekül-Konzentration und -Bindungszuständen unterscheiden.

2 Methodik

2.1 Patienten

Für die Zwecke dieser Studie wurden aus der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin 19 Patienten diagnostiziert mit Psoriasis vulgaris (8 weiblich, 11 männlich – Durchschnittsalter 37 ± 12 Jahre) und 21 Patienten diagnostiziert mit AD (9 weiblich, 12 männlich – Durchschnittsalter 34 ± 10 Jahre) rekrutiert. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Messung zwischen 19 und 59 Jahre alt, hatten Hauttyp I–III nach Fitzpatrick [107] und mindestens eine aktive Läsion in den Körperbereichen, die für die Messungen zugänglich waren (Ellenbogen, -beuge, Unterarm). Die Läsionen wurden so ausgesucht, dass sie eine möglichst geringe Schuppung bei der Psoriasis (s. Tab. 1 unter Ergebnisse) und eine möglichst geringe Lichenifikation bei der AD aufwiesen (s. Tab. 2 unter Ergebnisse). Es wurde explizit darauf hingewiesen, dass die Patienten die zu untersuchenden Stellen frei von Topika und Pflegeprodukten mindestens 24 Stunden vor der Untersuchung halten müssen. Alle Patienten wurden ausführlich über alle Aspekte der Studien informiert und haben vor Beginn der Studienteilnahme ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Studie erfolgte nach positivem Votum von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin (EA1/228/19 für Psoriasis und EA1/145/17 für AD).

2.2 Konfokale Raman-Mikrospektroskopie

Die Untersuchung der Haut erfolgte mit dem "Model 3510, skin composition analyzer" (RiverD International B.V., Rotterdam, The Netherlands), der für *in-vivo*- und *ex-vivo*-Messungen entwickelt wurde. Die Spektren im „*fingerprint*“ Bereich (FP, $400\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) wurden mithilfe eines auf 785 nm emittierenden Lasers (20 mW optische Leistung auf der Hautoberfläche mit 5 s Expositionszeit) und die Spektren im „*high wavenumber*“ Bereich (HWN, $2500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) mithilfe eines auf 671 nm emittierenden Lasers (17 mW optische Leistung auf der Hautoberfläche mit 1 s Expositionszeit) aufgenommen. Alle Profile wurden durch Spektren in 2- μm -Schritten aufgezeichnet, beginnend unmittelbar über der Hautoberfläche und bis zu einer Tiefe von 40 μm . Die axiale Auflösung beträgt $\leq 5\text{ }\mu\text{m}$ und die spektrale Auflösung circa 2 cm^{-1} . Bei jedem Profil wurden FP- und HWN-Spektren in der identischen Position und Tiefe mithilfe des piezoelektrischen Positionierers

vom CRM-Gerät „PIFOC piezo flexure nanopositioner“ (Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Waldbronn, Germany) aufgezeichnet. Die komplette Untersuchung einer Hautstelle inkl. FP- und HWN-Profilen dauert ungefähr 2 Minuten. Eine ausführliche Beschreibung des verwendeten Mikroskops erfolgt in der entsprechenden Literatur [108–110].

2.3 Messungen und Datenauswertung

Bei jedem Patienten wurden Messungen im Bereich der oberen Extremitäten auf gesund erscheinender (nicht-läsionaler, entsprechend nLPS und nLAS) und läsionaler (entsprechend LPS und LAS) Haut durchgeführt. Alle untersuchten Läsionen wurden fotodokumentiert und mittels krankheitsspezifischer Scores beurteilt: local-PASI [111,112] (Erythem, Induration, Schuppung) für die psoriatischen und local-EASI [113] (Erythem, Induration, Exkoration, Lichenifikation) für die atopischen Läsionen (s. auch Tab. 1 und 2). Jede komplette Messung (mit FP und HWN) erfolgte in abwechselnden Hautarealen innerhalb der Läsionen/gesunden Haut. Im Falle von kleineren Läsionen, die z.B. nur eine oder zwei Messungen in unterschiedlichen Arealen innerhalb der Läsionen ermöglichten, wurden auch weitere Läsionen von denselben Patienten untersucht. Die untersuchten Hautareale wurden vor der Messung auf keine Art manipuliert und die Messungen wurden nach einer Akklimatisierungszeit von mindestens 15 Minuten unter standardisierten Laborbedingungen durchgeführt (Temperatur ≈ 20 °C).

Insgesamt wurden von den Psoriasis-Patienten 24 läsionale und 16 nicht-läsionale und von den AD-Patienten 18 läsionale und 13 nicht-läsionale Hautareale für die weitere statistische Auswertung benutzt, nachdem minderqualitative Profile ausgeschlossen wurden. Gründe zum Ausschluss von Profilen von der weiteren Auswertung waren der Gebrauch von topischen Substanzen 24 Stunden vor der Messung (gegen Anweisung), dokumentierte Instabilität während der Messung oder unklare Zuordnung zu läsionaler oder nicht-läsionaler Haut. Die Raman-Spektren wurden anschließend mittels etablierter Methoden vorbearbeitet und vom Fluoreszenzhintergrund befreit [6,19]. Weiterhin erfolgte die Entfernung kosmischer Spikes, sowie eine Glättung mittels Prinzipalkomponentenanalyse (4 Komponenten). Die Hautoberfläche (definiert als 0% der SC-Tiefe) wurde an der Position definiert, an der die halbe maximale Intensität der Keratin-assoziierten Bande (bei 1655 cm^{-1}) von der Seite der Hautoberfläche auftrat [110]. Als Übergang vom

SC zum Stratum granulosum (definiert als 100% der SC-Tiefe) wurde die Position definiert, an der die erste Ableitung der Kurve von der Wasserkonzentration den Wert 0.5 erreichte [114,115]. Zum Zwecke der Vergleichbarkeit der untersuchten Parameter wurden sie in 10%-Schritten auf die normalisierte SC-Tiefe von 0 bis 100% interpoliert. Die Datenauswertung erfolgte mithilfe von "Skin Tools 2.0" (RiverD International B.V., Rotterdam, the Netherlands), "Matlab R2019b" (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA), "Origin 2020b" (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) und "Microsoft Office Excel 2016" (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA). Für die Untersuchung von statistischer Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Parameter-Mittelwerten von nLPS vs. LPS und nLAS vs. LAS jeweils wurden t -Tests verwendet, da von einer Normalverteilung der Mittelwerte ausgegangen wird, wie es für die gesunde Haut auch in deutlich kleineren Stichproben in der Literatur mehrmals gezeigt wurde [6,8,19]. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p < 0,05$ vordefiniert und in den Graphen mit * symbolisiert und ein hoch-signifikanter bei $p < 0,01$ und mit ** symbolisiert.

3. Ergebnisse

3.1 Stratum Corneum (SC) Dicke

Die demografischen Daten der rekrutierten Patienten sowie die detaillierten Informationen zu den verwendeten Läsionen sind den Tabellen 1 und 2 zu entnehmen. Die Dicke vom SC wurde wie unter der Methodik (s. 2.3.) beschrieben berechnet. Insgesamt konnte die SC-Dicke für 61 von 89 nLPS-Profilen ($\approx 69\%$) und 23 von 85 LPS-Profilen ($\approx 27\%$) für die Psoriasis-Patienten, sowie für 63 von 78 nLAS-Profilen ($\approx 81\%$) und 43 von 71 LAS-Profilen ($\approx 61\%$) für die AD-Patienten berechnet werden. Bei allen restlichen Profilen konnte entweder die Hautoberfläche oder der Übergang zum Stratum granulosum nicht korrekt bestimmt werden und sie wurden daher von der weiteren Auswertung ausgeschlossen (vgl. Tabellen 1 und 2). Die mittlere SC-Dicke von nLPS beträgt $24 \pm 6 \mu\text{m}$ und die von LPS $26 \pm 8 \mu\text{m}$, ohne dass dieser Unterschied der 2 Mittelwerte um $2 \mu\text{m}$ eine statistische Signifikanz erreicht hat ($p = 0,21$). Für die nLAS wurde eine SC-Dicke von $23 \pm 4 \mu\text{m}$ und für die LAS eine SC-Dicke von $24 \pm 5 \mu\text{m}$ berechnet. Dieser Unterschied von $1 \mu\text{m}$ konnte ebenfalls nicht das Niveau der statistischen Signifikanz erreichen ($p=0,15$).

Pat-Nr.	Alter	Geschlecht	Hauttyp (nach Fitzpatrick)	Anzahl von Läsionen	local PASI	LPS Profile (mit SC-Dicke)	nLPS Profile (mit SC-Dicke)	Ausgeschlossene Profile mit Begründung
1	56	W	II	1	2 2 0	3 (0)	3 (0)	
2	27	M	II	1	2 3 1	6 (1)	6 (5)	
3	19	F	II	1	1 1 2	6 (3)	6 (6)	
4	29	M	III	1	2 0 1	5 (0)	4 (2)	
5	34	M	II	1	2 2 2	5 (0)	5 (5)	
6	37	M	III	1	1 2 1	5 (0)	5 (4)	LPS: INS
7	28	F	II	1	2 0 1	4 (0)	4 (0)	LPS + nLPS: TOP
8	52	M	II	1	2 2 2	7 (0)	6 (2)	LPS: INS
9	34	M	III	1	2 3 2	6 (0)	6 (2)	
10	39	M	II	1	1 2 2	5 (1)	6 (0)	nLPS: INS
11	40	M	III	1	3 2 1	6 (2)	6 (5)	
12	27	F	II	3	2 1 0 2 1 1 2 1 1	2 (0) 2 (1) 1 (1)	6 (6)	
13	59	M	II	3	2 1 0 1 1 1 2 0 0	2 (1) 3 (0) 1 (0)	6 (3)	
14	33	F	II	2	2 0 0	3 (1)	6 (5)	

					2 0 0	3 (2)		
15	57	F	III	2	1 2 0 1 1 0	4 (0) 2 (0)	6 (0)	LPS + nLPS: TOP
16	40	M	III	1	2 1 1	6 (1)	6 (4)	
17	33	F	II	2	2 1 0 2 1 0	1 (1) 6 (1)	6 (5)	
18	45	M	III	2	2 1 1 2 2 1	5 (2) 2 (1)	6 (3)	
19	23	F	III	3	1 2 1 2 3 1 1 1 1	3 (3) 1 (0) 2 (1)	6 (4)	

Abkürzungen und Erläuterungen: INS: dokumentierte Instabilität/Bewegungen während der Messungen; LPS: lässionale psoriatische Haut; M: männlich; nLPS: nicht-lässionale psoriatische Haut; PASI: Psoriasis Area and Severity Index; Pat-Nr.: Patienten-Nummer; SC: Stratum corneum; TOP: Anwendung topischer Substanzen an untersuchten Stellen gegen Anweisung; W: weiblich

Die demographischen Daten der rekrutierten Psoriasis-Patienten: Alter, Geschlecht und Hauttyp nach Fitzpatrick. Darüber hinaus werden alle untersuchten Läsionen mit den entsprechenden local PASI scores (3 Zahlen von links nach rechts: Erythem, Induration, Schuppung) der Läsionen aufgeführt. Es werden die Anzahl der aufgenommenen Profile sowie in Klammern daneben die Anzahl der ausgewählten Profile nach Anschluss von ungeeigneten (entsprechend der Begründungen auf der letzten Spalte) und mit erfolgreicher Bestimmung der SC-Dicke angegeben. (Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116])

Pat-Nr.	Alter	Ge-schlecht	Alter bei AD-Beginn	Hauttyp (nach Fitzpatrick)	Anzahl von Läsionen	local EASI	LAS Pro-file (mit SC-Dicke)	nLAS Pro-file (mit SC-Dicke)	Ausgeschlossene Profile mit Begründung
1	37	M	KK	II	1	1 1 0 1	6 (0)	6 (2)	LAS: UKZ
2	31	M	KK	II	1	2 1 1 0	6 (0)	6 (4)	LAS: UKZ
3	53	M	K	II	1	2 1 1 0	6 (4)	6 (3)	
4	38	W	KK	II	2	2 1 1 0 1 1 0 0	4 (2) 2 (2)	6 (4)	
5	31	W	P/E	II	1	1 1 0 0	6 (6)	6 (6)	
6	48	W	K	II	2	2 0 0 0 1 0 0 0	3 (0) 3 (0)	6 (0)	LAS + nLAS: TOP
7	28	W	KK	II	2	2 1 3 0 2 1 2 0	5 (2) 1 (1)	6 (6)	
8	55	M	KK	III	2	1 1 0 0 2 1 0 0	4 (0) 2 (0)	6 (0)	LAS + nLAS: TOP
9	20	M	KK	II	2	2 1 2 1 3 1 0 0	3 (0) 3 (3)	6 (4)	
10	46	M	KK	II	2	2 0 0 0 2 0 0 0	3 (2) 3 (1)	6 (6)	
11	29	M	K	II	1	2 1 1 0	6 (2)	6 (6)	
12	22	M	K	II	3	2 1 2 0 1 0 0 0 2 1 1 0	3 (0) 3 (0) 2 (0)	6 (0)	LAS + nLAS: INS
13	29	M	KK	III	1	1 0 0 0	6 (0)	6 (0)	LAS + nLAS: UKZ
14	40	M	K	III	2	2 1 1 1	3 (0)	6 (0)	nLAS: UKZ
15	31	M	KK	II	2	1 0 1 0	3 (0)	6 (0)	LAS + nLAS: TOP

						0 1 0 1	3 (0)		
16	37	W	K	III	2	2 0 0 0 2 2 1 1	4 (0) 4 (0)	6 (0)	LAS + nLAS: INS
17	35	W	KK	III	1	1 1 0 0	6 (0)	6 (5)	LAS: INS
18	32	W	KK	III	2	2 1 0 0 1 1 0 0	6 (4) 1 (0)	6 (6)	
19	33	W	KK	III	1	2 1 0 0	6 (5)	6 (0)	nLAS: UKZ
20	23	W	K	III	2	1 0 1 0 2 1 0 1	3 (1) 4 (4)	6 (6)	
21	23	M	KK	III	1	2 1 1 1	6 (4)	6 (5)	

Abkürzungen und Erläuterungen: AD: atopische Dermatitis; EASI: Eczema Area and Severity Index; INS: dokumentierte Instabilität/Bewegungen während der Messungen; K: Kindheit (3–13 Jahre); KK: Kleinkindalter (0–2 Jahre); LAS: läasionale atopische Haut; M: männlich; nLAS: nicht-läasionale atopische Haut; Pat-Nr.: Patienten-Nummer; P/E: Pubertät/Erwachsenenalter (über 13 Jahre); SC: Stratum corneum; TOP: Anwendung topischer Substanzen an untersuchten Stellen gegen Anweisung; UKZ: unklare Zuordnung zu läasionaler/nicht-läasionaler Haut; W: weiblich

Die demographischen Daten der rekrutierten AD-Patienten: Alter, Geschlecht, Alter bei Beginn der Erkrankung und Hauttyp nach Fitzpatrick. Darüber hinaus werden alle untersuchten Läsionen mit den entsprechenden local EASI scores (4 Zahlen von links nach rechts: Erythem, Induration, Exkoration, Lichenifikation) der Läsionen aufgeführt. Es werden die Anzahl der aufgenommenen Profile sowie in Klammern daneben die Anzahl der ausgewählten Profile nach Ausschluss von ungeeigneten (entsprechend der Begründungen auf der letzten Spalte) und mit erfolgreicher Bestimmung der SC-Dicke angegeben. (Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [117])

3.2 Interzelluläre Lipide (ICL)

3.2.1 ICL-Konzentration

Für die Berechnung der ICL-Konzentration wurden die ICL-assoziierten Raman-Intensitäten bei 2880 und 2850 cm^{-1} addiert und über die Keratin-assoziierte Intensität bei 2930 cm^{-1} normiert [6,66]. Es zeigt sich eine niedrigere ICL-Konzentration über das gesamte SC in der läasionalen im Vergleich zur nicht-läasionalen Haut sowohl bei der Psoriasis als auch bei der AD. Der Vergleich zwischen LPS und nLPS ist hoch-signifikant bei den Tiefenniveaus 0–80% der SC-Dicke (Abb. 1A) und zwischen LAS und nLAS signifikant bei 0–10% und hoch-signifikant bei 20–70% (Abb. 1B).

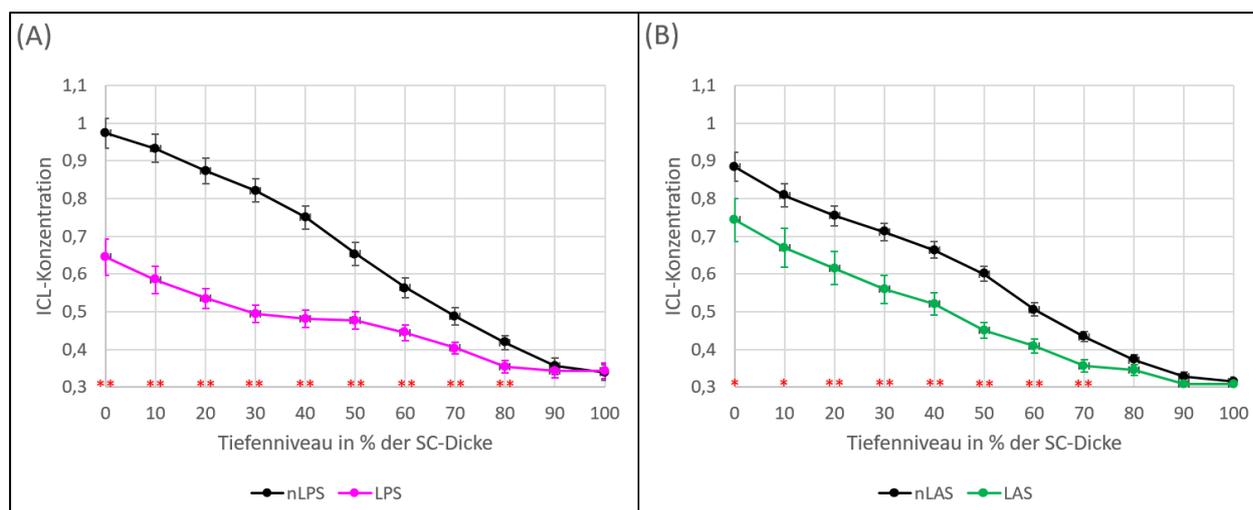


Abbildung 1 Tiefenprofile der ICL-Konzentration (in willkürlichen Einheiten), gegeben durch I_{2880}/I_{2850} normiert über die Keratin-Bande bei 2930 cm^{-1} , im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [ICL – Interzellulare Lipide, SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.2.2 Lamellare ICL-Anordnung

Es ist bekannt, dass die Raman-Banden bei 1130 und 1060 cm^{-1} der *all-trans*-Konformation der ICL entsprechen, während die Bande bei 1080 cm^{-1} der *gauche*-Konformation entspricht [22]. Daher wurde das Verhältnis $I_{1080}/(I_{1130} + I_{1060})$ zur Untersuchung der lamellaren Anordnung der ICL benutzt. Die LPS unterscheidet sich von der nLPS am oberflächlichen bis mittleren SC (10–40% der SC-Dicke) hoch-signifikant mit vermehrter *gauche*- als *trans*-Konformation der ICL (Abb. 2A), die auf eine weniger geordnete lamellare ICL-Anordnung hinweist. Eine ähnliche Tendenz zeigt sich auch bei der LAS im Vergleich zur nLAS, erreicht aber in keinem Tiefenniveau statistische Signifikanz (Abb. 2B).

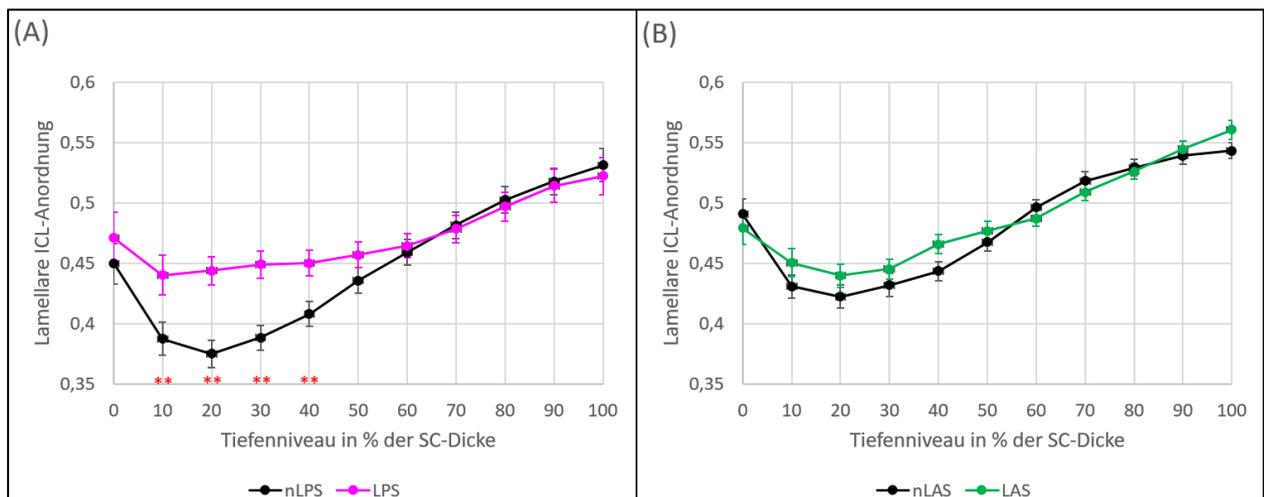


Abbildung 2 Tiefenprofile der lamellaren ICL-Anordnung (in willkürlichen Einheiten), gegeben durch $(I_{1130} + I_{1060}) / I_{1080}$, im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [ICL – Interzellulare Lipide, SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.2.3 Laterale ICL-Anordnung

Rückschlüsse auf die laterale Anordnung der ICL erlaubt das Verhältnis I_{2880}/I_{2850} , nachdem die Keratin-Interferenz ausgeschlossen wird, da höhere Werte eine erhöhte Prävalenz der orthorhombischen lateralen ICL-Anordnung zeigen, während niedrige Werte auf die weniger dichte hexagonale Anordnung hinweisen [22,66]. Sowohl bei der Psoriasis als auch bei der AD zeigen sich über das gesamte SC niedrigere Werte für die laterale ICL-Anordnung in der läsionalen im Vergleich zur nicht-läsionalen Haut. Die Unterschiede zwischen LPS und nLPS sind hoch-signifikant bei 0–70% und signifikant bei 80% der SC Dicke (Abb. 3A) und zwischen LAS und nLAS hoch-signifikant bei 20–30, 50 und 90% und signifikant bei 40 und 60–70% der SC Dicke (Abb. 3B).

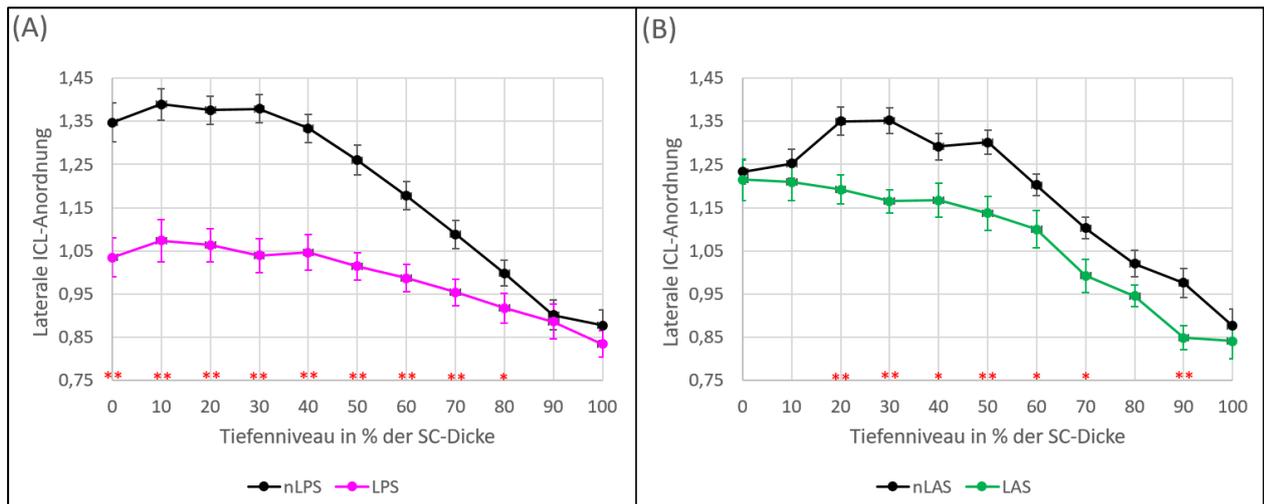


Abbildung 3 Tiefenprofile der lateralen ICL-Anordnung (in willkürlichen Einheiten), gegeben durch I_{2880} / I_{2850} mit entfernter Keratin-Interferenz, im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [ICL – Interzellulare Lipide, SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.2.4 Carotenoide

Carotenoide, wie das in der menschlichen Epidermis hoch konzentrierte β -Carotin und das Lycopin, sind an der lateralen ICL-Organisation beteiligt [118] und weisen anti-oxidative sowie photoprotektive Eigenschaften auf [119]. Aus diesen Gründen wurde die Carotenoidkonzentration mittels der Raman-Intensität bei 1524 cm^{-1} untersucht [120]. Während sich zwischen LPS und nLPS keine signifikanten Unterschiede zeigen (Abb. 4A), zeigt die LAS eine niedrigere Carotenoid-Konzentration als die nLAS über das gesamte SC. Die Unterschiede sind signifikant in den Tiefenniveaus 0–30, 60 und 80–100 und hoch-signifikant bei 70% der SC-Dicke.

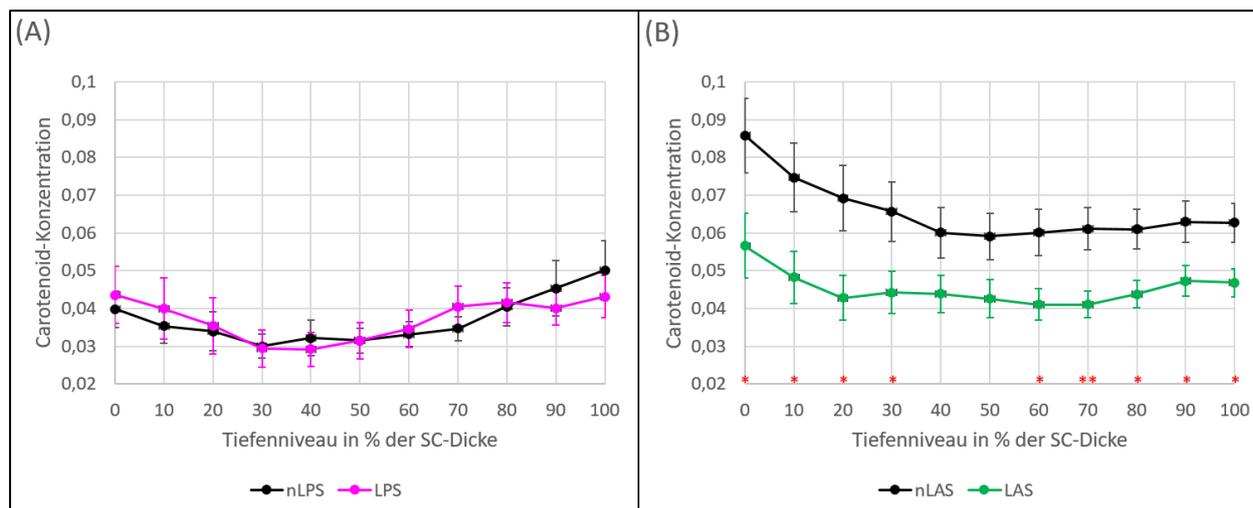


Abbildung 4 Tiefenprofile der Carotenoid-Konzentration (in willkürlichen Einheiten), gegeben durch die Bandenintensität bei 1524 cm^{-1} , im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.3 Natural Moisturizing Factor (NMF)

Für die semiquantitative Bestimmung der NMF-Konzentration wurde nach der beschriebenen Methode in der Literatur [108,121] die „Skin Tools 2.0“ Software benutzt. Insbesondere wurden die kombinierten Konzentrationen von Serin, Alanin, Glycin, Histidin bei pH4 und pH7, Ornithin, Prolin und Pyrrolidon-Carbonsäure berücksichtigt. Nachdem die Profile kombiniert wurden, für die sowohl eine SC-Dicke als auch NMF-Konzentration bestimmt werden konnte, haben sich insgesamt 56 nLPS-, 20 LPS-, 58 nLAS- und 43 LAS-Profile ergeben. Die Ergebnisse demonstrieren sehr große Unterschiede zwischen läsionaler und nicht läsionaler Haut in beiden Erkrankungen mit deutlich geringerer NMF-Konzentration in läsionaler Haut und zunehmendem Unterschied von tieferen zu oberflächlichen SC-Schichten. Die Unterschiede zwischen LPS und nLPS sind hoch-signifikant bei 0–60% und signifikant bei 70–90% der SC Dicke (Abb. 5A) und zwischen LAS und nLAS hoch-signifikant bei 0–70% und signifikant bei 80% der SC Dicke (Abb. 5B).

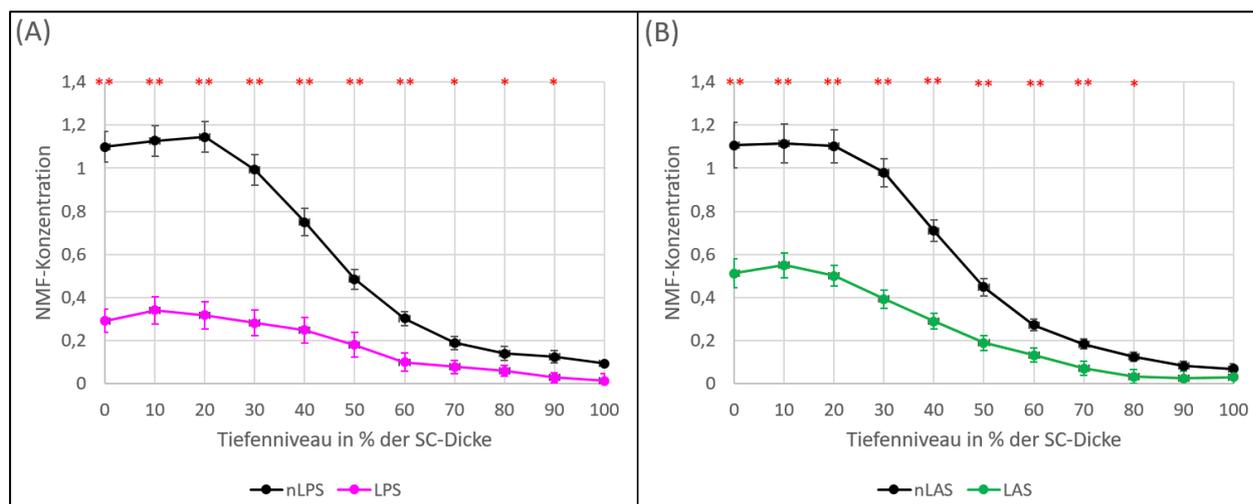


Abbildung 5 Tiefenprofile der NMF-Konzentration (in willkürlichen Einheiten) im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [NMF – natural moisturizing factor(s), SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.4 Keratin

3.4.1 Sekundäre Keratinstruktur

Die sekundäre Keratinstruktur wird u.a. von der Anzahl an α -Helices, β -Faltblättern, „turns“ (Wendungen) und „random coils“ bestimmt. Im Gegensatz zu den α -Helices, die hoch-stabile „coiled-coil“ Strukturen mit wenig freien Seitenketten bilden, erlauben β -Faltblätter, turns und random coils mehr freie Seitenketten mit höherer Wasserbindungskapazität [19,122]. Als Indikatoren für die sekundäre Keratinstruktur können daher zwei Verhältnisse benutzt werden. Erstens das Verhältnis von β -Faltblättern zu α -Helices, gegeben durch I_{960}/I_{938} [19], und zweitens das Verhältnis von β -Faltblättern plus turns plus random coils zu α -Helices, gegeben durch $(I_{1670} + I_{1685}) / I_{1655}$ [6,123].

Das Verhältnis von β -Faltblättern zu α -Helices zeigt sich bei der LPS deutlich in die Richtung von β -Faltblättern verschoben im Vergleich zur nLPS. Die Unterschiede sind im oberflächlichen SC am stärksten ausgeprägt und in den Tiefenniveaus von 0% der SC-Dicke signifikant und 10–30% hoch-signifikant (Abb. 6A). Der Vergleich zwischen LAS und nLAS lässt eine ähnliche Tendenz erahnen, aber er erreicht in keinem Tiefenniveau statistische Signifikanz (Abb. 6B) (aus nicht publizierten Daten von [117]).

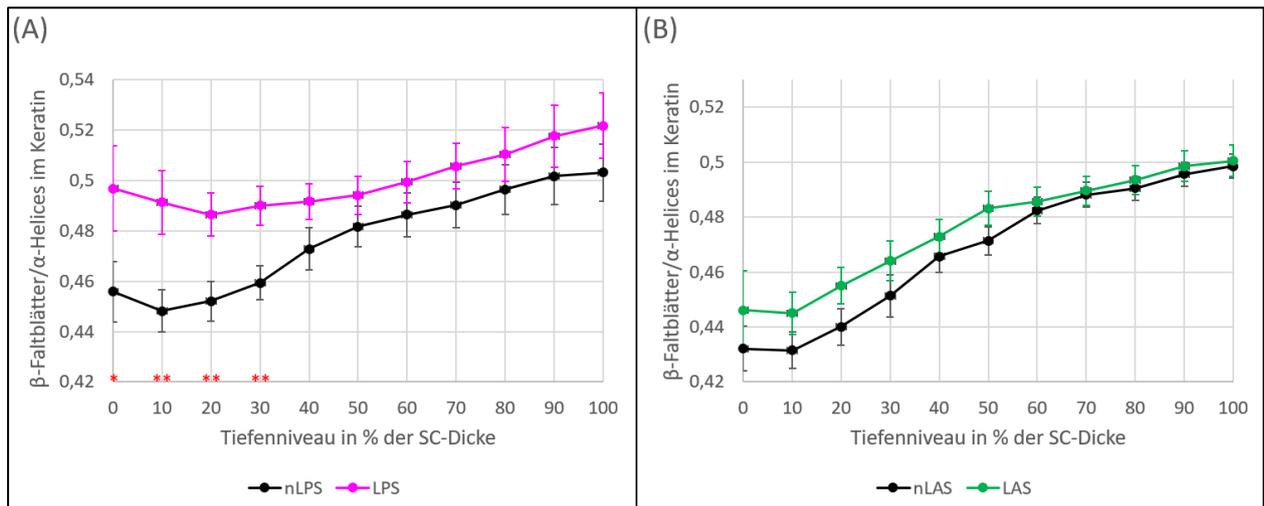


Abbildung 6 Tiefenprofile der sekundären Keratinstruktur im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B): β -Faltblätter / α -Helices gegeben durch I_{960} / I_{938} . Adaptiert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" zum Teil nach [116,117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

Das zweite untersuchte Verhältnis (β -Faltblätter plus *turns* plus *random coils* zu α -Helices) ergibt ähnlich verlaufende Kurven für die LPS und nLPS mit eher vereinzelt signifikanten Unterschieden bei 50–60 und 80% der SC-Dicke ohne signifikante Unterschiede am oberflächlichen SC (Abb. 7A) (aus nicht publizierten Daten von [116]). Im Gegensatz zum ersten Verhältnis demonstriert LAS signifikante Unterschiede im Vergleich zur nLAS bezüglich des zweiten: β -Faltblätter plus *turns* plus *random coils* treten bei der LAS im oberflächlichen SC vermehrt auf im Vergleich zur nLAS. Diese Unterschiede sind signifikant bei 0–10 und 40% und hoch-signifikant bei 20–30% der SC-Dicke.

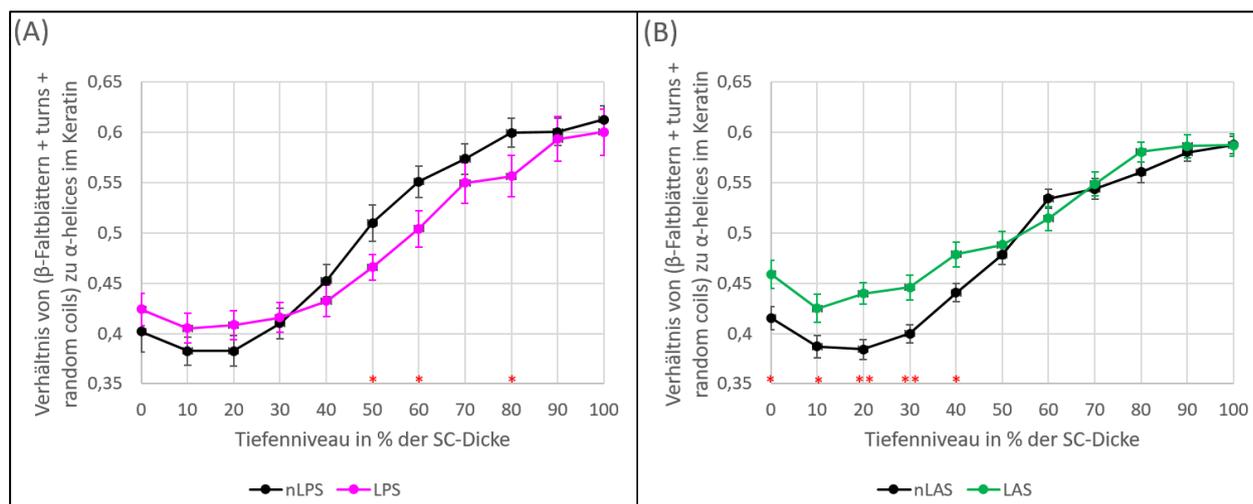


Abbildung 7 Tiefenprofile der sekundären Keratinstruktur im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B): (β -Faltblätter + turns und random coils) / α -Helices gegeben durch $(I_{1670} + I_{1685}) / I_{1655}$. Adaptiert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" zum Teil nach [116, 117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.4.2 Tertiäre Keratinstruktur

Die tertiäre Keratinstruktur wird maßgeblich von der Konformation und den Wechselwirkungen der Seitenketten bestimmt, die von der entsprechenden Menge der freien und gebundenen Seitenketten abhängt [18,19]. Daher wurden folgende Parameter untersucht.

3.4.2.1 Cystein in Disulfidbrückenbindungen

Die Raman-Bande bei $474\text{--}578\text{ cm}^{-1}$ korreliert mit den Disulfidbrückenbindungen (S–S), während die Bande bei $690\text{--}712\text{ cm}^{-1}$ die C–S-Bindungen (kovalente Bindung zwischen Kohlenstoff- und Schwefelatomen) der Cysteinmoleküle spiegelt [19]. Daher ist das Verhältnis $I_{690-712}/I_{474-578}$ ein Maß für die Menge an Cystein, das Disulfidbrückenbindungen in den Keratinfilamenten einhergeht [19]. Das Verhältnis zeigt eindeutig weniger Cystein in Disulfidbrückenbindungen in der LPS im Vergleich zur nLPS über das gesamte SC mit hoch-signifikanten Unterschieden bei 10–50 und 70% und signifikanten Unterschieden bei 60 und 80% der SC-Dicke (Abb. 8A). Die Kurven von LAS und nLAS zeigen sich fast überlappend ohne signifikante Unterschiede (Abb. 8B).

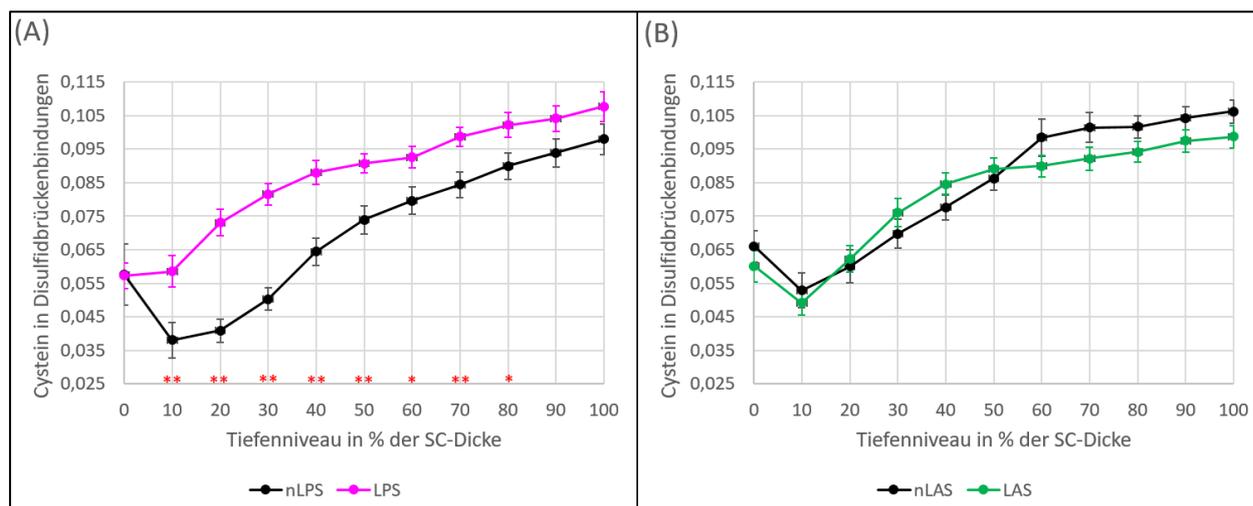


Abbildung 8 Tiefenprofile von Parametern der tertiären Keratinstruktur im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B): Menge an Cystein in Disulfidbrückenbindungen (in willkürlichen Einheiten) gegeben durch $I_{690-712}/I_{474-578}$. Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116, 117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.4.2.2 Stabilität der Disulfidbrückenbindungen

Weiterhin wurde die Stabilität der Disulfidbrückenbindungen in den Keratinfilamenten untersucht, indem die energetisch stabilste Form *gauche-gauche-gauche* im Verhältnis zu der Summe aller Formen von Disulfidbrückenbindungen (*gauche-gauche-gauche* plus *gauche-gauche-trans* plus *trans-gauche-trans*) gesetzt wurde. Dies erfolgt durch das Verhältnis der entsprechenden Raman-Banden: $I_{474-508}/I_{474-578}$ [19]. Die LPS unterscheidet sich von der nLPS mit energetisch weniger stabilen Disulfidbrückenbindungen hauptsächlich in den mittleren SC-Schichten. Die Unterschiede sind signifikant bei 10–20% und hoch-signifikant bei 30–60% der SC-Dicke (Abb. 9A). LAS und nLAS zeigen ein fast identisches Verhältnis abgesehen von zwei vereinzelt sehr geringen Unterschieden in den Tiefenniveaus bei 80 und 100% der SC-Dicke (Abb. 9B).

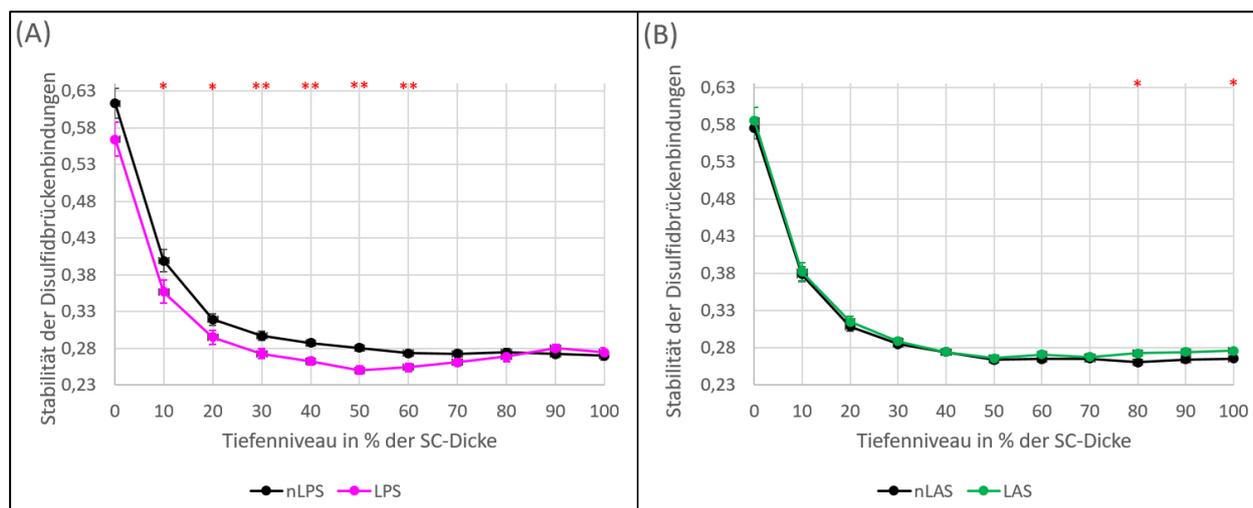


Abbildung 9 Tiefenprofile von Parametern der tertiären Keratinstruktur im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B): Stabilität der Disulfidbrückenbindungen (in willkürlichen Einheiten) gegeben durch $I_{474-508}/I_{474-578}$. Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.4.2.3 Verhältnis von verborgenen zu exponierten Tyrosin-Ringen

Ein weiterer Parameter für die tertiäre Keratinstruktur ist das Verhältnis von verborgenen zu exponierten aromatischen Tyrosin-Ringen. Letztere korrelieren mit der Raman-Intensität bei 850 cm^{-1} , während die verborgenen mit der Intensität bei 830 cm^{-1} korrelieren [123,124], daher wurde das Verhältnis I_{830}/I_{850} untersucht [6,19]. Die LPS weist eine höhere Anzahl an verborgenen Tyrosin-Ringen als die nLPS auf. Die Unterschiede sind an den oberflächlichen und mittleren SC-Schichten am stärksten ausgeprägt und bei 10% der SC-Dicke signifikant und bei 20–70% hoch-signifikant (Abb. 10A). Ähnliche Unterschiede mit geringerer Ausprägung zeigen sich auch zwischen LAS und nLAS mit mehr verborgenen Tyrosin-Ringen in LAS. Diese Unterschiede sind signifikant bei 0, 20–30 und 60% der SC-Dicke und hoch-signifikant bei 40–50% (Abb. 10B).

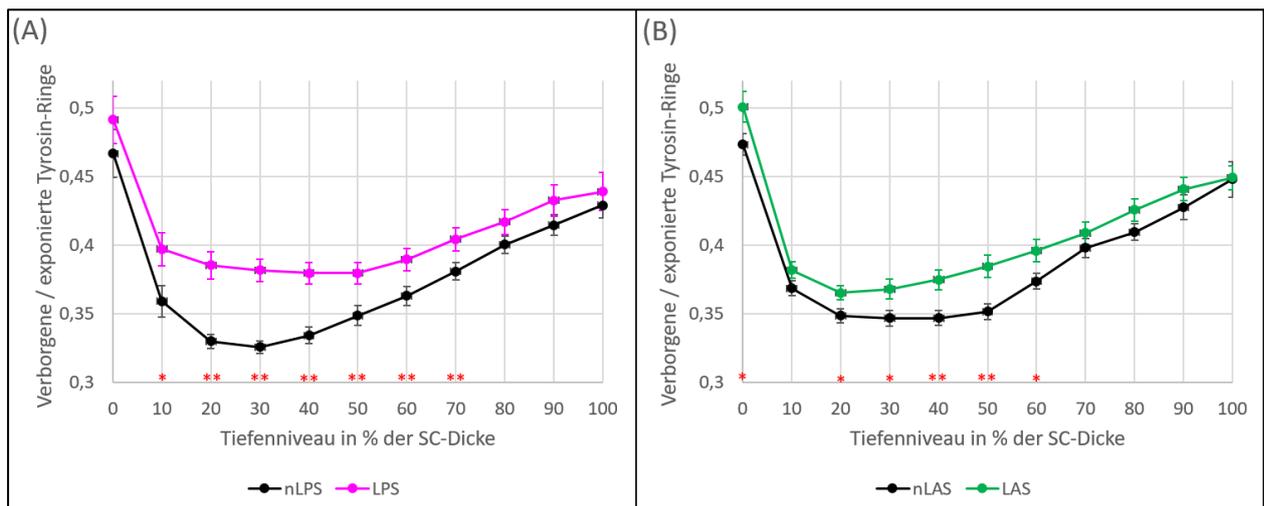


Abbildung 10 Tiefenprofile von Parametern der tertiären Keratinstruktur im SC von LPS vs. nLPS (a) und LAS vs. nLAS (B): Verhältnis von verborgenem zu exponiertem Tyrosin gegeben durch I_{830}/I_{850} . Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.4.2.4 Faltungszustand von Keratin

Zuletzt wurde im HWN-Bereich die maximale Position der breiten Bande bei 2930 cm^{-1} als Indikator für den gesamten Faltungszustand von Keratin untersucht [6,19]. Die LPS demonstriert eine klare Verschiebung des Bandenmaximums auf niedrigere Werte als die nLPS über das gesamte SC. Die Unterschiede sind hoch-signifikant bei 0–80% und signifikant bei 100% der SC-Dicke (Abb. 11A) und weisen auf eine tertiäre Keratinstruktur mit erhöhter Faltung hin. Während die Unterschiede bei der AD nicht so stark ausgeprägt sind, zeigt sich trotzdem eine klare Tendenz für niedrigere verschobene Werte bei der LAS im Vergleich zur nLAS über den größten Teil der mittleren und tiefen SC-Schichten mit signifikanten Unterschieden bei 50–60% und einem hoch-signifikanten Unterschied bei 100% der SC-Dicke (Abb. 11B).

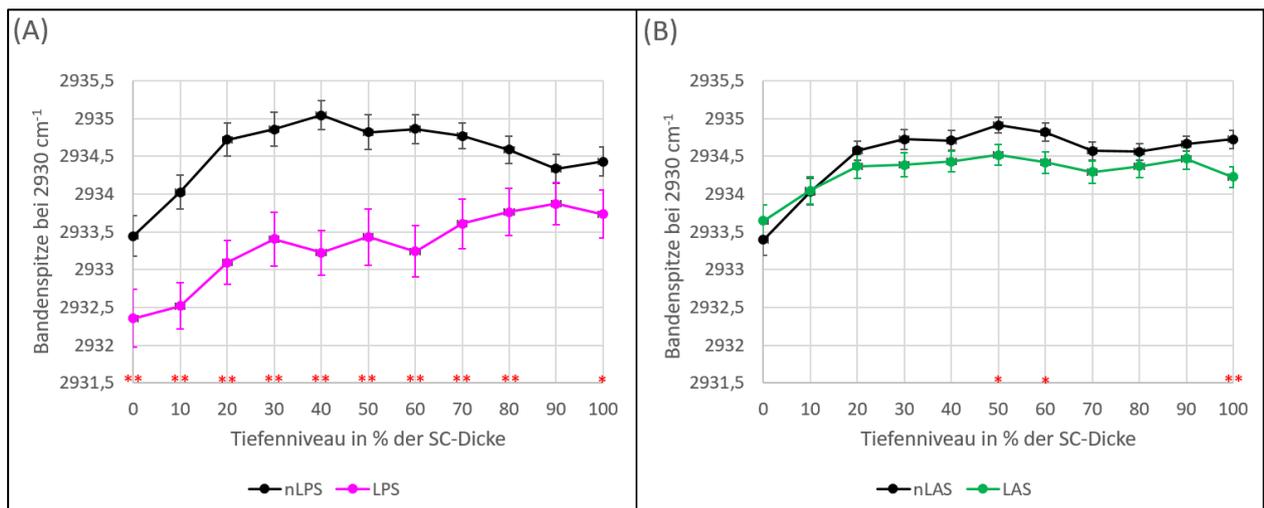


Abbildung 11 Tiefenprofile von Parametern der tertiären Keratinstruktur im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B): Gesamtfaltungszustand von Keratin gegeben durch die Position (in cm⁻¹) der Bande bei 2930 cm⁻¹. Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116, 117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.5 Wasser

3.5.1 Wasserkonzentration

Als Maß für die relative Wasserkonzentration im SC wurde das Verhältnis von Wasser zu Protein ermittelt: $I_{3350-3550} / I_{2910-2965}$ [108]. Es zeigt eine deutlich niedrigere Wasserkonzentration in der LPS im Vergleich zur nLPS über das gesamte SC mit signifikanten Unterschieden bei 10 und 100% und hoch-signifikanten Unterschieden bei 20–90% der SC-Dicke (Abb. 12A). LAS scheint sich von der nLAS hinsichtlich der Wasserkonzentration kaum zu unterscheiden, abgesehen von den zwei tiefsten Niveaus bei 90 und 100% der SC-Dicke, die eine geringe signifikant höhere relative Wasserkonzentration in LAS aufweisen (Abb. 12B).

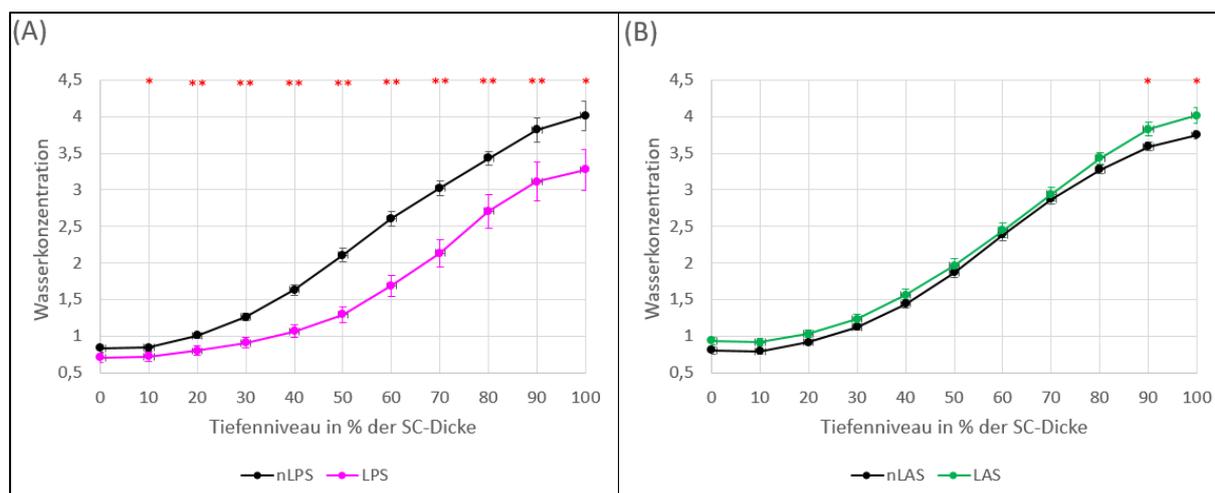


Abbildung 12 Tiefenprofile der Wasserkonzentration (in willkürlichen Einheiten), gegeben durch $I_{3350-3550} / I_{2910-2965}$, im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.5.2 Wasserbindungszustände

Abgesehen von der Konzentration der Wassermoleküle sind ihre Bindungszustände mit den umgebenden Molekülen auch von großem Interesse. Je nach Art und Menge der Wasserstoffbrückenbindungen, die die Wassermoleküle mit ihren Nachbarmolekülen eingehen, lassen sie sich in sehr stark / stark / schwach / ungebundene Wassermoleküle teilen [29]. Um die unterschiedlichen Bindungszustände zu untersuchen, wurden die HWN Raman-Spektren mittels 10 Gauß'scher Funktionen zerlegt und anschließend die Intensitäten der jeweiligen Wasserbindungszustände-assoziierten Sub-Banden der Spektren über die gesamten Wassermoleküle normiert [30].

3.5.2.1 Sehr stark gebundenes Wasser

Donor-Akzeptor-Akzeptor (DAA) Wassermoleküle wurden als sehr stark gebunden definiert und deren Tiefenprofil im SC mittels der Intensität bei $\approx 3015 \text{ cm}^{-1}$ (Zentralposition der Sub-Bande) berechnet [30,125]. LPS zeigt eine höhere Anzahl an DAA-Wassermolekülen als nLPS über das gesamte SC mit signifikanten Unterschieden bei 10–20% und hoch-signifikanten Unterschieden bei 30–100% der SC-Dicke (Abb. 13A). LAS zeigt keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu nLAS, sondern nur eine Tendenz zu mehr DAA-Wassermolekülen in den oberflächlichen Tiefenniveaus des SC (Abb. 13B).

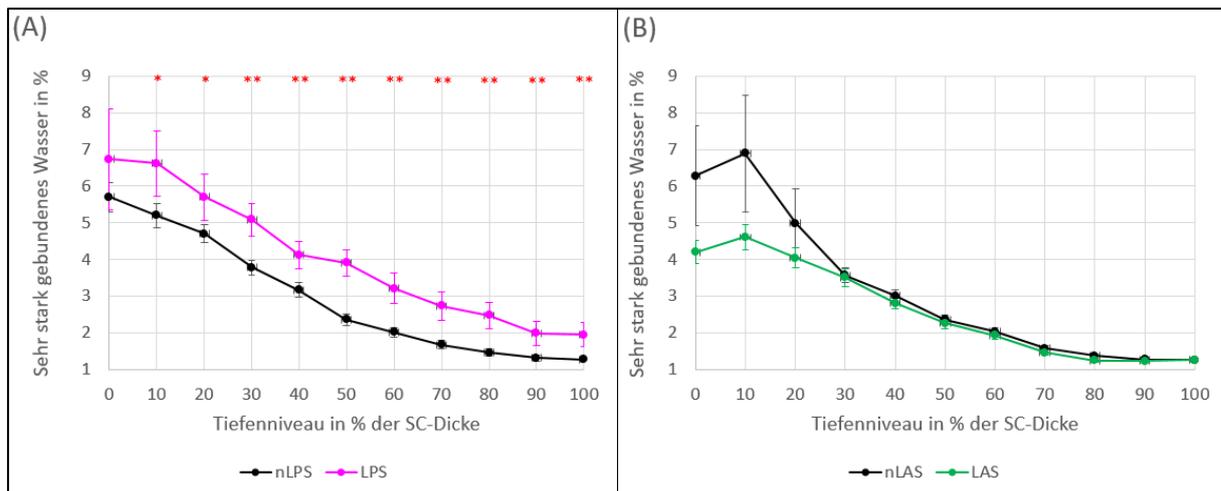


Abbildung 13 Tiefenprofile der Menge an sehr stark gebundenem Wasser (Bandenposition bei $\approx 3015 \text{ cm}^{-1}$) im Verhältnis zur gesamten Wasserkonzentration im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.5.2.2 Stark gebundenes Wasser

Donor-Donor-Akzeptor-Akzeptor (DDAA) Wassermoleküle wurden als stark gebunden definiert. Ihr Tiefenprofil im SC wurde anhand der Intensität bei $\approx 3225 \text{ cm}^{-1}$ (Zentralposition der Sub-Bande) berechnet [30,125]. Die Ergebnisse demonstrieren eine niedrigere Anzahl an DDAA-Wassermoleküle in LPS als in nLPS über das gesamte SC mit signifikanten Unterschieden bei 0–40 und 100% der SC-Dicke und hoch-signifikanten Unterschieden bei 50–80% (Abb. 14A). Im Gegensatz dazu scheint LAS besonders im oberflächlichen SC eine höhere Anzahl an stark gebundene Wassermoleküle als nLAS zu haben. Der Unterschied ist als Tendenz zu sehen, allerdings nur im Tiefenniveau von 10% der SC-Dicke signifikant (Abb. 14B).

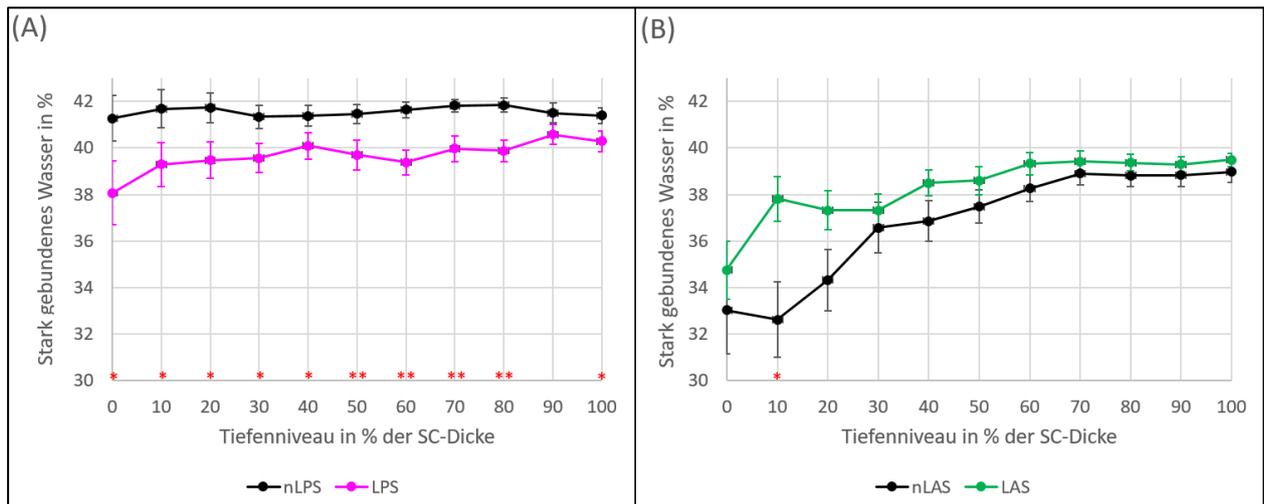


Abbildung 14 Tiefenprofile der Menge an stark gebundenem Wasser (Bandenposition bei $\approx 3225 \text{ cm}^{-1}$) im Verhältnis zur gesamten Wasserkonzentration im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.5.2.3 Schwach gebundenes Wasser

Als schwach gebunden wurden Donor-Akzeptor (DA) Wassermoleküle betrachtet, deren Anteil mittels der Intensität bei $\approx 3451 \text{ cm}^{-1}$ (Zentralposition der Sub-Bande) berechnet wurde [30,125]. LPS scheint eine Tendenz zu höherer Anzahl an schwach gebundenen Wassermolekülen als nLPS zu haben. Die einzigen Tiefenniveaus, die statistische Signifikanz für die Abweichungen zeigen, sind bei 60 und 80% der SC-Dicke (Abb. 15A). LAS und nLAS zeigen keine signifikanten Unterschiede, aber eine Tendenz zu weniger schwach gebundenen Wassermolekülen in der LAS (Abb. 15B).

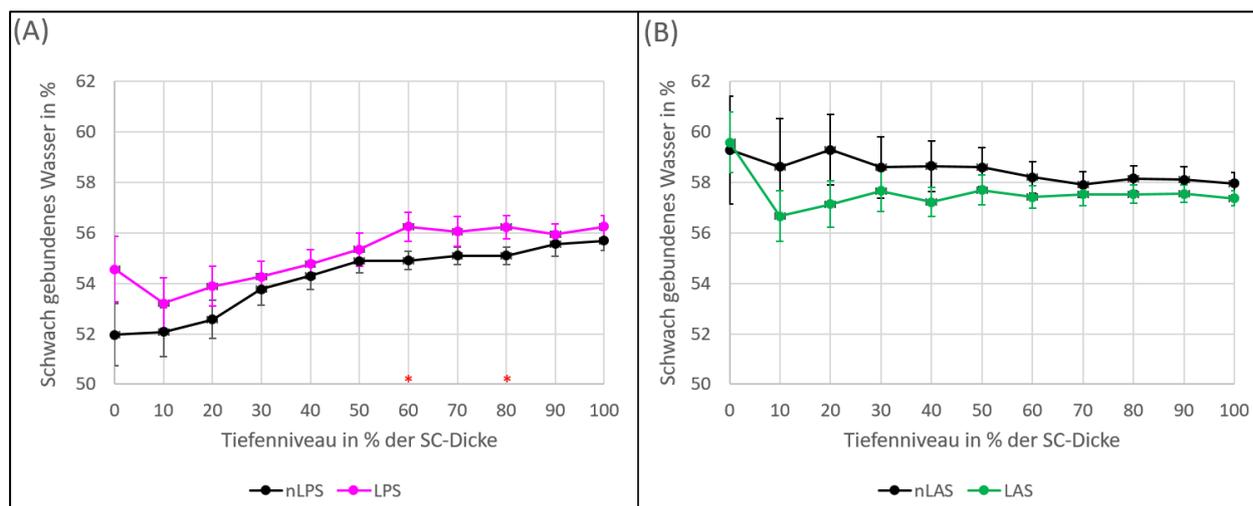


Abbildung 15 Tiefenprofile der Menge an schwach gebundenem Wasser (Bandenposition bei $\approx 3451 \text{ cm}^{-1}$) im Verhältnis zur gesamten Wasserkonzentration im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.5.2.4 Ungebundenes Wasser

Donor-Donor-Akzeptor (DDA) Wassermoleküle, definiert als sehr schwach gebunden, wurden zusammen mit freien Wassermolekülen als ungebundenes Wasser zusammengefasst. Die entsprechende Intensität liegt bei $\approx 3451 \text{ cm}^{-1}$ (Zentralposition der Sub-Bande) [30,125]. LPS scheint eine etwas geringere Anzahl an ungebundenen Wassermolekülen als nLPS zu haben. Die Unterschiede sind nur bei 50–60% der SC-Dicke signifikant (Abb. 16A). Die Kurven für LAS und nLAS erlauben keine Rückschlüsse auf signifikante Unterschiede bezüglich der ungebundenen Wassermoleküle mit Ausnahme einer vereinzelt Abweichung im Tiefenniveau von 10% der SC-Dicke (Abb. 16B).

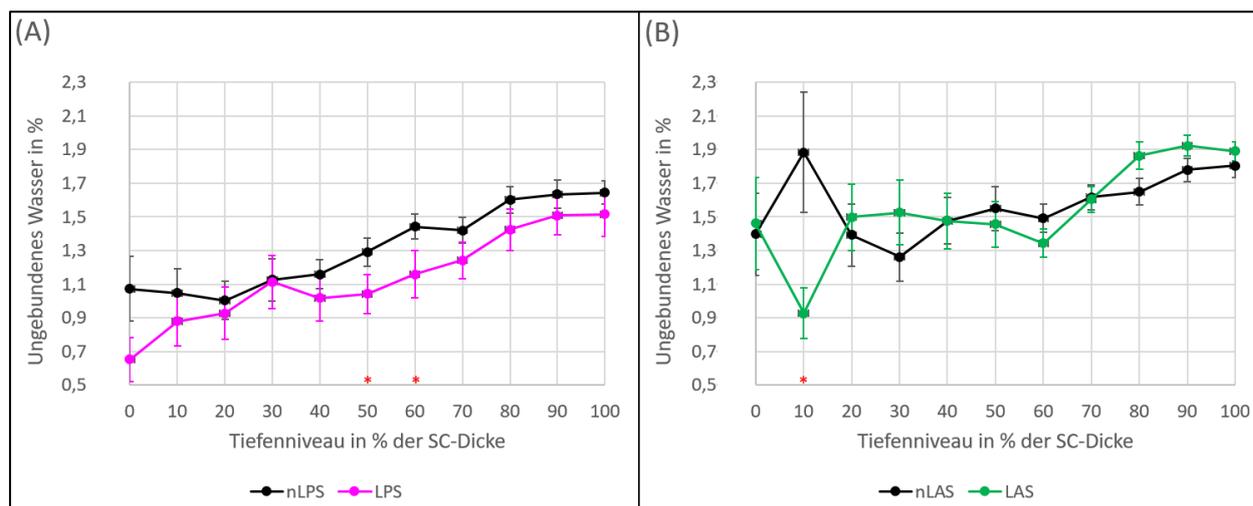


Abbildung 16 Tiefenprofile der Menge an ungebundenem Wasser (DAA, Bandenposition bei $\approx 3451 \text{ cm}^{-1}$) im Verhältnis zur gesamten Wasserkonzentration im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

3.5.3 Gesamtbindungsstatus des Wassers

Abschließend wurde noch das Verhältnis von schwach zu stark gebundenem Wasser mittels I_{3451}/I_{3225} untersucht. Es stellt ein nützliches Maß für den Gesamtbindungsstatus des Wassers dar, da physiologisch mehr als 90% der gesamten Wassermoleküle im SC den schwach und stark gebundenen Wassermolekülen zugeordnet sind [8,30]. Die Kurve von LPS liegt über der Kurve von nLPS in allen Tiefenniveaus mit hoch-signifikanten Unterschieden bei 60 und 80% und signifikantem Unterschied bei 70% der SC-Dicke (Abb. 17A). Somit weist LPS einen schwächeren Wasserbindungsstatus als nLPS auf. Die Kurve von LAS liegt insbesondere in den oberflächlichen Tiefenniveaus unter der Kurve von nLAS, bis sich die beiden Kurven ca. ab der Mitte der SC-Dicke überlappen (Abb. 17B). Trotz Abwesenheit von signifikanten Unterschieden kann eine Tendenz für stärkere Wasserbindung in LAS im oberflächlichen SC beobachtet werden.

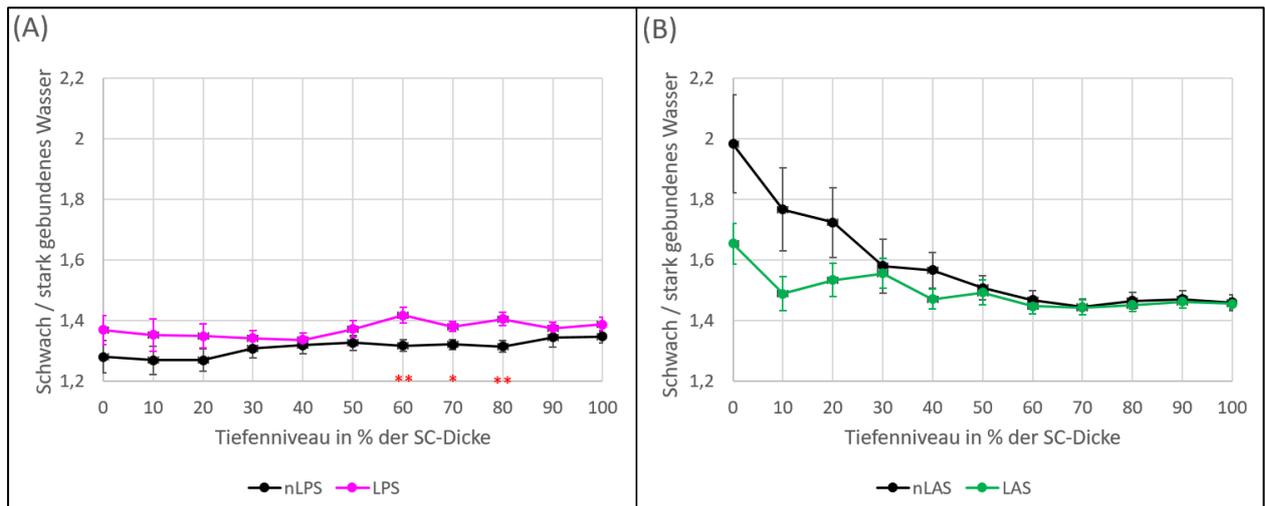


Abbildung 17 Tiefenprofile des Verhältnisses von schwach zu stark gebundenem Wasser, gegeben durch I_{3451} / I_{3225} , im SC von LPS vs. nLPS (A) und LAS vs. nLAS (B). Modifiziert unter "Creative Commons Attribution (CC BY) license" nach [116,117]. [SC – Stratum corneum, (n)LAS – (nicht-)läsionale atopische Haut, (n)LPS – (nicht-)läsionale psoriatische Haut, * – $p < 0,05$ und ** – $p < 0,01$; die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte].

4. Diskussion und Schlussfolgerungen

4.1 Zusammenfassung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Parameter der molekularen Feinstruktur des SC mit Auswirkungen auf die SBF bei Psoriasis und AD untersucht. Die Untersuchungen wurden nicht-invasiv und *in vivo* mittels CRM durchgeführt und haben signifikante Unterschiede zwischen läsionaler (LPS, LAS) und nicht-läsionaler (nLPS, nLAS) Haut bei diesen Erkrankungen gezeigt, die im Folgenden detailliert diskutiert werden. Die Ergebnisse der Arbeit wurden in zwei Publikationen [116,117] veröffentlicht und die folgende Diskussion orientiert sich daran.

4.2 Stratum Corneum (SC) Dicke

Der erste Parameter, der untersucht wurde, ist die Menge an Profilen, für die eine SC Dicke mit den unter 2.3 beschriebenen Methoden bestimmt werden konnte. Dabei zeigt sich sowohl bei der psoriatischen Haut als auch in geringerem Maße bei der atopischen Haut eine Diskrepanz zwischen läsionaler und nicht läsionaler Haut. Die SC-Dickenbestimmung war für 2,5-Mal mehr nLPS- als LPS-Profile möglich und für ca. 20% weniger LAS- als nLAS-Profile. Das kann als Zeichen für eine vermehrt gestörte physiologische Architektur des SC in läsionaler Haut gedeutet werden, wie es auch schon für das psoriatische SC beschrieben wird [102,103].

Die Dicke vom SC war weder zwischen LPS ($26\pm 8\ \mu\text{m}$) und nLPS ($24\pm 6\ \mu\text{m}$) noch zwischen LAS ($24\pm 5\ \mu\text{m}$) und nLAS ($23\pm 4\ \mu\text{m}$) signifikant unterschiedlich. Es zeigt sich jedoch eine leichte Tendenz für ein dickeres SC in der läsionalen Haut im Vergleich zur nicht-läsionalen. Andere Gruppen konnten diese leichten Unterschiede für psoriatische [10] und atopische [63,126] Haut auch mit statistischer Signifikanz zeigen. Eine mögliche Erklärung für die geringe Ausprägung der Unterschiede und Abwesenheit von statistischer Signifikanz in der vorliegenden Arbeit wäre, dass die ausgesuchten psoriatischen und atopischen Läsionen mit milder Ausprägung und geringer Induration (s. Tabellen 1 und 2) ausgesucht wurden.

Ein Vergleich mit Werten von gesunder Haut, die mit den gleichen Methoden berechnet wurden (z.B. $20\pm 2\ \mu\text{m}$ aus [6] oder $22\pm 2\ \mu\text{m}$ aus [125]) zeigt, dass die gesunde Haut eine geringere Standardabweichung vom Mittelwert der SC-Dicke aufweist als die psoriatische

oder atopische Haut (sowohl nicht-läsional als auch in höherem Maße lesional) [116,117], was eine geringere Streuung der Werte zeigt. Damit könnte man interpretieren, dass die atopische und psoriatische Hautstruktur inhomogener als die gesunde ist.

4.3 Interzelluläre Lipide (ICL)

4.3.1 ICL-Konzentration

Die ICL-Konzentration im SC ist ein relevanter Parameter für die SBF, der in läsionaler Haut sogar besser mit dem TEWL korreliert als die SC-Dicke [66].

Die LPS zeigt eine signifikante, deutlich niedrigere ICL-Konzentration am gesamten SC als die nLPS (Abb. 1A). Das reflektiert auch frühere Studien, die mit anderen Methoden sowohl eine geringere FFA-Konzentration [81,84], als auch eine veränderte Ceramidzusammensetzung [10,82] der psoriatischen Haut beschreiben. Eine verminderte Konzentration von Ceramid 3 in LPS im Vergleich zu HS konnte auch mittels CRM signifikant gezeigt werden [106]. Das Ausmaß des Ceramidabfalls scheint sogar mit dem klinischen Schweregrad und dem PASI-Score zu korrelieren [127,128], was auf den hohen Stellenwert besonders der langkettigen Ceramide für die laterale Lipidanordnung zurückzuführen sein könnte (s. auch 4.3.3). Mögliche Ursachen für die pathologische Ceramidzusammensetzung der LPS könnten die gestörte Keratinozytendifferenzierung [86], die erhöhten Interferon- γ -Spiegeln [129] oder die niedrigere Prosaposinkonzentration [130] sein. Im Gegensatz zu LPS konnte zwischen nLPS und HS kein beachtlicher Unterschied bezüglich der ICL-Konzentration festgestellt werden [22,116,125], was auch den Ergebnissen von Untersuchungen der FFA zwischen nLPS und HS entspricht [84].

Analog zur psoriatischen Haut weist auch die LAS eine stark reduzierte ICL-Konzentration im Vergleich zur nLAS (Abb. 1B) auf. In ehemaligen CRM-Untersuchungen konnte dieser Unterschied auch von Janssens et al. [66] (im Gegensatz zu Zhang et al. [131]) beobachtet werden. Darüber hinaus legt ein Vergleich mit Ergebnissen aus HS [6] auch eine niedrigere ICL-Konzentration in nLAS im Vergleich zu HS nahe [117]. Das stimmt gut mit früheren Studien (sowohl mit CRM [66,67] als auch mit anderen Methoden [39]) überein und belegt somit die Mittelstellung von nLAS zwischen LAS und HS bezüglich der ICL-Konzentration. Während FFA und Cholesterin in der atopischen Haut nicht reduziert zu sein scheinen [59], könnte die niedrigere ICL-Konzentration partiell auf erniedrigte Ceramide (insbesondere 1 und 3) in atopischer Haut [26,36,39,59,132] zurückzuführen sein. Auch mittels CRM konnte eine niedrigere Konzentration von Ceramid 2 und 3 in

LAS verglichen mit nLAS nachgewiesen werden [106]. Der Ceramidabfall wiederum könnte durch eine reduzierte Sphingomyelin-Deacylase-Aktivität [132] oder die vermehrt ausgeschütteten entzündlichen Zytokine Interferon- α [17] oder IL-4 [45] bedingt sein. Weitere potentielle Faktoren abgesehen von den Ceramiden, die zur verminderten ICL-Konzentration in AD führen, sind der beeinträchtigte Lipidtransport zum extrazellulären Raum [66], die erhöhte Aktivität von SPs [39,45,47] oder beeinträchtigte Enzyme des Lipidmetabolismus, wie z.B. die β -Glucocerebrosidase und saure Sphingomyelinase [39]. Die beschriebenen inflammationsmedierten pathogenetischen Mechanismen sind offensichtlich stärker in der läsionalen Haut ausgeprägt [66] und könnten die Abweichungen zwischen LAS und nLAS erklären.

4.3.2 Lamellare ICL-Anordnung

Die lamellare ICL-Anordnung bezieht sich auf das Verhältnis von *gauche*- zu *trans*-konformierten ICL und ist relevant für die SBF, da ein niedrigeres Verhältnis mit einer höheren Organisation und dementsprechend dichteren Barriere korreliert [22]. Der Punkt der höchsten lamellaren Organisation in der HS zeigt sich am oberflächlichen bis mittleren SC [22].

In der LPS zeigt sich v.a. in diesem Bereich eine signifikante und für die SBF sehr bedeutende Abweichung von der nLAS (Abb. 2A), i.S. eines höheren Verhältnisses (vermehrt *gauche*-Konformation), was mit einer weniger dichten lamellaren Anordnung einhergeht. Dieser Unterschied wird auch von anderen Autoren beschrieben [102,103] und stellt einen klaren Hinweis auf reduzierte SBF in LPS vs. nLPS dar. Im Gegensatz zu diesem eindeutigen Sachverhalt ist die Situation für die nLPS im Vergleich zur HS weniger klar, da unsere Ergebnisse zwar im Vergleich zu Daten aus HS [125] keine Unterschiede zeigen [116], ältere Studien aber solche berichten [9,103]. Das sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

Die beobachteten Unterschiede in der atopischen Haut sind zwar nicht so stark ausgeprägt und signifikant wie in der psoriatischen Haut, aber sie lassen eine klare Tendenz zu einer geringeren *trans*-Konformation in LAS verglichen mit nLAS im Bereich von 10–40% der SC-Dicke erkennen (Abb. 2B). Diese Abweichung würde wie im Falle der LPS auf eine reduzierte SBF in LAS hinweisen. Des Weiteren deutet ein Vergleich mit HS-Daten [125] auf vermehrte *gauche*-Konformation in nLAS als in HS hin [117], was eine Mittelstellung von nLAS zwischen LAS und HS auch in Bezug auf die lamellare ICL-Anordnung impliziert und im Einklang mit anderen Studien ist [67].

4.3.3 Laterale ICL-Anordnung

Die laterale ICL-Anordnung bezieht sich auf die Verpackung der ICL entweder in Richtung orthorhombischer oder hexagonaler Organisation und sie zeigt physiologisch eine inverse Beziehung zur lamellaren ICL-Anordnung [22]. Die orthorhombische laterale Organisation der ICL entspricht einer dichteren Verpackung mit geringerer Permeabilität und korreliert mit einer besseren SBF [32,133].

Die LPS zeigt eine signifikante und deutlich niedrigere Prävalenz der orthorhombischen ICL-Anordnung über das gesamte SC im Vergleich zur nLPS (Abb. 3A), was einer klaren Beeinträchtigung der SBF in LPS entspricht. Dies spiegelt auch die etablierten höheren TEWL-Werte für die psoriatische Haut wider [49,84,86,87,134] und stimmt gut mit anderen Studienergebnissen überein [104]. Die (insbesondere langkettigen) Ceramide könnten die pathologische laterale ICL-Anordnung in LPS erklären, da sie in LPS reduziert sind [83,102,135], was mit einer erhöhten Prävalenz der hexagonalen lateralen Anordnung korreliert [136]. Unter den Ursachen für die veränderte Ceramidzusammensetzung der psoriatischen Haut (s. auch 4.3.1) könnten in diesem Zusammenhang die inflammatorischen Zytokine eine besondere Rolle spielen, da z.B. erhöhte Interferon- γ -Spiegel als Ursache für die Kettenlängenreduktion der FFA in Ceramiden vermutet werden [129]. Der lamellaren ICL-Anordnung entsprechend scheint die laterale auch keine großen Abweichungen zwischen nLPS und HS aufzuweisen [116,125]. An dieser Stelle sei allerdings darauf hingewiesen, dass pathologische in LPS beschriebene ICL-Strukturen (z.B. abnorme Muster von ICL-Lamellen oder Auftreten von bis 10- μ m-großen Lipidtropfen [85,102,137]) die korrekte Interpretation der Lipidanordnung in der psoriatischen Haut beeinträchtigen könnten.

Analog zur LPS zeigt auch die LAS eine signifikante Verschiebung der lateralen ICL-Organisation in Richtung der hexagonalen ICL-Anordnung im Vergleich zur nLAS (Abb. 3B), was auf eine gestörte SBF hinweist. Im Vergleich zur HS (Schleusener J, 2021) zeigt die nLAS auch eine leichte Verschiebung in Richtung der hexagonalen ICL-Anordnung, v.a. im oberflächlichen SC [117]. Die Erkenntnis, dass die laterale ICL-Anordnung die niedrigste Organisation in LAS gefolgt von nLAS im Vergleich zur HS hat, lässt sich auch durch andere Studien bestätigen [67,138]. Wie im Falle der psoriatischen Haut ist die pathologische ICL-Anordnung in der AD u.a. auf eine pathologische Ceramidzusammensetzung zurückzuführen. So wird für die atopische Haut eine verringerte Kettenlänge von FFA und Ceramiden beschrieben (vermehrt in LAS) [48,59,138–140], die nicht nur zur

Beeinträchtigung der orthorhombischen lateralen ICL-Anordnung führt, sondern auch zu destabilisierten Lipidmembranen und einer Phasentrennung [48,135,136]. Ursächlich für die reduzierten Kettenlängen sind auch in diesem Falle u.a. die entzündlichen Zytokine wie IFN- α oder die AD-assoziierten IL-4 und -13, die zu einer gestörten Aktivität der Fettsäure-Elongasen ELOVL 1, 3, 4 und 6 führen [17,28,138]. Darüber hinaus beeinflusst der FFA-Sättigungsgrad die laterale ICL-Anordnung [141]. Entsprechende Abweichungen im Sättigungsgrad der Lipide und der Aktivität der dabei beteiligten Enzyme werden zwischen LAS, nLAS und HS berichtet, mit LAS am stärksten betroffen und nLAS zu geringerem Ausmaß im Vergleich zur HS [138]. Abgesehen davon könnten die Carotenoide ein weiterer relevanter Faktor für die veränderte ICL-Anordnung in der atopischen Haut sein (s. 4.3.4).

4.3.4 Carotenoidkonzentration

Die Carotenoide (wie Carotin und Lycopin) im SC sind sehr wichtige anti-oxidative und photoprotektive Agentien [119,142], die darüber hinaus maßgeblich in der Ausbildung der physiologischen lateralen Lipidanordnung beteiligt sind [118]. Diese Funktionen sind wichtig für die SBF und so konnte z.B. in Mausexperimenten eine Förderung der SBF durch β -Carotin demonstriert werden [143]. Eine langfristige Erhöhung der Carotenoidkonzentration in der Haut kann sowohl durch topische als auch systemische Substitution erfolgen [144].

In der psoriatischen Haut scheint es zwar keine signifikanten Abweichungen zwischen LPS und nLPS zu geben (Abb. 4A), allerdings lässt ein Vergleich mit HS eine niedrigere Carotenoidkonzentration in LPS und nLPS im Vergleich zur HS vermuten [116,125]. Diese Abweichung wird auch in der Literatur beschrieben [145,146], impliziert eine eingeschränkte SBF der psoriatischen im Vergleich zur gesunden Haut und rechtfertigt Ansätze zur topischen Therapie der psoriatischen Haut mit Carotenoiden [147].

Im Gegensatz dazu konnte in der atopischen Haut auch ein signifikanter Unterschied zwischen LAS und nLAS nachgewiesen werden (Abb. 4B), der weiterhin die eingeschränkte SBF von LAS vs. nLAS belegt. Eine Verbesserung der AD-Symptome durch Applikation topischer anti-oxidativer und -inflammatorischer Mittel konnte belegt werden [148], daher wäre es – wie im Falle der Psoriasis – sehr interessant, Interventionen mit topischen Carotenoiden auf läsionaler und nicht-läsionaler Haut zu untersuchen.

Abschließend sei bemerkt, dass die physiologische Carotenoidkonzentration im SC eine hohe Variabilität aufweist, die von multiplen exogenen Faktoren stark abhängig ist

[120,149]. Daher sind die dargestellten Ergebnisse ggf. eingeschränkt auf die Allgemeinheit anwendbar und weitere Untersuchungen, die möglichst alle relevanten exogenen Faktoren mitberücksichtigen, von hohem Interesse.

4.4 Natural Moisturizing Factor (NMF)

Sowohl in der atopischen als auch in der psoriatischen Haut zeigen unsere Untersuchungen erhebliche Abweichungen der NMF-Konzentration zwischen läsionaler und nicht-läsionaler Haut.

Die NMF-Konzentration in LPS wurde als signifikant niedriger im Vergleich zu nLPS (Abb. 5A) nachgewiesen. Im Vergleich zu HS [8,125] scheint nLPS eine vergleichbare NMF-Konzentration aufzuweisen [116]. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit anderen CRM-Untersuchungen [10,84]. Die verminderte NMF-Konzentration in LPS könnte auf die verminderten Profilaggrin-enthaltenden Keratohyalin-Granula in der psoriatischen Haut zurückgeführt werden [150,151]. Proinflammatorische Zytokine, die in der psoriatischen Pathogenese beteiligt sind, wie z.B. $TNF\alpha$, stehen in Verbindung mit der reduzierten Expression von Filaggrin [152,153].

Die atopische Haut zeigte entsprechende Ergebnisse zur psoriatischen: eine signifikante, stark erniedrigte NMF-Konzentration in LAS im Vergleich zur nLAS (Abb. 5B) und vergleichbare NMF-Werte zwischen nLAS und HS [117,125]. Im direkten Vergleich konnten Mlitz et al. [63] allerdings nicht nur eine geringere NMF-Konzentration in nLAS im Vergleich zu HS feststellen, sondern auch die Unterschiede mit Filaggrin-Mutations-Status und Krankheitsschweregrad korrelieren. Die deutlich niedrigere NMF-Konzentration in LAS stimmt mit der Literatur gut überein und wird sogar als klinischer Marker für die AD diskutiert [154].

Im tiefen SC ist physiologisch die NMF-Konzentration deutlich geringer, da Filaggrin noch nicht in die NMF-bildenden Aminosäuren abgebaut ist. In den oberflächlicheren Schichten des SC nimmt die NMF-Konzentration zu und NMF übernimmt mit den starken hygroskopischen Eigenschaften die Hauptverantwortung für die Bindung von Wassermolekülen [19] sowie auch eine wichtige Funktion in der Abwehr gegen mikrobielle Erreger, der Regulation von pH sowie Aktivität der SPs [17,45]. Dadurch wird klar, dass die reduzierte NMF-Konzentration in LPS und LAS ein Zeichen beeinträchtigter SBF ist.

4.5 Keratin

4.5.1 Sekundäre Keratinstruktur

Keratin in LPS weist v.a. im oberflächlichen SC eine vermehrt aufgelockerte Sekundärstruktur auf, die mehr β -Faltblätter als α -Helices (β/α -Verhältnis) im Vergleich zu nLPS enthält (Abb. 6A). Unter Berücksichtigung weiterer Strukturen im Verhältnis von β -Faltblättern zusammen mit *turns* und *random coils* zu den α -Helices (Abb. 7A) ist die Abweichung in den oberflächlichen SC-Schichten weiterhin leicht bestehend, allerdings nicht mehr signifikant. In den mittleren und tieferen Schichten sinkt die LPS-Kurve sogar unter der Kurve der nLPS. Vermutlich sind diese Effekte auf die anderen Strukturen zurückzuführen, mit unklarer Relevanz für die SBF. Das höhere β/α -Verhältnis in LPS stimmt mit anderen Studien [84] überein. Ein Erklärungsansatz dafür beruht auf der höheren Expression von inflammations- und proliferationsassoziierten Keratintypen wie K6/K16/K17 [11,155] in der psoriatischen Haut, die ein höheres β/α -Verhältnis als die physiologisch häufiger vorkommenden K1/K10 haben. Eine weitere denkbare Erklärung wäre die Streckung/Schwellung der psoriatischen Corneozyten, die in diesem Zustand vermehrt β -Faltblatt-Keratin aufweisen [84]. In welchem Ausmaß diese Veränderungen auch die nLPS betreffen, ist nicht klar. Das β/α -Verhältnis für nLPS scheint in unserer Studie dem von HS zu entsprechen [116,125]. Dies könnte in zukünftigen Studien mit einem direkten Vergleich als primären Endpunkt weiter untersucht werden.

In der atopischen Haut zeigt sich zwar kein signifikanter Unterschied im β/α -Verhältnis, allerdings eine klare Tendenz zu mehr β -Faltblättern als α -Helices über das oberflächliche bis mittlere SC in LAS verglichen mit nLAS (Abb. 6B). Unter Berücksichtigung der weiteren Strukturen (*turns* und *random coils*) im Verhältnis wird interessanterweise die Abweichung in den oberflächlichen Schichten stärker und erreicht das Signifikanzniveau in mehreren benachbarten Tiefenschichten (Abb. 7B). Somit ist der Einfluss dieser Strukturen in der oberen Hälfte des SC gegenteilig von dem in der psoriatischen Haut, was in weiteren Studien genauer untersucht werden könnte. Für die, der Psoriasis analogen, Abweichung im β/α -Verhältnis zwischen LAS und nLAS könnte die entsprechende höhere Expression von den Keratintypen K16/17 in LAS und die reduzierte Expression der physiologisch vorhandenen Typen K1/10 eine Ursache sein [126,156]. Die reduzierte Expression von K1/10 wird auch mit den für die AD relevanten, TH₂-assoziierten Zytokinen IL-4 und -13 in Verbindung gesetzt [157]. Eine weitere mögliche Interpretation der beobachteten Verschiebung könnte i.S. eines Kompensationsmechanismus für die deutlich

niedrigere NMF-Konzentration in LAS (Abb. 5A) betrachtet werden: in den oberflächlichen SC-Schichten, wo am meisten NMF als wasserbindendes Element fehlt, verschiebt sich die sekundäre Keratinstruktur in eine Richtung, die mehr Wasserbindung erlaubt. HS [125] und nLAS weisen im Rahmen unserer Untersuchungen keine markanten Unterschiede in der sekundären Keratinstruktur auf [117]. LAS zeigt hingegen ein höheres β/α -Verhältnis als HS [125] im oberflächlichen SC [117] und aus einer anderen CRM-Untersuchung ist des Weiteren bekannt, dass LAS eine höhere Menge sowohl an β -Faltblätter als auch an α -Helices im Vergleich zu HS im oberen SC aufweist [67]. Mögliche Erklärungen dafür sind modifizierte Filaggrin-Keratin-Interaktionen oder vermehrtes Vorkommen von IgEs, die bekanntermaßen mit epidermalen Proteinen interagieren und mit der Krankheitsschwere der AD korrelieren [67,158].

4.5.2 Tertiäre Keratinstruktur

Die tertiäre Struktur, d.h. die u.a. von den Seitenketteninteraktionen geprägte dreidimensionale Konformation, von Keratin spielt eine bedeutende Rolle für die SBF [19]. Sie beeinflusst die Wasserbindungskapazität des SC maßgeblich in den mittleren SC-Schichten und gewährleistet die mechanische Stabilität der Corneozyten [18,19].

Unsere untersuchten Parameter in der psoriatischen Haut zeigen teils ambivalente Unterschiede zwischen LPS und nLPS. So scheint LPS im Vergleich zu nLPS eine geringere Menge an Cystein in Disulfidbrückenbindungen im Keratin (Abb. 8A) zu haben und die Disulfidbrückenbindungen an sich scheinen weniger stabil zu sein (Abb. 9A). Diese Unterschiede sind signifikant, deuten beide auf einen niedrigeren Faltungsgrad von Keratin hin und würden mit den Resultaten von anderen CRM-Studien, die allerdings nicht *in vivo* psoriatische mit gesunder Haut vergleichen, übereinstimmen [103,104]. Andererseits scheint LPS weniger exponierte Tyrosinringe (Abb. 10A) und eine auf niedrigere Werte verschobene Bandenspitze bei 2930 cm^{-1} (Abb. 11A) zu haben als nLPS. Diese beiden Resultate deuten auf einen höheren Faltungszustand von Keratin hin und da die Verschiebung der Bandenspitze bei 2930 cm^{-1} den Gesamtfaltungszustand von Keratin widerspiegelt, ist eher von einem insgesamt stärker gefalteten Zustand von Keratin in LPS vs. nLPS auszugehen. Infolgedessen können auch weniger Wassermoleküle in LPS gebunden werden (vgl. 4.6.1). Was die nLPS betrifft, konnten weder unsere [116,125] noch andere [9] CRM-Studien Unterschiede in der tertiären Keratinstruktur im Vergleich zu HS nachweisen. Inwieweit nLPS und HS in dieser Hinsicht korrelieren, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

In der atopischen Haut scheint die tertiäre Keratinstruktur mittels CRM eine eindeutigere Tendenz nachzuweisen. Die Menge an Cystein in Disulfidbindungen sowie die Stabilität der Disulfidbindungen scheinen zwischen nLAS und LAS vergleichbar zu sein (Abb. 8B, 9B). Dafür hat die LAS weniger exponierte Tyrosinringe (Abb. 10B) und eine auf niedrigere Werte verschobene Bandspitze bei 2930 cm^{-1} (Abb. 11B). Beide Parameter sprechen für eine vermehrte Faltung in der tertiären Keratinstruktur in LAS mit reduzierter Wasserbindungskapazität [19]. Das könnte abgesehen von der reduzierten NMF-Konzentration in LAS (Abb. 5B) eine weitere Ursache für die bekannte Xerosis [17,50,51,131] der atopischen Haut sein. Mögliche Erklärungen für die veränderte Keratinstruktur in der LAS könnten reduzierte Interaktionen mit Filaggrin oder anderen Proteinen wie Loricrin und Involucrin sein, die in der AD reduziert sind [45,156], oder das inflammatorische Milieu an sich [157]. Wie im Falle der psoriatischen Haut kann auf Basis unserer Untersuchungen keine klare Schlussfolgerung bzgl. des Stellenwerts von nLAS zwischen LAS und HS gezogen werden [117], was die tertiäre Keratinstruktur betrifft. Zukünftige Studien mit einem direkten Vergleich wären dafür benötigt.

4.6 Wasser

4.6.1 Wasserkonzentration

Die Wasserkonzentration im SC zeigte sich signifikant niedriger in der LPS im Vergleich zur nLPS (Abb. 12A), was mit dem klinischen Korrelat der Hauttrockenheit psoriatischer Plaques sowie den Vorbefunden aus der Literatur gut übereinstimmt [10,49,84,90]. Mögliche Erklärungen dafür sind die deutlich reduzierte NMF-Konzentration (insbesondere in den oberflächlichen und mittleren SC-Tiefenschichten) (Abb. 5A) sowie der dichtere Faltungszustand von Keratin (Abb. 11A) in LPS vs. nLPS. Diese könnten insbesondere die Abweichung von LPS vs. nLPS in den tieferen SC-Schichten erklären, da die Wasserbindung an Keratin in diesen Tiefen an Bedeutung zunimmt [19]. Bezüglich der Frage, ob sich nLPS und HS hinsichtlich der Wasserkonzentration unterscheiden, kann aufgrund unserer Studie keine sichere Antwort gegeben werden, da sich keine großen Unterschiede im Vergleich zu gesunden Probanden zeigen [116,125]. Dinish et al. konnten eine signifikant niedrigere Wasserkonzentration in psoriatischer Haut im Vergleich zu HS zeigen, allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen LPS und nLPS [106].

Im Gegensatz zur psoriatischen Haut und in guter Übereinstimmung mit einer neueren CRM-Studie [106] konnten im Rahmen unserer Studie keine relevanten Unterschiede zwischen der Wasserkonzentration in LAS und nLAS gezeigt werden (Abb. 12B). Andere Studien konnten eine niedrigere Wasserkonzentration in LAS als in nLAS nachweisen [131]. Unumstritten ist wiederum die niedrigere Wasserkonzentration in nLAS (und LAS) im Vergleich zu HS [63,67,106]. Diese Resultate erklären die klinischen Korrelate der Xerosis cutis und sind im Einklang mit den aus anderen Methoden bekannten Ergebnissen bzgl. der Wasserkonzentration im atopischen SC [17,50,51]. Wie auch bei der psoriatischen Haut ist davon auszugehen, dass Faktoren wie die niedrigere NMF-Konzentration (Abb. 5B) oder der erhöhte Faltungszustand von Keratin (Abb. 11B) eine kausale Rolle bei eventuell bestehenden Unterschieden zwischen LAS und nLAS spielen.

4.6.2. Wasserbindungszustände

Um eine genauere Analyse zu ermöglichen, wurden die unterschiedlichen Bindungszustände der Wassermoleküle im SC untersucht.

Schwach gebundene Wassermoleküle entsprechen physiologisch den am häufigsten vorkommenden im SC (ca. 50% des Gesamtwassers) [30]. Diese zeigen kaum signifikante Unterschiede zwischen LPS und nLPS abgesehen von einer Tendenz zu einer etwas höheren Konzentration in LPS (Abb. 15A). Der bedeutendste beobachtete Unterschied zwischen LPS und nLPS betrifft die Konzentration der stark gebundenen Wassermoleküle (Abb. 14A), die in LPS signifikant niedriger ist. Angesichts der Tatsache, dass diese Moleküle physiologisch ca. 45% des Gesamtwassers im SC ausmachen [30], könnte das als direktes Korrelat der geringeren SC-Hydrierung in LPS gesehen werden. Die Rolle des NMF-Mangels in der LPS bezüglich dieses Effekts wird daran deutlich, dass die größte Abweichung im oberflächlichen SC erscheint, wo auch die NMF-Konzentration in LPS am stärksten von der in nLPS abweicht (Abb. 5A). Sehr stark gebundene Wassermoleküle sind signifikant höher konzentriert (Abb. 13A) und ungebundene Wassermoleküle tendenziell etwas niedriger konzentriert in LPS, allerdings ist deren Rolle eher untergeordnet, da sie zusammen physiologisch ca. 5% des Gesamtwassers ausmachen [30].

LPS zeigt, besonders im tieferen SC, ein höheres Verhältnis von schwach zu stark gebundenem Wasser als nLPS (Abb. 17A). Diese Verschiebung der Wassermoleküle in Richtung schwächer gebundener Zustände könnte als Hinweis auf eine Schwellung der Corneozyten [159] gedeutet werden, was auch in Einklang mit den Befunden über die

sekundäre Keratinstruktur wäre (s. 4.5.1) [116]. Die Zunahme der SC-Dicke (s. 4.2) und die höhere Prävalenz von Keratin β -Faltblättern in LPS (Abb. 6A) stellen weitere solche potenziellen Hinweise dar. Zwischen nLPS und HS [125] konnten keine markanten Unterschiede hinsichtlich der unterschiedlichen Wasserbindungszustände gesehen werden. Im Gegensatz zur psoriatischen Haut zeigen sich im Rahmen unserer Studie für die atopische Haut kaum signifikante Unterschiede zwischen nLAS und LAS. Als Tendenz kann eine höhere Konzentration von stark gebundenen (Abb. 14B) und eine niedrige Konzentration von schwach gebundenen Wassermolekülen (Abb. 15B) in LAS vs. nLAS beobachtet werden, die sich auch im entsprechenden Verhältnis (Abb. 17B) widerspiegelt. Eine mögliche Erklärung für diese Tendenz könnte die lockerere sekundäre Keratinstruktur (Abbildung 7B) in LAS sein, die mehr Wasserbindungen erlauben würde und gut mit den oberflächlichen Tiefenniveaus im SC korreliert, wo auch die abweichenden Tendenzen zwischen LAS und nLAS zu beobachten sind. In Zusammenschau mit der deutlich geringeren NMF-Konzentration in diesen SC-Schichten (Abb. 5B) könnte eventuell ein Kompensationsmechanismus durch die sekundäre Keratinstruktur gegeben sein. Die prozentuell weniger relevanten Fraktionen von sehr stark und ungebundenen Wassermolekülen [30] weisen kaum Unterschiede zwischen LAS und nLAS auf (Abb. 13B, 16B).

Im Vergleich zur gesunden Haut ist wohl bekannt, dass die atopische Haut (LAS und nLAS) im Allgemeinen eine geringere Wasserkonzentration aufweist. (s. 1.3.1.2). Im Vergleich zu CRM-Daten aus gesunder Haut [125] weisen in unserer Studie sowohl LAS als auch nLAS ein höheres Verhältnis von schwach zu stark gebundenen Wassermolekülen auf, was die geringere Wasserbindungsleistung der atopischen Haut spiegelt [117]. Im Einklang damit sind Beobachtungen von Verzeaux et al. bezüglich des funktionellen Wassers in der atopischen Haut und weisen weiterhin auf die Auswirkungen der reduzierten NMF-Konzentration und des höheren Faltungszustands von Keratin in der atopischen Haut hin [67].

4.7 Stärken und Schwächen der Arbeit

4.7.1 Schwächen

Die durchgeführten Studien weisen bestimmte Limitationen auf, von denen einige im Folgenden aufgeführt werden. Alle Patienten, die rekrutiert wurden, entsprechen den Hauttypen I–III und Altersgrenzen 19–59, was die Anwendbarkeit der Resultate auf die entsprechende Subpopulation beschränkt. Des Weiteren wurde die Auswertung nicht nach einer Stratifikation der Patienten bezüglich Erkrankungsschweregrad, -manifestationsalter oder Filaggrinmutationsstatus (bei AD) angepasst. Solche Aspekte können im Rahmen weiterführender zukünftiger Analysen untersucht werden. Alle Hautareale von allen Patienten für LPS, nLPS, LAS und nLAS wurden jeweils zusammengelegt und als entsprechend vergleichbar betrachtet (aufgrund der ähnlich gewählten Läsionen – vgl. local PASI und EASI), ohne dass eine *mixed model* Analyse für abhängige Daten durchgeführt wurde. Darüber hinaus wurden multiple *t*-Tests ohne Korrektur für multiple Testung angewandt. Die statistische Auswertung wurde auf diese Art durchgeführt, damit eine gute Vergleichbarkeit mit präexistierender CRM-Literatur gewährleistet ist, die auch dieselbe Art von Auswertung aufweist [6,22,30,125,160]. Die Ergebnisse wurden mit Vorsicht interpretiert und es wurden nur über mehrere Tiefenschichten gruppierte Signifikanzen als relevant und vereinzelt signifikante Befunde eher als zufällig gedeutet. Somit werden im Rahmen des explorativen Charakters der Studien lieber Typ-II- als Typ-I-Fehler toleriert. Eine weitere Schwäche der Studien ist der Mangel eines direkten Vergleichs mit einer Kohorte von gesunden Probanden. Dafür wurde zum Zwecke der besten Vergleichbarkeit mit Daten aus der HS-Studie [125] verglichen, die fast zu derselben Zeit und mit derselben Methodik stattgefunden hat. Zuletzt sei erwähnt, dass der Gebrauch von Externa bei den untersuchten Stellen 24 Stunden vor den Messungen streng ausgeschlossen wurde, dennoch hatten die meisten Patienten in der Vergangenheit sowohl topische als auch systemische Therapien hatten. Diese könnten die Ergebnisse im Vergleich zu vorher vollständig unbehandelten Patienten beeinflussen. Diese potenziellen Unterschiede könnten ebenfalls in zukünftigen Studien untersucht werden.

4.7.2. Stärken

Stärken der Studien bestehen darin, dass die verwendeten Methoden *in vivo* und nicht invasiv angewandt werden konnten, ohne jegliche Nebenwirkungen für die Patienten oder erhöhten zeitlichen Aufwand (insgesamt ca. 0,5 Stunden für alle Messungen pro Patienten) zu verursachen. Außerdem sind CRM und die angewandten analytischen Methoden zwar mittels vorheriger Studien für gesunde Haut gut etabliert, bis jetzt aber kaum bei entzündlichen Dermatosen appliziert. Entscheidender Vorteil der Methodik ist die

Möglichkeit der tiefenbezogenen Analyse (bezogen auf die SC-Dicke), die im Gegenteil zu integrierten Parametern über das gesamte SC einen sehr detaillierten Einblick in die feine Struktur des SC ermöglicht. So konnten z.B. tiefenbezogenen Unterschiede zwischen läSIONalem und nicht-läSIONalem SC nachgewiesen werden (z.B. u.a. Abb. 2B, 7B), die pathophysiologisch relevant sein können und über eine integrierte Analyse möglichst verloren gegangen wären. Die untersuchten molekularen Parameter wurden zahl- und facettenreich gewählt und spiegeln die wichtigsten strukturellen Bestandteile des SC wider. Darüber hinaus ist eine Stärke der verwendeten Methodik die Anwendbarkeit in weiteren Studien, wie z.B. auch interventionellen Studien, mit guter Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit. Die Fragestellungen konnten mittels der Studien eindeutig beantwortet werden. Die untersuchten strukturellen Parameter konnten die reduzierte SBF von LPS und LAS im Vergleich zu nLPS und nLAS jeweils gut belegen und eine Mittelstellung von nLPS zwischen HS und LPS sowie von nLAS zwischen HS und LAS andeuten [116,117].

4.8. Klinische Relevanz und Implikationen für zukünftige Forschung

Die klinische Relevanz der vorliegenden Arbeit beruht hauptsächlich auf zwei Säulen. Einerseits liefert sie wertvolle pathophysiologische Erkenntnisse über die Feinstruktur vom läSIONalen und nicht-läSIONalen SC bei zwei sehr häufigen dermatologischen Erkrankungen, die bekannterweise mit einer gestörten SBF einhergehen. So konnten molekulare Abweichungen in Bezug auf ICL-Konzentration und -Anordnung, Carotenoid-, NMF- und Wasserkonzentration sowie Keratinstruktur nachgewiesen werden, die eine beeinträchtigte SBF von LPS vs. nLPS und LAS vs. nLAS nahelegen. Darüber hinaus konnte mittels Vergleichs mit vorherigen CRM-Studien eine Mittelstellung von nLPS zwischen LPS und HS sowie von nLAS zwischen LAS und HS angedeutet werden. Die Ergebnisse ergänzen die schon vorhandene Literatur und decken z.T. neue Fragen auf (s. z.B. 4.5.2 oder 4.6.2), die im Rahmen weiterer Recherche beantwortet werden müssen. Ein detailliertes Verständnis der pathophysiologischen Verhältnisse bildet die Grundlage für jede kausale Therapie (topisch und systemisch).

Andererseits belegt unsere Arbeit den hohen Stellenwert der CRM und verwendeten analytische Methoden als potentes, nicht-invasives diagnostisches Verfahren, welches für weitere Untersuchungen dermatologischer Erkrankungen eingesetzt werden kann. Abgesehen von den vielfältigen molekularen Parametern, die aktuell erhoben werden kön-

nen, ist zu erwarten, dass unter der ständigen Entwicklung der CRM und unter stets zunehmenden Erkenntnissen auch weitere neue SBF-relevante Parameter in Zukunft untersucht werden können.

Aktuell wären in Bezug auf AD und Psoriasis Untersuchungen zum direkten Vergleich von nLAS und LAS mit gesunder Haut und darüber hinaus im nächsten Schritt die Untersuchung von Auswirkungen einer Intervention (z.B. mittels topischer oder auch systemischer Therapie) auf die atopischen oder psoriatischen Läsionen sehr interessant. Außerdem kann das nicht-/läsionale SC weiterer Hautkrankheiten, die mit einer gestörten SBF einhergehen (wie z.B. kutane Lymphome, Ichthyosen, allergische oder Kontaktdermatitis, blasenbildende Erkrankungen [11]), mittels CRM untersucht werden. Von besonderem Interesse wäre auch der potentielle Einsatz der CRM in der Berufsdermatologie und der Gutachtenerstellung, insbesondere für die Berufskrankheit BK5101 (z.B. Handekzem). Eine Untersuchung der SBF mittels CRM bei bestimmten Berufsgruppen mit erhöhtem Risiko für die Entwicklung eines Handekzems oder der standardisierte Einsatz von CRM zur Ergänzung der Beurteilung hautphysiologischer Parameter abgesehen von der Corneometrie, TEWL-Messung und Alkaliresistenztestung, die bis jetzt verwendet werden, bei der Gutachtenerstellung wären denkbare Aussichten.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die erzielten Erkenntnisse dieser medizinischen Doktorarbeit vielversprechende Perspektiven eröffnen. Die zukünftige Entwicklung auf diesem Gebiet wird zweifellos von großem Interesse sein und weitere Fortschritte in der klinischen Praxis ermöglichen. Es wird spannend sein, diese Entwicklungen aufmerksam zu verfolgen und ihre Auswirkungen auf die medizinische Versorgung zu beobachten.

Literaturverzeichnis

1. Raman, C.V.; Krishnan, K.S. A New Type of Secondary Radiation. *Nature* **1928**, *121*, 501–502, doi:DOI 10.1038/121501c0.
2. Förster, M.; Bolzinger, M.-A.; Montagnac, G.; Briançon, S. Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin. *European Journal of Dermatology* **2011**, *21*, 851–863, doi:10.1684/ejd.2011.1494.
3. Darvin, M.E.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Choe, C.-S. Current Views on Noninvasive in Vivo Determination of Physiological Parameters of the Stratum Corneum Using Confocal Raman Microspectroscopy. *Skin Pharmacology and Physiology* **2022**, *35*, 125–136, doi:10.1159/000521416.
4. Darvin, M.E. Optical Methods for Non-Invasive Determination of Skin Penetration: Current Trends, Advances, Possibilities, Prospects, and Translation into In Vivo Human Studies. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 2272, doi:10.3390/pharmaceutics15092272.
5. Vyumvuhore, R.; Tfayli, A.; Duplan, H.; Delalleau, A.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A. Raman Spectroscopy: A Tool for Biomechanical Characterization of Stratum Corneum. *J Raman Spectrosc* **2013**, *44*, 1077–1083, doi:10.1002/jrs.4334.
6. Choe, C.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Human Skin in Vivo Has a Higher Skin Barrier Function than Porcine Skin Ex Vivo-Comprehensive Raman Microscopic Study of the Stratum Corneum. *J. Biophotonics* **2018**, *11*, e201700355, doi:10.1002/jbio.201700355.
7. Rigal, A.; Michael-Jubeli, R.; Nkengne, A.; Baillet-Guffroy, A.; Bigouret, A.; Tfayli, A. Raman Confocal Microscopy and Biophysics Multiparametric Characterization of the Skin Barrier Evolution with Age. *Journal of Biophotonics* **2021**, *14*, e202100107, doi:10.1002/jbio.202100107.
8. Choe, C.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Age Related Depth Profiles of Human Stratum Corneum Barrier-Related Molecular Parameters by Confocal Raman Microscopy in Vivo. *Mech. Ageing Dev.* **2018**, *172*, 6–12, doi:10.1016/j.mad.2017.08.011.
9. Wohlrab, J.; Vollmann, A.; Wartewig, S.; Marsch, W.C.; Neubert, R. Noninvasive Characterization of Human Stratum Corneum of Undiseased Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis as Studied by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Biopolymers* **2001**, *62*, 141–146, doi:DOI 10.1002/bip.1006.
10. Egawa, M.; Kunizawa, N.; Hirao, T.; Yamamoto, T.; Sakamoto, K.; Terui, T.; Tagami, H. In Vivo Characterization of the Structure and Components of Lesional Psoriatic Skin from the Observation with Raman Spectroscopy and Optical Coherence Tomography: A Pilot Study. *J Dermatol Sci* **2010**, *57*, 66–69, doi:10.1016/j.jdermsci.2009.10.006.
11. Proksch, E.; Brandner, J.M.; Jensen, J.M. The Skin: An Indispensable Barrier. *Exp. Dermatol.* **2008**, *17*, 1063–1072, doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
12. Elias, P.M.; Choi, E.H. Interactions among Stratum Corneum Defensive Functions. *Experimental Dermatology* **2005**, *14*, 719–726, doi:10.1111/j.1600-0625.2005.00363.x.
13. Marks, R. The Stratum Corneum Barrier: The Final Frontier. *The Journal of Nutrition* **2004**, *134*, 2017S–2021S, doi:10.1093/jn/134.8.2017S.
14. Nemes, Z.; Steinert, P.M. Bricks and Mortar of the Epidermal Barrier. *Exp Mol Med* **1999**, *31*, 5–19, doi:10.1038/emm.1999.2.

15. Baroni, A.; Buommino, E.; De Gregorio, V.; Ruocco, E.; Ruocco, V.; Wolf, R. Structure and Function of the Epidermis Related to Barrier Properties. *Clinics in Dermatology* **2012**, *30*, 257–262, doi:10.1016/j.clinidermatol.2011.08.007.
16. O'Regan, G.M.; Irvine, A.D. The Role of Filaggrin in the Atopic Diathesis. *Clinical & Experimental Allergy* **2010**, *40*, 965–972, doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03522.x.
17. Yang, G.; Seok, J.K.; Kang, H.C.; Cho, Y.-Y.; Lee, H.S.; Lee, J.Y. Skin Barrier Abnormalities and Immune Dysfunction in Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 2867, doi:10.3390/ijms21082867.
18. Bragulla, H.H.; Homberger, D.G. Structure and Functions of Keratin Proteins in Simple, Stratified, Keratinized and Cornified Epithelia. *Journal of Anatomy* **2009**, *214*, 516–559, doi:10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x.
19. Choe, C.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Keratin-Water-NMF Interaction as a Three Layer Model in the Human Stratum Corneum Using in Vivo Confocal Raman Microscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15900, doi:10.1038/s41598-017-16202-x.
20. Weerheim, A.; Ponc, M. Determination of Stratum Corneum Lipid Profile by Tape Stripping in Combination with High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Arch. Dermatol. Res.* **2001**, *293*, 191–199, doi:10.1007/s004030100212.
21. Harding, C.R. The Stratum Corneum: Structure and Function in Health and Disease. *Dermatologic Therapy* **2004**, *17*, 6–15, doi:10.1111/j.1396-0296.2004.04S1001.x.
22. Choe, C.; Lademann, J.; Darvin, M.E. A Depth-Dependent Profile of the Lipid Conformation and Lateral Packing Order of the Stratum Corneum in Vivo Measured Using Raman Microscopy. *Analyst* **2016**, *141*, 1981–1987, doi:10.1039/c5an02373d.
23. Doucet, J.; Potter, A.; Baltenneck, C.; Domanov, Y.A. Micron-Scale Assessment of Molecular Lipid Organization in Human Stratum Corneum Using Microprobe X-Ray Diffraction. *J Lipid Res* **2014**, *55*, 2380–2388, doi:10.1194/jlr.M053389.
24. van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G.S.; Bouwstra, J.A. The Important Role of Stratum Corneum Lipids for the Cutaneous Barrier Function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841*, 295–313, doi:10.1016/j.bbalip.2013.11.006.
25. Verdier-Sevrain, S.; Bonte, F. Skin Hydration: A Review on Its Molecular Mechanisms. *J. Cosmet. Dermatol.* **2007**, *6*, 75–82, doi:10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x.
26. Levin, J.; Friedlander, S.F.; Del Rosso, J.Q. Atopic Dermatitis and the Stratum Corneum: Part 1: The Role of Filaggrin in the Stratum Corneum Barrier and Atopic Skin. *J Clin Aesthet Dermatol* **2013**, *6*, 16–22.
27. Miajlovic, H.; Fallon, P.G.; Irvine, A.D.; Foster, T.J. Effect of Filaggrin Breakdown Products on Growth of and Protein Expression by *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2010**, *126*, 1184-1190.e3, doi:10.1016/j.jaci.2010.09.015.
28. van den Bogaard, E.H.; Elias, P.M.; Goleva, E.; Berdyshev, E.; Smits, J.P.H.; Danby, S.G.; Cork, M.J.; Leung, D.Y.M. Targeting Skin Barrier Function in Atopic Dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* **2023**, *11*, 1335–1346, doi:10.1016/j.jaip.2023.02.005.
29. Sun, Q. Local Statistical Interpretation for Water Structure. *Chem Phys Lett* **2013**, *568*, 90–94, doi:10.1016/j.cplett.2013.03.065.
30. Choe, C.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Depth Profiles of Hydrogen Bound Water Molecule Types and Their Relation to Lipid and Protein Interaction in the Human

- Stratum Corneum in Vivo. *Analyst* **2016**, *141*, 6329–6337, doi:10.1039/c6an01717g.
31. Caussin, J.; Groenink, H.W.; de Graaff, A.M.; Gooris, G.S.; Wiechers, J.W.; van Aelst, A.C.; Bouwstra, J.A. Lipophilic and Hydrophilic Moisturizers Show Different Actions on Human Skin as Revealed by Cryo Scanning Electron Microscopy. *Exp. Dermatol.* **2007**, *16*, 891–898, doi:10.1111/j.1600-0625.2007.00596.x.
 32. Damien, F.; Boncheva, M. The Extent of Orthorhombic Lipid Phases in the Stratum Corneum Determines the Barrier Efficiency of Human Skin in Vivo. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130*, 611–614, doi:10.1038/jid.2009.272.
 33. Nettis, E.; Ortoncelli, M.; Pellacani, G.; Foti, C.; Di Leo, E.; Patrino, C.; Rongioletti, F.; Argenziano, G.; Ferrucci, S.M.; Macchia, L.; Napolitano, M.; Ribero, S.; Bonzano, L.; Romita, P.; Di Bona, D.; Bennardo, L.; Piras, V.; Calabrese, G.; Tavecchio, S.; Detoraki, C.; Carbonara, M.; Fabbrocini, G. A Multicenter Study on the Prevalence of Clinical Patterns and Clinical Phenotypes in Adult Atopic Dermatitis. *J. invest. allergol. clin. immunol* **2020**, 448–450.
 34. Silvestre Salvador, J.; Romero-Pérez, D.; Encabo-Durán, B. Atopic Dermatitis in Adults: A Diagnostic Challenge. *J Investig Allergol Clin Immunol* **2017**, *27*, 78–88, doi:10.18176/jiaci.0138.
 35. Heratizadeh, A.; Haufe, E.; Stölzl, D.; Abraham, S.; Heinrich, L.; Kleinheinz, A.; Wollenberg, A.; Weisshaar, E.; Augustin, M.; Wiemers, F.; Zink, A.; von Kiedrowski, R.; Hilgers, M.; Worm, M.; Pawlak, M.; Sticherling, M.; Fell, I.; Handrick, C.; Schäkel, K.; Staubach-Renz, P.; Asmussen, A.; Schwarz, B.; Bell, M.; Effendy, I.; Bieber, T.; Homey, B.; Gerlach, B.; Tchitcherina, E.; Stahl, M.; Schwichtenberg, U.; Rossbacher, J.; Buck, P.; Mempel, M.; Beissert, S.; Biedermann, T.; Weidinger, S.; Schmitt, J.; Werfel, T. Baseline Characteristics, Disease Severity and Treatment History of Patients with Atopic Dermatitis Included in the German AD Registry TREATgermany. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2020**, *34*, 1263–1272, doi:10.1111/jdv.16078.
 36. Cork, M.J.; Danby, S.G.; Vasilopoulos, Y.; Hadgraft, J.; Lane, M.E.; Moustafa, M.; Guy, R.H.; MacGowan, A.L.; Tazi-Ahnini, R.; Ward, S.J. Epidermal Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* **2009**, *129*, 1892–1908, doi:10.1038/jid.2009.133.
 37. Sroka-Tomaszewska, J.; Trzeciak, M. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 4130, doi:10.3390/ijms22084130.
 38. Bin, L.; Leung, D.Y.M. Genetic and Epigenetic Studies of Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma Clin Immunol* **2016**, *12*, 52, doi:10.1186/s13223-016-0158-5.
 39. Levin, J.; Friedlander, S.F.; Del Rosso, J.Q. Atopic Dermatitis and the Stratum Corneum: Part 2: Other Structural and Functional Characteristics of the Stratum Corneum Barrier in Atopic Skin. *J Clin Aesthet Dermatol* **2013**, *6*, 49–54.
 40. Sabat, R.; Wolk, K.; Loyal, L.; Döcke, W.-D.; Ghoreschi, K. T Cell Pathology in Skin Inflammation. *Semin Immunopathol* **2019**, *41*, 359–377, doi:10.1007/s00281-019-00742-7.
 41. Worm, M.; Glatzel, V.; Baumgart, S.; Mei, H.E.; Sörensen, T.; Grützkau, A.; Heine, G. Immune Cell Profiling Reveals Natural Killer and T Cell Subpopulations to Be Associated with Atopic Dermatitis Severity. *Clin Exp Allergy* **2023**, *53*, 105–108, doi:10.1111/cea.14228.

42. Schmuth, M.; Blunder, S.; Dubrac, S.; Gruber, R.; Moosbrugger-Martinz, V. Epidermal Barrier in Hereditary Ichthyoses, Atopic Dermatitis, and Psoriasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* **2015**, *13*, 1119–1123, doi:10.1111/ddg.12827.
43. Levin, J.; Fallon Friedlander, S.; Del Rosso, J.Q. Atopic Dermatitis and the Stratum Corneum: Part 3: The Immune System in Atopic Dermatitis. *J Clin Aesthet Dermatol* **2013**, *6*, 37–44.
44. Elias, P.M.; Hatano, Y.; Williams, M.L. Basis for the Barrier Abnormality in Atopic Dermatitis: Outside-inside-Outside Pathogenic Mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2008**, *121*, 1337–1343, doi:10.1016/j.jaci.2008.01.022.
45. Elias, P.M.; Schmuth, M. Abnormal Skin Barrier in the Etiopathogenesis of Atopic Dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep* **2009**, *9*, 265–272, doi:10.1007/s11882-009-0037-y.
46. Hata, M.; Tokura, Y.; Takigawa, M.; Sato, M.; Shioya, Y.; Fujikura, Y.; Imokawa, G. Assessment of Epidermal Barrier Function by Photoacoustic Spectrometry in Relation to Its Importance in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Lab Invest* **2002**, *82*, 1451–1461, doi:10.1097/01.LAB.0000036874.83540.2B.
47. Voegeli, R.; Rawlings, A.V.; Breternitz, M.; Doppler, S.; Schreier, T.; Fluhr, J.W. Increased Stratum Corneum Serine Protease Activity in Acute Eczematous Atopic Skin. *British Journal of Dermatology* **2009**, *161*, 70–77, doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09142.x.
48. van Smeden, J.; Janssens, M.; Kaye, E.C.J.; Caspers, P.J.; Lavrijsen, A.P.; Vreeken, R.J.; Bouwstra, J.A. The Importance of Free Fatty Acid Chain Length for the Skin Barrier Function in Atopic Eczema Patients. *Experimental Dermatology* **2014**, *23*, 45–52, doi:10.1111/exd.12293.
49. Montero-Vilchez, T.; Segura-Fernández-Nogueras, M.-V.; Pérez-Rodríguez, I.; Soler-Gongora, M.; Martínez-Lopez, A.; Fernández-González, A.; Molina-Leyva, A.; Arias-Santiago, S. Skin Barrier Function in Psoriasis and Atopic Dermatitis: Transepidermal Water Loss and Temperature as Useful Tools to Assess Disease Severity. *Journal of Clinical Medicine* **2021**, *10*, 359, doi:10.3390/jcm10020359.
50. Knor, T.; Meholjić-Fetahović, A.; Mehmedagić, A. Stratum Corneum Hydration and Skin Surface pH in Patients with Atopic Dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat* **2011**, *19*, 242–247.
51. Matsuki, H.; Kiyokane, K.; Matsuki, T.; Sato, S.; Imokawa, G. Recharacterization of the Nonlesional Dry Skin in Atopic Dermatitis through Disrupted Barrier Function. *EXD* **2004**, *3*, 282–292, doi:10.1159/000091909.
52. Eberlein-König, B.; Schäfer, T.; Huss-Marp, J.; Darsow, U.; Möhrenschrager, M.; Herbert, O.; Abeck, D.; Krämer, U.; Behrendt, H.; Ring, J. Skin Surface pH, Stratum Corneum Hydration, Trans-Epidermal Water Loss and Skin Roughness Related to Atopic Eczema and Skin Dryness in a Population of Primary School Children. *Acta Derm Venereol* **2000**, *80*, 188–191.
53. Kezic, S.; Kemperman, P.M.J.H.; Koster, E.S.; de Jongh, C.M.; Thio, H.B.; Campbell, L.E.; Irvine, A.D.; McLean, W.H.I.; Puppels, G.J.; Caspers, P.J. Loss-of-Function Mutations in the Filaggrin Gene Lead to Reduced Level of Natural Moisturizing Factor in the Stratum Corneum. *J Invest Dermatol* **2008**, *128*, 2117–2119, doi:10.1038/jid.2008.29.
54. Palmer, C.N.A.; Irvine, A.D.; Terron-Kwiatkowski, A.; Zhao, Y.; Liao, H.; Lee, S.P.; Goudie, D.R.; Sandilands, A.; Campbell, L.E.; Smith, F.J.D.; O'Regan, G.M.; Watson, R.M.; Cecil, J.E.; Bale, S.J.; Compton, J.G.; DiGiovanna, J.J.; Fleckman, P.; Lewis-Jones, S.; Arseculeratne, G.; Sergeant, A.; Munro, C.S.; El Houate, B.;

- McElreavey, K.; Halkjaer, L.B.; Bisgaard, H.; Mukhopadhyay, S.; McLean, W.H. Common Loss-of-Function Variants of the Epidermal Barrier Protein Filaggrin Are a Major Predisposing Factor for Atopic Dermatitis. *Nat Genet* **2006**, *38*, 441–446, doi:10.1038/ng1767.
55. Irvine, A.D. Fleshing Out Filaggrin Phenotypes. *Journal of Investigative Dermatology* **2007**, *127*, 504–507, doi:10.1038/sj.jid.5700695.
56. De Benedetto, A.; Rafaels, N.M.; McGirt, L.Y.; Ivanov, A.I.; Georas, S.N.; Cheadle, C.; Berger, A.E.; Zhang, K.; Vidyasagar, S.; Yoshida, T.; Boguniewicz, M.; Hata, T.; Schneider, L.C.; Hanifin, J.M.; Gallo, R.L.; Novak, N.; Weidinger, S.; Beaty, T.H.; Leung, D.Y.; Barnes, K.C.; Beck, L.A. Tight Junction Defects in Patients with Atopic Dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2011**, *127*, 773–786.e7, doi:10.1016/j.jaci.2010.10.018.
57. Paller, A.S.; Kong, H.H.; Seed, P.; Naik, S.; Scharschmidt, T.C.; Gallo, R.L.; Luger, T.; Irvine, A.D. The Microbiome in Patients with Atopic Dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2019**, *143*, 26–35, doi:10.1016/j.jaci.2018.11.015.
58. Simpson, E.L.; Villarreal, M.; Jepson, B.; Rafaels, N.; David, G.; Hanifin, J.; Taylor, P.; Boguniewicz, M.; Yoshida, T.; De Benedetto, A.; Barnes, K.C.; Leung, D.Y.M.; Beck, L.A. Patients with Atopic Dermatitis Colonized with *Staphylococcus Aureus* Have a Distinct Phenotype and Endotype. *Journal of Investigative Dermatology* **2018**, *138*, 2224–2233, doi:10.1016/j.jid.2018.03.1517.
59. Choi, M.J.; Maibach, H.I. Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin. *Am J Clin Dermatol* **2005**, *6*, 215–223, doi:10.2165/00128071-200506040-00002.
60. Fluhr, J.W.; Zuberbier, T.; Darlenski, R. Noninvasive Measures in Atopic Dermatitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **2018**, *18*, 417, doi:10.1097/ACI.0000000000000476.
61. O'Regan, G.M.; Kemperman, P.M.; Sandilands, A.; Chen, H.; Campbell, L.E.; Kroboth, K.; Watson, R.; Rowland, M.; Puppels, G.J.; McLean, W.H.; Caspers, P.J.; Irvine, A.D. Raman Profiles of the Stratum Corneum Define 3 Filaggrin Genotype-Determined Atopic Dermatitis Endophenotypes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *126*, 574–80 e1, doi:10.1016/j.jaci.2010.04.038.
62. González, F.J.; Alda, J.; Moreno-Cruz, B.; Martínez-Escanamé, M.; Ramírez-Elías, M.G.; Torres-Álvarez, B.; Moncada, B. Use of Raman Spectroscopy for the Early Detection of Filaggrin-Related Atopic Dermatitis. *Skin Research and Technology* **2011**, *17*, 45–50, doi:10.1111/j.1600-0846.2010.00461.x.
63. Mlitz, V.; Latreille, J.; Gardinier, S.; Jdid, R.; Drouault, Y.; Hufnagl, P.; Eckhart, L.; Guinot, C.; Tschachler, E. Impact of Filaggrin Mutations on Raman Spectra and Biophysical Properties of the Stratum Corneum in Mild to Moderate Atopic Dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2012**, *26*, 983–990, doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04198.x.
64. Richters, R.J.; Falcone, D.; Uzunbajakava, N.E.; Varghese, B.; Caspers, P.J.; Puppels, G.J.; van Erp, P.E.; van de Kerkhof, P.C. Sensitive Skin: Assessment of the Skin Barrier Using Confocal Raman Microspectroscopy. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2017**, *30*, 1–12, doi:10.1159/000452152.
65. Dev, K.; Ho, C.J.H.; Bi, R.; Yew, Y.W.; S, D.U.; Attia, A.B.E.; Moothanchery, M.; Guan, S.T.T.; Olivo, M. Machine Learning Assisted Handheld Confocal Raman Micro-Spectroscopy for Identification of Clinically Relevant Atopic Eczema Biomarkers. *Sensors* **2022**, *22*, 4674, doi:10.3390/s22134674.
66. Janssens, M.; van Smeden, J.; Puppels, G.J.; Lavrijsen, A.P.; Caspers, P.J.; Bouwstra, J.A. Lipid to Protein Ratio Plays an Important Role in the Skin Barrier

- Function in Patients with Atopic Eczema. *Br. J. Dermatol.* **2014**, *170*, 1248–1255, doi:10.1111/bjd.12908.
67. Verzeaux, L.; Vyumvuhore, R.; Boudier, D.; Le Guillou, M.; Bordes, S.; Essendoubi, M.; Manfait, M.; Closs, B. Atopic Skin: In Vivo Raman Identification of Global Molecular Signature, a Comparative Study with Healthy Skin. *Exp. Dermatol.* **2018**, *27*, 403–408, doi:10.1111/exd.13388.
 68. Schön, M.P.; Boehncke, W.-H. Psoriasis. *New England Journal of Medicine* **2005**, *352*, 1899–1912, doi:10.1056/NEJMra041320.
 69. Ghoreschi, K.; Balato, A.; Enerbäck, C.; Sabat, R. Therapeutics Targeting the IL-23 and IL-17 Pathway in Psoriasis. *The Lancet* **2021**, *397*, 754–766, doi:10.1016/S0140-6736(21)00184-7.
 70. Grän, F.; Kerstan, A.; Serfling, E.; Goebeler, M.; Muhammad, K. Current Developments in the Immunology of Psoriasis. *Yale J Biol Med* **2020**, *93*, 97–110.
 71. Yamanaka, K.; Yamamoto, O.; Honda, T. Pathophysiology of Psoriasis: A Review. *The Journal of Dermatology* **2021**, *48*, 722–731, doi:10.1111/1346-8138.15913.
 72. Zeng, C.; Tsoi, L.C.; Gudjonsson, J.E. Dysregulated Epigenetic Modifications in Psoriasis. *Experimental Dermatology* **2021**, *30*, 1156–1166, doi:10.1111/exd.14332.
 73. Tao, R.; Li, R.; Wan, Z.; Wu, Y.; Wang, R. Skin Microbiome Signatures Associated with Psoriasis and Seborrheic Dermatitis. *Exp Dermatol* **2022**, *31*, 1116–1118, doi:10.1111/exd.14618.
 74. Berth-Jones, J. Psoriasis. *Medicine* **2013**, *41*, 334–340, doi:10.1016/j.mpmed.2013.04.011.
 75. Kokolakis, G.; Giannikaki, E.; Stathopoulos, E.; Avramidis, G.; Tosca, A.D.; Krüger-Krasagakis, S. Infliximab Restores the Balance between Pro- and Anti-Apoptotic Proteins in Regressing Psoriatic Lesions: Infliximab Restores Apoptotic Protein Balance in Psoriatic Keratinocytes. *British Journal of Dermatology* **2012**, *166*, 491–497, doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10689.x.
 76. Armstrong, A.W.; Read, C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA* **2020**, *323*, 1945–1960, doi:10.1001/jama.2020.4006.
 77. Bergboer, J.G.M.; Zeeuwen, P.L.J.M.; Schalkwijk, J. Genetics of Psoriasis: Evidence for Epistatic Interaction between Skin Barrier Abnormalities and Immune Deviation. *Journal of Investigative Dermatology* **2012**, *132*, 2320–2331, doi:10.1038/jid.2012.167.
 78. Wolf, R.; Orion, E.; Ruocco, E.; Ruocco, V. Abnormal Epidermal Barrier in the Pathogenesis of Psoriasis. *Clinics in Dermatology* **2012**, *30*, 323–328, doi:10.1016/j.clin-dermatol.2011.08.022.
 79. Orsmond, A.; Bereza-Malcolm, L.; Lynch, T.; March, L.; Xue, M. Skin Barrier Dysregulation in Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 10841, doi:10.3390/ijms221910841.
 80. Lademann, J.; Mansouri, P.; Nahavandi, A.; Ahlers, A.; Zibakalam-Mofrad, F.; Brower, B.; Nahavandi, M.; Feddern, F.; Darwin, M.E.; Schanzer, S.; Richter, H.; Meinke, M.C.; Rezaii, S.A.; Rohaninasab, M.; Farshi, S.; Iacobelli, M.; Jung, S. In Vivo Skin Penetration, Radical Protection, and Structural Changes after Topical Application of a Herbal Oil Cream Compared to Topical Calcipotriol in Mild to Moderate Psoriasis. *Skin Pharmacol Physiol* **2021**, *34*, 337–350, doi:10.1159/000518970.
 81. Motta, S.; Sesana, S.; Monti, M.; Giuliani, A.; Caputo, R. Interlamellar Lipid Differences between Normal and Psoriatic Stratum Corneum. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **1994**, *186*, 131–132.

82. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R. Ceramide Composition of the Psoriatic Scale. *Biochim Biophys Acta* **1993**, *1182*, 147–151, doi:Doi 10.1016/0925-4439(93)90135-N.
83. Kim, B.-K.; Shon, J.C.; Seo, H.S.; Liu, K.-H.; Lee, J.W.; Ahn, S.K.; Hong, S.P. Decrease of Ceramides with Long-Chain Fatty Acids in Psoriasis: Possible Inhibitory Effect of Interferon Gamma on Chain Elongation. *Experimental Dermatology* **2022**, *31*, 122–132, doi:10.1111/exd.14431.
84. Takahashi, H.; Tsuji, H.; Minami-Hori, M.; Miyauchi, Y.; Iizuka, H. Defective Barrier Function Accompanied by Structural Changes of Psoriatic Stratum Corneum. *The Journal of Dermatology* **2014**, *41*, 144–148, doi:10.1111/1346-8138.12393.
85. Ghadially, R.; Reed, J.T.; Elias, P.M. Stratum Corneum Structure and Function Correlates with Phenotype in Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* **1996**, *107*, 558–564, doi:10.1111/1523-1747.ep12582813.
86. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Mellesi, L.; Ghidoni, R.; Caputo, R. Abnormality of Water Barrier Function in Psoriasis: Role of Ceramide Fractions. *Archives of Dermatology* **1994**, *130*, 452–456, doi:10.1001/archderm.1994.01690040056007.
87. Grice, K.; Sattar, H.; Baker, H. The Cutaneous Barrier to Salts and Water in Psoriasis and in Normal Skin. *British Journal of Dermatology* **1973**, *88*, 459–463, doi:10.1111/j.1365-2133.1973.tb15450.x.
88. Wang, H.; Zhang, Q.; Mao, G.; Conroy, O.; Pyatski, Y.; Fevola, M.J.; Cula, G.O.; Maitra, P.; Mendelsohn, R.; Flach, C.R. Novel Confocal Raman Microscopy Method to Investigate Hydration Mechanisms in Human Skin. *Skin Research and Technology* **2019**, *25*, 653–661, doi:10.1111/srt.12698.
89. Espinosa-Rueda, M.I.; Montero-Vilchez, T.; Martinez-Lopez, A.; Molina-Leyva, A.; Sierra-Sánchez, A.; Arias-Santiago, S.; Buendia-Eisman, A. Cutaneous Homeostasis and Epidermal Barrier Function in a Young Healthy Caucasian Population. *Eur J Dermatol* **2021**, *31*, 176–182, doi:10.1684/ejd.2021.4021.
90. Serup, J.; Blichmann, C. Epidermal Hydration of Psoriasis Plaques and the Relation to Scaling. Measurement of Electrical Conductance and Transepidermal Water Loss. *Acta Derm Venereol* **1987**, *67*, 357–359.
91. Farwanah, H.; Raith, K.; Neubert, R.H.H.; Wohlrab, J. Ceramide Profiles of the Uninvolved Skin in Atopic Dermatitis and Psoriasis Are Comparable to Those of Healthy Skin. *Arch Dermatol Res* **2005**, *296*, 514–521, doi:10.1007/s00403-005-0551-2.
92. Berardesca, E.; Fideli, D.; Borroni, G.; Rabbiosi, G.; Maibach, H. In Vivo Hydration and Water-Retention Capacity of Stratum Corneum in Clinically Uninvolved Skin in Atopic and Psoriatic Patients. *Acta Derm. Venereol.* **1990**, *70*, 400–404.
93. Nosbaum, A.; Dahel, K.; Goujon, C.; Nicolas, J.-F.; Mengeaud, V.; Vocanson, M. Psoriasis Is a Disease of the Entire Skin: Non-Lesional Skin Displays a Prepsoriasis Phenotype. *Eur J Dermatol* **2021**, *31*, 143–154, doi:10.1684/ejd.2021.4015.
94. Pershing, L.K.; Bakhtian, S.; Wright, E.D.; Rallis, T.M. Differentiation of Involved and Uninvolved Psoriatic Skin from Healthy Skin Using Noninvasive Visual, Colorimeter and Evaporimeter Methods. *Skin Research and Technology* **1995**, *1*, 140–144, doi:10.1111/j.1600-0846.1995.tb00034.x.
95. Jean, J.; Leroy, M.; Duque-Fernandez, A.; Bernard, G.; Soucy, J.; Pouliot, R. Characterization of a Psoriatic Skin Model Produced with Involved or Uninvolved Cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2015**, *9*, 789–798, doi:10.1002/term.1666.
96. Kim, S.D.; Huh, C.H.; Seo, K.I.; Suh, D.H.; Youn, J.I. Evaluation of Skin Surface Hydration in Korean Psoriasis Patients: A Possible Factor Influencing Psoriasis.

- Clinical and Experimental Dermatology* **2002**, *27*, 147–152, doi:10.1046/j.1365-2230.2002.00975.x.
97. He, H.; Bissonnette, R.; Wu, J.; Diaz, A.; Saint-Cyr Proulx, E.; Maari, C.; Jack, C.; Louis, M.; Estrada, Y.; Krueger, J.G.; Zhang, N.; Pavel, A.B.; Guttman-Yassky, E. Tape Strips Detect Distinct Immune and Barrier Profiles in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2021**, *147*, 199–212, doi:10.1016/j.jaci.2020.05.048.
 98. König, K.; Breunig, H.G.; Batista, A.; Schindele, A.; Zieger, M.; Kaatz, M. Translation of Two-Photon Microscopy to the Clinic: Multimodal Multiphoton CARS Tomography of in Vivo Human Skin. *JBO* **2020**, *25*, 014515, doi:10.1117/1.JBO.25.1.014515.
 99. Welzel, J.; Bruhns, M.; Wolff, H.H. Optical Coherence Tomography in Contact Dermatitis and Psoriasis. *Arch Dermatol Res* **2003**, *295*, 50–55, doi:10.1007/s00403-003-0390-y.
 100. Yang, C.-C.; Yen, Y.-Y.; Hsu, C.-K.; Cheng, N.-Y.; Tzeng, S.-Y.; Chou, S.-J.; Chang, J.-M.; Tseng, S.-H. Investigation of Water Bonding Status of Normal and Psoriatic Skin in Vivo Using Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Sci Rep* **2021**, *11*, 8901, doi:10.1038/s41598-021-88530-y.
 101. Lademann, J.; Patzelt, A.; Darvin, M.; Richter, H.; Antoniou, C.; Sterry, W.; Koch, S. Application of Optical Non-Invasive Methods in Skin Physiology. *Laser Phys Lett* **2008**, *5*, 335–346, doi:10.1002/lapl.200710138.
 102. Leroy, M.; Lefevre, T.; Pouliot, R.; Auger, M.; Laroche, G. Using Infrared and Raman Microspectroscopies to Compare Ex Vivo Involved Psoriatic Skin with Normal Human Skin. *J. Biomed. Opt.* **2015**, *20*, 067004, doi:10.1117/1.JBO.20.6.067004.
 103. Bernard, G.; Auger, M.; Soucy, J.; Pouliot, R. Physical Characterization of the Stratum Corneum of an in Vitro Psoriatic Skin Model by ATR-FTIR and Raman Spectroscopies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2007**, *1770*, 1317–1323, doi:10.1016/j.bbagen.2007.06.014.
 104. Osada, M.; Gniadecka, M.; Wulf, H.C. Near-Infrared Fourier Transform Raman Spectroscopic Analysis of Proteins, Water and Lipids in Intact Normal Stratum Corneum and Psoriasis Scales. *Exp. Dermatol.* **2004**, *13*, 391–395, doi:10.1111/j.0906-6705.2004.00169.x.
 105. Schleusener, J.; Guo, S.X.; Darvin, M.E.; Thiede, G.; Chernavskaia, O.; Knorr, F.; Lademann, J.; Popp, J.; Bocklitz, T.W. Fiber-Based SORS-SERDS System and Chemometrics for the Diagnostics and Therapy Monitoring of Psoriasis Inflammatory Disease in Vivo. *Biomed Opt Express* **2021**, *12*, 1123–1135, doi:10.1364/Boe.413922.
 106. Dinish, U.S.; Yew, Y.W.; Vinod Ram, K.; Bi, R.; Attia, A.B.E.; Teo Xinhui, V.; Rajarahn, P.; Oon, H.H.; Thng, S.T.G.; Olivo, M. Non-Invasive Biochemical Analysis and Comparison of Atopic Dermatitis and Psoriasis Skin Using Handheld Confocal Raman Spectroscopy. *Journal of Biophotonics* **2023**, *16*, e202300191, doi:10.1002/jbio.202300191.
 107. Fitzpatrick, T.B. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I through VI. *Arch. Dermatol.* **1988**, *124*, 869–871, doi:10.1001/archderm.124.6.869.
 108. Caspers, P.J.; Lucassen, G.W.; Carter, E.A.; Bruining, H.A.; Puppels, G.J. In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles. *J Invest Dermatol* **2001**, *116*, 434–442, doi:DOI 10.1046/j.1523-1747.2001.01258.x.

109. Darvin, M.E.; Meinke, M.C.; Sterry, W.; Lademann, J. Optical Methods for Noninvasive Determination of Carotenoids in Human and Animal Skin. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, 61230, doi:10.1117/1.JBO.18.6.061230.
110. Choe, C.; Choe, S.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Modified Normalization Method in in Vivo Stratum Corneum Analysis Using Confocal Raman Microscopy to Compensate Nonhomogeneous Distribution of Keratin. *J Raman Spectrosc* **2019**, *50*, 945–957, doi:10.1002/jrs.5596.
111. Fredriksson, T.; Pettersson, U. Severe Psoriasis – Oral Therapy with a New Retinoid. *DRM* **1978**, *157*, 238–244, doi:10.1159/000250839.
112. Oji, V.; Luger, T.A. The Skin in Psoriasis: Assessment and Challenges. *Clin Exp Rheumatol* **2015**, *33*, S14-19.
113. Hanifin, J.M.; Thurston, M.; Omoto, M.; Cherill, R.; Tofte, S.J.; Graeber, M.; Evaluator Group, T.E. The Eczema Area and Severity Index (EASI): Assessment of Reliability in Atopic Dermatitis. *Experimental Dermatology* **2001**, *10*, 11–18, doi:10.1034/j.1600-0625.2001.100102.x.
114. Crowther, J.M.; Sieg, A.; Blenkiron, P.; Marcott, C.; Matts, P.J.; Kaczvinsky, J.R.; Rawlings, A.V. Measuring the Effects of Topical Moisturizers on Changes in Stratum Corneum Thickness, Water Gradients and Hydration in Vivo. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 567–577, doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08703.x.
115. Ri, J.S.; Choe, S.H.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Choe, C.S.; Darvin, M.E. In Vivo Tracking of DNA for Precise Determination of the Stratum Corneum Thickness and Superficial Microbiome Using Confocal Raman Microscopy. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2020**, *33*, 30–37, doi:10.1159/000503262.
116. Zolotas, M.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Meinke, M.C.; Kokolakis, G.; Darvin, M.E. Altered Structure Indicating Reduced Barrier Function of Lesional Compared to Non-Lesional Psoriatic Skin – a Non-Invasive in Vivo Study of the Human Stratum Corneum with Confocal Raman Micro-Spectroscopy. *Experimental Dermatology* **2023**, doi:10.1111/exd.14895.
117. Zolotas, M.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Meinke, M.C.; Kokolakis, G.; Darvin, M.E. Atopic Dermatitis: Molecular Alterations between Lesional and Non-Lesional Skin Determined Noninvasively by In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, 14636, doi:10.3390/ijms241914636.
118. Ri, J.-S.; Choe, C.-S.; Choe, S.-H.; Jong, K.-H.; Hong, S.-N.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Lycopene, but Not Zeaxanthin, Serves as a Skeleton for the Formation of an Orthorhombic Organization of Intercellular Lipids within the Lamellae in the Stratum Corneum: Molecular Dynamics Simulations of the Hydrated Ceramide NS Bilayer Model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2023**, *1865*, 184081, doi:10.1016/j.bbamem.2022.184081.
119. Darvin, M.E.; Lademann, J.; von Hagen, J.; Lohan, S.B.; Kolmar, H.; Meinke, M.C.; Jung, S. Carotenoids in Human Skin In Vivo: Antioxidant and Photo-Protectant Role against External and Internal Stressors. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1451, doi:10.3390/antiox11081451.
120. Choe, C.; Ri, J.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. The Non-Homogeneous Distribution and Aggregation of Carotenoids in the Stratum Corneum Correlates with the Organization of Intercellular Lipids in Vivo. *Exp. Dermatol.* **2019**, *28*, 1237–1243, doi:10.1111/exd.14018.

121. Darvin, M.E.; Choe, C.S.; Schleusener, J.; Lademann, J. Non-Invasive Depth Profiling of the Stratum Corneum in Vivo Using Confocal Raman Microscopy Considering the Non-Homogeneous Distribution of Keratin. *Biomed. Opt. Express* **2019**, *10*, 3092–3103, doi:10.1364/BOE.10.003092.
122. Paquin, R.; Colomban, P. Nanomechanics of Single Keratin Fibres: A Raman Study of the Alpha-Helix \rightarrow beta-Sheet Transition and the Effect of Water. *J Raman Spectrosc* **2007**, *38*, 504–514, doi:10.1002/jrs.1672.
123. Vyumvuhore, R.; Tfayli, A.; Duplan, H.; Delalleau, A.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A. Effects of Atmospheric Relative Humidity on Stratum Corneum Structure at the Molecular Level: Ex Vivo Raman Spectroscopy Analysis. *Analyst* **2013**, *138*, 4103–4111, doi:10.1039/c3an00716b.
124. Akhtar, W.; Edwards, H.G. Fourier-Transform Raman Spectroscopy of Mammalian and Avian Keratotic Biopolymers. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1997**, *53A*, 81–90, doi:10.1016/s1386-1425(97)83011-9.
125. Schleusener, J.; Salazar, A.; von Hagen, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Retaining Skin Barrier Function Properties of the Stratum Corneum with Components of the Natural Moisturizing Factor—A Randomized, Placebo-Controlled Double-Blind In Vivo Study. *Molecules* **2021**, *26*, 1649, doi:10.3390/molecules26061649.
126. Proksch, E.; Fölster-Holst, R.; Jensen, J.-M. Skin Barrier Function, Epidermal Proliferation and Differentiation in Eczema. *Journal of Dermatological Science* **2006**, *43*, 159–169, doi:10.1016/j.jdermsci.2006.06.003.
127. Nakajima, K.; Terao, M.; Takaishi, M.; Kataoka, S.; Goto-Inoue, N.; Setou, M.; Horie, K.; Sakamoto, F.; Ito, M.; Azukizawa, H.; Kitaba, S.; Murota, H.; Itami, S.; Katayama, I.; Takeda, J.; Sano, S. Barrier Abnormality Due to Ceramide Deficiency Leads to Psoriasiform Inflammation in a Mouse Model. *Journal of Investigative Dermatology* **2013**, *133*, 2555–2565, doi:10.1038/jid.2013.199.
128. Cho, Y.; Lew, B.-L.; Seong, K.; Kim, N.-I. An Inverse Relationship Between Ceramide Synthesis and Clinical Severity in Patients with Psoriasis. *J Korean Med Sci* **2004**, *19*, 859–863, doi:10.3346/jkms.2004.19.6.859.
129. Tawada, C.; Kanoh, H.; Nakamura, M.; Mizutani, Y.; Fujisawa, T.; Banno, Y.; Seishima, M. Interferon- γ Decreases Ceramides with Long-Chain Fatty Acids: Possible Involvement in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* **2014**, *134*, 712–718, doi:10.1038/jid.2013.364.
130. Alessandrini, F.; Stachowitz, S.; Ring, J.; Behrendt, H. The Level of Prosaposin Is Decreased in the Skin of Patients with Psoriasis Vulgaris. *Journal of Investigative Dermatology* **2001**, *116*, 394–400, doi:10.1046/j.1523-1747.2001.01283.x.
131. Zhang, L.; Cambron, T.; Niu, Y.; Xu, Z.; Su, N.; Zheng, H.; Wei, K.; Ray, P. MCR Approach Revealing Protein, Water, and Lipid Depth Profile in Atopic Dermatitis Patients' Stratum Corneum via in Vivo Confocal Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 2784–2790, doi:10.1021/acs.analchem.8b04597.
132. Imokawa, G. Cutting Edge of the Pathogenesis of Atopic Dermatitis: Sphingomyelin Deacylase, the Enzyme Involved in Its Ceramide Deficiency, Plays a Pivotal Role. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 1613, doi:10.3390/ijms22041613.
133. Bouwstra, J.A.; Ponc, M. The Skin Barrier in Healthy and Diseased State. *Bba-Biomembranes* **2006**, *1758*, 2080–2095, doi:10.1016/j.bbamem.2006.06.021.
134. Darlenski, R.; Hristakieva, E.; Aydin, U.; Gancheva, D.; Gancheva, T.; Zheleva, A.; Gadjeva, V.; Fluhr, J.W. Epidermal Barrier and Oxidative Stress Parameters Improve during in 311 nm Narrow Band UVB Phototherapy of Plaque Type Psoriasis.

- Journal of Dermatological Science* **2018**, *91*, 28–34, doi:10.1016/j.jderm-sci.2018.03.011.
135. Pullmannová, P.; Pavlíková, L.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Školová, B.; Slepíčka, P.; Maixner, J.; Zbytovská, J.; Vávrová, K. Permeability and Microstructure of Model Stratum Corneum Lipid Membranes Containing Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyl Chains. *Biophysical Chemistry* **2017**, *224*, 20–31, doi:10.1016/j.bpc.2017.03.004.
 136. Li, Q.; Fang, H.; Dang, E.; Wang, G. The Role of Ceramides in Skin Homeostasis and Inflammatory Skin Diseases. *Journal of Dermatological Science* **2020**, *97*, 2–8, doi:10.1016/j.jdermsci.2019.12.002.
 137. Menon, G.K.; Elias, P.M. Ultrastructural Localization of Calcium in Psoriatic and Normal Human Epidermis. *Archives of Dermatology* **1991**, *127*, 57–63, doi:10.1001/archderm.1991.01680010067010.
 138. Danso, M.; Boiten, W.; van Drongelen, V.; Gmelig Meijling, K.; Gooris, G.; El Ghalbzouri, A.; Absalah, S.; Vreeken, R.; Kezic, S.; van Smeden, J.; Lavrijsen, S.; Bouwstra, J. Altered Expression of Epidermal Lipid Bio-Synthesis Enzymes in Atopic Dermatitis Skin Is Accompanied by Changes in Stratum Corneum Lipid Composition. *Journal of Dermatological Science* **2017**, *88*, 57–66, doi:10.1016/j.jderm-sci.2017.05.005.
 139. Sho, Y.; Sakai, T.; Sato, T.; Sonezaki, M.; Taima, H.; Taguchi, H.; Kaizu, K.; Nishizaka, T.; Takagi, Y.; Hatano, Y. Stratum Corneum Ceramide Profiles Provide Reliable Indicators of Remission and Potential Flares in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* **2022**, *142*, 3184–3191.e7, doi:10.1016/j.jid.2022.06.012.
 140. Ho, Q.W.C.; Zheng, X.; Ali, Y. Ceramide Acyl Chain Length and Its Relevance to Intracellular Lipid Regulation. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 9697, doi:10.3390/ijms23179697.
 141. Mojumdar, E.H.; Helder, R.W.J.; Gooris, G.S.; Bouwstra, J.A. Monounsaturated Fatty Acids Reduce the Barrier of Stratum Corneum Lipid Membranes by Enhancing the Formation of a Hexagonal Lateral Packing. *Langmuir* **2014**, *30*, 6534–6543, doi:10.1021/la500972w.
 142. Lademann, J.; Patzelt, A.; Schanzer, S.; Richter, H.; Meinke, M.C.; Sterry, W.; Zastrow, L.; Doucet, O.; Vergou, T.; Darvin, M.E. Uptake of Antioxidants by Natural Nutrition and Supplementation: Pros and Cons from the Dermatological Point of View. *Skin Pharmacol Physiol* **2011**, *24*, 269–273, doi:10.1159/000328725.
 143. Kake, T.; Imai, M.; Takahashi, N. Effects of β -Carotene on Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis in Hairless Mice. *Experimental Dermatology* **2019**, *28*, 1044–1050, doi:10.1111/exd.14003.
 144. Darvin, M.E.; Fluhr, J.W.; Schanzer, S.; Richter, H.; Patzelt, A.; Meinke, M.C.; Zastrow, L.; Golz, K.; Doucet, O.; Sterry, W.; Lademann, J. Dermal Carotenoid Level and Kinetics after Topical and Systemic Administration of Antioxidants: Enrichment Strategies in a Controlled in Vivo Study. *J. Dermatol. Sci.* **2011**, *64*, 53–58, doi:10.1016/j.jdermsci.2011.06.009.
 145. Lima, X. t.; Kimball, A. b. Skin Carotenoid Levels in Adult Patients with Psoriasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2011**, *25*, 945–949, doi:10.1111/j.1468-3083.2010.03888.x.
 146. Darlenski, R.; Deliyska, R.; Al-Sadek, L.T.; Hristakieva, E.; Fluhr, J.W. Epidermal Carotenoid Levels in Vivo of Patients with Plaque Psoriasis: Effects of Narrow-Band UVB Phototherapy. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **2021**, *37*, 111–114, doi:10.1111/phpp.12617.

147. Lopes, G.; Clarinha, D.; Vasconcelos, V. Carotenoids from Cyanobacteria: A Biotechnological Approach for the Topical Treatment of Psoriasis. *Microorganisms* **2020**, *8*, 302, doi:10.3390/microorganisms8020302.
148. Zhang, Y.; Heinemann, N.; Rademacher, F.; Darvin, M.E.; Raab, C.; Keck, C.M.; Vollert, H.; Fluhr, J.W.; Gläser, R.; Harder, J.; Meinke, M.C. Skin Care Product Rich in Antioxidants and Anti-Inflammatory Natural Compounds Reduces Itching and Inflammation in the Skin of Atopic Dermatitis Patients. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1071, doi:10.3390/antiox11061071.
149. Darvin, M.E.; Gersonde, I.; Albrecht, H.; Sterry, W.; Lademann, J. Resonance Raman Spectroscopy for the Detection of Carotenoids in Foodstuffs. Influence of the Nutrition on the Antioxidative Potential of the Skin. *Laser Phys Lett* **2007**, *4*, 452–456, doi:10.1002/lapl.200710004.
150. Bernard, B.A.; Asselineau, Daniel.; Schaffar-Deshayes, Laurence.; Darmon, M.Yves. Abnormal Sequence of Expression of Differentiation Markers in Psoriatic Epidermis: Inversion of Two Steps in the Differentiation Program? *Journal of Investigative Dermatology* **1988**, *90*, 801–805, doi:10.1111/1523-1747.ep12462014.
151. Gassenmeier, T.; Busch, P.; Hensen, H.; Seipel, W. Some Aspects of Refatting the Skin: Effects Oriented to Skin Lipids for Improving Skin Properties. *Cosmet. toilettes* **1998**, *113*, 89–92.
152. Kim, B.E.; Howell, M.D.; Guttman, E.; Gilleaudeau, P.M.; Cardinale, I.R.; Boguniewicz, M.; Krueger, J.G.; Leung, D.Y.M. TNF- α Downregulates Filaggrin and Loricrin through c-Jun N-Terminal Kinase: Role for TNF- α Antagonists to Improve Skin Barrier. *Journal of Investigative Dermatology* **2011**, *131*, 1272–1279, doi:10.1038/jid.2011.24.
153. Akhlaghi, M.; Karrabi, M.; Atabti, H.; Raofi, A.; Mousavi Khaneghah, A. Investigation of the Role of IL18, IL-1 β and NLRP3 Inflammasome in Reducing Expression of FLG-2 Protein in Psoriasis Vulgaris Skin Lesions. *Biotechnic & Histochemistry* **2022**, *97*, 277–283, doi:10.1080/10520295.2021.1954692.
154. Nouwen, A.E.M.; Karadavut, D.; Pasmans, S.G.M.A.; Elbert, N.J.; Bos, L.D.N.; Nijsten, T.E.C.; Arends, N.J.T.; Pijnenburg, M.W.H.; Koljenović, S.; Puppels, G.J.; Caspers, P.J. Natural Moisturizing Factor as a Clinical Marker in Atopic Dermatitis. *Allergy* **2020**, *75*, 188–190, doi:10.1111/all.13942.
155. Zhang, X.; Yin, M.; Zhang, L. Keratin 6, 16 and 17—Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells* **2019**, *8*, 807, doi:10.3390/cells8080807.
156. Ekanayake-Mudiyanselage, S.; Jensen, J.-M.; Proksch, E.; Aschauer, H.; Schmook, F.P.; Meingassner, J.G. Expression of Epidermal Keratins and the Cornified Envelope Protein Involucrin Is Influenced by Permeability Barrier Disruption. *Journal of Investigative Dermatology* **1998**, *111*, 517–523, doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00318.x.
157. Totsuka, A.; Omori-Miyake, M.; Kawashima, M.; Yagi, J.; Tsunemi, Y. Expression of Keratin 1, Keratin 10, Desmoglein 1 and Desmocollin 1 in the Epidermis: Possible Downregulation by Interleukin-4 and Interleukin-13 in Atopic Dermatitis. *Eur J Dermatol* **2017**, *27*, 247–253, doi:10.1684/ejd.2017.2985.
158. Altrichter, S.; Kriehuber, E.; Moser, J.; Valenta, R.; Kopp, T.; Stingl, G. Serum IgE Autoantibodies Target Keratinocytes in Patients with Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* **2008**, *128*, 2232–2239, doi:10.1038/jid.2008.80.
159. Choe, C.; Schleusener, J.; Choe, S.; Ri, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Stratum Corneum Occlusion Induces Water Transformation towards Lower Bonding State: A Molecular Level in Vivo Study by Confocal Raman Microspectroscopy. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2020**, *42*, 482–493, doi:10.1111/ics.12653.

160. Choe, C.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. In Vivo Confocal Raman Microscopic Determination of Depth Profiles of the Stratum Corneum Lipid Organization Influenced by Application of Various Oils. *J. Dermatol. Sci.* **2017**, *87*, 183–191, doi:10.1016/j.jdermsci.2017.04.016.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Michael Zolotas, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „In vivo Analyse molekularer Parameter der Hautbarriere im Stratum corneum bei Psoriasis und atopischer Dermatitis mittels konfokaler Raman-Mikrospektroskopie.“ / „In vivo analysis of molecular parameters of the skin barrier in the stratum corneum of psoriasis and atopic dermatitis using confocal Raman microspectroscopy.“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Michael Zolotas hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Zolotas, M.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Meinke, M.C.; Kokolakis, G.; Darvin, M.E. Altered Structure Indicating Reduced Barrier Function of Lesional Compared to Non-Lesional Psoriatic Skin – a Non-Invasive in Vivo Study of the Human Stratum Corneum with Confocal Raman Micro-Spectroscopy. *Experimental Dermatology*, 2023

Beitrag im Einzelnen:

- Erstellung der Fragestellungen und des Studiendesigns in Zusammenarbeit mit den Ko-Autoren/innen.
- Koordinierung und Durchführung der Studienmessungen: u.a. Patienten-Rekrutierung, Anamnese- und Datenerhebung, CRM-Messungen (nach Einarbeitung durch Dr. Maxim Darvin und Dr. Johannes Schleusener), Verwaltung und Organisation der Rohdaten.
- Analyse und statistische Auswertung der Primärdaten in Zusammenarbeit mit Dr. Maxim Darvin und Dr. Johannes Schleusener.
- Interpretation der Ergebnisse und Erstellung des Manuskripts inkl. aller Tabellen und Abbildungen.
- Implementation von Korrekturen und Feedback aller Ko-Autoren/innen.
- Erstellung der Überarbeitungen der Veröffentlichungen mit Unterstützung aller Ko-Autoren/innen.

Publikation 2: Zolotas, M.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Meinke, M.C.; Kokolakis, G.; Darvin, M.E. Atopic Dermatitis: Molecular Alterations between Lesional and Non-Lesional Skin Determined Noninvasively by In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023

Beitrag im Einzelnen:

- Erstellung der Fragestellungen und des Studiendesigns in Zusammenarbeit mit den Ko-Autoren/innen.
- Koordinierung und Durchführung der Studienmessungen: u.a. Patienten-Rekrutierung, Anamnese- und Datenerhebung, CRM-Messungen (nach Einarbeitung durch Dr. Maxim Darvin und Dr. Johannes Schleusener), Verwaltung und Organisation der Rohdaten.
- Analyse und statistische Auswertung der Primärdaten in Zusammenarbeit mit Dr. Maxim Darvin und Dr. Johannes Schleusener.
- Interpretation der Ergebnisse und Erstellung des Manuskripts inkl. aller Tabellen und Abbildungen.
- Implementation von Korrekturen und Feedback aller Ko-Autoren/innen.
- Erstellung der Überarbeitungen der Veröffentlichungen mit Unterstützung aller Ko-Autoren/innen.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Druckexemplare der Publikationen

Publikation 1:



Received: 21 February 2023 | Revised: 23 May 2023 | Accepted: 16 July 2023

DOI: 10.1111/exd.14895

RESEARCH ARTICLE

Experimental Dermatology | WILEY

Altered structure indicating reduced barrier function of lesional compared to non-lesional psoriatic skin—A non-invasive in vivo study of the human stratum corneum with confocal Raman micro-spectroscopy

Michael Zolotas¹ | Johannes Schleusener¹ | Jürgen Lademann¹ | Martina C. Meinke¹ | Georgios Kokolakis² | Maxim E. Darwin¹

¹Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Department of Dermatology, Venereology and Allergology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany

²Psoriasis Research and Treatment Centre, Department of Dermatology, Venereology and Allergology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany

Correspondence

Johannes Schleusener and Maxim E. Darwin, Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Department of Dermatology, Venereology and Allergology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Charitéplatz 1, Berlin 10117, Germany. Email: johannes.schleusener@charite.de and maxim.darwin@protonmail.com

Abstract

Psoriasis, one of the most common skin diseases affecting roughly 2%–3% of the world population, is associated with a reduced skin barrier function (SBF) that might play an important role in its pathophysiology. The SBF is provided primarily by the stratum corneum (SC) of the skin. Previous studies have revealed a higher trans-epidermal water loss, lower hydration, abnormal concentration and composition of intercellular lipids, as well as alterations in secondary keratin structure in the psoriatic SC. We compared on molecular level lesional psoriatic skin (LPS) with non-lesional psoriatic skin (nLPS) from 19 patients non-invasively in vivo, using confocal Raman micro-spectroscopy. By analysing the corresponding Raman spectra, we determined SBF-defining parameters of the SC depth-dependently. Our results revealed a lower total lipid concentration, a shift of lamellar lipid organisation towards more *gauche*-conformers and an increase of the less dense hexagonal lateral packing of the intercellular lipids in LPS. Furthermore, we observed lower natural moisturising factor concentration, lower total water as well as a strong tendency towards less strongly bound and more weakly bound water molecules in LPS. Finally, we detected a less stable secondary keratin structure with increased β -sheets, in contrast to the tertiary structure, showing a higher degree of folded keratin in LPS. These findings clearly suggest structural differences indicating a reduced SBF in LPS, and are discussed in juxtaposition to preceding outcomes for psoriatic and healthy skin. Understanding the alterations of the psoriatic SC provides insights into the exact pathophysiology of psoriasis and paves the way for optimal future treatments.

Abbreviations: CRM, confocal Raman micro-spectroscopy; DA, single donor, single acceptor; DAA, single donor, double acceptor; DDA, double donor, single acceptor; DDAA, double donor, double acceptor; FFA, free fatty acids; HS, healthy skin, that is, skin of healthy subjects; HWN, high wavenumber region; ICL, intercellular lipids; I_x , intensity at Raman peak position 'x' (in cm^{-2}); LPS, lesional psoriatic skin; nLPS, non-lesional psoriatic skin; NMF, natural moisturising factor(s); PASI, psoriasis area severity index; SBF, skin barrier function; SC, stratum corneum; TEWL, trans-epidermal water loss.

Georgios Kokolakis and Maxim E. Darwin contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Experimental Dermatology* published by John Wiley & Sons Ltd.

KEYWORDS

carotenoids, keratin, lipid organisation, psoriasis, water binding

1 | INTRODUCTION

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease, affecting approximately 2%–3% of the worldwide population of various age and sex.^{1,2} The pathophysiology of the disease involves environmental, genetic and immunologic aspects,^{3,4} with recent research also revealing an altered microbiome⁵ and epigenetic dysregulation.⁶ In the most common clinical manifestation, psoriatic lesions appear as well demarcated erythematous plaques with coarse scales, which are characterised by an abnormal and incomplete proliferation and differentiation of keratinocytes resulting in increased thickness of the epidermis, corresponding to the histological findings of parakeratosis, acanthosis and hyperkeratosis.^{2,7,8}

Psoriasis is associated with a disrupted skin barrier function (SBF), however, it is a matter of debate^{9–11} whether this dysfunction is of primary or secondary pathogenetic nature, with recent evidence suggesting rather a combination of both.¹² Thus, inflammation is one cause of barrier dysfunction, for example, by disrupting the physiological production and maintenance of SBF-related constituents. On the other hand, genetic variations in psoriasis are also known to affect the composition and structure of the epidermis, such as cholesterol and ceramide production, which in turn lead to inflammation, higher susceptibility to environmental influences and potentially induce the psoriatic phenotype.^{11,13} Therefore, to understand the exact pathophysiology of psoriasis, it is instructive to examine the structure and SBF of psoriatic skin on molecular level.

The physiologic SBF is primarily provided by the stratum corneum (SC) and the interactions of its structural components.^{14,15} Among the most important components are the intercellular lipids (ICL), which consist of a nearly equal ratio of free fatty acids (FFA), cholesterol and ceramides¹⁶ and are stacked together in form of bilayers inside lamellae. Depending on the amount of *trans*- and *gauche*-conformers, the lateral organisation of lipids is a combination of orthorhombic (ordered, very densely packed lipids) and hexagonal (ordered, less densely packed lipids) phases, which are inhomogeneous in the SC depth^{17,18} and essential in maintaining the integrity of the SC and SBF.^{10,19} A further important SBF-related component are the corneocytes, bound together by corneodesmosomes and located in a water-lipid extracellular matrix (brick-and-mortar model of the SC).^{9,20} The corneocytes entail stabilising keratin filaments, mostly of the types K1/10,²¹ which can vary between less or more folded conformations, as well as various amino acids with strong hygroscopic ability, forming the natural moisturising factor (NMF). Both the folding of keratin and the NMF concentration are primarily responsible for binding water within the corneocytes in a depth-dependent manner, maintaining the physiological SC hydration.²²

Water diffusion into and out of the epidermis is controlled by the SC.²³ One of the most commonly examined parameters

describing the SBF in vivo is the trans-epidermal water loss (TEWL), which correlates with the orthorhombic organisation of the ICL.²⁴ Nevertheless, TEWL might not be in every case a reliable parameter for the inside-outside barrier, especially in diseased and topically treated skin.⁹ Further relevant parameters are the SC hydration and the different water mobility states. Water is located intra- as well as extracellularly in the SC and forms bonds of different strength (ranging from tightly bound to unbound water)²⁵ with ICL, keratin and NMF, depending on the SC depth²² as well as age and other factors.^{24–28}

Several methods have been used to examine the psoriatic SC, like TEWL, corneometry, 'attenuated total reflectance—Fourier-transform infrared spectroscopy',^{29,30} tape-stripping,³¹ multiphoton CARS tomography,³² optical coherence tomography,³³ diffuse reflectance spectroscopy,³⁴ scanning electron microscopy³⁵ and laser scanning microscopy.^{36,37} Previous studies have revealed a less ordered SC structure regarding lipid organisation in psoriatic lesions,^{10,38,39} which is thought to be partly due to differences in the composition of ceramides.^{38,39} The FFA concentration of lesional psoriatic skin (LPS) has been found to be lower than of non-lesional psoriatic skin (nLPS).²⁹ Furthermore, scanning electron microscopy has shown an abnormal lamellar ICL structure and appearance of lipid droplets in the psoriatic SC.³⁵ The NMF concentration in LPS is known to be lower than in nLPS, with the latter being reported similar to healthy skin (HS).²⁹ Further differences are suggested for the secondary keratin structure, with LPS having a higher ratio of β -sheet/ α -helix compared to nLPS or HS.²⁹ Additionally, LPS shows a higher TEWL in comparison to nLPS,^{29,40} with the extent possibly correlating with the disease severity.⁴¹ Finally, SC hydration, which also correlates with SBF,^{42–44} is reported to be lower in LPS than nLPS.^{29,45} In contrast to LPS, it is still unclear whether nLPS can be thought of as HS regarding its structure and SBF. Some studies indicate so, regarding lipid composition or TEWL and SC hydration,^{29,46,47} but others^{48–50} suggest an intermediate state of nLPS between LPS and HS.

Confocal Raman micro-spectroscopy (CRM) has become an increasingly valuable method for the non-invasive examination of the composition and SBF-related parameters of the SC.^{19,18,51,52} Regarding psoriasis, different versions of CRM and near-infrared spectroscopy have been applied in nLPS,⁵³ LPS areas of deceased psoriasis patients,⁵⁴ psoriatic scales in vitro,⁵⁵ an in vitro psoriatic skin model,⁵⁶ as well as in a pilot in vivo study⁵⁷ focusing on specific SC components. Raman spectroscopy has also been used in order to monitor the therapy progress on psoriatic skin.⁵⁸

So far, to the best of the authors' knowledge, no in vivo studies have examined SBF-related structural parameters of the psoriatic SC depth-dependently on molecular level. Therefore, we have applied CRM and analytical algorithms established before^{17,22,24} to

compare the SC of LPS and nLPS in an explorative analysis with regard to lipid concentration and organisation, carotenoids, NMF, keratin secondary and tertiary structure, water concentration and mobility states as depth-dependent molecular parameters. Examining the fine SC structure in contrast to integrated parameters over the entire SC allows a better understanding of the SBF and its alteration in LPS.

2 | PATIENTS AND METHODS

2.1 | Patients

Nineteen patients (8 female and 11 male) between 19–59 years old (mean age: 37 ± 12 years) of Fitzpatrick skin type I–III,⁵⁰ diagnosed with psoriasis vulgaris, were recruited from the department of Dermatology, Venerology and Allergology of the Charité–Universitätsmedizin Berlin. All patients were required to have at least one psoriatic lesion, chosen with a preferably low desquamation level (Table 1 and Table S1) on the elbows and/or forearms, and instructed not to apply any topical skincare or pharmaceutical products on the examined body parts for at least 24 h prior to the CRM examination. All patients gave their written informed consent for their participation in the study. The study was conducted after approval by the ethics committee of the Charité–Universitätsmedizin Berlin (EA1/228/19) according to the Declaration of Helsinki.

2.2 | Data collection

The measurements were performed under standardised laboratory conditions (room temperature 20–21°C). After an acclimatisation time of at least 15 min, Raman depth profiles were recorded in vivo and non-invasively from the epidermis of the patients in the LPS and nLPS areas of the elbow and/or forearm, which were photographically documented and evaluated by a local PASI (Psoriasis Area and Severity Index) score,⁶⁰ regarding erythema, induration and desquamation of the lesions (Table 1 and Table S1). The lesions were not manipulated in any way before the measurements. It should further be noted that no profile was recorded from the actual tip of the elbow as this would not have been possible due to an inadequate contact between skin and glass surface of the microscope and those

TABLE 1 The median, maximum and minimum values of the psoriasis area severity index (PASI) parameters of each psoriatic lesion used for the measurements and statistical analysis (compare also Tables S1 and S3).

Lesional PASI	Erythema	Induration	Desquamation	Sum
Median	2	1	1	4
Maximum	3	3	2	7
Minimum	1	0	0	2

profiles recorded from the forearm, were recorded from the dorsal forearm in proximity to the elbow.

In order to record the Raman spectra, the skin composition analyser designed for in vivo/ex vivo measurements (RiverD International B.V., Model 3510, Rotterdam, The Netherlands) was utilised with a 785 nm laser (20 mW on skin surface, exposure time 5 s) for the fingerprint region: 400–2000 cm^{-1} ; and a 671 nm laser (17 mW on skin surface, exposure time 1 s) for the high wavenumber region (HWN): 2000–4000 cm^{-1} . The Raman profiles were recorded at 2 μm increments up to a total depth of 40 μm with an axial depth resolution of $\leq 5 \mu\text{m}$ and a spectral resolution of approximately 2 cm^{-1} . The used CRM device has been described in detail before.^{61,62} Exemplary Raman Spectra of LPS and nLPS from the FP and HWN range are shown in Figure S1.

Different profiles recorded from the same lesion were never in the same position. For all fingerprint spectra the corresponding HWN spectra were recorded in the identical position. In total, CRM profiles from 24 lesional and 16 non-lesional sites (Tables S2 and S3) were chosen for statistical evaluation after excluding low quality spectra, that is, in cases of documented movement during measurement or failure to comply with the instructions.

2.3 | Data analysis

The Raman spectra were pre-processed according to the established methods.^{22,63} The skin surface (0% of SC depth) was defined as the point of half maximal intensity of the keratin-related band at 1655 cm^{-1} seen from outside the skin.⁶⁴ The transition from the SC to the stratum granulosum (100% of SC depth) was determined as the point where the first derivative of the water concentration profile curve reaches 0.5, according to Crowther et al.⁶⁵ and as confirmed by the findings of Ri et al.⁶⁶ comparing different analytical procedures. For the correct comparison of the SBF-related parameters, the SC thickness was normalised to 100% and all parameters were interpolated from 0% to 100% at 10% increments. The exact determination of each parameter regarding lipid concentration and structure, water mobility states and concentration, as well as keratin secondary and tertiary structure can be found in the corresponding results section. The NMF profiles were calculated as in the study of Choe et al.,²⁷ in form of a mathematical adaptation of the non-restricted multiple least squares fitting method proposed by Caspers et al.⁶⁷

The data analysis was performed using Skin Tools 2.0 (RiverD International B.V.), Matlab R2019b (The MathWorks Inc.), Origin 2020b (OriginLab Corporation) and Excel 2016 (Microsoft Corporation). For the examination of statistical significance between the mean values of LPS versus nLPS parameters at specific SC depths, *t*-tests were used assuming the normal distribution for the parameters on the basis of the large sample sizes and in accordance with the literature on CRM.^{22,27,68} The significance level was predefined as $p < 0.05$ and denoted with the symbol * in the graphs and a highly significant result was predefined with $p < 0.01$ and symbolised by **.

3 | RESULTS

3.1 | Stratum corneum thickness

The SC thickness could be determined with the method described above in 61 out of 89 Raman spectra profiles of nLPS (>69%) and 23 out of 85 profiles of LPS (>27%), as can also be seen in Table S3. In the remaining profiles, either the skin surface could not be correctly determined, or the water-related gradient of 0.5 was not observed. The mean SC thickness of nLPS was $24 \pm 6 \mu\text{m}$, while LPS had a mean SC thickness of $26 \pm 8 \mu\text{m}$. The difference between the means was not statistically significant ($p=0.21$). Raman profiles with an undetermined SC thickness were excluded from further analysis.

3.2 | Intercellular lipids

The ICL concentration was calculated as the sum of the decomposed lipid-related Raman band intensities at 2880 and 2850cm^{-1} ,

normalised by the keratin-related band intensity at 2930cm^{-1} .^{65,66} The resulting comparison is summarised in Figure 1A, which clearly demonstrates that LPS has a lower mean ICL concentration than nLPS with high significance at 0%–80% SC depth ($p < 0.01$).

Next, the lamellar ICL organisation was examined by the ratio $I_{1060}/(I_{1130} + I_{1060})$, exploiting the fact that the bands at 1130 and 1060cm^{-1} represent the all-*trans* conformation and the band at 1080cm^{-1} the *gauche*-conformation of the ICL.¹⁷ As shown in Figure 1B, the ratio is significantly higher at 10%–40% SC depth for LPS ($p < 0.01$), indicating that ICL of LPS in this SC depth have a higher prevalence of *gauche*-conformers than nLPS, and thus suggesting a less ordered lamellar ICL organisation.

The lateral organisation of the ICL was determined using the I_{2880}/I_{2850} ratio, modified to exclude keratin interference to the Raman bands, as described in.¹⁷ Higher values are associated with a prevalence of the denser orthorhombic lateral organisation and lower values with the less ordered hexagonal lateral organisation of ICL.^{17,68} The results are presented in Figure 1C and show that LPS has a lower ratio over most of the SC thickness (highly significant

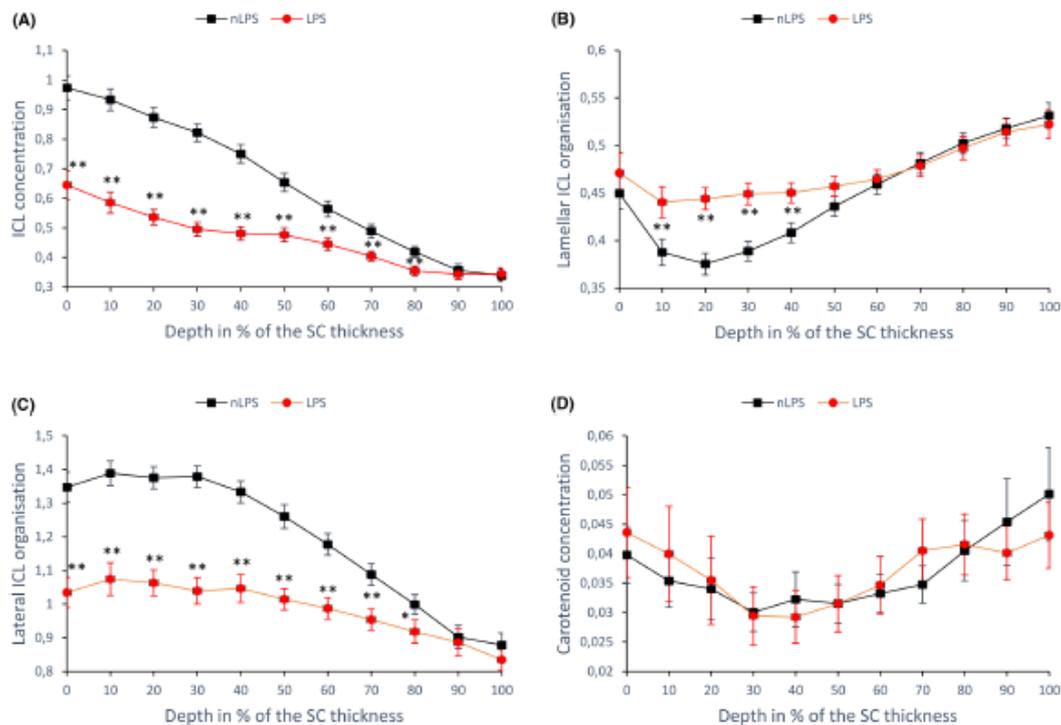


FIGURE 1 Depth profiles of the ICL-related parameters in the SC of LPS and nLPS: (A) The ICL concentration given by the ratio of the intensities at 2880 and 2850cm^{-1} normalised to the keratin-related band intensity at 2930cm^{-1} after spectra decomposition. (B) The lamellar ICL organisation calculated with the ratio of the band intensities at 1130 and 1060 to 1080cm^{-1} . (C) The lateral ICL organisation analysed by the ratio of intensity at 2880 to 2850cm^{-1} , modified to exclude keratin interference. (D) The carotenoid concentration represented by the band intensity at 1524cm^{-1} . [* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; ICL, intercellular lipids; SC, stratum corneum; (n)LPS, (non-) lesional psoriatic skin; the error bars show the standard error of the means].

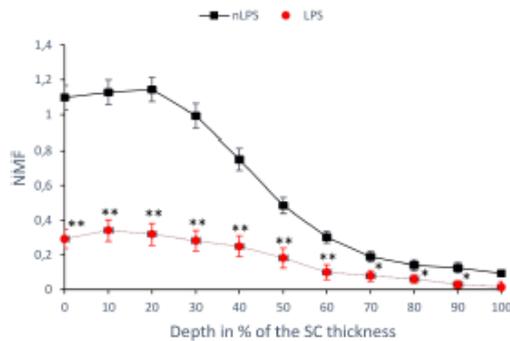


FIGURE 2 Depth profiles of the NMF concentration in the SC of LPS and nLPS. [* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; NMF, natural moisturising factor; SC, stratum corneum; (n)LPS, (non-) lesional psoriatic skin; the error bars show the standard error of the means].

from 0%–70% and significant at 80% SC depth) than nLPS, demonstrating a less dense lateral packing of ICL.

β -carotene and lycopene are highly concentrated carotenoids in the human SC with potent antioxidant and photo-protective properties,⁴⁹ supporting the lateral ICL organisation.⁷⁰ For this reason, the carotenoid concentration was analysed, using the Raman band intensity at 1524 cm^{-1} .⁷¹ LPS and nLPS show no significant differences (Figure 1D) in carotenoid concentration over the entire SC.

3.3 | Natural moisturising factor (NMF)

For the calculation of the NMF concentration, 56 profiles of nLPS and 20 profiles of LPS were used in total, after combining the profiles for which a SC thickness could be determined with the ones for which the NMF concentration was able to be calculated with the Skin Tools 2.0 software. As demonstrated in Figure 2, LPS shows a much lower NMF concentration than nLPS over the entire SC thickness with a highly significant difference at 0%–60% and a significant difference at 70%–90% SC depth.

3.4 | Keratin structure

The secondary structure of keratin is largely determined by the number of α -helices, forming the stable coiled-coil structure, and β -sheets, allowing more exposed side chains.⁷² The β -sheet/ α -helix ratio is described by the I_{850}/I_{830} ratio²² and shown in Figure 3A. It indicates that LPS has a significantly higher ratio than nLPS in the superficial SC depth ($p < 0.05$ for 0% and $p < 0.01$ for 10%–30% SC depth), thus revealing a less stable secondary structure of keratin with higher number of β -sheets.

The tertiary keratin structure depends on the conformation and interaction of its side-chains.²¹ Figure 3B demonstrates the maximum position of the 2930 cm^{-1} band as obtained after

decomposition of the broad band in the HWN region, confirming the non-homogeneous folding state of keratin in the SC.^{22,68} In LPS, the 2930 cm^{-1} band is shifted towards lower wavenumbers than in nLPS (highly significant difference at 0%–80% and significant at 100% SC depth), revealing a higher degree of folded keratin with reduced free side-chains in LPS.

Figure 3C demonstrates the amount of cysteine in keratin filaments which forms disulphide bonds, given by the $I_{490-712}/I_{474-578}$ ratio, as the band at $474-578\text{ cm}^{-1}$ corresponds to the S–S bonds only, and the band at $690-712\text{ cm}^{-1}$ to the C–S groups of the total cysteine.²² The ratio is higher for LPS, indicating a lower amount of cysteine forming disulphide bonds than for nLPS, and signifying a less folded keratin state with respect to cysteine forming disulphide bonds. This is statistically highly significant at 10%–50% and 70% and significant at 60% and 80% SC depth.

Next, the stability of disulphide bonds in keratin was investigated using the ratio of the *gauche-gauche-gauche* to the total conformation of disulphide bonds (*gauche-gauche-gauche* + *gauche-gauche-trans* + *trans-gauche-trans*), calculated by $I_{474-508}/I_{474-578}$.²² As can be seen in Figure 3D, the ratio is lower for LPS than for nLPS over the superficial and intermediate SC depth (with $p < 0.01$ at 30%–60% and $p < 0.05$ at 10%–20% SC depth), concluding that LPS has a lower percentage of the energetically most stable disulphide bonds than nLPS.

Finally, the ratio of buried to exposed aromatic rings of tyrosine in keratin side-chains was determined by the I_{850}/I_{830} ratio.^{22,48} This exploits the finding that buried tyrosine is associated with the 830 cm^{-1} , while exposed tyrosine with the 850 cm^{-1} band.^{73,74} Figure 3E establishes that LPS has a higher amount of buried tyrosine in comparison to nLPS over the superficial and intermediate SC depth ($p < 0.01$ for 20%–70% and $p < 0.05$ for 10% SC depth), which indicates an increased folding of keratin in LPS.

3.5 | Water mobility states

Water molecules can be characterised by the strength of hydrogen bonds they form with their surrounding molecules, determining the different water mobility states as tightly, strongly, weakly, very weakly bound and free water.^{25,26} To explore the water mobility states within the SC, the HWN Raman spectra were decomposed with 10 Gaussian functions after subtracting the fluorescence background.²⁶ To obtain the SC depth profiles, the intensities of the water-related sub-bands were calculated after decomposition and normalised by the total water concentration. The depth profile of the tightly bound water (forming single-donor-double-acceptor-bonds: DAA) in the SC is calculated at $\approx 3015\text{ cm}^{-1}$ (centre position)^{26,75} and shown in Figure 4A. LPS has a higher amount of tightly bound water than nLPS over the entire SC ($p < 0.05$ at 10%–20%, $p < 0.01$ at 30%–100% SC depth). Figure 4B exhibits the depth profile of the strongly bound water (DDAA) in the SC calculated at $\approx 3225\text{ cm}^{-1}$ (centre position).^{26,75} Evidently, LPS has a lower amount of strongly bound water molecules than nLPS over the entire SC ($p < 0.05$ at 0%–40% and 100%, $p < 0.01$ at 50%–80% SC depth). The

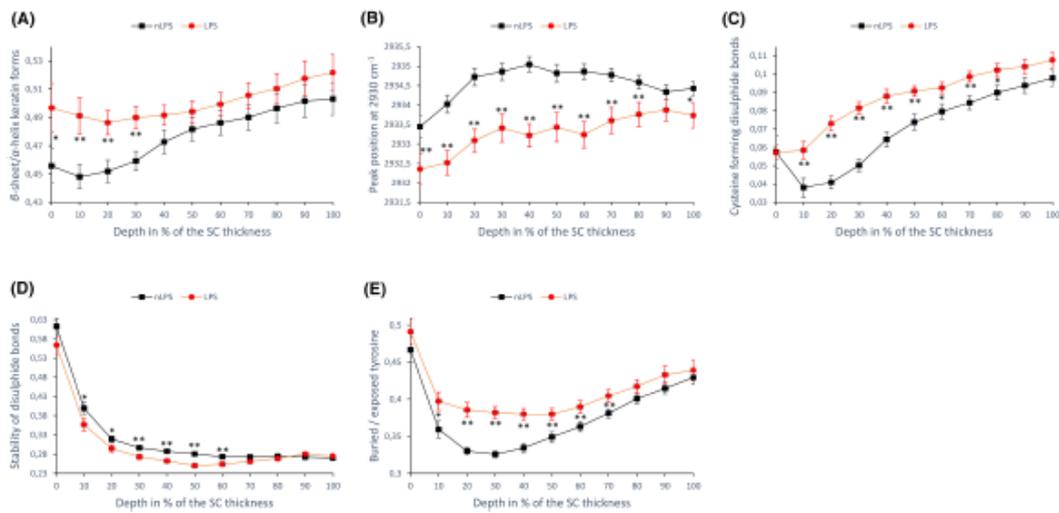


FIGURE 3 Depth profiles of the secondary (A) and tertiary (B–E) structure of keratin in the SC of LPS and nLPS: (A) The ratio of β -sheet/ α -helix in secondary keratin structure plotted as the I_{2920}/I_{2925} ratio. (B) The 2930 cm^{-1} band position, which measures the folding of tertiary keratin structure. (C) The amount of cysteine in keratin filaments, which forms disulphide bonds, given by the $I_{4920-712}/I_{474-578}$ ratio. (D) The stability of disulphide bonds in keratin, analysed by the $I_{474-508}/I_{474-578}$ ratio. (E) The ratio of buried/exposed aromatic rings of tyrosine in keratin side chains determined by the I_{250}/I_{250} ratio. [* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; SC, stratum corneum; (n)LPS, (non-) lesional psoriatic skin; the error bars show the standard error of the means].

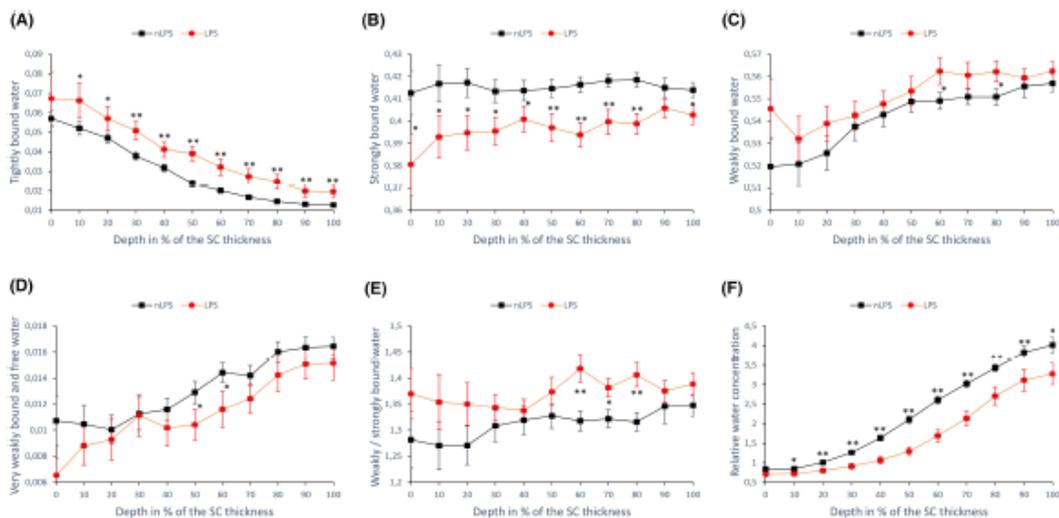


FIGURE 4 Depth profiles of the water mobility states and concentration in the SC of LPS and nLPS calculated after decomposition of HWN Raman spectra with 10 sub-bands: (A) The relative amount of tightly bound (DAA) water in the SC (sub-band corresponding to centre position $\approx 3015 \text{ cm}^{-2}$) normalised to the total water amount. (B) The relative amount of strongly bound (DDAA) water in the SC (sub-band corresponding to centre position $\approx 3225 \text{ cm}^{-2}$) normalised to the total water amount. (C) The relative amount of weakly bound (DA) water in the SC (sub-band corresponding to centre position $\approx 3451 \text{ cm}^{-2}$) normalised to the total water amount. (D) The relative amount of very weakly bound (DDA) and free water in the SC (sub-band corresponding to centre position $\approx 3633 \text{ cm}^{-2}$) normalised to the total water amount. (E) The ratio of weakly to strongly bound water in the SC calculated as I_{3451}/I_{3225} . (F) The relative water concentration in the SC calculated as $I_{2550-2550}/I_{2920-2925}$. [* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; SC, stratum corneum; (n)LPS, (non-) lesional psoriatic skin; HWN, high wavenumber; DA, single donor, single acceptor; DAA, single donor, double acceptor; DDAA, double donor, double acceptor; DDA, double donor, single acceptor; the error bars show the standard error of the means].

depth profile of weakly bound water (DA), calculated at $\approx 3451 \text{ cm}^{-1}$ (centre position),^{26,27} is displayed in Figure 4C and does not reveal any significant differences between LPS and nLPS apart from the two exemplary at 60% and 80% SC depth. The superposition of the very weakly bound (DDA) and free water, also characterised as unbound water, is calculated at $\approx 3633 \text{ cm}^{-1}$ (centre position)^{26,27} and illustrated in Figure 4D. Figure 4D shows similar profiles of unbound water with a significantly higher concentration in nLPS only at 50%–60% SC depth, compared to LPS.

The ratio of weakly to strongly bound water is a useful descriptor of the hydrogen-bonding state of water, calculated by the ratio of the corresponding decomposed band intensities as I_{3451}/I_{3222} .^{26,27} LPS appears to have a higher ratio than nLPS (highly significant at 60%, 80% and significant at 70% SC depth), as demonstrated in Figure 4E. It is further evident that LPS shows a lower hydrogen bonding state of water with the surrounding molecules than nLPS in the entire SC as a visible trend apart from the significant differences at 60%–80% SC depth. Ultimately, the relative water concentration (water/protein ratio), calculated as $I_{3650-3550}/I_{2910-2965}$ ⁴⁷ and depicted in Figure 4F, is manifestly lower in LPS than nLPS over the entire SC depth, with significance at 10% and 100% and high significance at 20%–90% SC depth.

4 | DISCUSSION

In this non-interventional in vivo study of the psoriatic SC, we demonstrated using CRM that LPS has an altered molecular structure suggesting a reduced SBF compared to nLPS.

The SC thickness could not be calculated for every recorded profile. The determination was successful for nearly 2.5-times more nLPS than LPS sites, reflecting in our opinion previously published results,^{54,55} which describe a perturbed and poorly defined SC in psoriasis. We failed to obtain a significant difference between the SC thickness of nLPS and LPS in contrast to Egawa et al.,⁵⁷ who report a significantly thicker SC in the lesional areas. It should be noted that most of the measured lesions were only slightly indurated (Table 1, Table S1), which might partly explain this lack of significant difference. Both nLPS and LPS were found to have higher mean SC thickness (also with much higher standard deviation) than values obtained with the same CRM method^{54,55} from healthy subjects.

ICL concentration in LPS was found to be much lower than in nLPS (Figure 1A), in agreement with the results of other groups, who have shown a lower concentration of FFA.^{26,58} Further known is an altered ceramide composition of the psoriatic skin,^{56,57} with the extent of ceramide-decrease correlating with the PASI score⁷⁶ and clinical severity.⁷⁷ Prosaposin, which plays a role in the generation of ceramides, has been reported to be lower concentrated in nLPS and even lower in LPS than HS.⁷⁸ The different ceramide composition of the psoriatic SC might be related to the pathological keratinocyte differentiation⁴⁰ and/or increased presence of interferon- γ , which has been suspected to reduce the number of long-chain fatty acids in ceramides.⁷⁹ Indeed, the decrease of long-chain ceramides in psoriasis has also been found by other groups,^{24,80} and is crucially

associated with a shift of ICL organisation towards hexagonal lateral packing of lipids.⁵¹ Takahashi et al.²⁹ did not find any significant differences between FFA of nLPS and HS, which would be in accordance with our results showing a similar ICL concentration in nLPS to that in HS.^{17,75}

Apart from the ICL concentration, even more relevant for the SBF is their lateral and lamellar organisation in the SC. The curves describing the lamellar ICL organisation (Figure 1B) reach their minimum values at 10%–40% SC depth, as also known for HS,¹⁷ corresponding to the highest order of lamellar ICL packing (more *trans*-conformers) in this SC depth. This is also the region, where LPS differs significantly from nLPS, thus indicating the less ordered lamellar organisation (more *gauche*-conformers) of LPS, which is in total agreement with results of previous studies.^{24,55} Regarding the nLPS, it is unclear whether its lipid organisation differs from HS. Our results for nLPS compared to HS⁷⁵ seem to suggest no difference as also reported by Leroy et al.,²⁴ in contrast to other studies.^{24,55}

The lateral ICL organisation was observed to be much denser in nLPS than in LPS (Figure 1C), which demonstrates further clear evidence of SBF impairment in LPS. It has a shifted ICL lateral organisation towards decreased orthorhombic packing, consequently showing a higher SC permeability.⁵¹ This loss of crystalline organisation in favour of the more fluid-like in LPS is in agreement with the results of Osada et al.,⁵⁹ as well as the findings regarding reduced long-chain ceramides,^{51,80} and also reflects the well-established higher TEWL values for psoriatic skin.^{29,44,85} Similar to the lamellar ICL organisation, our results for the lateral organisation of nLPS do not seem to differ from HS.⁷⁵ It should be noted that some factors might potentially disturb the correct interpretation of lipid organisation in psoriatic skin, such as the abnormal patterns of intercellular bilayers and lamellae,^{55,86} or the presence of lipid droplets, which have been observed in psoriatic SC.⁵⁴

Carotenoids without hydroxyl groups (carotenes, lycopene) have been shown to facilitate the formation of the orthorhombic organisation of ICL,⁷⁰ which maintains the intact SBF. In this study, we observed an analogous distribution of carotenoids in nLPS and LPS (Figure 1D). Compellingly, the means for both LPS and nLPS seem to be lower (especially at the intermediate SC depth) than for HS (unpublished data from the subjects in).⁷⁹ Previous studies^{87,88} have also reported lower carotenoid concentrations in psoriatic skin compared to HS, with Lopes et al.⁸⁹ even proposing potential topical therapies for psoriatic skin with cyanobacterial carotenoids.

Our results suggest a very high difference in NMF concentration: LPS has a much lower mean NMF concentration in the SC compared to nLPS (Figure 2) and HS.²⁷ This result is in agreement with other studies,^{29,57} where the lower NMF concentration is explained as a consequence of reduced profilaggrin-filled keratohyaline granules in psoriatic skin,⁹⁰ resulting in less filaggrin expression.²¹ The reduced filaggrin levels are related to increased tumour-necrosis-factor- α in LPS and nLPS⁹¹ and a lower expression of filaggrin-2 in LPS has recently been linked to specific inflammatory cytokine molecules.⁹² Especially at the superficial SC depth, where NMF concentration is physiologically the highest

and NMF the primary water-binding element,²² the reduced NMF in LPS indicates a serious alteration of the water-binding properties of the SC, and as a result reduced SC hydration (Figure 4F) and, non-directly, reduced SBF. The NMF concentration in nLPS seems to be comparable to that of HS,^{27,28} also in agreement with Takahashi et al.²⁹

The secondary structure of keratin in LPS is found to be less dense than in nLPS, as it is shifted towards more β -sheets than α -helices (Figure 3A). This outcome is in agreement with Takahashi et al.,²⁹ who name as possible explanations of this effect the stretching of psoriatic keratinocytes and/or higher expression of proliferation-related keratin types K6/K16/K17, as has been described for psoriatic skin.³⁰ It is not clear to which extent these alterations apply to the nLPS; the β -sheet/ α -helix ratio for nLPS appears in our study to be as in HS (unpublished data from the subjects in).²⁸

The tertiary folding status of keratin directly influences the water binding properties of the SC.²² In LPS we found tertiary keratin structure parameters indicating more folded conformations than in nLPS, such as the higher ratio of buried tyrosine rings (Figure 3C) and the lower-shifted band position at 2930 cm⁻¹ (Figure 3B) in disagreement with previous results.²⁸ In contrast, there seems to be a lower amount of cysteine-forming disulphide bonds in keratin of LPS (Figure 3D) and the disulphide bonds themselves seem to be less stable (Figure 3E), that is, shifted away from the energetically stable *gauche-gauche-gauche* conformation in accordance with Osada et al.³⁰—both rather indicating a more unfolded keratin tertiary structure, as also described for the *in vitro* psoriatic skin model.²² However, as the band position at 2930 cm⁻¹ describes the folding properties of the entire tertiary keratin structure, it can be argued that keratin is probably in a more folded state in LPS than nLPS and consequently has a lower ability to bind water. It has been known for decades that the protein maturation in psoriasis is deranged,³¹ rendering the direct comparison of LPS with HS difficult. Regarding nLPS, neither our results for nLPS seem to differ from HS (unpublished data from the subjects in²⁸) nor those of others.²⁸ Further research is needed to clarify the exact alterations of tertiary keratin structure in psoriatic skin.

The SC hydration was found to be lower in LPS than nLPS (Figure 4F), which is in agreement with previous results^{29,27,28} and indirectly confirmed by the lower NMF concentration (Figure 2) and possibly the increased folding of tertiary keratin structure in LPS (Figure 3B). Our results show that the difference increases in the intermediate and bottom SC depth, which is responsible for binding water by keratin.²² In our study, SC hydration for nLPS was found apparently analogous to HS (from unpublished data).

So far, to the best of the authors' knowledge, no studies exist comparing the different water mobility states in the SC of psoriatic skin. Our study revealed a lower amount of strongly bound water in LPS than nLPS (Figure 4B), which amounts to the greatest difference observed among the different water mobility states. It might explain the lower hydration level of LPS, as at normal physiological conditions strongly bound water exceeds 45% of the total water in the SC.²⁶ The lowest concentration of strongly bound water in LPS

is observed near the SC surface, which correlates well with the very low concentration of NMF at this SC depth (Figure 2). In contrast, tightly bound water is observed at a slightly higher amount in LPS (Figure 4A), but it represents physiologically less than 5% of the total water in the SC. This is also the case for unbound water,²⁶ which is detected marginally lower in LPS than in nLPS (Figure 4D). Finally, weakly bound water, physiologically amounting to the most common water state in the SC,²⁶ also demonstrates a weak divergence between LPS and nLPS with a tendency for more weakly bound water in LPS. The results for nLPS appear similar to results for HS²⁷ regarding the different water mobility states.

The exact interpretation of the water profiles for LPS and nLPS is not clear; while secondary and tertiary keratin structure-provided hydration do not correlate, the tertiary structure seems to have a higher influence on binding water, as the lower SC hydration of LPS agrees with the lower-shifted band position at 2930 cm⁻¹ (Figure 3B), which shows an increase of folded keratin and thus lower ability to bind water molecules. The observed transformation of water from strongly to weakly bound states (Figure 4E) can also be interpreted as an additional hallmark of swelling of keratinocytes³⁰ in LPS, with others being the increase of SC thickness and the higher prevalence of keratin β -sheets (Figure 3A). A comparison with HS²⁸ suggests that LPS has a higher ratio of weakly to strongly bound water than HS in the bottom half of the SC, while nLPS does not seem to differ from HS.

The performed study has some limitations. All skin sites of different patients corresponding to nLPS and LPS were considered similar and pooled together, without a mixed model analysis for dependent data. Furthermore, numerous t-tests were applied without correction for multiple testing. The performed analysis was motivated by the intention to facilitate comparability with previous studies using the same analysis, and the lack of the above mentioned corrections was compensated by a cautious interpretation of the results, for example regarding only clustered significant differences as relevant. A further possible limitation is the application of methods established with healthy skin (e.g. determination of SC thickness) to psoriatic skin, for which different conditions might apply. The high number of excluded profiles due to unobtainable SC thickness limits the direct applicability of the results to mild lesions (corresponding to mildly perturbed SC structure) and reduces the effectively analysed sample size with a resulting uneven distribution between male and female patients. Arguably, the study design also poses some limits to the study's findings, as only Caucasians with skin type I–III and between ages 19–59 were examined, reducing the impact of the results to this population. While the primary focus of the study was on the comparison between nLPS and LPS, we also used results from previous studies with the same CRM and analytical methods to compare with HS. Unfortunately, it was not possible to include a direct comparison, as the HS data are published in different studies. We have chosen reference⁷⁹ as the most frequent for adequate comparability, because the same CRM and analytical methods were used and the time of measurements was nearly overlapping with the psoriasis study. Lastly, even though short-term previous topical treatments

were excluded for all patients, many of the patients had received topical and systemic therapies in the past, which could potentially influence the results and should be studied in detail in the future.

In conclusion, our study provides the first in vivo, non-invasive, depth-dependent analysis of the SC structure, using CRM to compare molecular parameters between LPS and nLPS. The depth-dependent analysis yields insights into the exact structure of the SC and allows a better comparison of LPS with nLPS, which may be important in the non-invasive evaluation of disease severity and treatment control/optimisation. The impaired SBF of LPS for which a SC thickness can be obtained (i.e. is not greatly perturbed) is clearly related to the structural alterations evident from our results regarding ICL concentration and organisation, as well as NMF and water concentration. The secondary/tertiary keratin structure and their interactions with the different water mobility states also provide indications thereof, which should be further elucidated. A thorough understanding of the psoriatic SC and SBF offers useful information about the disease's pathophysiology and forms the basis for targeted topical therapies. The CRM method used in this study is well established for the determination of SC structure and SBF-related parameters in patients and may, together with the study results, provide a valuable tool for future interventional studies, comparing the psoriatic SC before and after specific treatments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Maxim E. Darvin, Jürgen Lademann, Martina C. Meinke and Georgios Kokolakis conceived and designed the study. Michael Zolotas conducted the measurements. Johannes Schleusener, Michael Zolotas and Maxim E. Darvin analysed the data. Michael Zolotas created the original draft, which was edited by Maxim E. Darvin, Johannes Schleusener, Martina C. Meinke, Georgios Kokolakis and Jürgen Lademann. All authors have approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge Sabine Schanzer from the Center of Experimental and Applied and Cutaneous Physiology, Department of Dermatology, Venereology and Allergology, Charité—Universitätsmedizin Berlin for her excellent technical support and all resident doctors of the Department of Dermatology, Venereology and Allergology of Charité—Universitätsmedizin Berlin involved in the consultation of psoriasis patients for their kind assistance in the patients recruitment. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no conflicts of interest to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings are available upon request by the authors.

ORCID

Maxim E. Darvin  <https://orcid.org/0000-0003-1075-1994>

REFERENCES

- Greb JE, Goldminz AM, Elder JT, et al. Psoriasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16082.
- Ghoreschi K, Balato A, Enerbäck C, Sabat R. Therapeutics targeting the IL-23 and IL-17 pathway in psoriasis. *Lancet*. 2021;397:754-766.
- Grän F, Kerstan A, Serfling E, Goebeler M, Muhammad K. Current developments in the immunology of psoriasis. *Yale J Biol Med*. 2020;93:97-110.
- Yamanaka K, Yamamoto O, Honda T. Pathophysiology of psoriasis: a review. *J Dermatol*. 2021;48:722-731.
- Tao R, Li R, Wan Z, Wu Y, Wang R. Skin microbiome signatures associated with psoriasis and seborrheic dermatitis. *Exp Dermatol*. 2022;31:1116-1118.
- Zeng C, Tsai LC, Gudjonsson JE. Dysregulated epigenetic modifications in psoriasis. *Exp Dermatol*. 2021;30:1156-1166.
- Kokolakis G, Giannikaki E, Stathopoulos E, Avramidis G, Tosca AD, Krüger-Krasagakis S. Infliximab restores the balance between pro- and anti-apoptotic proteins in regressing psoriatic lesions: infliximab restores apoptotic protein balance in psoriatic keratinocytes. *Br J Dermatol*. 2012;166:491-497.
- Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: a review. *JAMA*. 2020;323:1945-1960.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*. 2008;17:1063-1072.
- van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841:295-313.
- Bergboer JGM, Zeeuwen PLJM, Schalkwijk J. Genetics of psoriasis: evidence for epistatic interaction between skin barrier abnormalities and immune deviation. *J Invest Dermatol*. 2012;132:2320-2331.
- Schmuth M, Blunder S, Dubrac S, Gruber R, Moosbrugger-Martinez V. Epidermal barrier in hereditary ichthyoses, atopic dermatitis, and psoriasis. *JDDG. J Dtsch Dermatol Ges*. 2015;13:1119-1123.
- Orsmond A, Bereza-Malcolm L, Lynch T, March L, Xue M. Skin barrier dysregulation in psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2021;22:10841.
- Elias PM, Choi EH. Interactions among stratum corneum defensive functions. *Exp Dermatol*. 2005;14:719-726.
- Haftek M, Roy DC, Liao IC. Article: evolution of skin barrier science for healthy and compromised skin. *J Drugs Dermatol*. 2021;20:s3-s9.
- Weerheim A, Ponc M. Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res*. 2001;293:191-199.
- Choe C, Lademann J, Darvin ME. A depth-dependent profile of the lipid conformation and lateral packing order of the stratum corneum in vivo measured using Raman microscopy. *Analyst*. 2016;141:1981-1987.
- Doucet J, Pottier A, Baltenneck C, Domanov YA. Micron-scale assessment of molecular lipid organization in human stratum corneum using microprobe X-ray diffraction. *J Lipid Res*. 2014;55:2380-2388.
- Darvin ME, Schleusener J, Lademann J, Choe CS. Current views on noninvasive in vivo determination of physiological parameters of the stratum corneum using confocal Raman microspectroscopy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2022;35:125-136.
- Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med*. 1999;31:5-19.
- Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat*. 2009;214:516-559.
- Choe C, Schleusener J, Lademann J, Darvin ME. Keratin-water-NMF interaction as a three layer model in the human stratum corneum using in vivo confocal Raman microscopy. *Sci Rep*. 2017;7:15900.
- Vyumvuhore R, Tfayli A, Duplan H, Delalleau A, Manfait M, Baillet-Guffroy A. Raman spectroscopy: a tool for biomechanical characterization of stratum corneum. *J Raman Spectrosc*. 2013;44:1077-1083.

24. Damien F, Boncheva M. The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2010;130:611-614.
25. Sun Q. Local statistical interpretation for water structure. *Chem Phys Lett*. 2013;568:90-94.
26. Choe C, Lademann J, Darvin ME. Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum in vivo. *Analyst*. 2016;141:6329-6337.
27. Choe C, Schleusener J, Lademann J, Darvin ME. Age related depth profiles of human stratum corneum barrier-related molecular parameters by confocal Raman microscopy in vivo. *Mech Ageing Dev*. 2018;172:6-12.
28. Caussin J, Groenink HW, de Graaff AM, et al. Lipophilic and hydrophilic moisturizers show different actions on human skin as revealed by cryo scanning electron microscopy. *Exp Dermatol*. 2007;16:891-898.
29. Takahashi H, Tsuji H, Minami-Hori M, Miyauchi Y, Iizuka H. Defective barrier function accompanied by structural changes of psoriatic stratum corneum. *J Dermatol*. 2014;41:144-148.
30. Kim SD, Huh CH, Seo KI, Suh DH, Youn JI. Evaluation of skin surface hydration in Korean psoriasis patients: a possible factor influencing psoriasis. *Clin Exp Dermatol*. 2002;27:147-152.
31. He H, Bissonnette R, Wu J, et al. Tape strips detect distinct immune and barrier profiles in atopic dermatitis and psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147:199-212.
32. König K, Breunig HG, Batista A, Schindele A, Zieger M, Kaatz M. Translation of two-photon microscopy to the clinic: multimodal multiphoton CARS tomography of in vivo human skin. *JBO*. 2020;25:14515.
33. Welzel J, Bruhns M, Wolff HH. Optical coherence tomography in contact dermatitis and psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 2003;295:50-55.
34. Yang CC, Yen YY, Hsu CK, et al. Investigation of water bonding status of normal and psoriatic skin in vivo using diffuse reflectance spectroscopy. *Sci Rep*. 2021;11:8901.
35. Ghadially R, Reed JT, Elias PM. Stratum corneum structure and function correlates with phenotype in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 1996;107:558-564.
36. Lademann J, Mansouri P, Nahavandi A, et al. In vivo skin penetration, radical protection, and structural changes after topical application of a herbal oil cream compared to topical Calcipotriol in mild to moderate psoriasis. *Skin Pharmacol Physiol*. 2021;34:337-350.
37. Lademann J, Patzelt A, Darvin M, et al. Application of optical non-invasive methods in skin physiology. *Laser Phys Lett*. 2008;5:335-346.
38. Motta S, Sesana S, Monti M, Giuliani A, Caputo R. Interlamellar lipid differences between normal and psoriatic stratum corneum. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1994;186:131-132.
39. Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1182:147-151.
40. Motta S, Monti M, Sesana S, Mellesi L, Ghidoni R, Caputo R. Abnormality of water barrier function in psoriasis: role of ceramide fractions. *Arch Dermatol*. 1994;130:452-456.
41. Grice K, Sattar H, Baker H. The cutaneous barrier to salts and water in psoriasis and in normal skin. *Br J Dermatol*. 1973;88:459-463.
42. Verdier-Sevrain S, Bonte F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. *J Cosmet Dermatol*. 2007;6:75-82.
43. Wang H, Zhang Q, Mao G, et al. Novel confocal Raman microscopy method to investigate hydration mechanisms in human skin. *Skin Res Technol*. 2019;25:653-661.
44. Espinosa-Rueda MI, Montero-Vilchez T, Martinez-Lopez A, et al. Cutaneous homeostasis and epidermal barrier function in a young healthy Caucasian population. *Eur J Dermatol*. 2021;31:176-182.
45. Serup J, Blichmann C. Epidermal hydration of psoriasis plaques and the relation to scaling. Measurement of electrical conductance and transepidermal water loss. *Acta Derm Venereol*. 1987;67:357-359.
46. Farwanah H, Raith K, Neubert RHH, Wohlrab J. Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch Dermatol Res*. 2005;296:514-521.
47. Berardesca E, Fideli D, Borroni G, Rabbiosi G, Maibach H. In vivo hydration and water-retention capacity of stratum corneum in clinically uninvolved skin in atopic and psoriatic patients. *Acta Derm Venereol*. 1990;70:400-404.
48. Nosbaum A, Dahel K, Goujon C, Nicolas JF, Mengeaud V, Vocanson M. Psoriasis is a disease of the entire skin: non-lesional skin displays a prepsoriasis phenotype. *Eur J Dermatol*. 2021;31:143-154.
49. Pershing LK, Bakhtian S, Wright ED, Rallis TM. Differentiation of involved and uninvolved psoriatic skin from healthy skin using non-invasive visual, colorimeter and evaporimeter methods. *Skin Res Technol*. 1995;1:140-144.
50. Jean J, Leroy M, Duque-Fernandez A, Bernard G, Soucy J, Pouliot R. Characterization of a psoriatic skin model produced with involved or uninvolved cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9:789-798.
51. Rigal A, Michael-Jubeli R, Nkengne A, Baillet-Guffroy A, Bigouret A, Tfyali A. Raman confocal microscopy and biophysics multiparametric characterization of the skin barrier evolution with age. *J Biophotonics*. 2021;14:e202100107.
52. Lunter D, Klang V, Kocsis D, Varga-Medveczky Z, Berkó S, Erdő F. Novel aspects of Raman spectroscopy in skin research. *Exp Dermatol*. 2022;31:1311-1329.
53. Wohlrab J, Vollmann A, Wartewig S, Marsch WC, Neubert R. Noninvasive characterization of human stratum corneum of undiseased skin of patients with atopic dermatitis and psoriasis as studied by Fourier transform Raman spectroscopy. *Biopolymers*. 2001;62:141-146.
54. Leroy M, Lefevre T, Pouliot R, Auger M, Laroche G. Using infrared and Raman microspectroscopies to compare ex vivo involved psoriatic skin with normal human skin. *J Biomed Opt*. 2015;20:67004.
55. Bernard G, Auger M, Soucy J, Pouliot R. Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770:1317-1323.
56. Osada M, Gniadecka M, Wulf HC. Near-infrared Fourier transform Raman spectroscopic analysis of proteins, water and lipids in intact normal stratum corneum and psoriasis scales. *Exp Dermatol*. 2004;13:391-395.
57. Egawa M, Kunizawa N, Hirao T, et al. In vivo characterization of the structure and components of lesional psoriatic skin from the observation with Raman spectroscopy and optical coherence tomography: a pilot study. *J Dermatol Sci*. 2010;57:66-69.
58. Schleusener J, Guo SX, Darvin ME, et al. Fiber-based SORS-SERDS system and chemometrics for the diagnostics and therapy monitoring of psoriasis inflammatory disease in vivo. *Biomed Opt Express*. 2021;12:1123-1135.
59. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988;124:869-871.
60. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis—Oral therapy with a new retinoid. *DRM*. 1978;157:238-244.
61. Darvin ME, Meinke MC, Sterry W, Lademann J. Optical methods for noninvasive determination of carotenoids in human and animal skin. *J Biomed Opt*. 2013;18:61230.
62. Choe C, Schleusener J, Ri J, et al. Quantitative determination of concentration profiles of skin components and topically applied oils by tailored multivariate curve resolution-alternating least squares using in vivo confocal Raman micro-spectroscopy. *J Biophotonics*. 2023;16:e202200219.
63. Choe C, Schleusener J, Lademann J, Darvin ME. Human skin in vivo has a higher skin barrier function than porcine skin ex

- vivo-comprehensive Raman microscopic study of the stratum corneum. *J Biophotonics*. 2018;11:e201700355.
64. Choe C, Choe S, Schleusener J, Lademann J, Darvin ME. Modified normalization method in vivo stratum corneum analysis using confocal Raman microscopy to compensate nonhomogeneous distribution of keratin. *J Raman Spectrosc*. 2019;50:945-957.
 65. Crowther JM, Sieg A, Blenkinsop P, et al. Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo. *Br J Dermatol*. 2008;159:567-577.
 66. Ri JS, Choe SH, Schleusener J, Lademann J, Choe CS, Darvin ME. In vivo tracking of DNA for precise determination of the stratum corneum thickness and superficial microbiome using confocal Raman microscopy. *Skin Pharmacol Physiol*. 2020;33:30-37.
 67. Caspers PJ, Bruining HA, Puppels GJ, Lucassen GW, Carter EA. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol*. 2001;116:434-442.
 68. Janssens M, van Smeden J, Puppels GJ, Lavrijsen APM, Caspers PJ, Bouwstra JA. Lipid to protein ratio plays an important role in the skin barrier function in patients with atopic eczema. *Br J Dermatol*. 2014;170:1248-1255.
 69. Darvin ME, Lademann J, von Hagen J, et al. Carotenoids in human skin In vivo: antioxidant and photo-protectant role against external and internal stressors. *Antioxidants*. 2022;11:1451.
 70. Ri J-S, Choe C-S, Choe S-H, et al. Lycopene, but not zeaxanthin, serves as a skeleton for the formation of an orthorhombic organization of intercellular lipids within the lamellae in the stratum corneum: molecular dynamics simulations of the hydrated ceramide NS bilayer model. *Biochim Biophys Acta*. 2023;1865:184081.
 71. Choe C, Ri J, Schleusener J, Lademann J, Darvin ME. The non-homogeneous distribution and aggregation of carotenoids in the stratum corneum correlates with the organization of intercellular lipids in vivo. *Exp Dermatol*. 2019;28:1237-1243.
 72. Paquin R, Colomban P. Nanomechanics of single keratin fibres: a Raman study of the alpha-helix \rightarrow beta-sheet transition and the effect of water. *J Raman Spectrosc*. 2007;38:504-514.
 73. Akhtar W, Edwards HG. Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 1997;53A:81-90.
 74. Vyumvuhore R, Tfayli A, Duplan H, Delalleau A, Manfait M, Baillet-Guffroy A. Effects of atmospheric relative humidity on stratum corneum structure at the molecular level: ex vivo Raman spectroscopy analysis. *Analyst*. 2013;138:4103-4111.
 75. Schleusener J, Salazar A, von Hagen J, von Hagen J, Lademann J, Darvin ME. Retaining skin barrier function properties of the stratum corneum with components of the natural moisturizing factor—a randomized, placebo-controlled double-blind in vivo study. *Molecules*. 2021;26:1649.
 76. Nakajima K, Terao M, Takaishi M, et al. Barrier abnormality due to ceramide deficiency leads to psoriasisiform inflammation in a mouse model. *J Invest Dermatol*. 2013;133:2555-2565.
 77. Cho Y, Lew B-L, Seong K, Kim NI. An inverse relationship between ceramide synthesis and clinical severity in patients with psoriasis. *J Korean Med Sci*. 2004;19:859-863.
 78. Alessandrini F, Stachowitz S, Ring J, Behrendt H. The level of pro-saposin is decreased in the skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*. 2001;116:394-400.
 79. Tawada C, Kanoh H, Nakamura M, et al. Interferon- γ decreases ceramides with long-chain fatty acids: possible involvement in atopic dermatitis and psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2014;134:712-718.
 80. Kim B-K, Shon JC, Seo HS, et al. Decrease of ceramides with long-chain fatty acids in psoriasis: possible inhibitory effect of interferon gamma on chain elongation. *Exp Dermatol*. 2022;31:122-132.
 81. Li Q, Fang H, Dang E, Wang G. The role of ceramides in skin homeostasis and inflammatory skin diseases. *J Dermatol Sci*. 2020;97:2-8.
 82. Bouwstra JA, Ponc M. The skin barrier in healthy and diseased state. *BBA-Biomembranes*. 2006;1758:2080-2095.
 83. Pullmannová P, Pavlíková L, Kováčik A, et al. Permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes containing ceramides with long (C16) and very long (C24) acyl chains. *Biophys Chem*. 2017;224:20-31.
 84. Darlenski R, Hristakieva E, Aydin U, et al. Epidermal barrier and oxidative stress parameters improve during in 311 nm narrow band UVB phototherapy of plaque type psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2018;91:28-34.
 85. Montero-Vilchez T, Segura-Fernández-Nogueras M-V, Pérez-Rodríguez I, et al. Skin barrier function in psoriasis and atopic dermatitis: transepidermal water loss and temperature as useful tools to assess disease severity. *J Clin Med*. 2021;10:359.
 86. Menon GK, Elias PM. Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and Normal human epidermis. *Arch Dermatol*. 1991;127:57-63.
 87. Lima XT, Kimball AB. Skin carotenoid levels in adult patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25:945-949.
 88. Darlenski R, Deliyaska R, Al-Sadek LT, Hristakieva E, Fluhr JW. Epidermal carotenoid levels in vivo of patients with plaque psoriasis: effects of narrow-band UVB phototherapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2021;37:111-114.
 89. Lopes G, Clarinha D, Vasconcelos V. Carotenoids from cyanobacteria: a biotechnological approach for the topical treatment of psoriasis. *Microorganisms*. 2020;8:302.
 90. Bernard BA, Asselineau D, Schaffar-Deshayes L, Darmon MY. Abnormal sequence of expression of differentiation markers in psoriatic epidermis: inversion of two steps in the differentiation program? *J Invest Dermatol*. 1988;90:801-805.
 91. Gassenmeier T, Busch P, Hensen H, Seipel W. Some aspects of re-fattening the skin: effects oriented to skin lipids for improving skin properties. *Cosmet Toiletries*. 1998;113:89-92.
 92. Kim BE, Howell MD, Guttman E, et al. TNF- α downregulates filaggrin and loricrin through c-Jun N-terminal kinase: role for TNF- α antagonists to improve skin barrier. *J Invest Dermatol*. 2011;131:1272-1279.
 93. Akhlaghi M, Karrabi M, Atabti H, Raofi A, Mousavi Khaneghah A. Investigation of the role of IL18, IL-1 β and NLRP3 inflammasome in reducing expression of FLG-2 protein in psoriasis vulgaris skin lesions. *Biotech Histochem*. 2022;97:277-283.
 94. Zhang X, Yin M, Zhang L. Keratin 6, 16 and 17—critical barrier alarmin molecules in skin wounds and psoriasis. *Cell*. 2019;8:807.
 95. Baden HP, Norah MG, Cheng CK, Lee LD, Kubilus J. The keratin polypeptides of psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*. 1978;70:294-297.
 96. Choe C, Schleusener J, Choe S, Ri J, Lademann J, Darvin ME. Stratum corneum occlusion induces water transformation towards lower bonding state: a molecular level in vivo study by confocal Raman microspectroscopy. *Int J Cosmet Sci*. 2020;42:482-493.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

Data S1: Supporting Information.

How to cite this article: Zolotas M, Schleusener J, Lademann J, Meinke MC, Kokolakis G, Darvin ME. Altered structure indicating reduced barrier function of lesional compared to non-lesional psoriatic skin—A non-invasive in vivo study of the human stratum corneum with confocal Raman microspectroscopy. *Exp Dermatol*. 2023;00:1-11. doi:10.1111/exd.14895



Article

Atopic Dermatitis: Molecular Alterations between Lesional and Non-Lesional Skin Determined Noninvasively by In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy

Michael Zolotas ¹, Johannes Schleusener ^{1,*}, Jürgen Lademann ¹, Martina C. Meinke ¹, Georgios Kokolakis ² and Maxim E. Darvin ^{1,*}

¹ Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, Department of Dermatology, Venereology and Allergy, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

² Psoriasis Research and Treatment Centre, Department of Dermatology, Venereology and Allergy, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

* Correspondence: johannes.schleusener@charite.de (J.S.); maxim.darvin@protonmail.com (M.E.D.)

Abstract: Atopic dermatitis (AD)/atopic eczema is a chronic relapsing inflammatory skin disease affecting nearly 14% of the adult population. An important pathogenetic pillar in AD is the disrupted skin barrier function (SBF). The atopic stratum corneum (SC) has been examined using several methods, including Raman microspectroscopy, yet so far, there is no depth-dependent analysis over the entire SC thickness. Therefore, we recruited 21 AD patients (9 female, 12 male) and compared the lesional (LAS) with non-lesional atopic skin (nLAS) in vivo with confocal Raman microspectroscopy. Our results demonstrated decreased total intercellular lipid and carotenoid concentrations, as well as a shift towards decreased orthorhombic lateral lipid organisation in LAS. Further, we observed a lower concentration of natural moisturising factor (NMF) and a trend towards increased strongly bound and decreased weakly bound water in LAS. Finally, LAS showed an altered secondary and tertiary keratin structure, demonstrating a more folded keratin state than nLAS. The obtained results are discussed in comparison with healthy skin and yield detailed insights into the atopic SC structure. LAS clearly shows molecular alterations at certain SC depths compared with nLAS which imply a reduced SBF. A thorough understanding of these alterations provides useful information on the aetiology of AD and for the development/control of targeted topical therapies.

Keywords: atopic eczema; atopic dermatitis; skin barrier function; stratum corneum; lipid ordering; keratin structure; natural moisturising factor; water binding; skin hydration; carotenoids



Citation: Zolotas, M.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Meinke, M.C.; Kokolakis, G.; Darvin, M.E. Atopic Dermatitis: Molecular Alterations between Lesional and Non-Lesional Skin Determined Noninvasively by In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14636. <https://doi.org/10.3390/ijms241914636>

Academic Editor: Ivan Bratchenko

Received: 26 July 2023

Revised: 14 September 2023

Accepted: 25 September 2023

Published: 27 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Atopic dermatitis (AD) is a chronic relapsing inflammatory skin disease that affects 15–30% of children and nearly 14% of adults [1,2], inflicting a heavy disease burden [3]. AD is one of the diseases of the atopic march together with bronchial asthma, allergic rhinitis, and type-I allergies [4], and its clinical manifestations include symptoms such as dry skin, indurated eczematous lesions with erythema and scaling, as well as pruritus, causing excoriation and, in the long term, skin thickening and lichenification [4–6].

Even though the exact pathogenesis of AD is not completely understood, it is assumed to be a combination of (epi)genetic (e.g., filaggrin mutations), immunologic (inflammation with a T_H2-shift and higher IgE-levels), and exogenous factors, such as exposure to allergens and irritants, infections and alteration in the physiological skin microbiome, excessive hygiene, and climatic changes [5,7–13]. One of the defining pathophysiological aspects of AD is the disruption of the skin barrier function (SBF), correlating with the disease severity [5,14]. The skin barrier dysfunction—partly attributable to genetic factors—is

thought to interplay with a dysregulated immune system, resulting in inadequate response to external factors, prolonged wound healing, and higher allergic sensitisation [8,9,15–17]. A detailed understanding of the atopic SBF is required to thoroughly understand the disease's pathogenesis.

The main actor regarding the SBF is the epidermis and especially its most superficial layer, the stratum corneum (SC), accounting for most of the skin's functionality [18,19]. The SC consists of denucleated corneocytes, which represent the end product of keratinisation [20] and are strongly interconnected with the help of corneodesmosomes, crosslinked cornified envelopes, including the proteins involucrin, loricrin, and filaggrin, and keratin-filaggrin attachments [21]. They provide the main barrier against mechanical and chemical disturbances [4]. In what is often described as the "brick and mortar model" of the SC [18,22], the corneocytes are imbedded in an intercellular lipid (ICL) matrix, consisting mainly of ceramides, cholesterol, and free fatty acids (FFA) [23], which is essential in maintaining an intact SBF (especially regarding the regulation of water diffusion) [4]. The ICL organisation in the SC directly influences the SBF: orthorhombic lateral and *trans*-conformation-shifted lamellar organisations promote a denser packing of ICL and intact SBF [24,25] nonhomogeneous throughout the SC. The highest SBF is observed at a depth of ≈ 20 –40% SC thickness [26]. A further relevant fraction of the lipophilic substances in the human SC are carotenoids, consisting mostly of β -carotene and lycopene, facilitating the orthorhombic organisation of ICL [27] and playing a major antioxidative and photoprotective role in the SC [28]. Also important in maintaining an intact SBF are the natural moisturising factor (NMF) molecules derived from filaggrin, which correspond to certain highly humectant amino acids, maintaining the SC's hydration, acidic pH, adequate maturation and healthy microbiologic milieu by reducing colonisation with *Staphylococcus aureus* [8,29].

The impaired SBF in AD is a result of both structural and functional alterations in the SC [8,9] and is not limited to lesional atopic skin (LAS) sites, as it is well established that the entire atopic skin, including non-lesional (nLAS), has a higher permeability for hydrophilic and lipophilic chemicals compared with healthy skin (HS) [30]. Furthermore, the SC of LAS is known to be thinner than the SC of HS [31]. The transepidermal water loss (TEWL), as a measure of SBF [18], is increased in AD [6,9], with differences being observed between LAS and nLAS as well as between nLAS and HS [32,33]. Knor et al. [34] even described differences between lesional, perilesional, non-lesional atopic, and HS regarding pH (with highest values in LAS) and hydration (with lowest values in LAS) of the SC. Matsuki et al. found a correlation between AD severity and TEWL increase and, to a lesser extent, SC hydration [35], and a similar correlation is also found for the higher pH [36], which is thought to influence lipid metabolism, serine proteases (SPs) activity, and vulnerability to infections [8]. An increased activity of SPs, also associated with lower SC hydration [31], is generally considered a reason for reduced SBF in AD [16,31], disturbing the physiologic lipid metabolism (e.g., reducing the total amount of lipids in the SC) and protein balance, that are essential for the SBF [8,9], and even promoting T_H2 -shifted inflammation by increasing IL-1 α and IL-1 β [15].

Further well-examined SBF-related factors in AD are filaggrin loss-of-function-mutations because of the important structural function of filaggrin in HS and its role in producing components of the natural moisturising factor (NMF) (especially at superficial SC depth), with consequential impact on the physiologic hydration, (acidic) pH and SP activity regulation, and the antimicrobial properties of the SC [4,16]. Thus, it is not surprising that reduced or even total loss of filaggrin in AD is associated with lower NMF concentration, higher TEWL, skin xerosis [4,37], and higher *Staphylococcus aureus* colonisation [29]. While genetic filaggrin mutations are not found in all AD patients [38–40], inflammatory cytokines such as IL-4/13 are also able to reduce filaggrin expression. Other described factors responsible for the impaired atopic SBF are dysfunctional tight junctions [41], reduced antimicrobial peptides [4], and a disturbed milieu of commensal microbiome [42–44], e.g., with reduced presence of physiologically appearing *Cutibacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, and

Proteobacteria, in favour of *Staphylococcus* colonisation [45] which correlates with higher TEWL [46]. Finally, important structural aberrations in the atopic SC are observed with respect to the ICL. The total amount of ICL and the number of ceramides (especially ceramides 1 and 3) are found to be lower in atopic skin, and the FFA chain length is reduced in comparison with HS [33,47] with effects on the SBF [9] that will be further discussed below.

Various noninvasive methods have been used to study the alterations in the SC in AD in vivo so far, for example, TEWL measurement, capacitance–conductance determination, reflectance spectroscopy, optical coherence tomography, or diverse methods of lipid analysis [48]. Confocal Raman microspectroscopy (CRM) describes the combination of Raman spectroscopy (i.e., the spectroscopic recording of Stokes Raman-scattered photons after excitation of a probe, e.g., with continuous-wave laser light) and confocal microscopy, which offers the potential of axial resolution into a probe. CRM offers a valuable non-invasive optical method to examine the SC structure and the SBF-related parameters on the molecular level, as it detects specific molecules, their conformation, structure, and concentration with high chemical specificity and sensitivity in in vivo skin studies [49,50]. CRM has been widely used in the past to examine HS [51–54], the effects of ageing [55], and psoriatic skin [56–58]. So far, CRM has already been applied in AD to study the impact of filaggrin mutations [59–61], to compare sensitive skin with atopic and non-sensitive skin [62], to compare HS with lesional atopic and psoriatic skin [63], and to create an objective classification score for AD [64]. Janssens et al. have focussed on the lipid analysis of atopic skin [65], and Verzeaux et al. studied several molecular SBF-related parameters comparing LAS and HS up to a depth of 12.5 μm in the SC [66].

Considering the limited analogous investigations of the SC in AD patients on a molecular level, in this study, we compare for the first time the entire SC of LAS with nLAS in vivo in a noninvasive depth-dependent manner using CRM. We apply the processing methods developed in our group [26,67,68], focusing on molecular parameters related to the SBF, such as ICL concentration and organisation, NMF concentration, secondary and tertiary structure of keratin, as well as water mobility states and total water concentration. This will reveal important information regarding the pathophysiology of AD and potentially provide a useful diagnostic tool for disease development and treatment control in the future.

2. Results

2.1. SC Thickness

Boundaries of the SC could successfully be computed with the method described under Section 4.3 for 43 out of 71 Raman profiles of LAS ($\approx 61\%$) and for 63 out of 78 profiles of nLAS ($\approx 81\%$) (Supplementary Tables S1 and S2). The remaining spectra, for which a SC thickness could not be determined, were not considered for further analysis. With a mean SC thickness of $24 \pm 5 \mu\text{m}$, LAS was found not to differ significantly ($p = 0.15$) from nLAS, with $23 \pm 4 \mu\text{m}$.

2.2. Concentration and Organisation of Intercellular Lipids

In order to obtain the concentration of ICL, we added the decomposed Raman band intensities at 2850 and 2880 cm^{-1} related to ICL and normalised them to the decomposed band intensity at 2930 cm^{-1} related to keratin [53]. The result shows a lower ICL concentration in LAS than nLAS for the superficial and intermediate SC depth (significant for 0–10% and highly significant for 20–70% SC depth, Figure 1A).

Regarding the lamellar organisation of the ICL, we computed the $I_{1080}/(I_{1130} + I_{1060})$ ratio, revealing the ratio of *gauche* conformers (associated with the 1080 cm^{-1} band) to all-*trans* conformers (associated with the 1130 and 1060 cm^{-1} bands) [26]. Figure 1B shows similar curves for LAS and nLAS, with a clear tendency towards a higher number of *gauche* conformers in LAS than nLAS at the 10–40% SC depth, which suggests a possibility of impaired SBF in LAS compared with nLAS at this depth. None of the differences reached the level of statistical significance.

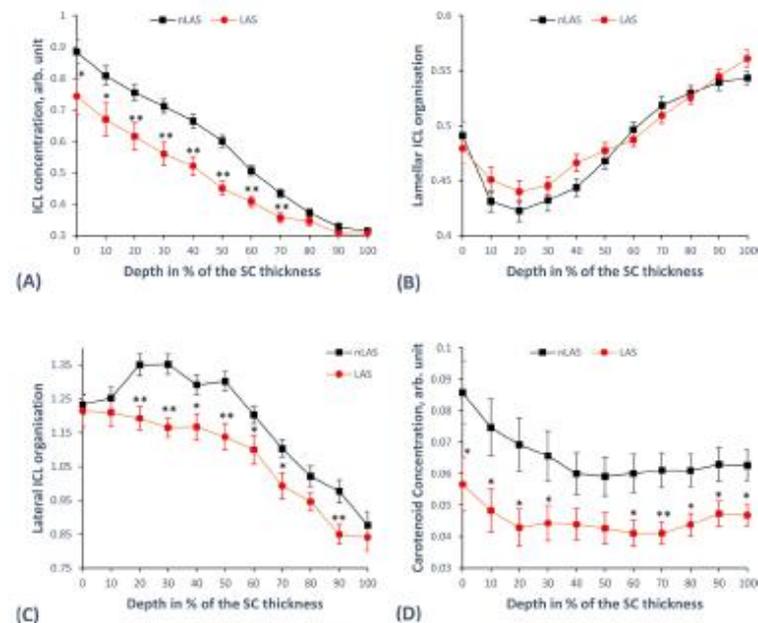


Figure 1. The depth-dependent lipid-related parameters in the SC of LAS vs. nLAS. **(A)** The concentration of ICL given by $(I_{2880} + I_{2890})/I_{2930}$. **(B)** The lamellar organisation of ICL given by $I_{1080}/(I_{1130} + I_{1060})$. **(C)** The lateral organisation of ICL given by I_{2880}/I_{2890} upon exclusion of the interference of keratin (the procedure is shown in detail in [26]). **(D)** The concentration of carotenoids given by I_{1524} . The results are derived from 43 Raman profiles for LAS and 63 Raman profiles for nLAS in total. [*— $p < 0.05$, **— $p < 0.01$ for significant differences between LAS and nLAS; I_x —intensity at Raman peak position “x” (in cm^{-1}); ICL—intercellular lipids; SC—stratum corneum; (n)LAS—non-lesional atopic skin, the error bars show the standard error of the means].

Further, we observed the lateral ICL organisation with the help of the ratio of lipid-related band intensities at 2880 to 2850 cm^{-1} (separated from the superposition of keratin), which is sensitive to the orthorhombic and hexagonal lateral packing of the ICL [26]. The ratio is lower, indicating reduced SBF for LAS over most of the SC depth, revealing the presence of a less dense hexagonal organisation, with the strongest deviation from the nLAS curve appearing at 20–50% SC depth. The differences are significant at 40, 60, and 70% and highly significant at 20–30, 50, and 90% SC depth, as shown in Figure 1C.

Finally, we examined the carotenoids, such as β -carotene and lycopene, which are the major carotenoids in the human SC [28] and play an important role in the formation of the orthorhombic organisation of ICL [27]. Their concentration was determined using the carotenoid-related Raman band intensity at 1524 cm^{-1} (I_{1524}) [69]. Figure 1D shows the resulting curves, with LAS clearly having a lower carotenoid concentration than nLAS over the entire SC depth. The differences are significant at 0–30, 60, and 80–100% and highly significant at 70% SC depth.

2.3. Concentration of Natural Moisturising Factor (NMF) Molecules

In total, 43 LAS and 58 nLAS profiles were used for statistical analysis after the exclusion of profiles for which either NMF or SC thickness could not be successfully computed. The NMF consists of the combined concentrations of alanine, serine, glycine, proline, ornithine, histidine at pH4 and pH7, and pyrrolidone carboxylic acid (Figure 2A). It could be seen that LAS has a much lower NMF concentration than nLAS, with the

difference being highest at the superficial SC depth. For 0–70%, the difference of the means is highly significant, and for 80% SC depth, is significant.

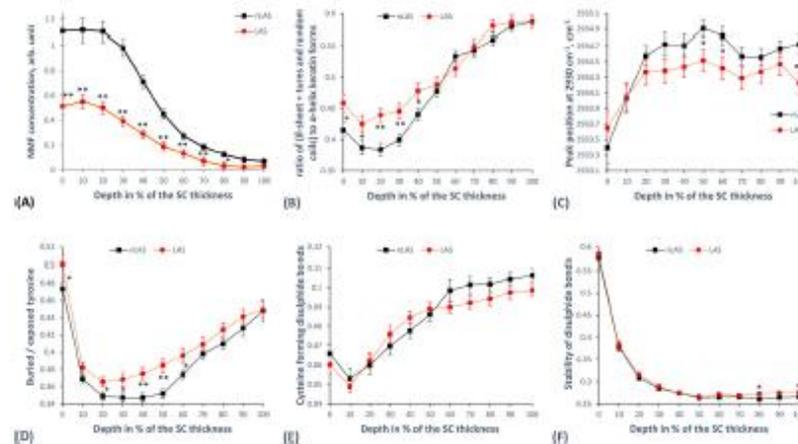


Figure 2. The concentration of NMF (A) and parameters of secondary (B) and tertiary (C–F) keratin structure in the SC of LAS vs. nLAS. (A) The NMF concentration calculated in a semiquantitative manner with a least-squares fitting method from Skin Tools Software 2.0. (B) The ratio of (β -sheets, turns, and random coils) to α -helices, as a defining parameter of the secondary keratin structure, calculated by $(I_{1670} + I_{1685})/I_{1655}$. (C) The shifting of the I_{2930} band indicating the folding status of the tertiary keratin structure. (D) The ratio of buried to exposed tyrosine rings in side chains of keratin calculated by I_{830}/I_{850} . (E) The cysteine forming disulphide bonds in keratin calculated by $I_{690-712}/I_{674-578}$. (F) Stability of the disulphide bonds calculated by $I_{674-508}/I_{474-578}$ showing the ratio of the most energetically stable to all possible conformations of the disulphide bonds in keratin filaments. The results are derived from 43 Raman profiles for LAS and 63 Raman profiles for nLAS in total. In the case of NMF in (A), 43 Raman profiles for LAS and 58 Raman profiles for nLAS were used. [$*$ — $p < 0.05$, $**$ — $p < 0.01$ for significant differences between LAS and nLAS; I_x —intensity at Raman peak position “x” (in cm^{-1}); NMF—natural moisturising factor; SC—stratum corneum; (n)LAS—non-lesional atopic skin, the error bars show the standard error of the means].

2.4. Keratin Structure

2.4.1. Secondary Keratin Structure

The different components of the secondary structure of keratin are α -helices, β -sheets, turns, and random coils. While the α -helices provide a highly stable coiled-coil structure, allowing very little interaction with water or other molecules, the other mentioned secondary conformations allow a higher number of interactions with surrounding molecules [68,70]. As an indicator for the stability of the secondary structure, we used the $(I_{1670} + I_{1685})/I_{1655}$ quotient, which reveals the ratio of β -sheets, turns, and random coils to α -helices [53,71]. This ratio is higher for LAS in the superficial half of the SC depth than nLAS, thus showing a lower prevalence of α -helices and a less stable secondary structure, as shown in Figure 2B. The differences are significant for 0–10 and 40% and highly significant for 20–30% SC depth. In the remaining 50–100% SC depth, the curves seem to overlap, indicating no difference.

2.4.2. Tertiary Keratin Structure

On a tertiary structure level, keratin is characterised by the folding of its side chains and the way they interact, depending on their degree of exposure and the bonds they form with each other [68,72]. As a measure of the keratin folding state, we evaluated the shifting of the I_{2930} maximum position upon decomposing the corresponding high wavenumber region (HWN) broadband [53,68]. As depicted in Figure 2C, our results

indicate a tendency towards lower-shifted wavenumber values for LAS than nLAS in the intermediate and bottom SC depths, with some significant differences at 50, 60, and 100% SC depth. This would indicate an increased keratin folding with less exposed side chains for LAS. Comparing directly the ratio of buried to exposed tyrosine rings in the side chains calculated as I_{830}/I_{850} [71,73], we see that LAS has more buried (i.e., less exposed) aromatic rings of tyrosine than nLAS, especially in the intermediate SC depth. The corresponding curves are shown in Figure 2D, and the differences are significant for 0, 20–30, and 60% and highly significant for 40–50% SC depth. Furthermore, we compared the portion of cysteine forming disulphide bonds in keratin indicated by the $I_{690-712}/I_{474-578}$ ratio [68], which did not reveal any significant difference between LAS and nLAS (Figure 2E). Similarly, the last parameter of tertiary keratin structure we examined, namely the stability of disulphide bonds, also appears not to exhibit deviation between LAS and nLAS. The stability of disulphide bonds is given by the ratio $I_{474-508}/I_{474-578}$ [68], dividing the energetically stable *gauche-gauche-gauche*-conformation by the sum of all possible conformations (*gauche-gauche-gauche* + *gauche-gauche-trans* + *trans-gauche-trans*). As demonstrated in Figure 2F, the curves for LAS and nLAS overlap for most of the SC depth apart from the exemplary significant (but very small) differences at 80 and 100% SC depth.

2.5. Concentration and Mobility States of Water

As a measure of water concentration in the SC, we examined the ratio of water to protein: $I_{3350-3550}/I_{2910-2965}$ [49], as shown in Figure 3A. It appears to be nearly the same for LAS and nLAS, apart from the bottom SC depth, where LAS seems to have a slightly higher concentration, with the difference being significant only at 90–100% SC depth.

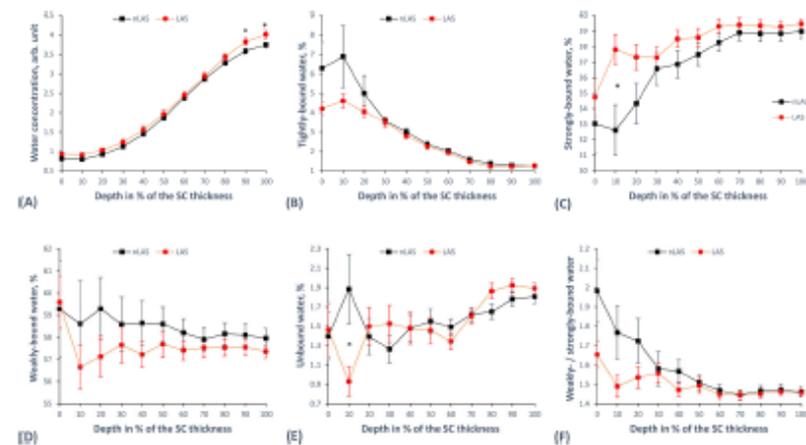


Figure 3. The depth-dependent water-related parameters in the SC of LAS vs. nLAS. (A) The water concentration calculated by the $I_{3350-3550}/I_{2910-2965}$ ratio. (B) The concentration of tightly bound water (DAA-bound water, band centred at 3015 cm^{-1}). (C) The concentration of strongly bound water (DDAA-bound water, band centred at 3225 cm^{-1}). (D) The concentration of weakly bound water (DA-bound water, band centred at 3451 cm^{-1}). (E) The concentration of unbound water (DDA-bound and free water, band centred at 3633 cm^{-1}). (F) The quotient I_{3451}/I_{3225} representing the ratio of weakly bound to strongly bound water. The results are derived from 43 Raman profiles for LAS and 63 Raman profiles for nLAS. [$^*p < 0.05$ for significant differences between LAS and nLAS; I_x —intensity at Raman peak position “x” (in cm^{-1}); DA—single donor—single acceptor; DAA—single donor—double acceptor; DDA—double donor—single acceptor; DDAA—double donor—double acceptor; SC—stratum corneum; (n)LAS—non-lesional atopic skin, the error bars show the standard error of the means].

To determine water mobility state concentrations, we decomposed the HWN spectra using 10 Gaussian functions according to previously described algorithms [67]. Next, we looked in detail at the different water mobility states according to how strongly the water bonded with its neighbouring molecules, differentiating between tightly, strongly, weakly bound, and unbound water [53,67,74]. In order to calculate the portion of tightly bound water, defined as DAA-bound water (forming single donor—double acceptor bonds with surrounding molecules), we normalised the corresponding band centred at 3015 cm^{-1} to the total water [67,75]. Figure 3B shows the results, with LAS having a lower concentration of tightly bound water at 0–20% SC depth as a trend with no statistically significant difference. Strongly bound water, defined as a double donor—double acceptor (DDAA-bound water), is associated with the band centred at 3225 cm^{-1} [67,75], and Figure 3C shows its concentration depth profile in the SC. LAS appears to have a higher concentration over the entire SC, with the strongest deviation appearing at the superficial depth and with a significant difference at only 10% SC depth. Figure 3D illustrates the concentration profile of weakly bound water, defined as a single donor—single acceptor (DA-bound water) and associated with the band centred at 3451 cm^{-1} [67,75]. Although the curves seem to differ from each other in a clear trend, with LAS having a lower concentration of weakly bound water over most of the SC depth, no difference reaches the level of statistical significance. The last type of mobility state we examined was unbound water, defined as the combination of DDA-bound water and free water and related to the band centred at 3633 cm^{-1} [67,75]. The concentration profile of unbound water is illustrated in Figure 3E and does not show a clear difference between LAS and nLAS apart from a single exemplary significant difference at the 10% SC depth. Finally, we investigated the weakly to strongly bound water ratio given by I_{3451}/I_{3225} , which correlates inversely with the hydrogen bonding state of water [55,67]. The resulting curves, shown in Figure 3F, represent a clear trend towards a decrease in the I_{3451}/I_{3225} ratio (increase in hydrogen bonding state of water) in LAS compared with nLAS at the 0–20% SC depth, but the differences are not statistically significant.

3. Discussion

In this *in vivo* study of the atopic skin, we examined the SC molecular parameters indicating disrupted skin barrier function in LAS compared with nLAS, using noninvasive CRM.

The mean SC thickness values obtained for LAS and nLAS did not reveal any statistically significant difference. Further, the values were comparable to values obtained for HS with the same CRM method [75]. Mlitz et al. [61] were able to show a significant difference between the SC depth of nLAS and HS, with nLAS having a slightly thinner SC by a mean difference of $1\text{ }\mu\text{m}$. This agrees with other results indicating a thinner SC with smaller corneocytes in nLAS compared with HS [76]. It should be noted that for LAS, SC thickness could be determined in approximately 20% fewer skin sites than for nLAS, which might be interpreted as an indication of a more perturbed/ altered SC structure in the LAS. This is also the case to an even greater extent for lesional compared with non-lesional psoriatic skin [58].

We found the total concentration of ICL to be significantly lower in LAS than nLAS over nearly the entire SC depth (Figure 1A), in contrast to Zhang et al. [77], whose multivariate curve resolution approach failed to show this difference over the entire SC thickness, but in good agreement with the results of Janssens et al. [65]. Furthermore, a comparison with results obtained for HS using the same method [53] strongly suggests a lower ICL concentration in nLAS than HS, which would agree well with previous CRM studies [65,66]. Thus, we can confirm the conclusion of Janssens et al. [65] that ICL concentration is reduced in LAS and, to a lesser extent, in nLAS, which is a parameter of higher relevance for the SBF than the SC thickness. While FFA and cholesterol are not reduced [47], the well-established decreased amount of ceramides in atopic skin (especially ceramides 1 and 3) [6,8,9,47,78] might provide a possible explanation for the lower ICL concentration. Mechanisms leading

to ceramide deficiency that have been described are reduced sphingomyelin deacylase activity [78], increased interferon- α [4], and increased IL-4 [16]. The reduction in ceramides has been linked with a higher TEWL value [9]. Further possible explanations that have been proposed are related to impaired lipid transport from the cells to the extracellular space [65], increased activity of SPs [9,16,31], and higher signalling of protease activator type 2 receptor leading to degraded β -glucocerebrosidase and acidic sphingomyelinase, important enzymes for the lipid processing [9]. The inflammation-related mechanisms are expected to play a greater role in the LAS, thus enforcing the difference between LAS and nLAS [65], as it has been shown that inflammatory cytokine concentrations are higher in LAS vs. nLAS and in nLAS vs. HS [79].

While ICL concentration provides a useful SBF parameter, the ICL organisation in the SC is even more important for maintaining an intact SBF. Our results show lower curve values for LAS than for nLAS regarding lateral organisation (Figure 1C), i.e., a shift towards a decrease in orthorhombic and an increase in hexagonal lateral packing of lipids, associated with a reduced SBF [24,25]. Comparison with HS [75] suggests that nLAS is slightly shifted towards less dense lateral packing in the superficial SC, with the values becoming comparable in deeper SC, in agreement with Verzeaux et al., who examined a similar ratio in the upper 12.5 μm of the SC in LAS and HS [66]. Using ATR-FTIR-spectroscopy, Danso et al. also confirm this finding, reporting an increased hexagonal organisation of ICL in LAS vs. nLAS and nLAS vs. HS [80]. Earlier findings indicate a reduced chain length of FFA and ceramides in atopic skin (nLAS vs. HS and LAS vs. nLAS) [33,80,81], especially the very-long-chain FFA [47,82], which causes decreased formation of the orthorhombic lateral organisation in favour of the less dense hexagonal organisation [33,83,84]. Higher levels of inflammatory cytokines (such as IFN- α) are potential factors causing this reduction in the chain length by decreasing the two elongases of fatty acids ELOVL1 and ELOVL4 [4,80] and higher IL-4/13 levels inhibiting ELOVL3 and ELOVL6 [40]. Apart from chain length, the level of saturation in FFA also influences the lateral ICL organisation [85], with corresponding differences being observed among LAS, nLAS, and HS regarding the concentration of unsaturated FFA and the activity of the corresponding processing enzymes [80]. Danso et al. reported that the alterations in lipid-associated enzyme activity are more pronounced in LAS than in nLAS [80], which agrees with the observed differences.

The lateral ICL organisation shows an inverse relation to the lamellar (i.e., the ratio of *gauche*- to *trans*-conformation) [26]. While our results did not indicate a statistically significant difference, one may interpret as a clear trend (Figure 1B) that LAS has a lower number of *trans*-conformers (and consequently a less dense lamellar organisation of ICL) than nLAS in the region of 10–40% of the SC thickness. These depth levels are known to physiologically demonstrate the highest order of lamellar organisation in healthy skin (with the lowest ratio of *gauche*- to *trans*-conformation) [26], thus highlighting the importance of the observed difference between LAS and nLAS and indicating a reduced SBF of LAS compared with nLAS. Results from HS indicate more *gauche*-conformers in nLAS than HS [75], which is also supported by the findings of Verzeaux et al., confirming the difference between HS and nLAS [66]. In conclusion, lateral as well as lamellar ICL organisation, clearly demonstrate a reduced SBF for LAS compared with nLAS and HS.

Also relevant with respect to the ICL organisation are carotenoids without hydroxyl groups like carotenes and lycopene, which may promote the formation of orthorhombic ICL packing [27]. Apart from this important SBF-related property, carotenoids also provide valuable photoprotective and antioxidant defence against stress-induced reactive oxygen species for the SC [28]. Kake et al. were able to show that β -carotene improves the SBF in mice with AD [86]. Thus, the indication of a reduced concentration of carotenoids for LAS compared with nLAS (Figure 1D) would further support the thesis that LAS has a reduced SBF and suggest a factor that might partially explain the less dense lateral ICL packing in LAS. However, a physiological concentration of carotenoids in the SC of HS may vary strongly, reflecting the individual diet, lifestyle, and health status [28,69]. Thus,

the carotenoid concentration could completely overlap in AD and HS patients and should be carefully compared, considering individual factors. It is known that topical and/or systemic application of carotenoids results in a long-term increase in their concentration in the HS [28]. Furthermore, topical application of antioxidant and anti-inflammatory substances has recently been shown to improve clinical symptoms in AD [87]. Therefore, it might be helpful to test in the future whether topical and/or systemic application of carotenoids in AD patients will improve the SBF and clinical disease management.

The obtained results for the NMF concentration suggest a very high significant difference between LAS and nLAS, with LAS containing less than a half of nLAS's NMF concentration over most of the SC depth (Figure 2A) until both curves reach their lowest levels towards the deepest SC, where filaggrin is not yet broken down to the amino acids composing the NMF. The values for nLAS are in the same range as values obtained from HS determined using the same method [75], which is in disagreement with the results of Mlitz et al., who found a lower NMF concentration in nLAS than in HS, especially associated with filaggrin mutations, but also with disease severity [61]. However, the determination of NMF in that study was not depth-resolved, making it impossible to see any changes at certain SC depths. The dramatically lower NMF concentration in LAS agrees with the literature and has even been found to correlate with the disease severity, potentially providing a useful clinical marker for AD, as described by Nouwen et al. [88]. Given the important hygroscopic (primary water-binding actor in the superficial SC [68]) and antimicrobial properties of NMF, as well as its function in regulating pH and SP activity [4,16] closely linked to the AD pathophysiology, it is clear that the reduced NMF concentration in LAS implies a reduced SBF and is in good agreement with the reported lower SC hydration values obtained for LAS [34,35].

Regarding the secondary keratin structure, our results suggest a small difference in the ratio of β -sheets, turns, and random coils to α -helices, with LAS having a significantly higher ratio in the superficial SC than nLAS (Figure 2B). A possible reason might be the higher expression of proliferation- and inflammation-associated keratin types K16/17 in LAS and the reduced levels of the physiologically present K1/10 [76,89]. Totsuka et al. [90] have proposed that increased levels of T_H2 cytokines IL-4/13 downregulate K1/10. Verzeaux et al. found an increased amount of both α -helices and β -sheets in the superficial 12.5 μm of LAS compared with HS using CRM [66]. They proposed possible explanations, which include a reduced capacity for binding water, modified filaggrin-keratin interactions, or altered IgE levels in the SC, which are known to interact with epidermal proteins with a correlation to disease severity in AD [91]. To what extent these effects play a role in the shift of the $(I_{1670} + I_{1685})/I_{1685}$ ratio is not clear. A further possible interpretation is that, as the NMF concentration in LAS is drastically reduced, especially in the superficial SC depth, the keratin's secondary structure is shifted towards a higher water-binding state as a compensation mechanism to maintain SC hydration. Results from HS [53] suggest a lower ratio for HS compared with nLAS in the bottom SC depth.

Further, we focus on the tertiary keratin structure, which is of essential importance for the mechanical structure of the corneocytes and the ability to bind water molecules, especially in the intermediate SC depth [68]. The amount of cysteine-forming-disulphide bonds and the stability of the disulphide bonds do not seem to differ between nLAS and LAS (Figure 2E,F), and also not with respect to HS as unpublished data from subjects in [75] indicates. In contrast, LAS appears to have less exposed tyrosine aromatic rings than nLAS in the intermediate SC depth (Figure 2D), implying decreased ability to bind water molecules. Further, the band position at around 2930 cm^{-1} , a parameter reflecting the total amount of free side chains in tertiary keratin, is shifted lower in LAS (Figure 2C), indicating a lower number of side chains and thus less possibility to bind water. It can be speculated whether the known xerosis and lower SC hydration for atopic skin [4,34,35,77] are a cause of a more folded tertiary keratin structure or whether it is the altered keratin structure that provides a causative factor for the xerosis and lower water binding. Potential factors leading to an altered keratin structure might be inflammation [90] and reduced

interaction with filaggrin or other proteins like loricrin and involucrin, which are known to be reduced in atopic skin [16,89].

The total water concentration in the LAS failed to show a significant difference with nLAS (Figure 3A), as was also the case in the recent study by Dinisch et al. [63] using integrated parameters over the epidermis. Previous CRM studies report a lower total water amount in LAS compared with nLAS [77] as well as HS [61,66], in agreement with the above-mentioned facts regarding xerosis and SC hydration in AD [4,34,35,77]. The lower water content in the SC of atopic skin can be explained as a result of reduced NMF (in agreement with our results shown in Figure 2A) and, to a lesser extent, of more folded tertiary keratin [68] (Figure 2C,D). The different water mobility states we examined (Figure 3B–E) also did not reveal many significant differences between LAS and nLAS. However, a clear trend towards a lower concentration of weakly bound water (Figure 3D) and a higher concentration of strongly bound water (Figure 3C) was observed in the SC of LAS compared with nLAS. The stronger hydrogen-binding state of LAS compared with nLAS at the superficial SC depth (Figure 3F) might be attributed to the looser secondary keratin structure (Figure 2B) in LAS at the same depth. This would allow more hydrogen bonds with water molecules and might be a compensation mechanism for the corresponding much lower NMF concentration at this depth in LAS (Figure 2A). A comparison with HS data [75] reveals that LAS and nLAS have more weakly and less strongly bound water than HS, and consequently also a higher ratio of weakly to strongly bound water [67]. As weakly and strongly bound water together physiologically represent more than 90% of the total water [55,67], this shift in their corresponding ratio in atopic skin (LAS and nLAS) compared with HS can be interpreted as the lower water-binding capacity of the atopic skin. This interpretation is in agreement with the observations of Verzeaux et al. regarding functional water in the atopic skin and further points to the effects of reduced NMF and higher folding of keratin [66].

A limitation of this study is the lack of a healthy group of subjects as a direct reference and no stratification of the patients' cohort to disease severity, filaggrin mutation status, or age of AD onset. Furthermore, although we ensured that the examined skin sites were untreated at least 24 h before measurements, most patients had received topical and systemic treatments in the past.

4. Materials and Methods

4.1. Confocal Raman Microspectroscopy (CRM)

The CRM measurements were conducted with the "skin composition analyzer" appropriate for *in vivo*/*ex vivo* measurements (RiverD International B.V., Model 3510, Rotterdam, The Netherlands). In order to obtain skin spectra in the fingerprint region (FP, 400–2000 cm^{-1}) and in the HWN (2000–4000 cm^{-1}), a 785 nm laser (20 mW on the skin surface with 5 s exposure time) and a 671 nm laser (17 mW on the skin surface with 1 s exposure time) were used. Starting from above the skin surface, Raman profiles were recorded in increments of 2 μm , reaching a total depth of 40 μm . The depth resolution was $\leq 5 \mu\text{m}$, and the spectral resolution was 2 cm^{-1} . For each profile, FP and HWN spectra were recorded in precisely the same position and depth with the help of the CRM's piezoelectric actuator (PIFOC piezo flexure nanopositioner, Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Waldbronn, Germany). The time to obtain a complete FP + HWN depth profile of a single skin site was approximately 2 min. For more details on the CRM method utilised, refer to the literature [49,92]. To determine the NMF depth profiles, we followed the same method described by Caspers et al. [49], using the Skin Tools 2.0 (RiverD International B.V., Rotterdam, The Netherlands) software.

4.2. Subjects and Measurements

In total, 21 patients diagnosed with AD (9 female and 12 male), with skin type I–III in the Fitzpatrick classification [93] and a mean age of 34 ± 10 years, were recruited prospectively for this study (Supplementary Table S1). The age of AD onset among the patients

varied from infancy (aged 0–2: 13) and childhood (aged 3–13: 7) to puberty/adulthood (aged ≥ 14 : 1). All patients had at least one active AD lesion at the time and were asked to keep the body parts (forearm and elbow) intended for measurements free of any topical treatments at least 24 h before the CRM measurements to exclude a possible influence of the formulation on the molecular structure of the SC [75]. Measurements were conducted for each patient at healthy-appearing, non-lesional skin sites (corresponding to nLAS) and eczematous lesional skin sites (corresponding to LAS) *in vivo*; no biopsies were taken. Each complete measurement, including the FP and corresponding HWN spectra, was conducted at a distinct skin site. The atopic lesions were chosen with none-to-mild lichenification (Table 1 and Supplementary Table S3), evaluated by a local EASI (Eczema Area and Severity Index) score [94], and photo-documented at the time of examination. Two exemplary skin sites (one for nLAS and one for LAS) and their corresponding FP and HWN spectra at an exemplary depth level are shown in Figure 4. No manipulation of the lesions in any form took place prior to the measurements. The laboratory conditions were standardised (temperature ≈ 20 °C), and the acclimatisation time was not shorter than 15 min. All patients were informed in detail about the study and provided written consent. The ethics committee of the Charité—Universitätsmedizin approved the study (EA1/145/17), and all procedures complied with the Declaration of Helsinki revised in 2013.

Table 1. Descriptive statistics of the local EASI parameters of the atopic lesions used for the analysis (compare also Supplementary Table S3).

Local EASI	Erythema	Oedema/Papulation	Excoriation	Lichenification
median	2	1	0.5	0
maximum	3	1	3	1
minimum	1	0	0	0

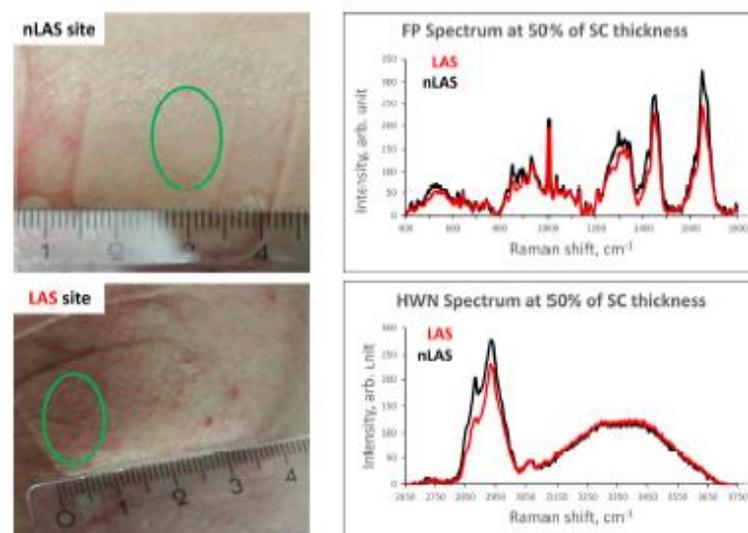


Figure 4. One exemplary nLAS and one LAS site with green circles designating the exact areas examined *in vivo* using CRM (left). The corresponding exemplary Raman profiles of the skin sites are shown for the depth level of approx. 50% of the SC thickness (≈ 12 μm), one for LAS and one for nLAS, in the FP and HWN regions (right). [SC—stratum corneum; (n)LAS—non-lesional atopic skin; FP—fingerprint region; HWN—high wavenumber region].

4.3. Data Processing and Statistical Analysis

Profiles of low quality were excluded from further analysis, i.e., in case of contact instability or movement during the measurement, noncompliance with the no-pretreatment requirement 24 h before measurement, or ambiguity between nLAS or LAS in the examined skin site (Supplementary Table S1). The remaining CRM profiles were recorded from 18 LAS sites (yielding 71 profiles) and 13 nLAS sites (yielding 78). After preprocessing the recorded Raman spectra and subtracting the fluorescence background, following the methods established in our group before [53,67,68], the SC boundaries were determined by defining its surface position (0% SC depth) as the point where the keratin-related band at 1655 cm^{-1} reaches the half of its maximal intensity [92], and the bottom of the SC (100% SC depth) as the point where the first derivative of the water concentration profile curve reaches 0.5 [95]. Every examined parameter was interpolated from 0 to 100% of the SC depth with increments of 10%. In accordance with the literature [53,55,58,68], *t*-tests were used to obtain the significance level of the comparison of the means for the parameters of LAS and nLAS, predefining differences with $p < 0.05$ as significant (*) and $p < 0.01$ as highly significant (**). The programs used for analysing the data were Skin Tools 2.0 (RiverD International B.V., Rotterdam, The Netherlands), Matlab R2019b (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA), Origin 2020b (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA), and Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA).

5. Conclusions

In summary, the results of the conducted study strongly suggest a reduced SBF for LAS compared with nLAS, as LAS has a lower concentration of NMF, a lower concentration and less dense lateral organisation of ICL, a reduced concentration of carotenoids, and an altered secondary and tertiary keratin structure, allowing less water binding. Comparisons with other studies using the same methods applied in HS seem to confirm the intermediate position of nLAS between LAS and HS regarding its SBF. However, to the best of our knowledge, this is the first time that the entire SC of LAS and nLAS are compared using CRM in a depth-dependent manner regarding molecular SBF-defining composition and parameters. Comprehending the alterations of the atopic SC and its SBF in detail is not only essential in understanding the pathogenetic aetiology of the disease but also in developing targeted therapies, as well as optimal galenic formulations for LAS and nLAS. Furthermore, the current study shows that the performed CRM and analytical methods are useful for optimal remission assessment and treatment control in future interventional studies in AD.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms241914636/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.E.D. and J.S.; methodology, M.E.D. and J.S.; software, J.S. and M.Z.; validation, M.E.D., J.S. and M.Z.; formal analysis, M.E.D., J.S. and M.Z.; investigation, M.Z.; resources, M.E.D., J.S., J.L. and M.C.M.; data curation, M.E.D., J.S. and M.Z.; writing—original draft preparation, M.Z.; writing—review and editing, M.Z., M.E.D., J.S., J.L., M.C.M. and G.K.; visualization, M.Z.; supervision, M.E.D., J.S., J.L., M.C.M. and G.K.; project administration, M.E.D., J.S., J.L., M.C.M. and G.K.; funding acquisition, not applicable. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was partly funded by the Foundation for Skin Physiology of the Donor Association for German Science and Humanities for financial support.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the ethics committee of Charité—Universitätsmedizin (protocol code EA1/145/17, 10 August 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data can be shared upon request from the corresponding authors.

Acknowledgments: We would like to thank Margitta Worm for her kind assistance with the patients' recruitment.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. Maxim E. Darwin is no longer affiliated with Charité-Universitätsmedizin Berlin. However, with the permission of the Center of Experimental and Applied Cutaneous Physiology, where the entire work was carried out, the author uses the Charité affiliation.

Abbreviations

This section contains a list of abbreviations used in the main text and Supplementary Material.

AD	atopic dermatitis
CRM	confocal Raman microspectroscopy
DA	single donor—single acceptor
DAA	single donor—double acceptor
DDA	double donor—single acceptor
DDAA	double donor—double acceptor
EASI	eczema area and severity index
FFA(s)	free fatty acids
FP	fingerprint region
HWN	high wavenumber region
HS	healthy skin, i.e., skin of healthy subjects
I_x	intensity at Raman peak position "x" (in cm^{-1})
IL	interleukin
ICL(s)	intercellular lipid(s)
Kx	keratin type "x"
LAS	lesional atopic skin
nLAS	non-lesional atopic skin
NMF(s)	natural moisturizing factor(s)
SC	stratum corneum
SBF	skin barrier function
SG	stratum granulosum
SP	serine protease(s)
TEWL	transepidermal water loss
T_H2	type 2 T-helper cells

References

1. Nettis, E.; Ortoncelli, M.; Pellacani, G.; Foti, C.; Di Leo, E.; Patrino, C.; Rongioletti, E.; Argenziano, G.; Ferrucci, S.M.; Macchia, L.; et al. A Multicenter Study on the Prevalence of Clinical Patterns and Clinical Phenotypes in Adult Atopic Dermatitis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2020**, *30*, 448–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Silvestre Salvador, J.; Romero-Pérez, D.; Encabo-Durán, B. Atopic Dermatitis in Adults: A Diagnostic Challenge. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2017**, *27*, 78–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Heratizadeh, A.; Haufe, E.; Stölzl, D.; Abraham, S.; Heinrich, L.; Kleinheinz, A.; Wollenberg, A.; Weisshaar, E.; Augustin, M.; Wiemers, F.; et al. Baseline Characteristics, Disease Severity and Treatment History of Patients with Atopic Dermatitis Included in the German AD Registry TREATgermany. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **2020**, *34*, 1263–1272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Yang, G.; Seok, J.K.; Kang, H.C.; Cho, Y.-Y.; Lee, H.S.; Lee, J.Y. Skin Barrier Abnormalities and Immune Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2867. [[CrossRef](#)]
5. Sroka-Tomaszewska, J.; Trzeciak, M. Molecular Mechanisms of Atopic Dermatitis Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4130. [[CrossRef](#)]
6. Cork, M.J.; Danby, S.G.; Vasilopoulos, Y.; Hadgraft, J.; Lane, M.E.; Moustafa, M.; Guy, R.H.; MacGowan, A.L.; Tazi-Ahnini, R.; Ward, S.J. Epidermal Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *J. Investig. Dermatol.* **2009**, *129*, 1892–1908. [[CrossRef](#)]
7. Bin, L.; Leung, D.Y.M. Genetic and Epigenetic Studies of Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2016**, *12*, 52. [[CrossRef](#)]
8. Levin, J.; Friedlander, S.F.; Del Rosso, J.Q. Atopic Dermatitis and the Stratum Corneum: Part 1: The Role of Filaggrin in the Stratum Corneum Barrier and Atopic Skin. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2013**, *6*, 16–22.
9. Levin, J.; Friedlander, S.F.; Del Rosso, J.Q. Atopic Dermatitis and the Stratum Corneum: Part 2: Other Structural and Functional Characteristics of the Stratum Corneum Barrier in Atopic Skin. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2013**, *6*, 49–54.
10. Sabat, R.; Wolk, K.; Loyal, L.; Döcke, W.-D.; Ghoreschi, K. T Cell Pathology in Skin Inflammation. *Semin. Immunopathol.* **2019**, *41*, 359–377. [[CrossRef](#)]

11. Worm, M.; Glatzel, V.; Baumgart, S.; Mei, H.E.; Sörensen, T.; Grützkau, A.; Heine, G. Immune Cell Profiling Reveals Natural Killer and T Cell Subpopulations to Be Associated with Atopic Dermatitis Severity. *Clin. Exp. Allergy* **2023**, *53*, 105–108. [\[CrossRef\]](#)
12. Callard, R.E.; Harper, J.I. The Skin Barrier, Atopic Dermatitis and Allergy: A Role for Langerhans Cells? *Trends Immunol.* **2007**, *28*, 294–298. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Fotopoulou, M.; Iordanidou, M.; Vasileiou, E.; Trypsianis, G.; Chatzimichael, A.; Paraskakis, E. A Short Period of Breastfeeding in Infancy, Excessive House Cleaning, Absence of Older Sibling, and Passive Smoking Are Related to More Severe Atopic Dermatitis in Children. *Eur. J. Dermatol.* **2018**, *28*, 56–63. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Schmuth, M.; Blunder, S.; Dubrac, S.; Gruber, R.; Moosbrugger-Martinz, V. Epidermal Barrier in Hereditary Ichthyoses, Atopic Dermatitis, and Psoriasis. *JDDG. Der Dtsch. Dermatol. Ges.* **2015**, *13*, 1119–1123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Levin, J.; Fallon Friedlander, S.; Del Rosso, J.Q. Atopic Dermatitis and the Stratum Corneum: Part 3: The Immune System in Atopic Dermatitis. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2013**, *6*, 37–44.
16. Elias, P.M.; Schmuth, M. Abnormal Skin Barrier in the Etiopathogenesis of Atopic Dermatitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2009**, *9*, 265–272. [\[CrossRef\]](#)
17. Elias, P.M.; Hatano, Y.; Williams, M.L. Basis for the Barrier Abnormality in Atopic Dermatitis: Outside-inside-Outside Pathogenic Mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *121*, 1337–1343. [\[CrossRef\]](#)
18. Proksch, E.; Brandner, J.M.; Jensen, J.M. The Skin: An Indispensable Barrier. *Exp. Dermatol.* **2008**, *17*, 1063–1072. [\[CrossRef\]](#)
19. Matsui, T.; Amagai, M. Dissecting the Formation, Structure and Barrier Function of the Stratum Corneum. *Int. Immunol.* **2015**, *27*, 269–280. [\[CrossRef\]](#)
20. Pouillot, A.; Dayan, N.; Polla, A.S.; Polla, L.L.; Polla, B.S. The Stratum Corneum: A Double Paradox. *J. Cosmet. Dermatol.* **2008**, *7*, 143–148. [\[CrossRef\]](#)
21. O'Regan, G.M.; Irvine, A.D. The Role of Filaggrin in the Atopic Diathesis. *Clin. Exp. Allergy* **2010**, *40*, 965–972. [\[CrossRef\]](#)
22. Nemes, Z.; Steinert, P.M. Bricks and Mortar of the Epidermal Barrier. *Exp. Mol. Med.* **1999**, *31*, 5–19. [\[CrossRef\]](#)
23. Weerheim, A.; Ponc, M. Determination of Stratum Corneum Lipid Profile by Tape Stripping in Combination with High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Arch. Dermatol. Res.* **2001**, *293*, 191–199. [\[CrossRef\]](#)
24. Bouwstra, J.A.; Ponc, M. The Skin Barrier in Healthy and Diseased State. *Bba-Biomembr.* **2006**, *1758*, 2080–2095. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Damien, F.; Boncheva, M. The Extent of Orthorhombic Lipid Phases in the Stratum Corneum Determines the Barrier Efficiency of Human Skin in Vivo. *J. Investig. Dermatol.* **2010**, *130*, 611–614. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Choe, C.; Lademann, J.; Darvin, M.E. A Depth-Dependent Profile of the Lipid Conformation and Lateral Packing Order of the Stratum Corneum in Vivo Measured Using Raman Microscopy. *Analyst* **2016**, *141*, 1981–1987. [\[CrossRef\]](#)
27. Ri, J.-S.; Choe, C.-S.; Choe, S.-H.; Jong, K.-H.; Hong, S.-N.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Lycopene, but Not Zeaxanthin, Serves as a Skeleton for the Formation of an Orthorhombic Organization of Intercellular Lipids within the Lamellae in the Stratum Corneum: Molecular Dynamics Simulations of the Hydrated Ceramide NS Bilayer Model. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Biomembr.* **2023**, *1865*, 184081. [\[CrossRef\]](#)
28. Darvin, M.E.; Lademann, J.; von Hagen, J.; Lohan, S.B.; Kolmar, H.; Meinke, M.C.; Jung, S. Carotenoids in Human Skin In Vivo: Antioxidant and Photo-Protectant Role against External and Internal Stressors. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1451. [\[CrossRef\]](#)
29. Mijalovic, H.; Fallon, P.G.; Irvine, A.D.; Foster, T.J. Effect of Filaggrin Breakdown Products on Growth of and Protein Expression by *Staphylococcus Aureus*. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *126*, 1184–1190.e3. [\[CrossRef\]](#)
30. Hata, M.; Tokura, Y.; Takigawa, M.; Sato, M.; Shiota, Y.; Fujikura, Y.; Imokawa, G. Assessment of Epidermal Barrier Function by Photoacoustic Spectrometry in Relation to Its Importance in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Lab. Investig.* **2002**, *82*, 1451–1461. [\[CrossRef\]](#)
31. Voegeli, R.; Rawlings, A.V.; Breternitz, M.; Doppler, S.; Schreier, T.; Fluhr, J.W. Increased Stratum Corneum Serine Protease Activity in Acute Eczematous Atopic Skin. *Br. J. Dermatol.* **2009**, *161*, 70–77. [\[CrossRef\]](#)
32. Montero-Vilchez, T.; Segura-Fernández-Nogueras, M.-V.; Pérez-Rodríguez, I.; Soler-Gongora, M.; Martínez-Lopez, A.; Fernández-González, A.; Molina-Leyva, A.; Arias-Santiago, S. Skin Barrier Function in Psoriasis and Atopic Dermatitis: Transepidermal Water Loss and Temperature as Useful Tools to Assess Disease Severity. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 359. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. van Smeden, J.; Janssens, M.; Kaye, E.C.J.; Caspers, P.J.; Lavrijsen, A.P.; Vreeken, R.J.; Bouwstra, J.A. The Importance of Free Fatty Acid Chain Length for the Skin Barrier Function in Atopic Eczema Patients. *Exp. Dermatol.* **2014**, *23*, 45–52. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Knor, T.; Meholic-Fetahović, A.; Mehmedagić, A. Stratum Corneum Hydration and Skin Surface PH in Patients with Atopic Dermatitis. *Acta Dermatovenerol. Croat.* **2011**, *19*, 242–247. [\[PubMed\]](#)
35. Matsuki, H.; Kiyokane, K.; Matsuki, T.; Sato, S.; Imokawa, G. Recharacterization of the Nonlesional Dry Skin in Atopic Dermatitis through Disrupted Barrier Function. *Exp. Dermatol.* **2004**, *3*, 282–292. [\[CrossRef\]](#)
36. Eberlein-König, B.; Schäfer, T.; Huss-Marp, J.; Darsow, U.; Möhrenschrager, M.; Herbert, O.; Abeck, D.; Krämer, U.; Behrendt, H.; Ring, J. Skin Surface PH, Stratum Corneum Hydration, Trans-Epidermal Water Loss and Skin Roughness Related to Atopic Eczema and Skin Dryness in a Population of Primary School Children. *Acta Derm. Venereol.* **2000**, *80*, 188–191. [\[CrossRef\]](#)
37. Kezic, S.; Kemperman, P.M.J.H.; Koster, E.S.; de Jongh, C.M.; Thio, H.B.; Campbell, L.E.; Irvine, A.D.; McLean, W.H.I.; Puppels, G.J.; Caspers, P.J. Loss-of-Function Mutations in the Filaggrin Gene Lead to Reduced Level of Natural Moisturizing Factor in the Stratum Corneum. *J. Investig. Dermatol.* **2008**, *128*, 2117–2119. [\[CrossRef\]](#)

38. Palmer, C.N.A.; Irvine, A.D.; Terron-Kwiatkowski, A.; Zhao, Y.; Liao, H.; Lee, S.P.; Goudie, D.R.; Sandilands, A.; Campbell, L.E.; Smith, F.J.D.; et al. Common Loss-of-Function Variants of the Epidermal Barrier Protein Filaggrin Are a Major Predisposing Factor for Atopic Dermatitis. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 441–446. [\[CrossRef\]](#)
39. Irvine, A.D. Fleshing Out Filaggrin Phenotypes. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 504–507. [\[CrossRef\]](#)
40. van den Bogaard, E.H.; Elias, P.M.; Goleva, E.; Berdyshev, E.; Smits, J.P.H.; Danby, S.G.; Cork, M.J.; Leung, D.Y.M. Targeting Skin Barrier Function in Atopic Dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2023**, *11*, 1335–1346. [\[CrossRef\]](#)
41. De Benedetto, A.; Rafaels, N.M.; McGirt, L.Y.; Ivanov, A.I.; Georas, S.N.; Cheadle, C.; Berger, A.E.; Zhang, K.; Vidyasagar, S.; Yoshida, T.; et al. Tight Junction Defects in Patients with Atopic Dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *127*, 773–786.e7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Darlenski, R.; Kozyrskyj, A.L.; Fluhr, J.W.; Caraballo, L. Association between Barrier Impairment and Skin Microbiota in Atopic Dermatitis from a Global Perspective: Unmet Needs and Open Questions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2021**, *148*, 1387–1393. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Francuzik, W.; Franke, K.; Schumann, R.R.; Heine, G.; Worm, M. Propionibacterium Acnes Abundance Correlates Inversely with Staphylococcus Aureus: Data from Atopic Dermatitis Skin Microbiome. *Acta Derm.-Venereol.* **2018**, *98*, 490–495. [\[CrossRef\]](#)
44. Lee, H.-J.; Kim, M. Skin Barrier Function and the Microbiome. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13071. [\[CrossRef\]](#)
45. Paller, A.S.; Kong, H.H.; Seed, P.; Naik, S.; Scharschmidt, T.C.; Gallo, R.L.; Luger, T.; Irvine, A.D. The Microbiome in Patients with Atopic Dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, *143*, 26–35. [\[CrossRef\]](#)
46. Simpson, E.L.; Villarreal, M.; Jepson, B.; Rafaels, N.; David, G.; Hanifin, J.; Taylor, P.; Boguniewicz, M.; Yoshida, T.; De Benedetto, A.; et al. Patients with Atopic Dermatitis Colonized with Staphylococcus Aureus Have a Distinct Phenotype and Endotype. *J. Investig. Dermatol.* **2018**, *138*, 2224–2233. [\[CrossRef\]](#)
47. Choi, M.J.; Maibach, H.I. Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2005**, *6*, 215–223. [\[CrossRef\]](#)
48. Fluhr, J.W.; Zuberbier, T.; Darlenski, R. Noninvasive Measures in Atopic Dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *18*, 417. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Caspers, P.J.; Lucassen, G.W.; Carter, E.A.; Bruining, H.A.; Puppels, G.J. In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles. *J. Investig. Dermatol.* **2001**, *116*, 434–442. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Yakimov, B.P.; Venets, A.V.; Schleusener, J.; Fadeev, V.V.; Lademann, J.; Shirshin, E.A.; Darvin, M.E. Blind Source Separation of Molecular Components of the Human Skin in Vivo: Non-Negative Matrix Factorization of Raman Microspectroscopy Data. *Analyst* **2021**, *146*, 3185–3196. [\[CrossRef\]](#)
51. Darvin, M.E.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Choe, C.-S. Current Views on Noninvasive in Vivo Determination of Physiological Parameters of the Stratum Corneum Using Confocal Raman Microspectroscopy. *Ski. Pharmacol. Physiol.* **2022**, *35*, 125–136. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Yunvuhore, R.; Tfayli, A.; Duplan, H.; Delalleau, A.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A. Raman Spectroscopy: A Tool for Biomechanical Characterization of Stratum Corneum. *J. Raman Spectrosc.* **2013**, *44*, 1077–1083. [\[CrossRef\]](#)
53. Choe, C.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Human Skin in Vivo Has a Higher Skin Barrier Function than Porcine Skin Ex Vivo—Comprehensive Raman Microscopic Study of the Stratum Corneum. *J. Biophotonics* **2018**, *11*, e201700355. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Rigal, A.; Michael-Jubeli, R.; Nkengne, A.; Baillet-Guffroy, A.; Bigouret, A.; Tfayli, A. Raman Confocal Microscopy and Biophysics Multiparametric Characterization of the Skin Barrier Evolution with Age. *J. Biophotonics* **2021**, *14*, e202100107. [\[CrossRef\]](#)
55. Choe, C.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Age Related Depth Profiles of Human Stratum Corneum Barrier-Related Molecular Parameters by Confocal Raman Microscopy in Vivo. *Mech. Ageing Dev.* **2018**, *172*, 6–12. [\[CrossRef\]](#)
56. Wohlrab, J.; Vollmann, A.; Wartewig, S.; Marsch, W.C.; Neubert, R. Noninvasive Characterization of Human Stratum Corneum of Undiseased Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis as Studied by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Biopolymers* **2001**, *62*, 141–146. [\[CrossRef\]](#)
57. Egawa, M.; Kunizawa, N.; Hirao, T.; Yamamoto, T.; Sakamoto, K.; Terui, T.; Tagami, H. In Vivo Characterization of the Structure and Components of Lesional Psoriatic Skin from the Observation with Raman Spectroscopy and Optical Coherence Tomography: A Pilot Study. *J. Dermatol. Sci.* **2010**, *57*, 66–69. [\[CrossRef\]](#)
58. Zolotas, M.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Meinke, M.C.; Kokolakis, G.; Darvin, M.E. Altered Structure Indicating Reduced Barrier Function of Lesional Compared to Non-Lesional Psoriatic Skin—A Non-Invasive in Vivo Study of the Human Stratum Corneum with Confocal Raman Micro-Spectroscopy. *Exp. Dermatol.* **2023**. [\[CrossRef\]](#)
59. O'Regan, G.M.; Kemperman, P.M.; Sandilands, A.; Chen, H.; Campbell, L.E.; Kroboth, K.; Watson, R.; Rowland, M.; Puppels, G.J.; McLean, W.H.; et al. Raman Profiles of the Stratum Corneum Define 3 Filaggrin Genotype-Determined Atopic Dermatitis Endophenotypes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *126*, 574–580.e1. [\[CrossRef\]](#)
60. González, F.J.; Alda, J.; Moreno-Cruz, B.; Martínez-Escanamé, M.; Ramírez-Eliás, M.G.; Torres-Álvarez, B.; Moncada, B. Use of Raman Spectroscopy for the Early Detection of Filaggrin-Related Atopic Dermatitis. *Ski. Res. Technol.* **2011**, *17*, 45–50. [\[CrossRef\]](#)
61. Mlitz, V.; Latreille, J.; Gardinier, S.; Jdid, R.; Drouault, Y.; Hufnagl, P.; Eckhart, L.; Guinot, C.; Tschachler, E. Impact of Filaggrin Mutations on Raman Spectra and Biophysical Properties of the Stratum Corneum in Mild to Moderate Atopic Dermatitis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2012**, *26*, 983–990. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

62. Richters, R.J.; Falcone, D.; Uzunbajakava, N.E.; Varghese, B.; Caspers, P.J.; Puppels, G.J.; van Erp, P.E.; van de Kerkhof, P.C. Sensitive Skin: Assessment of the Skin Barrier Using Confocal Raman Microspectroscopy. *Ski. Pharmacol. Physiol.* **2017**, *30*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
63. Dinish, U.S.; Yik Weng, Y.; Ram, K.V.; Bi, R.; Attia, A.B.E.; Valerie, T.X.; Rajarahm, P.; Tien Guan Thng, S.; Olivo, M. Non-Invasive Biochemical Analysis and Comparison of Atopic Dermatitis and Psoriasis Skin Using Handheld Confocal Raman Spectroscopy. *J. Biophotonics* **2023**, e202300191. [CrossRef] [PubMed]
64. Dev, K.; Ho, C.J.H.; Bi, R.; Yew, Y.W.; Dinish, U.S.; Attia, A.B.E.; Moothanchery, M.; Guan, S.T.T.; Olivo, M. Machine Learning Assisted Handheld Confocal Raman Micro-Spectroscopy for Identification of Clinically Relevant Atopic Eczema Biomarkers. *Sensors* **2022**, *22*, 4674. [CrossRef] [PubMed]
65. Janssens, M.; van Smeden, J.; Puppels, G.J.; Lavrijsen, A.P.; Caspers, P.J.; Bouwstra, J.A. Lipid to Protein Ratio Plays an Important Role in the Skin Barrier Function in Patients with Atopic Eczema. *Br. J. Dermatol.* **2014**, *170*, 1248–1255. [CrossRef]
66. Verzeaux, L.; Vyumvuhore, R.; Boudier, D.; Le Guillou, M.; Bordes, S.; Essendoubi, M.; Manfait, M.; Closs, B. Atopic Skin: In Vivo Raman Identification of Global Molecular Signature, a Comparative Study with Healthy Skin. *Exp. Dermatol.* **2018**, *27*, 403–408. [CrossRef]
67. Choe, C.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Depth Profiles of Hydrogen Bound Water Molecule Types and Their Relation to Lipid and Protein Interaction in the Human Stratum Corneum in Vivo. *Analyst* **2016**, *141*, 6329–6337. [CrossRef]
68. Choe, C.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Keratin-Water-NMF Interaction as a Three Layer Model in the Human Stratum Corneum Using in Vivo Confocal Raman Microscopy. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15900. [CrossRef]
69. Choe, C.; Ri, J.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. The Non-Homogenous Distribution and Aggregation of Carotenoids in the Stratum Corneum Correlates with the Organization of Intercellular Lipids in Vivo. *Exp. Dermatol.* **2019**, *28*, 1237–1243. [CrossRef]
70. Paquin, R.; Colombari, P. Nanomechanics of Single Keratin Fibres: A Raman Study of the Alpha-Helix \rightarrow beta-Sheet Transition and the Effect of Water. *J. Raman Spectrosc.* **2007**, *38*, 504–514. [CrossRef]
71. Vyumvuhore, R.; Tfayli, A.; Duplan, H.; Delalleau, A.; Manfait, M.; Baillet-Guffroy, A. Effects of Atmospheric Relative Humidity on Stratum Corneum Structure at the Molecular Level: Ex Vivo Raman Spectroscopy Analysis. *Analyst* **2013**, *138*, 4103–4111. [CrossRef] [PubMed]
72. Bragulla, H.H.; Homberger, D.G. Structure and Functions of Keratin Proteins in Simple, Stratified, Keratinized and Cornified Epithelia. *J. Anat.* **2009**, *214*, 516–559. [CrossRef] [PubMed]
73. Akhtar, W.; Edwards, H.G. Fourier-Transform Raman Spectroscopy of Mammalian and Avian Keratotic Biopolymers. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1997**, *53A*, 81–90. [CrossRef] [PubMed]
74. Sun, Q. Local Statistical Interpretation for Water Structure. *Chem. Phys. Lett.* **2013**, *568*, 90–94. [CrossRef]
75. Schleusener, J.; Salazar, A.; von Hagen, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Retaining Skin Barrier Function Properties of the Stratum Corneum with Components of the Natural Moisturizing Factor-A Randomized, Placebo-Controlled Double-Blind In Vivo Study. *Molecules* **2021**, *26*, 1649. [CrossRef] [PubMed]
76. Proksch, E.; Fölster-Holst, R.; Jensen, J.-M. Skin Barrier Function, Epidermal Proliferation and Differentiation in Eczema. *J. Dermatol. Sci.* **2006**, *43*, 159–169. [CrossRef]
77. Zhang, L.; Cambron, T.; Niu, Y.; Xu, Z.; Su, N.; Zheng, H.; Wei, K.; Ray, P. MCR Approach Revealing Protein, Water, and Lipid Depth Profile in Atopic Dermatitis Patients' Stratum Corneum via in Vivo Confocal Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 2784–2790. [CrossRef]
78. Imokawa, G. Cutting Edge of the Pathogenesis of Atopic Dermatitis: Sphingomyelin Deacylase, the Enzyme Involved in Its Ceramide Deficiency, Plays a Pivotal Role. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1613. [CrossRef]
79. Clausen, M.-L.; Kezic, S.; Olesen, C.M.; Agner, T. Cytokine Concentration across the Stratum Corneum in Atopic Dermatitis and Healthy Controls. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21895. [CrossRef]
80. Danso, M.; Boiten, W.; van Drongelen, V.; Gmelig Meijling, K.; Gooris, G.; El Ghalbzouri, A.; Absalah, S.; Vreeken, R.; Kezic, S.; van Smeden, J.; et al. Altered Expression of Epidermal Lipid Bio-Synthesis Enzymes in Atopic Dermatitis Skin Is Accompanied by Changes in Stratum Corneum Lipid Composition. *J. Dermatol. Sci.* **2017**, *88*, 57–66. [CrossRef]
81. Sho, Y.; Sakai, T.; Sato, T.; Sonezaki, M.; Taima, H.; Taguchi, H.; Kaizu, K.; Nishizaka, T.; Takagi, Y.; Hatano, Y. Stratum Corneum Ceramide Profiles Provide Reliable Indicators of Remission and Potential Flares in Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2022**, *142*, 3184–3191.e7. [CrossRef] [PubMed]
82. Ho, Q.W.C.; Zheng, X.; Ali, Y. Ceramide Acyl Chain Length and Its Relevance to Intracellular Lipid Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9697. [CrossRef] [PubMed]
83. Li, Q.; Fang, H.; Dang, E.; Wang, G. The Role of Ceramides in Skin Homeostasis and Inflammatory Skin Diseases. *J. Dermatol. Sci.* **2020**, *97*, 2–8. [CrossRef] [PubMed]
84. Pullmannová, P.; Pavlíková, L.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Školová, B.; Šlepička, P.; Maixner, J.; Zbytovská, J.; Vávrová, K. Permeability and Microstructure of Model Stratum Corneum Lipid Membranes Containing Ceramides with Long (C16) and Very Long (C24) Acyl Chains. *Biophys. Chem.* **2017**, *224*, 20–31. [CrossRef]
85. Mojudar, E.H.; Helder, R.W.J.; Gooris, G.S.; Bouwstra, J.A. Monounsaturated Fatty Acids Reduce the Barrier of Stratum Corneum Lipid Membranes by Enhancing the Formation of a Hexagonal Lateral Packing. *Langmuir* **2014**, *30*, 6534–6543. [CrossRef]

86. Kake, T.; Imai, M.; Takahashi, N. Effects of β -Carotene on Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis in Hairless Mice. *Exp. Dermatol.* **2019**, *28*, 1044–1050. [\[CrossRef\]](#)
87. Zhang, Y.; Heinemann, N.; Rademacher, F.; Darvin, M.E.; Raab, C.; Keck, C.M.; Vollert, H.; Fluhr, J.W.; Gläser, R.; Harder, J.; et al. Skin Care Product Rich in Antioxidants and Anti-Inflammatory Natural Compounds Reduces Itching and Inflammation in the Skin of Atopic Dermatitis Patients. *Antioxidants* **2022**, *11*, 1071. [\[CrossRef\]](#)
88. Nouwen, A.E.M.; Karadavut, D.; Pasmans, S.G.M.A.; Elbert, N.J.; Bos, L.D.N.; Nijsten, T.E.C.; Arends, N.J.T.; Pijnenburg, M.W.H.; Koljenović, S.; Puppels, G.J.; et al. Natural Moisturizing Factor as a Clinical Marker in Atopic Dermatitis. *Allergy* **2020**, *75*, 188–190. [\[CrossRef\]](#)
89. Ekanayake-Mudiyanselage, S.; Jensen, J.-M.; Proksch, E.; Aschauer, H.; Schmook, F.P.; Meingassner, J.G. Expression of Epidermal Keratins and the Cornified Envelope Protein Involucrin Is Influenced by Permeability Barrier Disruption. *J. Investig. Dermatol.* **1998**, *111*, 517–523. [\[CrossRef\]](#)
90. Totsuka, A.; Omori-Miyake, M.; Kawashima, M.; Yagi, J.; Tsunemi, Y. Expression of Keratin 1, Keratin 10, Desmoglein 1 and Desmocollin 1 in the Epidermis: Possible Downregulation by Interleukin-4 and Interleukin-13 in Atopic Dermatitis. *Eur. J. Dermatol.* **2017**, *27*, 247–253. [\[CrossRef\]](#)
91. Altrichter, S.; Kriehuber, E.; Moser, J.; Valenta, R.; Kopp, T.; Stingl, G. Serum IgE Autoantibodies Target Keratinocytes in Patients with Atopic Dermatitis. *J. Investig. Dermatol.* **2008**, *128*, 2232–2239. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Choe, C.; Choe, S.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Modified Normalization Method in in Vivo Stratum Corneum Analysis Using Confocal Raman Microscopy to Compensate Nonhomogeneous Distribution of Keratin. *J. Raman Spectrosc.* **2019**, *50*, 945–957. [\[CrossRef\]](#)
93. Fitzpatrick, T.B. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I through VI. *Arch. Dermatol.* **1988**, *124*, 869–871. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Hanifin, J.M.; Thurston, M.; Omoto, M.; Cherill, R.; Tofte, S.J.; Graeber, M.; Evaluator Group, T.E. The Eczema Area and Severity Index (EASI): Assessment of Reliability in Atopic Dermatitis. *Exp. Dermatol.* **2001**, *10*, 11–18. [\[CrossRef\]](#)
95. Crowther, J.M.; Sieg, A.; Blenkinsop, P.; Marcott, C.; Matts, P.J.; Kaczvinsky, J.R.; Rawlings, A.V. Measuring the Effects of Topical Moisturizers on Changes in Stratum Corneum Thickness, Water Gradients and Hydration in Vivo. *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 567–577. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

1. Zolotas M, Schleusener J, Lademann J, Meinke MC, Kokolakis G, Darvin ME. Altered structure indicating reduced barrier function of lesional compared to non-lesional psoriatic skin-A non-invasive in vivo study of the human stratum corneum with confocal Raman micro-spectroscopy. *Exp Dermatol*. 2023 Oct;32(10):1763-1773. doi: 10.1111/exd.14895. Epub 2023 Aug 4. PMID: 37540053.
2. Zolotas M, Schleusener J, Lademann J, Meinke MC, Kokolakis G, Darvin ME. Atopic Dermatitis: Molecular Alterations between Lesional and Non-Lesional Skin Determined Noninvasively by In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy. *Int J Mol Sci*. 2023 Sep 27;24(19):14636. doi: 10.3390/ijms241914636. PMID: 37834083; PMCID: PMC10572245.

Danksagung

Hier möchte ich allen Personen meinen herzlichen Dank aussprechen, die mich auf dem Weg zur Vervollständigung meiner Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Dr. Jürgen Lademann, bedanken, der mir diese Dissertationsarbeit ermöglicht hat und durch seine wertvolle Erfahrung und unterstützende Weitsicht meine Promotion bereichert hat.

Dr. Maxim Darwin, meinem Betreuer, bin ich herzlich dankbar. Seine umfassende Expertise, engagierte Betreuung und motivierende Unterstützung waren unabdingbar für den erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation.

Dr. Johannes Schleusener danke ich für seine unverzichtbare Unterstützung und wertvollen Beiträge, die einen bedeutenden Einfluss auf meine Forschungsarbeit hatten.

Des Weiteren möchte ich PD Dr. Georgios Kokolakis für seine Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und für die anregenden Gespräche bedanken, die zur Entwicklung meiner Forschungsideen beigetragen haben.

Prof. Dr. Martina Meinke möchte ich herzlichen Dank für Ihre Unterstützung und ermutigenden Worte aussprechen, die meine Arbeit auf ein höheres Niveau gehoben haben.

Ebenso möchte ich mich beim gesamten Team des Zentrums für Hautphysiologie der Charité sowie bei allen Assistenzärzten/innen der Dermatologie, die mich bei der Patientenrekrutierung unterstützt haben, für ihre kollegiale Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden herzlich bedanken. Meinen Eltern, Désirée Eugenia Hildegard von Kalckreuth-Zolotas und Dr. Georgios Zolotas, habe ich meine Ausbildung, meinen Werdegang und bedingungslose Unterstützung zu verdanken. Meiner Schwester, Danae Evangelia Zolotas, bin ich für die ständige Unterstützung und Ermutigung dankbar. Gleiches gilt für Emanuel Reitemeyer, dessen Hilfe ich äußerst schätze. Zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin, Sepide Shirkhani, für ihre Geduld, ihre Zusprüche und ihre Unterstützung bedanken.