

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Prof. Dr. med. M. P. Schön)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Auswirkungen der
Hautbarrierestörung in Filaggrin- und
Hornerin(*FlgHrnr*)-defizienten
Mäusen auf den atopischen Marsch**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Konstantin Reier

aus

Omsk, Russland

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. W. Brück
Referent:	Prof. Dr. M. P. Schön
Korreferent:	Prof. Dr. H. Reichardt
Drittreferent:	Prof. Dr. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 17. März 2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel **"Auswirkungen der Hautbarrierestörung in Filaggrin- und Hornerin(*FlgHrrr*)-defizienten Mäusen auf den atopischen Marsch"** eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 24. Februar 2021

.....

Konstantin Reier

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Reier K, Brauns B, Lorenz VN, Mempel M, Schön MP, Braun A (2017): 105 An acute AD-like phenotype facilitates allergen sensitization and aggravates experimental asthma in barrier-impaired FlgHrrn^{-/-} mice. *J Invest Dermatol* 137, S210

Reier K, Brauns B, Lorenz VN, Mempel M, Schön MP, Braun A (2017): 44th Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) Göttingen, Germany, March 9–11, 2017. *Exp Dermatol* 26, E1-115

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Haut als Grenzfläche zur Umwelt.....	1
1.1.1 Aufbau und Funktion	1
1.1.2 Die Epidermis	2
1.1.3 Die epidermale Differenzierung.....	2
1.1.4 Filaggrin und Hornerin: Komponenten der Hautbarriere	3
1.2 Erkrankungen des atopischen Formenkreises	5
1.2.1 Atopische Dermatitis	5
1.2.2 Asthma bronchiale	7
1.2.3 Der atopische Marsch.....	8
1.3 Atopie im Mausmodell	9
1.3.1 Gängige <i>In-vivo</i> -Modelle	9
1.3.2 Möglichkeiten und Grenzen	10
1.4 Zielsetzung.....	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.2 Reagenzien, Chemikalien und Lösungen.....	14
2.1.3 Software	17
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung	18
2.2.2 Tierexperimentelle Eingriffe.....	18
2.2.3 Behandlungsprotokoll zur Induktion allergischer Atemwegserkrankungen.....	20
2.2.4 Behandlungsprotokolle zur Auslösung einer <i>AD-like</i> -Dermatitis	21
2.2.5 Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	22
2.2.6 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	25
2.2.7 Histologische Aufarbeitung und Färbung: HE und PAS	26
2.2.8 Statistische Auswertung.....	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Auswirkung einer <i>AD-like</i> -Dermatitis während der Sensibilisierungsphase auf den atopischen Marsch.....	32
3.1.1 <i>AD-like</i> -Dermatitis führt bei <i>FlgHmr^{-/-}</i> -Mäusen zu ausgeprägter Reaktion im <i>Mouse-ear-swelling</i> -Test.....	32

3.1.2	<i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäuse mit <i>AD-like</i> -Läsionen weisen erhöhte Serumspiegel von OVA-IgG ₁ und Gesamt-IgE nach systemischer OVA-Sensibilisierung auf	34
3.1.3	Zeitgleiche Auslösung einer Hautentzündung und Antigen-Sensibilisierung bewirkt eine Zunahme von Entzündungszellen in der BAL	37
3.1.4	<i>AD-like</i> -Dermatitis induziert eine leicht erhöhte Becherzellhyperplasie nach inhalativer OVA-Provokation.....	39
3.1.5	Kein vermehrtes pulmonales Infiltrat nach inhalativer OVA- <i>Challenge</i>	39
3.1.6	Anstieg des TSLP-Serumspiegels nach inhalativer OVA- <i>Challenge</i>	40
3.2	<i>AD-like</i> -Dermatitis in der <i>Challenge</i> -Phase	42
3.2.1	Ausgeprägtere Reaktion von <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} im <i>Mouse-ear-swelling</i> -Test auch bei Kurzzeitanwendung von MC903	42
3.2.2	Geringer Anstieg der Serumspiegel von OVA-spezifischem IgG1 und Gesamt-IgE nach systemischer OVA-Sensibilisierung	43
3.2.3	Parallel zur OVA- <i>Challenge</i> verlaufende Hautkontakte zu MC903 haben einen geringen Anstieg von Entzündungszellen in der BAL zur Folge	44
4	Diskussion	46
4.1	Folgen einer barrieregeschädigten Haut für das lokale Entzündungsgeschehen	46
4.2	Sensibilisierung von <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäusen im OVA-Asthma-Modell.....	48
4.3	Symptomschwere von <i>FlgHrrr</i> -defizienten Tieren im OVA-Asthma-Modell.....	50
4.4	TSLP-Expression in <i>FlgHrrr</i> -defizienter Haut und Folgen für die Asthma-Entwicklung	51
4.5	Einfluss von MC903 auf die Asthma-Provokationsphase	53
4.6	Ausblick: Klinische Konsequenzen und Fragen nach Präventionsmöglichkeiten.....	54
4.7	Fazit	55
5	Zusammenfassung.....	57
6	Anhang	58
7	Literaturverzeichnis	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Protokoll zur Induktion eines experimentellen Asthma bronchiale	20
Abbildung 2: Auslösung einer AD-like Dermatitis während der Sensibilisierung	22
Abbildung 3: „Provokationsmodell“	22
Abbildung 4: Beispiel eines Zytospin-Präparats	25
Abbildung 5: Lungenhistologie PAS, Becherzellhyperplasie	29
Abbildung 6: Lungenhistologie HE, pulmonales Zellinfiltrat	30
Abbildung 7: Hautläsion nach MC903-Applikation, aufgenommen 18 Tage nach Erstkontakt (d14)	33
Abbildung 8: Zunahme der Schwellung von Mäuseohren nach wiederholtem Kontakt mit MC903	34
Abbildung 9: OVA-IgG1 Serumspiegel bei mit OVA oder PBS sensibilisierten Mäusen	35
Abbildung 10: Gesamt-IgE-Serumkonzentrationen bei mit OVA oder PBS sensibilisierten Mäusen.....	37
Abbildung 11: Zellzählungen in BAL nach OVA- und PBS-Provokation	38
Abbildung 12: Becherzellhyperplasien nach inhalativer OVA- oder PBS-Provokation	39
Abbildung 13: Pulmonales Zellinfiltrat nach inhalativer OVA- oder PBS-Provokation	40
Abbildung 14: TSLP-Serumspiegel.....	41
Abbildung 15: Zunahme der Schwellung von Mäuseohren nach wiederholtem Kontakt mit MC903	49
Abbildung 16: OVA-IgG1-Serumkonzentrationen nach intraperitonealer Sensibilisierung mit OVA oder PBS.....	43
Abbildung 17: Gesamt-IgE-Serumkonzentrationen bei mit OVA oder PBS sensibilisierten Mäusen.....	44
Abbildung 18: Zellzählungen in BAL nach intrapulmonaler OVA- oder PBS-Provokation.....	45
Abbildung A1: Epikutanen OVA-Asthma Modell.....	58
Abbildung A2: OVA-IgG1- und IgE-Serumspiegel im epikutanen OVA-Asthma-Modell.....	58
Abbildung A3: BAL im epikutanen OVA-Asthma-Modell.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte.....	13
Tabelle 2: Übersicht der Verbrauchsmaterialien.....	14
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Reagenzien und Chemikalien	14
Tabelle 4: ELISA-Systeme	16
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Lösungen für den OVA-IgG1-ELISA	16
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen.....	16
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Softwareprodukte.....	17
Tabelle 8: OVA-Asthma-Modell.....	20
Tabelle 9: Induktion einer <i>AD-like</i> -Dermatitis	22
Tabelle 10: Färbeprotokoll PAS.....	27
Tabelle 11: Färbeprotokoll HE	28
Tabelle 12: Beurteilung von Becherzellhyperplasien	28
Tabelle 13: Beurteilung des pulmonalen Zellinfiltrates	30
Tabelle A1: Epikutanen OVA-Asthma-Modell.....	58

Abkürzungsverzeichnis

AD	atopische Dermatitis
AE	atopisches Ekzem
Alum	Aluminiumhydroxid
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
CE	<i>cornified envelope</i>
d	<i>day</i> (Tag)
EDC	<i>epidermal differentiation complex</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
<i>Flg</i>	Filaggrin
HE	Hämatoxylin-Eosin
<i>Hmr</i>	Hornerin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
IV	Ichthyosis Vulgaris
IVC	<i>individually ventilated cage</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MC903	Calcipotriol
NMF	<i>natural moisturizing factor</i>
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAS	<i>periodic acid-Schiff</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
p. i.	per inhalationem
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SPF	<i>specific pathogen free</i>
Th1/Th2	Subpopulationen CD4-positiver T-Helferzellen
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
U	Umdrehungen
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die Haut als Grenzfläche zur Umwelt

1.1.1 Aufbau und Funktion

Die Haut (lat. *Cutis*) ist das flächenmäßig größte Organ nicht nur des Menschen, sondern sämtlicher Säugetiere. Sie besteht aus einem epithelialen (*Epidermis*) und bindegewebigen Anteil (*Dermis*) sowie den Hautanhangsgebilden. Von einer darunter liegenden Schicht aus Fett- und Bindegewebe (*Subcutis*) wird sie an tiefer gelegenen Körperstrukturen verankert (Lüllmann-Rauch 2009, S. 526) Die Haut eines erwachsenen Menschen ist durchschnittlich 2 m² groß und wiegt ohne Unterhautfettgewebe etwa 3 kg (Schiebler und Korf 2007, S. 214). Die Haut ist ein komplexes Organ und Träger vielfältiger, zum Teil lebensnotwendiger Funktionen. Essenziell und in dieser Arbeit von besonderer Relevanz ist ihre Rolle als Barriere zwischen dem Organismus und seiner Umwelt. Eine ihrer wesentlichen Aufgaben besteht im Schutz vor Krankheitserregern und weiteren schädigenden Umwelteinflüssen, seien diese mechanischer, thermischer oder chemischer Art. Hierzu trägt nicht bloß ihre komplexe zelluläre Architektur bei. Auch von ihr sezernierte Substanzen halten den pH-Wert der Hautoberfläche konstant im sauren Bereich und bilden derart einen schützenden Säuremantel. Auf diesem Wege werden alkalische Produkte neutralisiert und die Vermehrung von Keimen behindert. Ferner vermitteln in der Haut gelegene Langerhans-Zellen, Mastzellen, Lymphozyten und weitere Zellen zahlreiche Immunprozesse. Zugleich wirkt die Haut einem Wasser- und Elektrolytverlust des Organismus entgegen. Auf diese Weise lässt sich die Haut als eine in beide Richtungen funktionierende Barriere verstehen. Ihr Zweck liegt jedoch nicht nur in der bloßen Abgrenzung. Auch ein Austausch mit der Umwelt findet über die Haut statt. Über eine Vielzahl von Schweißdrüsen und die Variation der Durchblutung nimmt sie entscheidend an der Thermoregulation des Körpers teil. Hochspezialisierte Sinnesorgane und Nervenendigungen dienen der Aufnahme äußerer Reize, erfassen Schmerz, Temperatur oder Berührung und leiten die Signale zur Verarbeitung an das zentrale Nervensystem weiter. Nicht zuletzt trägt die Haut auch zum Hormonhaushalt bei und ist eine wichtige Station bei der Synthese von Vitamin D. Auf diese Weise erbringt sie wichtige Leistungen für den Gesamtorganismus - jedoch bedingen exponierte Lage, Komplexität und Aufgabenvielfalt auch eine gewisse Störanfälligkeit und machen sie zum Ausgangspunkt zahlreicher Erkrankungen. Aus medizinisch-diagnostischer Sicht hat die Haut einen kaum zu unterschätzenden Stellenwert, denn ihr Erscheinungsbild gibt dem Betrachter Aufschlüsse über das körperliche und seelische Befinden des Besitzers.

1.1.2 Die Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel und bildet die eigentliche Grenzfläche des Organismus zur Umwelt. Sie besteht zu etwa 95% aus Keratinozyten (Yaar und Gilchrest 2001). Zu einem kleineren Teil finden sich auch antigenpräsentierende Langerhans-Zellen, Melanozyten, Merkel-Zellen und Lymphozyten in ihr. Die Epidermis ist frei von Gefäßen und wird per Diffusion aus der darunter gelegenen Dermis versorgt (Lüllmann-Rauch 2009, S. 526f.). Histologisch besteht sie aus vier Zellschichten. Von basal nach superfiziell sind dies die Basalzellschicht (*Stratum basale*), die Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*), die Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*) sowie die äußere Hornschicht (*Stratum corneum*). Mitunter wird zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* palmarer und plantarer Haut noch die Glanzschicht (*Stratum lucidum*) beschrieben. Die Epidermis ist einem permanenten Regenerationsprozess unterworfen, der beim Menschen etwa 28 und bei der Maus bis zu 10 Tage in Anspruch nimmt (Potten et al. 1987; Iizuka 1994). Hierzu gehen aus undifferenzierten, mitotisch aktiven Progenitorzellen der Basalzellschicht lebenslang neue Keratinozyten hervor (Lüllmann-Rauch 2009, S. 529). Diese durchlaufen bei ihrer Wanderung bis zum *Stratum corneum* strukturelle und metabolische Veränderungen, an deren Ende der Untergang der lebenden Zelle, ihre Eingliederung in die Hornschicht und schließlich ihre Abschilferung von der Hautoberfläche stehen. Sämtliche Schritte erfolgen dabei sequenziell, in einem zeitlich und örtlich genauestens aufeinander abgestimmten Prozess und sind durch die Expression der dafür notwendigen Proteine charakterisiert (Candi et al. 2005). Das auf diese Weise entstehende *Stratum corneum* besteht schließlich je nach Körperregion aus etwa 9 bis 25 Lagen komprimierter, plättchenartiger und keratinreicher Keratinozyten (Wickett und Visscher 2006). Mit Ausnahme der Leistenhaut an Handinnenflächen und Fußsohlen weist die Hornschicht zwar lediglich eine Dicke von etwa 13 – 21 µm auf (Böhling et al. 2014). Dennoch ist sie ein integraler Bestandteil der Haut und stellt das eigentliche Ziel der epidermalen Differenzierung dar (Lüllmann-Rauch 2009, S. 528).

1.1.3 Die epidermale Differenzierung

Im Laufe ihrer Differenzierung tauchen in den noch vitalen Keratinozyten Syntheseprodukte auf, die sich in den lichtmikroskopisch sichtbaren Keratohyalingranula zusammenlagern und namensgebend für das *Stratum granulosum* sind (Lüllmann-Rauch 2009, S. 530). Diese Granula enthalten typischerweise eine Mischung aus Zytokeratinfilamenten und weiteren Strukturproteinen (Freeman und Sonthalia 2019). Je nach vorherrschender Proteinklasse wird dabei zwischen F- und L-Granula unterschieden. Größere, irregulär geformte F-Granula setzen sich vornehmlich aus Profilaggrin zusammen - kleinere, zumeist in der Peripherie der Keratinozyten gelegene L-Granula enthalten Loricrin (Steven et al. 1990). Die Interaktion dieser Strukturproteine ermöglicht die morphologische Transformation der Keratinozyten.

Mit dem Eintritt der Zelle ins Stratum corneum wird Profilaggrin in Filaggrin-Monomere gespalten (Brown und Irwin McLean 2012). Die entstandenen Spaltprodukte interagieren mit Bestandteilen des Zytoskeletts und führen zur Aggregation von Zytokeratinfilamenten. Die Zellen werden dabei stark komprimiert, abgeflacht und horizontal gedehnt. Die auf diese Weise entstehenden Korneozyten besitzen weder Zellkern noch andere Organellen und sind vollständig von Keratin ausgefüllt. Ihre ursprüngliche Zellmembran wird durch den sogenannten *cornified cell envelope* (CE) ersetzt. Verschiedene Proteine lagern sich hierzu der Innenseite der Zellmembran an und werden über Transaminasen kovalent mit dieser und dem Keratingerüst verbunden. Die Doppellipidmembran der Zellen wird schließlich durch eine einschichtige Lage polarer Lipide ersetzt (Lüllmann-Rauch 2009, S. 529f.).

Der entstandene CE besteht zu 80% aus Loricrin, 8% SPR (*small proline-rich proteins*) und 6% Filaggrin (Candi et al. 2005). Umliegende Zwischenzellräume werden von Lipiden ausgekleidet. Dabei handelt es sich vornehmlich um Phospholipide, Sphingolipide, Cholesterin und freie Fettsäuren (Joshi 2014). Sie werden ebenfalls von Keratinozyten synthetisiert, in kleinen Lamellenkörperchen (*odland bodies*) gespeichert und schließlich exozytotisch in den Interzellularraum des Stratum corneum freigesetzt (Lüllmann-Rauch 2009, S. 530). Die Hornzellschicht ist charakterisiert durch eine kompakte Struktur und Lipophilie. Diese verhindern den transepidermalen Wasserverlust (TEWL) und bieten Schutz vor übermäßiger Penetration wasserlöslicher Substanzen (Lüllmann-Rauch 2009, S. 530).

1.1.4 Filaggrin und Hornerin: Komponenten der Hautbarriere

Strukturproteine wie Filaggrin (abgeleitet von „Filamente aggregierendes Protein“) und Hornerin sind entscheidend am epidermalen Differenzierungsprozess und folglich am Aufbau einer intakten Hautbarriere beteiligt (Marenholz et al. 2001; Henry et al. 2011). Ihre genetische Information befindet sich auf dem Chromosom 1q21 (Compton et al. 2002) im sogenannten epidermalen Differenzierungskomplex (EDC), einer Region, die auch für viele weitere Strukturproteine, wie etwa Involucrin, Loricrin oder die Gruppe der S100-Proteine kodiert (Marenholz et al. 2001). Mutationen in Genen des EDC haben Störungen der epidermalen Integrität zur Folge und konnten bereits mit verbreiteten Hauterkrankungen wie der Psoriasis (Heller-Milev et al. 2000), der Ichthyosis vulgaris (Smith et al. 2006) oder der atopischen Dermatitis in Verbindung gebracht werden (Barnes 2010).

LOF-Mutationen im *Fil*-Gen sind mit Ichthyosis vulgaris (IV) assoziiert (Smith et al. 2006). Diese ist durch trockene, schuppige Haut, verminderte Talgproduktion (Sebostase) und Hyperlinearität der Handinnenflächen und Fußsohlen charakterisiert. Bei stärkeren Ausprägungsgraden (insbesondere bei homozygoten Mutationsträgern) kann sich die Haut gefeldert darstellen und die Schuppen einen bräunlich-schwarzen Farbton annehmen (Altmeyers Enzyklopädie 2016). Die Ichthyosis vulgaris ist häufig mit atopischer Dermatitis assoziiert, für welche heterozygote *Fil*-Nullmutationen der bislang bedeutendste Risikofaktor sind (Sandilands et al. 2006; Smith et al. 2006). Da LOF-Mutationen im *Fil*-

Gen sowohl nicht-entzündliche (IV) als auch entzündliche Erkrankungen (AD) bedingen können, ist anzunehmen, dass auf die komplexe Pathogenese der AD noch weitere exo- und/oder endogene Faktoren einwirken. Viele, jedoch nicht alle Symptome beider Erkrankungen lassen sich dennoch aus der Funktion von Strukturproteinen wie Filaggrin und Hornerin ableiten.

1.1.4.1 Filaggrin

Das hochmolekulare Profilaggrin (ca. 400 kDa) ist der Vorläufer des Filaggrins und bildet den Hauptbestandteil der Keratohyalingranula der epidermalen Granularzellschicht (Brown und Irwin McLean 2012). Es besteht aus insgesamt zehn bis zwölf repetitiven Filaggrin-Einheiten sowie je einem C- und N-Terminus, die Aufgaben bei der weiteren Prozessierung erfüllen (Sandilands et al. 2009). Profilaggrin ist vielfach phosphoryliert und stark hydrophob. Seine biochemischen Eigenschaften ermöglichen die kompakte Organisation der Keratohyalingranula und wirken zudem einer vorzeitigen Assoziation mit Keratinfilamenten entgegen (Lonsdale-Eccles et al. 1982).

Mit zunehmender Differenzierung der Keratinozyten zerfallen die Keratohyalingranula infolge eines Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle (Vičanová et al. 1998). Was folgt, ist der schrittweise proteolytische Abbau von Profilaggrin. Dabei zunächst freiwerdende Filaggrin-Monomere (37 kDa) interagieren mit Bestandteilen des Zytoskeletts, dessen Kondensation zur Abflachung der Zelle führt (Sandilands et al. 2009). Gemeinsam mit anderen Strukturproteinen wie Loricrin, Involucrin und Hornerin werden anschließend weitere Filaggrin-Monomere dem CE angelagert. Dieser Vorgang erfolgt über membrangebundene, kalziumabhängige Transaminasen (Henry et al. 2011). Schließlich wird auf diese Weise die Zellmembran der Keratinozyten zugunsten eines dichten Proteinkomplexes ausgetauscht (Candi et al. 2005).

Der entstandene CE ist ein Charakteristikum der oberen Hornzellschicht. Seine kompakte Struktur und Hydrophobie verleihen den Keratinozyten Festigkeit, verhindern unkontrollierten Wasserverlust und bieten Schutz vor der Absorption wasserlöslicher Umweltstoffe (Brown und Irwin McLean 2012). Im oberen Stratum granulosum werden einzelne Filaggrin-Monomere weiter aufgespalten und die entstehenden Aminosäuren zu Pyrrolidincarboxylat (PCA) und trans-Urocaninsäure (trans-UCA) degradiert (McAleer und Irvine 2013). Als *natural moisturizing factors* (NMF) dienen diese der Bindung von körpereigenem und atmosphärischem Wasser (Rawlings und Harding 2004), der Aufrechterhaltung eines optimalen Haut-pH und der natürlichen Photoprotektion (Mildner et al. 2010).

1.1.4.2 Hornerin

Hornerin ist ebenfalls ein Protein der epidermalen Differenzierung und weist ein Molekulargewicht von 280 kDa auf (Henry et al. 2011). Seine Erstbeschreibung in Maushaut erfolgte 2001 (Makino et al. 2001). Die Funktionen von Hornerin sind weniger gut erforscht

als die des bereits länger bekannten Filaggrins. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft und der benachbarten genetischen Lokalisation wurden jedoch ähnliche Funktionen beider Proteine postuliert (Makino et al. 2001). Hornerin gehört, wie auch Filaggrin, zur Familie der S100-*fused*-Proteine des EDC. Große Übereinstimmungen der Primärstruktur und die repetitive Sequenz legen nahe, dass Hornerin ein Vorläuferprotein ist, das bei der epidermalen Differenzierung proteolytisch gespalten wird. Seine Expression in Keratinozyten erfolgt vergleichsweise spät. Immunhistochemische Färbungen konnten Hornerin insbesondere in der Peripherie von Keratohyalin granula des oberen Stratum granulosum nachweisen. Weiterhin findet sich Hornerin im gesamten CE der Hornzellschicht (Henry et al. 2011).

1.2 Erkrankungen des atopischen Formenkreises

Atopie (griechisch *ατοπία*, *atopía* = Ortlosigkeit) beschreibt die Neigung eines Organismus zu immunologischen Überempfindlichkeitsreaktionen im Sinne einer Allergie vom Soforttyp (Typ-I-Allergie). Charakteristisch ist die gesteigerte Bildung von Immunglobulin E infolge eines Kontakts mit *per se* ungefährlichen Umweltstoffen wie etwa Hausstaubmilbenkot, Pollen, Tierhaaren oder Schimmelpilzen. Allergien führen zu chronischen Entzündungen des Organismus an seinen Grenzen zur Umwelt. Typische Manifestationsorte sind die Haut (atopische Dermatitis), der Gastrointestinaltrakt (Lebensmittelallergie) sowie die Schleimhaut der Luftwege (allergisches Asthma bronchiale, Rhinitis allergica). Bei der Atopie handelt sich um eine polygenetisch bedingte Prädisposition (Johansson et al. 2001). Zugleich verdeutlicht der weltweite Anstieg der Prävalenz von Atopien, welchen Stellenwert Umweltfaktoren bei der Pathogenese haben (Burbank et al. 2017; Bonamonte et al. 2019).

1.2.1 Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine chronisch inflammatorische Hauterkrankung mit ekzematösen Hautläsionen, Juckreiz und trockener Haut. Charakteristisch ist ihr schubhafter Verlauf (Thomsen 2014). Die AD zählt zu den verbreitetsten Hauterkrankungen unter Neugeborenen und Kindern und manifestiert sich meist in den ersten sechs Lebensmonaten (Bonifazi und L Meneghini 1989). In Industrienationen beträgt ihre Prävalenz bei Kindern ca. 15-20%, bei Erwachsenen etwa 1-3% (Henry et al. 2011). Mit steigendem Alter wird oftmals eine spontane Remission beobachtet (Thomsen 2014). Die Ätiologie der Erkrankung ist komplex und nicht abschließend geklärt. Diskutiert wird ein Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren. Typisch sind exogene Auslöser (Provokationsfaktoren, *trigger*) wie Staub, Wärme, Stress oder mechanische Irritation, die für Erstmanifestation und Erkrankungsschübe verantwortlich sein sollen (Kantor und Silverberg 2017). Betroffene weisen zudem häufig eine positive Familienanamnese für Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis auf (Apfelbacher et al. 2011). Insbesondere Mutationen des *Filg*-Gens gelten in diesem Sinne als bedeutsam und wurden vielfach mit einer

erhöhten Auftretswahrscheinlichkeit und Schwere der AD in Verbindung gebracht (Marenholz et al. 2006; Palmer et al. 2006; Weidinger et al. 2006; Barker et al. 2007). Bei etwa einem Drittel aller europäisch-kaukasischen Patienten lassen sich die Allelvarianten R501X und 2282del4 nachweisen (Rodriguez et al., 2009). Weiterhin konnten jüngst auch Assoziationen der AD zu Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) im *Hrrnr*-Gen (Esparza-Gordillo et al. 2009) sowie genetischer Varianten der Strukturproteine Cornulin und Repetin (Trzeciak et al. 2017) belegt werden. So findet sich die *Hrrnr*-Allelvariante rs877776 bei etwa 13% der europäischen Bevölkerung und ist mit einem ca. 1,5-fach erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden (Esparza-Gordillo et al. 2009).

Obwohl *Flg*-Mutationen derzeit der wichtigste bekannte Risikofaktor für die AD sind, bilden etwa 40% aller Träger von *Flg*-Null-Mutationen niemals ein Ekzem aus. Folglich ist selbst die vollkommene Filaggrin-Defizienz weder eine notwendige noch hinreichende Bedingung für die Entstehung einer AD (O'Regan et al. 2008). Vielmehr liegt dieser eine multifaktorielle Genese zugrunde, die sich aus dem Zusammenwirken von genetischen und Umweltfaktoren ergibt. Dies belegen Studien, nach denen die AD nicht nur signifikant mit Genen der Hautbarriere sondern auch zahlreichen anderen assoziiert ist. Hierzu zählen Mutationen in Genen des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Salpietro et al. 2011), der menschlichen Leukozytenantigene (HLA) (Lee et al. 2001), verschiedener Zyto- und Chemokine (Nickel et al. 2000; He et al. 2003), der Arzneimittelmetabolisierung (Safronova et al. 2003), epidermaler Enzyme (Kabesch et al. 2004) und vielen weiteren (Al-Shobaili et al. 2016).

Die Diagnostik der atopischen Dermatitis umfasst neben dem *Prick*-Test, mit dem allergische Sofortreaktionen gegen Umweltallergene nachgewiesen werden können, insbesondere die Bestimmung der Konzentration von IgE insgesamt (Gesamt-IgE) und Allergen-spezifischem IgE im Blut. Der Schweregrad der Erkrankung lässt sich klinisch mithilfe des SCORAD (*scoring atopic dermatitis*) erfassen. Säulen der Therapie sind eine optimale Hauthygiene, die regelmäßige Anwendung rückfettender und hydrierender Lotionen sowie die generelle Vermeidung auslösender Allergene. Um akute Schübe einzudämmen, kommen insbesondere glucocorticoidhaltige Externa und Immunmodulatoren wie Tacrolimus zum Einsatz. Zur supportiven symptomatischen Therapie eignen sich antipruriginöse Mittel wie Antihistaminika oder Lokalanästhetika (Polidocanol). Neuere, zum Teil noch in klinischer Entwicklung befindliche Medikamente, werden sich zudem zur spezifischen Unterbrechung immunologischer Signalkaskaden nutzen lassen. So richtet sich das seit 2017 in Deutschland zugelassene Dupilumab gegen die Alpha-Untereinheit des IL-4- und IL-13-Rezeptors und blockiert so die Effekte dieser Zytokine (Simpson et al. 2016). Alle genannten Therapien ermöglichen jedoch lediglich die Symptomkontrolle der atopischen Dermatitis. Eine Heilung der Erkrankung ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht möglich.

1.2.2 Asthma bronchiale

Das allergische Asthma bronchiale ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege als Reaktion auf normalerweise harmlose Umweltallergene. Charakteristisch sind anfallsweise auftretende Episoden von Atemnot und Husten infolge einer Obstruktion der Bronchien (Bronchospasmen). Wie auch bei anderen allergischen Erkrankungen können die Auslöser von Schüben spezifischer (Allergene) oder unspezifischer Natur sein (Janssens und Ritz 2013). Typische unspezifische Reize sind kalte und feuchte Luft, Staub und Stress. Pathophysiologisch bewirkt die beim allergischen Asthma vorherrschende Th₂-gewichtete Immunlage die Infiltration der Atemwege durch eosinophile Granulozyten und Mastzellen, Becherzellhyperplasie mit konsekutiv vermehrter Mukusproduktion sowie bronchiale Hyperreagibilität (Fahy 2015). Die Chronifizierung der Erkrankung führt zum irreversiblen Umbau der Atemwege mit Verdickung der Basalmembran, subepithelialer Fibrosierung sowie einer Zunahme der glatten Muskulatur (Bergeron et al. 2010). Die Symptome des Asthma bronchiale können mehrmals täglich auftreten und äußern sich vermehrt nach körperlicher Aktivität sowie während der Nacht. Infolge eines mangelhaften Sauerstoffaustauschs treten beschleunigte körperliche Erschöpfung und Tagesmüdigkeit auf. Laut WHO ist Asthma die weltweit häufigste chronische Erkrankung bei Kindern (Asher und Pearce 2014). Wie bei anderen allergischen Erkrankungen ist die Prävalenz in westlichen Industrienationen am höchsten und beträgt in Staaten wie Großbritannien, Kanada oder Australien etwa 15 bis 20% (Subbarao et al. 2009). Ein seit Jahrzehnten zu beobachtender Anstieg der weltweiten Prävalenz unterstreicht die Bedeutung von Umwelteinflüssen auf die Erkrankung (Burbank et al. 2017). Wie bei der atopischen Dermatitis ist die Ätiologie multifaktoriell und nicht abschließend geklärt. Neben exogenen Faktoren, insbesondere der frühzeitigen inhalativen Sensibilisierung sowie der durch die Abnahme frühkindlicher Infektionen bedingten Risikozunahme für allergische Erkrankungen (Hygiene-Hypothese), spielen auch individuelle genetische Anlagen eine Rolle (Subbarao et al. 2009). Unter den bislang mit dem Asthma bronchiale assoziierten Genen fanden sich neben vielen anderen auch solche, die für aus Epithelzellen stammende Zytokine (TSLP, IL-33) oder ihre Rezeptoren kodieren (IL1RL1 kodiert für ST2, den Rezeptor für IL-33 auf Mastzellen, Th₂-Zellen und Makrophagen) (Ober und Yao 2011). Die Diagnostik des Asthma bronchiale umfasst neben der körperlichen Untersuchung auch eine Lungenfunktionsdiagnostik. Ein erhöhter Atemwegswiderstand lässt sich dabei durch Messung des funktionellen Einsekundenvolumens (FEV₁) sowie des Tiffaneau-Indexes (FEV₁/Vitalkapazität) erfassen. Bei den meisten Asthmapatienten (ca. 70 – 90 %) lassen sich zudem Antikörper gegen Aeroallergene wie etwa Hausstaubmilbenkot oder Pollen nachweisen (Peters 2014). Zu den therapeutischen Möglichkeiten gegen Asthma bronchiale gehört die Gabe inhalativer Corticosteroide (ICS), kurz wirkender β 2-Agonisten (SABA), Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten (LTRA) sowie langwirksamer β 2-Agonisten (LABA). Wie beim atopischen Ekzem bieten diese Ansätze jedoch keine Möglichkeit zur Heilung, sondern dienen lediglich der Eindämmung der Symptome.

1.2.3 Der atopische Marsch

Der Begriff „atopischer Marsch“ geht auf klinische Beobachtungen zurück und beschreibt das sequenzielle Auftreten IgE-assoziiierter Erkrankungen im Laufe des menschlichen Lebens. Hierzu zählen neben der atopischen Dermatitis Nahrungsmittelallergien, das Asthma bronchiale und die Rhinokonjunktivitis. Als Erkrankung des Kleinkindalters ist die atopische Dermatitis der erste Schritt dieses Prozesses. Sie geht den Folgeerkrankungen häufig um Jahre voraus (Bantz et al. 2014). Langzeitstudien zeigten, dass etwa ein Drittel (30%) aller AD-Patienten ein Asthma bronchiale und etwa zwei Drittel eine allergische Rhinitis entwickeln (van der Hulst et al. 2007). Die Schwere der AD korreliert zudem mit der Auftrittswahrscheinlichkeit weiterer atopischer Erkrankungen. So entwickeln etwa 20-30% der Patienten mit milder AD in der Folge ein Asthma bronchiale - bei schweren Formen sind es rund 70%. Bricht die AD vor dem zweiten Lebensjahr aus, ist dies ebenfalls mit einem höheren Risiko für Folgeerkrankungen verbunden. Deren Auftreten vollzieht sich dabei nicht in fester Reihenfolge und ist nicht an die Persistenz der AD über das Kindesalter hinaus gebunden (Bantz et al. 2014).

Trotz zahlreicher Studien, die den atopischen Marsch beschreiben, sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch ungeklärt und Gegenstand aktueller Forschung (Ker und Hartert 2009). Neben der frühen Manifestation des atopischen Ekzems und seines Ausprägungsgrades scheinen auch die frühkindliche Sensibilisierung gegenüber Umwelt- und Nahrungsmittelallergenen sowie das männliche Geschlecht Risikofaktoren für die Progression atopischer Erkrankungen zu sein (Lowe et al. 2008; Saunes et al. 2012). Insbesondere der Einfluss erblicher Faktoren auf das Phänomen ist mittlerweile unstrittig. So beträgt das Risiko eines Kindes an atopischer Dermatitis zu erkranken etwa 50%, wenn bereits ein Elternteil an AD, Asthma oder Rhinitis litt. Sind beide Eltern betroffen, steigt das Risiko auf etwa 75% (Altmeyers Enzyklopädie 2019). Der bislang wichtigste Risikofaktor für die AD sind *F_{lg}*-Nullmutationen, die mit einer Störung der epidermalen Differenzierung assoziiert sind (O'Regan et al. 2008). Die Mutationsträger weisen zugleich eine erhöhte Auftrittswahrscheinlichkeit für Asthma bronchiale, Rhinokonjunktivitis und Nahrungsmittelallergien auf (Ziyab et al. 2014). Zudem leiden Kinder mit AD in der Anamnese häufiger unter stärker ausgeprägtem Asthma als solche ohne (Beck et al., 2000). Daraus entwickelte sich die gegenwärtig favorisierte These einer transkutanen Sensibilisierung als Ursache für das Auftreten nachfolgender atopischer Erkrankungen. Ein sogenannter „Etagenwechsel“, also die Progression atopischer Erkrankungen, ereignet sich jedoch lediglich bei Patienten, die tatsächlich von der AD betroffen sind – die Erbanlage allein ist hierfür nicht ausreichend (Rogers et al. 2007). Dies bedeutet, dass die Entzündung der Haut selbst eine wesentliche Antriebskraft für den atopischen Marsch sein könnte (Han et al. 2017).

1.3 Atopie im Mausmodell

1.3.1 Gängige *In-vivo*-Modelle

1.3.1.1 Asthma bronchiale (Typ-I-Allergie)

Zur Erforschung allergischer Erkrankungen, wie dem Asthma bronchiale, wurden zahlreiche Tiermodelle vorgestellt (Nials und Uddin 2008). Die Verwendung Ovalbumin-basierter Mausmodelle gehört hierbei zu den populärsten Methoden. Die Gründe hierfür sind unter anderem in dessen ubiquitärer Verfügbarkeit sowie der sicheren Reproduzierbarkeit von Symptomen in Allergiemodellen zu sehen (Daubeuf und Frossard 2013). Darüber hinaus ist die Konzentration kontaminierender Endotoxine in Standardpräparaten gering und es werden nur kleinste Mengen des Allergens benötigt (Kumar et al. 2016). Das aus dem Eiklar von Hühnereiern isolierte Protein wird den Tieren üblicherweise intraperitoneal und in Kombination mit einem Adjuvans (meist Aluminiumhydroxid, Alum), das die Th2-gewichtete Immunantwort verstärkt, appliziert. Nach einigen Tagen, in denen das Immunsystem auf den Fremdstoff reagieren kann, findet die erneute Exposition des Tieres mit dem Antigen statt. Zur Induktion einer asthmaähnlichen Atemwegsallergie erfolgt diese meist inhalativ oder intranasal. Kritik erfuhr das Modell vor allem wegen seiner unphysiologischen Natur. In der klinischen Realität spielt OVA als krankheitsauslösendes Allergen keine Rolle und auch Adjuvantien sind klinisch nicht relevant (Aun et al. 2017). Als Alternative wurden daher natürlich vorkommende Allergene wie Hausstaubmilben- (Cates et al. 2004), Küchenschabenextrakte (Sarpong et al. 2004) oder Schimmelpilzsporen (*Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*) vorgeschlagen (Havaux et al. 2005). Neben ihrer größeren klinischen Relevanz bieten diese auch die Möglichkeit einer initialen Sensibilisierung über den Respirationstrakt (Kumar et al. 2016).

1.3.1.2 Atopische Dermatitis (AD)

Die atopische Dermatitis des Menschen ist eine komplexe, multifaktorielle Erkrankung. Um dieser Komplexität gerecht zu werden und ein besseres Verständnis der Genese der AD zu erhalten, wurden zahlreiche Mausmodelle entwickelt (Jin et al. 2009). Einerseits existieren Modelle, die auf das epikutane Aufbringen immunologisch aktiver Substanzen setzen, andererseits solche, bei denen genetisch veränderte Mäuse infolge einer Überexpression oder eines Mangels bestimmter Schlüsselproteine Symptome einer AD ausprägen (Gutermuth et al. 2004). Zu letzteren zählen *Nc/Nga*-Mäuse, die infolge einer Mutation auf Chromosom 9 spontan auftretende AD-ähnliche Läsionen sowie die krankheitstypische Erhöhung Th2-assoziiierter Interleukine und des IgE-Plasmaspiegels aufweisen (Matsuda et al. 1997). Spontane Läsionen mit ähnlichen Charakteristika treten auch bei transgenen Mäusen mit Überexpression von IL-4 (Chan et al. 2001) oder TSLP (Yoo et al. 2005) auf. Andere Mausmodelle der AD basieren auf repetitiver epikutaner Sensibilisierung. Teilweise geschieht dies nach mechanischer Schädigung der Hautbarriere im Sinne einer Imitation des

beim Menschen auftretenden starken Juckreizes und des damit verbundenen Kratzens. Ein gängiges Verfahren stellt hierbei die Verwendung von Klebestreifen (*tape stripping*) dar (Spergel et al. 1998). Zahlreiche Allergene und niedermolekulare Haptene fanden Anwendung in diesem Bereich. Zu den häufigsten Auslösern gehören Ovalbumin (Spergel et al. 1998), Hausstaubmilben (Huang et al. 2003), Oxazolon (Man et al. 2008), TNCB (Trinitrochlorbenzol) (Matsumoto et al. 2004) sowie MC903 (Li et al. 2006).

1.3.1.3 Atopischer Marsch

Um zu klären, wie die atopische Dermatitis ein Milieu der gesteigerten Vulnerabilität für allergische Folgeerkrankungen generiert, wurden verschiedene Hypothesen formuliert (Bantz et al. 2014). Experimentelle Mausmodellen zeigten, dass AD-ähnliche Entzündungen der Haut eine systemische Allergensensibilisierung begünstigen können (Zhang et al. 2009). Dabei rückten epitheliale Strukturproteine, wie Filaggrin, und in der Haut gebildete Interleukine in den Mittelpunkt gegenwärtiger Forschung. Zu letzteren zählen TSLP (Leyva-Castillo et al. 2013b) und IL-33 (Han et al. 2018). Bei den hierfür konzipierten Mausmodellen wird meist mit genetisch veränderten Tieren gearbeitet, die entweder spontan oder nach Provokation Zeichen einer AD ausprägen. Parallel hierzu werden den Tieren in verschiedenen Phasen Allergene verabreicht, um eine weitere allergische Erkrankung hervorzurufen, wie etwa das Asthma bronchiale oder eine Lebensmittelallergie. Im direkten Vergleich der Krankheitsausprägung der Versuchsgruppe mit einer Kontrollgruppe lassen sich so Aussagen über die Bedeutung einzelner Komponenten der Epidermis oder immunologischer Signalpfade beim atopischen Marsch treffen.

1.3.2 Möglichkeiten und Grenzen

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit ein Mangel an Strukturproteinen der Epidermis nicht nur zu Barriere-Anomalien führt, sondern auch die Entzündung bei der atopischen Dermatitis und des Asthma bronchiale beeinflussen kann. Um dieses Vorhaben zu realisieren, wurden verschiedene experimentelle Modelle etabliert und vergleichend an *Knockout*- sowie Wt-Mäusen getestet.

Viele Erkenntnisse in der Biomedizin und Immunologie wären ohne die Untersuchung von Tieren, insbesondere Mäusen, vermutlich nicht möglich gewesen (Masopust et al. 2017). Gründe für die Wahl von Mäusen liegen darin, dass diese einfach zu züchten sind, sich preiswert in wissenschaftlichen Einrichtungen halten lassen und neben dem Menschen die immunologisch am besten charakterisierten Wirbeltiere sind (Tao und Reese 2017). Insbesondere in der Immunologie, die komplexe multifaktorielle Zusammenhänge betrachtet, sind solche Modelle eine elegante und wirtschaftliche Möglichkeit zur Gewinnung neuer Erkenntnisse. Ein solcher experimenteller Rahmen erlaubt beispielsweise die Quantifizierung krankheitsspezifischer Symptome und zugleich eine präzise Erforschung der zugrundeliegenden immunologischen Prozesse. Alternative *In-vitro*-Verfahren wie die Verwendung von Kunsthautpräparaten (wie EpiDermTM) oder gar Computersimulationen

gewinnen zwar an Bedeutung, erfassen jedoch komplexe Zusammenhänge nur unzureichend (Halling-Brown et al. 2010; Rodrigues Neves und Gibbs).

Selbstverständlich bergen experimentelle Arbeiten an Tieren auch Schwierigkeiten, die sich nicht zuletzt auf die biologischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch zurückführen lassen. So konnten jüngere Untersuchungen aufzeigen, dass nur 15.187 der Gene beider Arten funktional verwandt sind und von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen. Dies entspricht 75% der Maus- und 80% der menschlichen Gene (Church et al. 2009). Ferner können theoretisch konzipierte Tiermodelle Probleme aufweisen, die sich erst während ihrer praktischen Umsetzung zeigen. In der vorliegenden Arbeit zählen hierzu makroskopisch sichtbare kleinere phänotypische Unterschiede zwischen Wildtyp- und genetisch veränderten *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen. So wiesen Letztere etwa etwas kürzere Schwänze und kleinere Ohren auf, wodurch doppelt-verblindete Testungen unmöglich waren. Eine weitere Problematik stellt die im Vergleich zum Menschen weitaus kürzere Lebensspanne von Mäusen dar. Chronische Schäden, wie etwa das beim menschlichen Asthma bronchiale krankheitstypische *airway remodelling*, bleiben bei den Tieren aufgrund der unumgänglichen Kurzzeitbehandlung weitestgehend aus (Nials und Uddin 2008).

Berechtigterweise ist die Verwendung von Tiermodellen ein auch über die medizinische Fachwelt hinaus kontrovers diskutiertes, gesellschaftliches Thema. Dennoch scheint, dass solange es Klärungsbedarf hinsichtlich der Frage geben wird, wie verschiedene Krankheitsbilder einander beeinflussen und aufrechterhalten, Tiermodelle ein für die Grundlagenforschung kaum entbehrliches Instrument bleiben werden. Zugleich wird sich diese Art der Forschung immer auch mit ethischen Überlegungen hinsichtlich ihrer Verhältnismäßigkeit konfrontiert sehen. Denn in welchem Maße sich Forschungsergebnisse aus artfremden *In-vivo*-Modellen auf den Menschen übertragen lassen, ist letzten Endes häufig ungewiss (van der Worp et al. 2010).

1.4 Zielsetzung

Loss-of-function-Mutationen im Filaggrin-Gen (*Flg*) gelten derzeit als wichtigster Risikofaktor für die Entstehung einer atopischen Dermatitis (AD) (Marenholz et al. 2006; Palmer et al. 2006; Weidinger et al. 2006; Barker et al. 2007). Auch Mutationen von Hornerin (*Hrrr*), welches der gleichen Genfamilie entstammt und über ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften verfügt, wurden mit der AD assoziiert (Makino et al. 2001; Esparza-Gordillo et al. 2009). Darüber hinaus belegen epidemiologische Studien eine bei *Flg*-Mutationsträgern signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit an Asthma bronchiale zu erkranken (Rodríguez et al. 2009). Als gesichert gilt, dass eine solche Entwicklung sich insbesondere bei denjenigen Mutationsträgern beobachten lässt, bei denen sich bereits im Kindesalter eine AD manifestiert hatte (Weidinger et al. 2008). Ein direkter Zusammenhang zwischen genetisch determinierter Hautbarrierestörung und Asthma wurde bislang nicht nachgewiesen (Rogers et al. 2007). Unstrittig ist jedoch die Bedeutung der Haut für die Entstehung atopischer

Erkrankungen (Oord und Sheikh 2009; Osawa et al. 2011). Diese Einsicht führte zur zunehmenden Erforschung auch anderer epidermaler Strukturproteine, wie etwa dem Hornerin (Makino et al. 2001; Henry et al. 2011; Rahrig et al. 2019). Im Fokus stehen hierbei die geschädigte Homöostase der Haut, die damit einhergehende (potenzielle) Neigung zu überschießenden Immunantworten, die geschädigte Hautbarriere als Eintrittspforte für Aeroallergene (transdermale Sensibilisierung) sowie systemisch-immunologische Folgen einer AD für Auftreten und Schweregrad eines Asthma bronchiale (Han et al. 2017).

Unter Berücksichtigung dieser Annahmen wird in der vorliegenden Arbeit ein Modell für OVA-basierte allergische Atemwegserkrankungen vorgestellt, mit Hilfe dessen systemisch-immunologische Folgen des Auftretens einer *AD-like*-Dermatitis in verschiedenen Phasen der Entstehung eines Asthma bronchiale erforscht werden können. Dies geschieht insbesondere unter Auswertung der Antikörperproduktion, der Bestimmung des intrapulmonalen Zellgehaltes mittels BAL und der histologischen Quantifizierung der lokalen Entzündungsreaktion. Über die Messung von TSLP-Serumkonzentrationen, einem epidermal gebildeten Zytokin, soll auch Bezug zu Mechanismen genommen werden, die dem atopischen Marsch zugrunde liegen. Mit der Fragestellung, ob die genannten Parameter je nach Genotyp variieren, werden vergleichende Testungen an genetisch modifizierten *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-Mäusen des Stammes *C57BL/6J* durchgeführt. Die Induktion der ekzematösen AD-ähnlichen Läsionen erfolgt dabei mittels MC903. Auf diese Weise sollen weitere Einblicke in die Dynamik atopischer Erkrankungen und einer defekten Hautbarriere als möglichem Bindeglied gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte

Geräte	Firma/ Standort
Haarschneidemaschine	Panasonic, Hamburg, Deutschland
Kamera am Mikroskop (AxioCam MRC)	Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA
Kryostat (CM3050 S)	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Kühl- und Gefrierschränke +4; -20; -80°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikroskop (Axioscope 2)	Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, USA
Minizentrifuge	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Narkosemittelverdampfer	Vaporizer Sales & Service, Rockmart, GA, USA
pH-Meter	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Präzisionsmessgerät	Kroeplin, Schlüchtern, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Rotationsmikrotom	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Schere, anatomisch	Hammacher, Solingen, Deutschland
Trockenschrank (37°C)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultraschallreinigungsgerät (Sonorex RK 100)	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vortexer	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Wärmebad	Medax, Rendsburg, Deutschland
Wipprüttler (Stuart TM See-Saw Rocker)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge (Megafuge 16R TX-400)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zytozentrifuge (Cytospin-2)	Thermo Fisher Scientific/Shandon Inc., Pittsburgh, USA

Tabelle 2: Übersicht der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma/ Standort
Deckgläser	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Gefäße (0,5/1,5/ 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Röhrchen (5ml)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Filterkarten	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Injektionskanüle, 0,30 x 12 mm (Sterican®)	Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland
Kapillarpipetten, Natrium-heparinisiert, (Minicaps®)	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Mikroplatten-Lesegerät (Appliscan Multimode Plate Reader)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Multipette	Brand, Wertheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Laboroptik, Lancing, England
Objektträger	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
Parafilm® Verschlussfolie	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg, Deutschland
Polypropylen Röhrchen (15/50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Spritze 1ml, steril	Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland
Super Frost Objektträger	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
Venenverweilkatheter, 20G, 1,1 x 33 mm (Vasofix® Safety)	Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland
Well-Platten, Rundboden, 96 Kavitäten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

2.1.2 Reagenzien, Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Reagenzien und Chemikalien

Material	Firma/ Standort
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aluminiumhydroxid	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Aqua dest.	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
BSA (Bovines Serumalbumin)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure (C ₆ H ₈ O ₇)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DePeX	Serva, Heidelberg, Deutschland

Material	Firma/ Standort
Diff-Quick Färbeset	Medion, Düringen, Schweiz
EosinY	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Faramount Eindeckmedium	Dako, Glostrup, Dänemark
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
H ₂ O ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin (nach Mayer)	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether)	AbbVie, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MC903, Calcipotriol	Tocris, Bristol, UK
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Perjodsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Propanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI	PAA, Pasching, Österreich
Schwefelsäure, 96% (H ₂ SO ₄)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin-Peroxidase	Merck, Darmstadt, Deutschland
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS (Tris-aminomethan)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tryptanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween®20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4: ELISA-Systeme

Immunglobulin/Zytokin	ELISA-Kit
TSLP	Mouse TSLP ELISA MAX™ Deluxe (#434104), Biolegend
Gesamt-IgE	Mouse IgE ELISA MAX™ Standard (#432401), Biolegend
OVA-IgG ₁	Laborprotokoll

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Lösungen für den OVA-IgG1-ELISA

Substanz	VF	Konzentration	Volumen/ Well	Hersteller
OVA V	1:1.000	1 µg/ml	50 µl	Sigma (#A5503)
Anti-OVA-AK (Standard)	1:40.000	250-0,049 ng/ml	50 µl	Sigma (#6075)
Sekundär-AK	1:400	1,25 µg/ml	50 µl	BD (#553441)
Peroxidase	1:1.000	1 µg/ml	50 µl	Calbiochem (#189733)

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

Lösung	Herstellung
<i>Blocking</i> -Puffer	200 ml TRIS 2 g BSA
Wasch-Puffer	100 ml 10-fach TRIS 900 ml Aqua bidest. 0,5 ml Tween20
Substrat-Puffer (pH 3,95)	7,68 g Citronensäure
<i>Coating</i> -Puffer (pH 9,5)	4,2 g NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat) 1,78 g Dinatriumhydrogencarbonat (Na ₂ HCO ₃) 500 ml Aqua bidest.

Lösung	Herstellung
TMB, gelöst	24 mg TMB 500 µl Ethanol 500 µl DMSO
Stopplösung	30 ml 96% H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure) 180 ml Aqua bidest.
ELISA-Substrat	5445 µl Substrat-Puffer 2,55 µl kaltes H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid) 55 µl gelöstes TMB
OVA/Alum	100 µl OVA (10mg/ml) 1.000 µl Aluminiumhydroxid 2.900 µl PBS
PBS/Alum	1.000 µl Aluminiumhydroxid 3.000 µl PBS

OVA/Alum- beziehungsweise PBS/Alum-Gemische wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt und im Anschluss für insgesamt 30 min bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte geschüttelt, um eine ausreichende Durchmischung/Homogenisierung sicherzustellen. Die intraperitoneale Injektion erfolgte im unmittelbaren Anschluss hieran.

2.1.3 Software

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Softwareprodukte

Software	Hersteller
AxioVision Rel. 4.7	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
ImageJ 1.46r	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
SkatIt™, ELISA-Analysesoftware	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Tierschutzkommission in Niedersachsen geprüft, genehmigt und nach den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Tiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen in Gruppen von je vier bis fünf Individuen in IVC-Käfigen (IVC, *individually ventilated cage*) gehalten und hatten permanenten Zugang zu Futter und Wasser. Zucht und Haltung erfolgten unter SPF-Bedingungen (SPF, *specific pathogen free*). Die Raumbeleuchtung wurde automatisch in 12-stündigen Intervallen ein- und ausgeschaltet. Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen verwendet. Wildtyp-Mäuse (Wt) des Stammes *C57BL/6J* wurden von Jackson Laboratory bezogen. Die *FlgHmr*-defizienten Mäuse wurden von der Firma TaconicArtemis GmbH (Köln) generiert. Die sich anschließende Zucht der Experimentaltiere erfolgte in der Universitätsmedizin Göttingen.

2.2.2 Tierexperimentelle Eingriffe

2.2.2.1 Narkose

Verfahren wie Ohrendickenmessungen und die finale Blutentnahme fanden am zuvor narkotisierten Tier statt. Narkosen wurden in einer hierfür vorgesehenen Vorrichtung, bestehend aus einer Plexiglaskammer und einem Narkosemittelverdampfer durchgeführt. Dabei wurde den Tieren ein volatiles Anästhetikum (Isofluran) zugeführt, bis sich deutliche Zeichen des Bewusstseinsverlusts einstellten.

2.2.2.2 Blutentnahmen

Blutentnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten d-4, d18 und d22 aus dem retroorbitalen Plexus der Tiere und umfassten ein Volumen von 150 μ l (d-4, d18). Am Versuchsende (d22) wurde die maximal mögliche Menge gewonnen (ca. 1 ml). Sämtliche Blutentnahmen erfolgten am zuvor narkotisierten Tier. Hierfür wurde bei leicht rekliniertem Kopf der retroorbitale Augenplexus der Tiere mithilfe einer heparinbeschichteten Kapillare punktiert. Anschließend wurden die gewonnenen Proben 7 min lang bei 13.000 U/min zentrifugiert. Das Blutplasma wurde abpipettiert und für weitere Untersuchungen bei -20°C gelagert. Die zellulären Bestandteile wurden verworfen. Die zügige Entnahme der größtmöglichen Blutmenge am narkotisierten Tier hatte den unmittelbaren Tod zur Folge. Dessen Sicherstellung erfolgte mittels Überprüfung des Zwischenzehen- und Kornealreflexes. Fielen diese negativ aus, wurden die Tiere auf einer Styroporplatte fixiert und für die weitere Präparation vorbereitet.

2.2.2.3 Intraperitoneale Punktionen

Intraperitoneale Punktionen zur Injektion eines OVA/Alum- oder PBS/Alum-Gemisches (Kontrollgruppen) wurden an d0 und d7 an wachen Mäusen durchgeführt. Die Versuchstiere wurden hierfür einzeln aus ihren Käfigen geholt und manuell im Bereich des Nackens und der Schwanzwurzel fixiert. Anschließend erfolgte die zügige Injektion im Bereich des Abdomens.

2.2.2.4 Ohrendickenmessungen

Eine infolge des MC903-Kontaktes auftretende ödematöse Schwellung und Dickenzunahme der Ohren wurde zu den Zeitpunkten d-4, d-1, d1, d3, d6, d8, d10 und d18 (Sensibilisierungsmodell) beziehungsweise d18 bis d22 (Provokationsmodell) bestimmt. Dazu wurde die Dicke beider Ohren an jeweils drei definierten Stellen (ventral, mittig, dorsal) mithilfe eines Präzisionsmessgeräts am zuvor narkotisierten Tier standardisiert erfasst. Schwellungen errechneten sich aus der Differenz des Ausgangswertes zur jeweiligen Messung.

2.2.2.5 Bronchoalveoläre Lavage

Die BAL erfolgte am Versuchsende und schloss sich unmittelbar der in Narkose durchgeführten finalen Blutentnahme an. Die weitere Präparation erfolgte nach Fixation der Tiere auf einer Styroporplatte. Im nächsten Schritt wurde die Bauchhöhle der Mäuse eröffnet und anschließend behutsam mittels einer feinen Kanüle das Zwerchfell punktiert, was ein Kollabieren der Lungen zur Folge hatte. Anschließend wurden Brusthöhle und Luftröhre freigelegt. Letztere wurde vorsichtig vom darunterliegenden Bindegewebe gelöst. Durch den Retrotrachealraum wurde ein dünner Faden geführt und bei stark rekliniertem Kopf (die Schnauze des Tieres wurde in dieser Position an der Unterlage befestigt) ein kleines Loch zwischen zwei Knorpelspannen der Luftröhre geschnitten. Durch dieses wurde eine Kanüle eingeführt und locker mit Hilfe des Bindfadens in ihrer Position fixiert. Zur Gewinnung der Lavagenflüssigkeit wurden die Lungen insgesamt dreimal mit je 1 ml PBS gespült. Dafür wurde eine Spritze auf die zuvor eingebrachte Kanüle gesetzt und anschließend langsam das entsprechende Volumen in die Lungen gegeben. Um eine gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeit und eine möglichst gute Mobilisierung der sich in den Lungen befindenden Immunzellen zu gewährleisten, wurden die gefüllten Lungenflügel einige Male manuell massiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit wieder aspiriert und in ein dafür bereitgestelltes Reaktionsgefäß überführt (Probe A). Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Das in der zweiten und dritten Spülung gewonnene Material wurde gemeinsam in ein separates Reaktionsgefäß gegeben (Probe B). Um mögliche Stoffwechselvorgänge zu unterbinden, wurden sämtliche Proben über die gesamte Dauer der Präparation auf Eis gelagert.

2.2.2.6 Entnahme der Lungen für histologische Zwecke

Nach Abschluss der BAL wurden die Lungen mit 1 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) befüllt. Anschließend wurde die Kanüle aus der Luftröhre entfernt und diese sogleich mit Hilfe des bereits anliegenden Fadens fest verschlossen, um ein Zurücktreten der Lösung aus den Atemwegen zu verhindern. Es folgte die Freilegung und Entnahme der Lunge aus dem knöchernen Thorax. Alle entnommenen Gewebeproben wurden in gründlich beschriftete Einbettkassetten gesetzt und zur Fixation in 4% PFA getaucht. Nach frühestens 24 Stunden erfolgte die histologische Aufarbeitung.

2.2.3 Behandlungsprotokoll zur Induktion allergischer Atemwegserkrankungen

In Anlehnung an die Literatur (Zhang et al., 2008) wurden die Versuchstiere zur Induktion einer allergischen Atemwegserkrankung für insgesamt 23 Tage (d0 bis d22) der folgenden Behandlung unterzogen (**Abb. 1**). Diese gliederte sich entsprechend der natürlichen Krankheitsentwicklung in Sensibilisierungs- und Provokationsphase. Als Allergen diente Ovalbumin. Dessen Applikation erfolgte intraperitoneal oder inhalativ. Am Versuchsende erfolgte die Tötung der Tiere sowie die Auswertung des gewonnenen Materials.

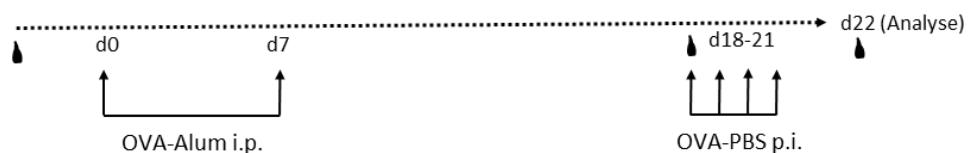


Abbildung 1: Protokoll zur Induktion des experimentellen Asthma bronchiale

Das dem Versuchsaufbau zugrundeliegende Protokoll umfasst die Tage 0 bis 22 (d0 bis d22). Tropfensymbole markieren die Zeitpunkte der Blutentnahmen. Die Applikation des Allergens erfolgte entsprechend der Angaben aus Tabelle 8.

Tabelle 8: OVA-Asthma-Modell

Lösung	Volumen	Darreichungsform
PBS, 2 mg Alum, 50 µg OVA Protein	200 µl	i. p.
PBS, 1% Aerosol (OVA)	15 ml	inhalativ (p. i.)

2.2.3.1 Sensibilisierung

Zur Sensibilisierung mit dem Allergen erhielten die Tiere in einem Abstand von sieben Tagen (d0 und d7) zwei intraperitoneale (i. p.) OVA-Alum-Injektionen unter Kurzzeitnarkose mit

Isofluran. Alum (Aluminiumhydroxid, $\text{Al}(\text{OH})_3$) diene als Adjuvans der Verstärkung der Immunantwort durch gesteigerte Antigenaufnahme durch antigenpräsentierende Zellen sowie eine verlängerte Phase der Antigenpräsentation (an CD4-positive Zellen) über MHC-Klasse-II-Rezeptoren (Ghimire et al. 2012). Dabei rief die Substanz über die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-4 und IL-5 eine Th2-gewichtete Reaktion hervor (Brewer et al. 1999).

2.2.3.2 Challenge

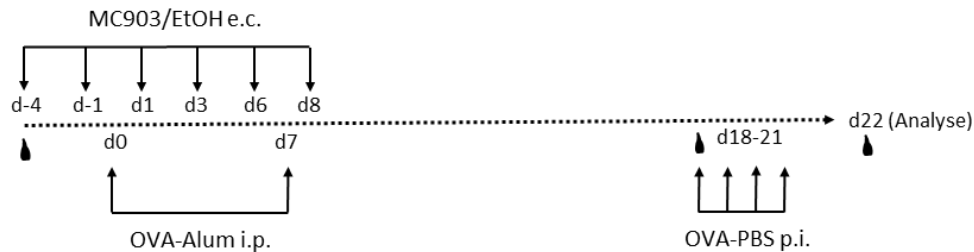
Nach der Sensibilisierung wurden die Tiere von d18 an 4-tägigen inhalativen OVA-Provokationen à 20 min ausgesetzt. Mittels eines Zerstäubers erfolgte die Herstellung des OVA-haltigen Aerosols und dessen anschließende Umleitung in eine Plexiglasskammer, in der sich die Versuchstiere befanden. Löcher in dessen Wand verhinderten eine übermäßige Akkumulation des Aerosols und ermöglichten den Eintritt von Frischluft.

2.2.4 Behandlungsprotokolle zur Auslösung einer *AD-like*-Dermatitis

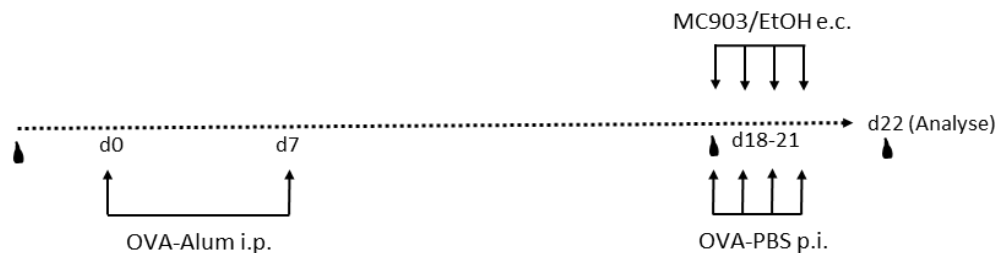
Zur Auslösung einer *AD-like*-Dermatitis wurden *FlgHrrr*^{-/-}- und Wt-Mäuse topisch mit MC903 (1,25-(OH)₂-D₃; Calcitriol) behandelt. MC903 ist eine niedrig-calcämische Variante des Vitamin D₃ (führt seltener zu Hypercalciämie) und wird als solche in der Therapie der Psoriasis genutzt. In Mausexperimenten induziert der wiederholte Hautkontakt Läsionen, die der atopischen Dermatitis des Menschen ähneln und als *AD-like*-Dermatitis beschrieben werden (Li et al. 2006). Zur Induktion einer *AD-like*-Dermatitis wurden pro Ohr einer mit Isofluran narkotisierten Maus insgesamt 8 nmol MC903/EtOH-Gemisch (4 nmol pro Ohr in 25 µl, verteilt auf jeweils 12,5 µl für die Innen- und Außenseiten) aufgetragen. Tiere der Kontrollgruppen wurden mit dem Vehikel EtOH im selben Volumen behandelt. Gemäß der zugrundeliegenden Fragestellung erfolgte die Applikation von MC903 und des Vehikels (EtOH) in zwei Varianten des OVA-Asthma-Modells entweder parallel zur OVA-Sensibilisierung (**Abb. 2**) oder zur OVA-provokation (**Abb. 3**).

Tabelle 9: Induktion einer *AD-like*-Dermatitis

Lösung	Volumen	Darreichungsform
8 nmol MC903/EtOH	25 µl/Ohr	topisch

**Abbildung 2: Auslösung einer *AD-like*-Dermatitis während der Sensibilisierung**

Das eigentliche Asthmaprotokoll, welches die Versuchstage d0 bis d22 umfasst und in eine Sensibilisierungs- und Provokationsphase unterteilt ist, wird in dieser modifizierten Version um eine Komponente erweitert. Hierzu erfolgt die repetitive Behandlung mit MC903 (d-4 bis d8). Das entstehende Ekzem soll eine systemische Immunreaktion zur Folge haben, die sich letztlich erschwerend auf die asthmatische Erkrankung auswirkt.

**Abbildung 3: „Provokationsmodell“**

Um den Einfluss einer *AD-like*-Dermatitis auf die intrapulmonale Provokationsphase untersuchen zu können, wurden die Versuchstiere in dieser Variante des Asthmaprotokolls zu den Zeitpunkten d18 bis d21 topisch mit MC903 behandelt.

2.2.5 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

2.2.5.1 Durchführung

Pulmonales Entzündungsinfiltrat wurde mittels BAL gewonnen, einer Methode, bei der die Lungen wiederholt mit einer sich im Respirationstrakt ausbreitenden Flüssigkeit gespült werden (Kapitel 4.2.2.5). Gegenüber einer Biopsie bietet sie den Vorteil, dass das Lungengewebe weitgehend unbeschadet bleibt und das Organ im Anschluss noch histologisch untersucht werden kann.

2.2.5.2 Bestimmung der absoluten Zellzahlen

Die bei der BAL gewonnenen Proben (A und B) wurden zunächst bei 1.000 U/min und einer Gerätetemperatur von 4°C für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Überstände der Proben A (BAL-Flüssigkeit, BALF) in neue Reaktionsgefäße überführt und für weitere Analysen bei -80°C gelagert. Die Überstände der Proben B wurden verworfen. Nachdem die Zellsedimente durch leichtes Schütteln der Reaktionsgefäße vom Untergrund gelöst worden waren, wurden die jeweils zusammengehörenden Proben unter Verwendung von 5% FCS in ein gemeinsames Reaktionsgefäß (15 ml Zentrifugenröhrchen) überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert (10 min bei 1.000 U/min und 4°C). Danach wurden die Überstände erneut entfernt und die verbliebenen Zellen in zunächst 0,5 ml FCS verdünnt. Um eine gleichmäßige Durchmischung zu erreichen, wurden die Zellsuspensionen einige Male vorsichtig auf- und abpipettiert. Zur Zählung der lebenden Zellen wurden je 10 µl der entstandenen Suspension mit 10 µl Trypanblau auf einem Parafilmstreifen vermischt. Anschließend wurden die Zellen in 10 µl des Gemisches in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. Bei zu geringer Verdünnung wurde weiteres 5% FCS zur ursprünglichen Suspension gegeben, bis eine Zellkonzentration erreicht war, die eine Zahl von 150-200 Zellen pro Neubauerkammer nicht überschritt und somit ein einfaches manuelles Auszählen möglich machte. Diese Arbeitsschritte wiederholten sich für alle Proben. Aus den Ergebnissen der 4-Kammer-Zählungen konnte schließlich mithilfe der nachstehenden Formel die Gesamtzellzahl der jeweiligen Probe errechnet werden

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen in allen vier Quadranten}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}} \times 10^3 = \text{Zellen pro ml BAL}$$

Fläche und Kammertiefe betragen bei einer Zählkammer nach Neubauer üblicherweise 4 mm² und 0,1 mm. Alle Proben wurden zur größeren Genauigkeit mindestens zweimal (bei stärkeren Abweichungen beider Werte gelegentlich ein drittes Mal) ausgezählt. Zuletzt wurden die Ergebnisse gemittelt und auf einen Milliliter hochgerechnet.

2.2.5.3 Anfertigung der zytologischen Präparate

Um das Verhältnis verschiedener Zelltypen in der Lavageflüssigkeit zu bestimmen, wurden zytologische Präparate aus den durch BAL gewonnenen Spülproben gefertigt. Diese wurden mithilfe einer Zytozentrifuge (Cytospin™) hergestellt. Dabei werden durch Zentrifugation einer Suspension deren flüssige von den zellulären Bestandteilen getrennt und letztere auf der umschriebenen Fläche eines Objektträgers gebündelt. Ein Cytospin-Objektträger sollte für ein optimales Resultat etwa 50.000 Zellen enthalten. Wurden die Flüssigkeitsbehälter des Gerätes konstant mit 150 µl Flüssigkeit befüllt, ergab sich daraus die folgende Formel, mit der sich näherungsweise die zu verwendende Suspensionsmenge bestimmen ließ.

$$\frac{50.000}{\text{Ergebnis der 4-Kammer-Zählung} \times 5} = \text{zu verwendendes Suspensionsvolumen in } \mu\text{l}$$

Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß für die Zytocentrifuge pipettiert und mit 5% RPMI auf ein Gesamtvolumen von 150 μl aufgefüllt. Bei 800 U/min, geringer Beschleunigung (*acc. low*) und einer Laufzeit von 10 min wurden die zytologischen Präparate hergestellt. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet, anschließend fixiert, mit einem Häma-Schnellfärbeset (DiffQuick®) gefärbt und unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

2.2.5.4 Differenzierte Färbung (DiffQuick)

Die getrockneten Präparate wurden in Plastikwannen mit einem Schnellfärbeset gefärbt. Hierfür wurden sie in einem ersten Schritt für 1,5 min mit dem Fixationsreagenz behandelt. Danach erfolgte abwechselnd die Überführung in die Färbelösungen 1 und 2. Die Inkubationszeiten konnten je nach Alter der Reagenzien leicht variieren und lagen im Mittel bei 7 min (Lösung 1) und 2 min (Lösung 2). Anschließend wurden die Präparate unter fließendem Wasser gespült und an der Luft getrocknet. Zuletzt erfolgte die Eindeckung unter Verwendung von DePeX.

2.2.5.5 BAL: differenzierte Zellzählung und Bestimmung der relativen Zellzahl

Mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ wurden die vier dominierenden Zelltypen ausgezählt. Dem Muster bei einer Typ-I-Allergie entsprechend waren dies eosinophile Granulozyten (Eosinophile), Makrophagen und Lymphozyten sowie in kleinerer Zahl neutrophile Granulozyten (Neutrophile). Pro Maus wurden drei Präparate erstellt und anschließend ca. 500 Zellen ausgezählt. Alle Zählungen erfolgten dabei manuell.

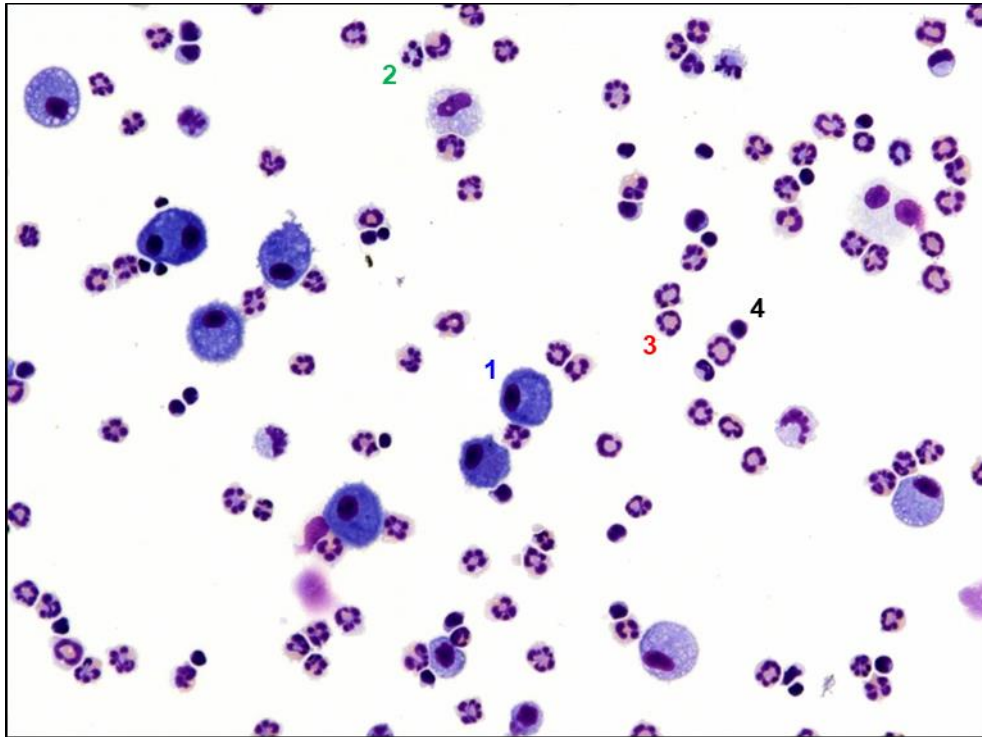


Abbildung 4: Beispiel eines Zytospin-Präparats

Dargestellt ist das zytologische Präparat eines an Asthma erkrankten Versuchstieres. Typisch für die Erkrankung ist die Dominanz von Eosinophilen Granulozyten. 1 Makrophage, 2 Neutrophiler Granulozyt, 3 Eosinophiler Granulozyt, 4 Lymphozyt.

2.2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Immunglobuline und Zytokine im Blutserum wurden mittels ELISA quantifiziert, einem auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhendem Nachweisverfahren für Proteine (Tabellen 4 – 6; Kap. 4.1.2). Zum Teil handelte es sich hierbei um Fertigsysteme. Diese wurden entsprechend der Herstellerangaben (Biologend) angewendet und anhand der beiliegenden Standardreihe ausgewertet.

2.2.6.1 OVA-spezifisches IgG₁

Zum Nachweis des OVA-spezifischen IgG₁ kam ein eigenes System zur Anwendung. Hierzu wurden zunächst Rundboden-Mikrotiterplatten mit je 50 µl OVA-Lösung (10 mg/ml) pro Kavität (OVA Grade V in PBS) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde am folgenden Tag verworfen, die Platten ausgeklopft und mit Waschpuffer (Tris, 0,05% TWEEN) ausgespült. Um freie Bindungsstellen zu besetzen, wurde ein Blockpuffer (100 µl/Well, Tris, 1% BSA) aufgetragen und die Platten für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert (alternativ dazu konnten die Platten bis zu 3 Wochen bei 4°C zwischengelagert werden). Im nächsten Schritt wurden die Serumproben verdünnt und in einem Volumen von je 50 µl auf die erneut gewaschenen Mikrotiterplatten gegeben. Werte für Verdünnungsprotokolle gingen dabei aus zuvor durchgeführten

Testreihen hervor. Unter Verwendung monoklonaler Anti-Albumin-Antikörper (*monoclonal anti-chicken egg albumin clone OVA-14*) wurde eine Standardreihe im Bereich von 250 bis 0,49 ng/ml gefertigt. Anschließend wurden die Proben 1-9 in Volumina von je 50 µl in die entsprechenden Wells pipettiert. Um eine ausreichende Bindung sowohl der im Serum enthaltenen Immunglobuline als auch der monoklonalen Antikörper der Standardreihe an ihr Zielantigen zu gewährleisten, wurden die Platten über Nacht bei 4°C inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die Platten gewaschen und 50 µl eines biotinmarkierten Detektions-AK (Biotin *rat anti-mouse IgG1*) aufgetragen. Der Zweitantikörper bindet spezifisch an den Fc-Teil des nachzuweisenden OVA-IgG₁ und lässt auf diese Weise Protein-Antikörper-Antikörper-Komplexe entstehen. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur. Danach wurden die Platten erneut gespült und ein streptavidinmarkiertes Enzym (Streptavidin-Peroxidase) aufgetragen (50 µl/Well). Streptavidin hat eine hohe Affinität zu Biotin und lässt entsprechende Enzymkonjugate entstehen. Nach einer weiteren Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurden die Platten gründlich gewaschen, um überschüssige Enzymkonjugate zu entfernen. Im Anschluss wurde ein zunächst farbloses Substrat (TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) auf die Platten gegeben. TMB dient als Reaktionsstarter und wird nach Aktivierung durch Peroxidase in seinem Absorptionsspektrum verändert, was dem Medium je nach Gehalt des nachzuweisenden Antigens (hier OVA-IgG₁) eine mehr oder weniger ausgeprägte Blaufärbung verleiht. Aufgrund der Photosensitivität von TMB erfolgte die anschließende Inkubation für einige Minuten unter einer Abdeckung. Durch Zugabe von Schwefelsäure (H₂SO₄, 2 M) wurde die Reaktion abgestoppt und ein erneuter Farbwechsel herbeigeführt. Die nun gelben Proben wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch analysiert. Durch Gegenüberstellung der Extinktionswerte von Serumproben und Standardreihe konnte auf den jeweiligen Gehalt von OVA-spezifischem IgG₁ in den einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte geschlossen werden. Die Auswertung erfolgte mittels SkanIt™ (ELISA-Analysesoftware).

2.2.6.2 Gesamt-IgE und TSLP

Gesamt-IgE- und TSLP-Spiegel in den Blutproben wurden mit Fertigsystemen der Firma Biolegend (Mouse IgE ELISA MAX™ Standard #432401, TSLP ELISA MAX™ Deluxe #434104) bestimmt. Diese wurden entsprechend der Herstellerangaben und anhand der beiliegenden Standardreihe ausgewertet.

2.2.7 Histologische Aufarbeitung und Färbung: HE und PAS

Zur histologischen Aufarbeitung wurden die Atemwegsorgane in Einbettkassetten platziert und für ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur in Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die folgende Paraffineinbettung fand in der Abteilung Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen statt. Sämtliche Paraffinblöcke wurden zunächst für eine Stunde auf einer Kühlplatte belassen. Mit einem Mikrotom wurden dann 3 µm dicke Schnittpräparate

angefertigt. Diese wurden in einem Kaltwasserbad aufgefangen. Ein nachfolgendes Überführen der Schnitte in ein Warmwasserbad erleichterte das manuelle Aufziehen auf die Objektträger. Vor ihrer Weiterverarbeitung wurden die Präparate bei 40°C über Nacht zum Trocknen in einem Wärmeschrank belassen. Am folgenden Tag erfolgten Entparaffinierung, Färbung und Eindeckung. Hierfür wurden die Präparate insgesamt dreimal für 10 min in Xylol inkubiert. Die Rehydrierung erfolgte für jeweils 10 min zunächst in 100% Isopropanol und dann in einer Ethanol-Reihe absteigender Konzentrationen (100% bis 50%).

Je nach Fragestellung kamen HE-(Hämatoxylin-Eosin) oder PAS-Färbungen zum Einsatz. PAS-Färbungen (*periodic acid-Schiff reaction*) wurden insbesondere zur Darstellung von kohlenhydratreichen Strukturen wie muzinhaltigen Becherzellen verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll in Tabelle 10.

Tabelle 10: Färbeprotokoll PAS

Nr.	Arbeitsschritt	Inkubationszeit
1	Hydrolyse mit Perjodsäure 1%	10 min
2	Mit Leitungswasser waschen (> 35°C)	10 min
3	Ausspülen mit destilliertem Wasser	2x2 min
4	Färbung mit Schiffs-Reagenz	15-20 min
5	Mit Leitungswasser waschen (> 35°C)	5 min
6	Ausspülen mit destilliertem Wasser	1 min
7	Gegenfärbung mit Hämalanlösung	5 min
8	In fließendem Leitungswasser bläuen	10-15 min
9	EtOH 50%	5 min
10	EtOH 70%	5 min
11	EtOH 90%	5 min
12	EtOH 100%	5 min
13	Propanol 100%	5 min
14	Xylol 100%	10 min
15	Xylol 100%	10 min

HE-Färbungen dienten der Darstellung des pulmonalen Zellinfiltrates und wurden nach dem folgendem Protokoll im Institut für Neuropathologie durchgeführt.

Tabelle 11: Färbeprotokoll HE

Nr.	Arbeitsschritt	Inkubationszeit
1	Ausspülen mit destilliertem Wasser	2 min
2	Kernfärbung mit Hämatoxylin	8 min
3	Differenzierung mit HCl-EtOH	5 sek
4	Ausspülen mit destilliertem Wasser	8 min
5	Färben mit EosinY Aqueous	2 min
6	Ausspülen mit destilliertem Wasser	2-3 sek
7	EtOH 70%	30 sek
8	EtOH 80%	1,5 min
9	EtOH 100%	2 min
10	Xylol	2x2 min

2.2.7.1 Beurteilung der Becherzellhyperplasie

Hyperplastische Gewebsveränderungen wurden in histologischen Präparaten ausgewählter Lungen in doppelt verblindeter Form lichtmikroskopisch aufgenommen und semiquantitativ ausgewertet (Arai et al. 2010). Die dabei untersuchten Atemwegsabschnitte sollten, um eine eingegrenzte Höhe innerhalb des Bronchialbaums zu gewährleisten, keine knorpeligen Anteile und einen Mindestdurchmesser von 200 µm aufweisen. Pro Tier wurden fünf Aufnahmen, entsprechend der fünf Lungenlappen, angefertigt. Bewertet wurde das Mengenverhältnis von Becherzellen zu übrigen Zellen des respiratorischen Epithels im jeweils angeschnittenen Bronchialzweig. Es wurden bis zu drei mögliche Punkte vergeben. Die Kriterien dazu sind in Tabelle 12 aufgelistet. **Abb. 5** zeigt repräsentative Beispiele verschiedener Ausprägungsgrade der Becherzellhyperplasie.

Tabelle 12: Beurteilung von Becherzellhyperplasien

Grad	Anteil der Becherzellen am Epithel eines angeschnittenen Bronchiolus
0	Keine
1	Besatz von weniger als 1/3 des gesamten Epithels
2	Besatz von 1/3 bis 2/3 des gesamten Epithels
3	Besatz von mehr als 2/3 des gesamten Epithels

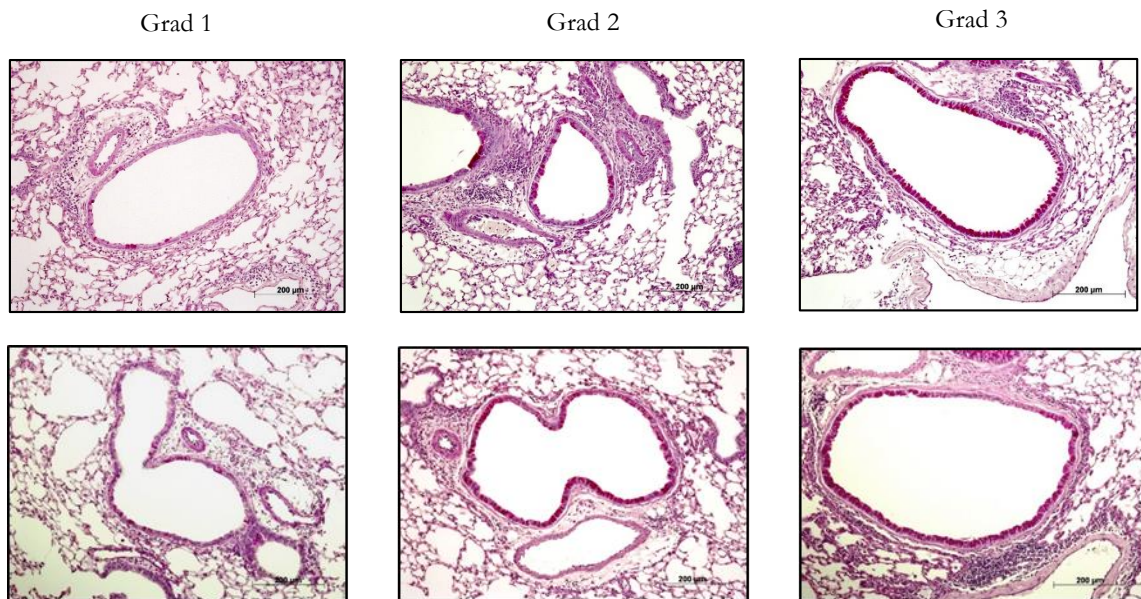


Abbildung 5: Lungenhistologie PAS, Becherzellhyperplasie

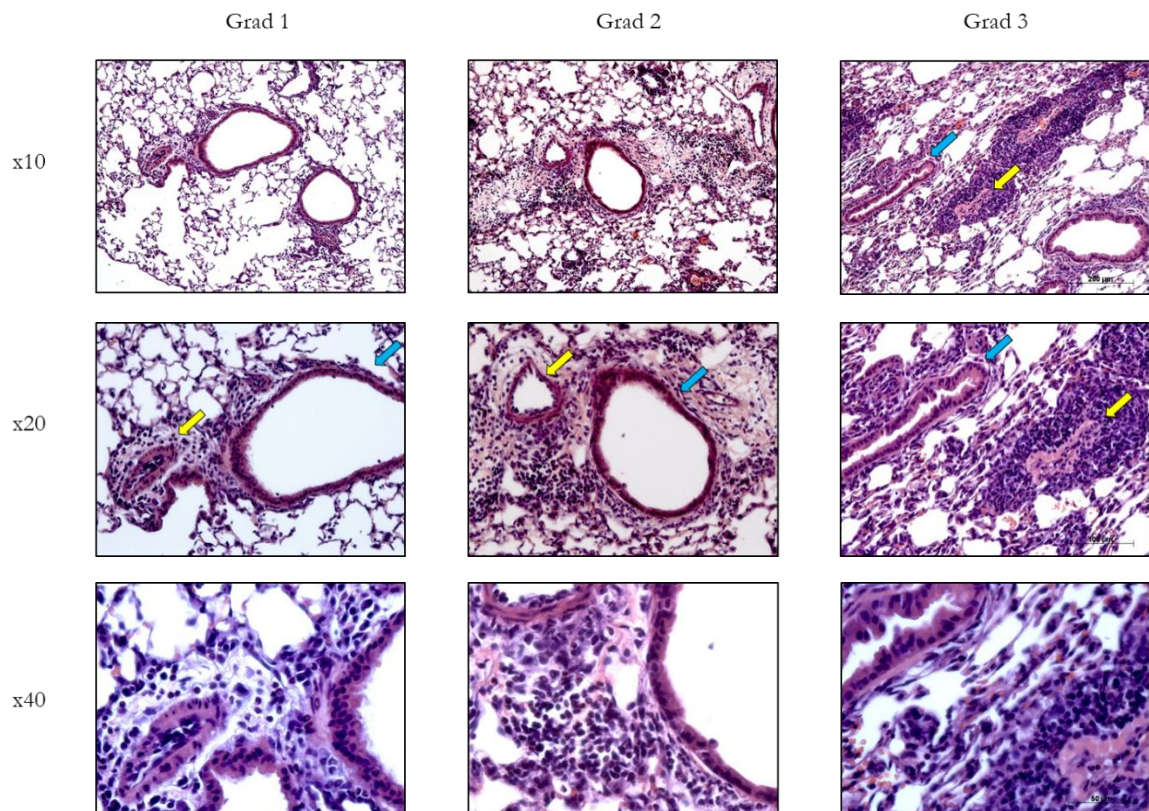
Dargestellt sind beispielhaft die histologischen Lungenpräparate einiger Versuchstiere. Die Ausprägungsgrade der Becherzellhyperplasie sind mit den Ziffern 1-3 angegeben und stehen sinngemäß für eine leichte, moderate oder schwere Ausprägung. Die mit Muzinen gefüllten Becherzellen sind deutlich eosinophiler als die übrigen Zellen des respiratorischen Epithels. Alle Schnitte wurden nach Abschluss des jeweiligen Versuchsprotokolls hergestellt und in 20-facher Vergrößerung fotografiert. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200 µm.

2.2.7.2 Beurteilung des pulmonalen Zellinfiltrates

Zur Beurteilung der nach inhalativer Provokation mit OVA auftretenden pulmonalen Entzündung wurden Lungenpräparate mit Haematoxylin und Eosin gefärbt. Verwendet wurden hierfür Lungen von Mäusen, an denen zuvor keine BAL durchgeführt worden war. Die Aufnahmen erfolgten lichtmikroskopisch in doppelt verblindeter Form und wurden semiquantitativ ausgewertet (Tournoy et al. 2000; Lee et al. 2007) (Tab. 13). Pro Tier wurden zwei Aufnahmen angefertigt. Bewertet wurde dabei die Menge an Entzündungszellen in zuvor definierten Gewebsarealen. Hierzu zählten perivenöser, periarterieller, peribronchialer und alveolärer Gewebsraum. Je nach Schweregrad der Entzündung wurden für jedes Kriterium bis zu drei Punkte vergeben und aus dem Mittelwert eine Punktzahl für jedes Individuum errechnet (Beispiele verschiedener Ausprägungsgrade der Becherzellhyperplasie in **Abb. 6**).

Tabelle 13: Beurteilung des pulmonalen Zellinfiltrates

Grad	Perivenös/periarteriell	Peribronchial	Alveolär
0	Keine Zellen	Keine Zellen	Keine Zellen
1	Einige Gefäße sind von inflammatorischen Zellen umgeben	Einige Bronchien sind von inflammatorischen Zellen umgeben	Vereinzelte Zellen in den Alveolarwänden
2	Die meisten Gefäße sind von einer dünnen Schicht inflammatorischer Zellen (1 – 5 Zellen) umgeben	Die meisten Bronchien sind von einer dünnen Schicht inflammatorischer Zellen (1 – 5 Zellen) umgeben	Fleckig erhöhtes Zellaufkommen
3	Die meisten Gefäße sind von einer dicken Schicht inflammatorischer Zellen (> 5 Zellen) umgeben	Die meisten Bronchien sind von einer dicken Schicht inflammatorischer Zellen (> 5 Zellen) umgeben	Deutliches Vorhandensein von Entzündungszellen im gesamten Präparat

**Abbildung 6: Lungenhistologie HE, pulmonales Zellinfiltrat**

Dargestellt sind beispielhaft die histologischen Lungenpräparate einiger Versuchstiere. Die Ausprägungsgrade pulmonaler Zellinfiltration werden mit den Ziffern 1 – 3 angegeben und stehen für leichte, moderate oder schwere Entzündung. Gelbe Pfeile markieren Blutgefäße, blaue Pfeile Atemwegsabschnitte. Die Schnitte werden in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung präsentiert. Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 200 µm.

2.2.8 Statistische Auswertung

Voneinander unabhängige Experimente wurden mit der jeweils angegebenen Tierzahl pro Gruppe durchgeführt. Die grafische und statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Microsoft Excel. Sämtliche Werte in den Säulen- und Liniendiagrammen wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Signifikanzen wurden mithilfe des zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Tests für gleiche Varianzen errechnet. Dabei entsprachen die Signifikanzniveaus * $p \leq 0.05$ (schwach signifikant), ** $p \leq 0.01$ (signifikant), *** $p \leq 0.001$ (hoch signifikant). Zur eingängigeren Visualisierung erfolgte die Darstellung einiger Diagramme zusätzlich als Boxplot. Bei diesen geben die Boxen eine Datenmenge wieder, in der sich 50% aller erhobenen Werte befinden (Interquartilsabstand). Die Grenzen der Box entsprechen den Werten für das untere beziehungsweise obere Quartil (25 beziehungsweise 75% der Messwerte sind kleiner als diese Grenzen). Whisker visualisieren den Wertebereich der Quartile und enden mit dem Maximal- beziehungsweise Minimalwert des Datensatzes (Querstriche). Punkte außerhalb der Whisker stellen Ausreißer dar und befinden sich per Definition jenseits des 1,5-fachen Interquartilsabstandes. Bei ungerader Anzahl der Werte im Datensatz wurde der Median nicht in die Quartilenberechnung einbezogen (exklusiver Median).

3 Ergebnisse

Um den Einfluss einer genetisch determinierten Hautbarriereschädigung auf den atopischen Marsch zu erfassen, wurden Wt- und *FlgHrrr*^{-/-}-Mäuse untersucht. Parallel zur Sensibilisierung und Induktion einer Atemwegsallergie durch OVA wurde der Einfluss einer durch topische Applikation von MC903 hervorgerufenen *AD-like*-Dermatitis sowohl auf die Sensibilisierung als auch auf die *Challenge*-Phase getrennt voneinander untersucht. Jede Stufe im Krankheitsverlauf wurde unter folgenden Aspekten analysiert:

- (1) Lokale Effekte einer MC903-induzierten *AD-like*-Dermatitis auf Mäuseohren
- (2) Status der Antigen-Sensibilisierung nach systemischer Sensibilisierung mit OVA
- (3) Schweregrad der Atemwegsentzündung (Typ-I-Allergie) gemessen am zellulären Infiltrat in der BAL und der Histologie
- (4) Systemische Mechanismen: Serum TSLP-Spiegel

Ergebnisse der Untersuchungen aus Sensibilisierungs- und Provokationsmodell wurden getrennt voneinander vorgestellt.

3.1 Auswirkung einer *AD-like*-Dermatitis während der Sensibilisierungsphase auf den atopischen Marsch

3.1.1 *AD-like*-Dermatitis führt bei *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen zu ausgeprägter Reaktion im *Mouse-ear-swelling-Test*

Zur Induktion einer *AD-like*-Dermatitis wurden *FlgHrrr*^{-/-}- und Wt-Mäuse über 13 Tage topisch mit dem Vitamin D₃-Analogon MC903 behandelt. Die Anwendung erfolgte in einer Dosis von je 4 nmol MC903 pro Ohr (gesamt: 8 nmol) und führte zur Ausbildung AD-typischer Läsionen. Die Haut war zunächst gerötet und geschwollen, im weiteren Verlauf auch zunehmend schuppig und lichenifiziert (**Abb. 7**).

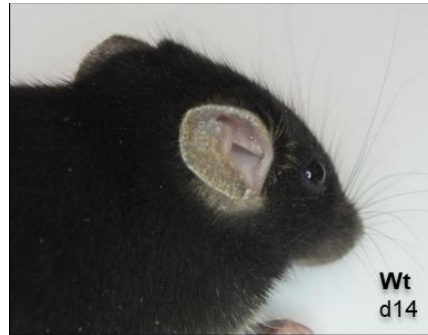


Abbildung 7: Hautläsion nach MC903-Applikation, aufgenommen 18 Tage nach Erstkontakt (d14)

Die topische Anwendung von MC903 hatte bei Mäusen beider Gruppen zunächst klassische Zeichen der Entzündung im Sinne einer Rötung und Schwellung (beginnend ab dem vierten Tag nach der ersten Anwendung) und später eine zunehmende Schuppung und Verkrustung der Ohren zur Folge. Das klinische Bild erinnert an die atopische Dermatitis des Menschen.

Die Ohrschwellung durch Ödem und Zellinfiltration ist ein Surrogatparameter der Entzündung. Der makroskopische Befund schritt über den Versuchszeitraum kontinuierlich voran und präsentierte sich in beiden Gruppen, bezogen auf den Anstieg und den Maximalwert, mit einer ähnlichen Dynamik. Wiederholter Kontakt zu MC903 führte bei Tieren mit *FlgHrrr*-Defizienz verglichen mit Wt zu einer stärker ausgeprägten und frühzeitiger einsetzenden *AD-like*-Dermatitis (**Abb. 8 a**). Signifikante bis hoch signifikante Unterschiede der Ohrdicken bestanden zu den vier Messzeitpunkten d3, d6, d8 und d10. Größte Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren zu den Zeitpunkten d8 und d10 zu beobachten. Ihr Maximum erreichten die Werte der *FlgHrrr*^{-/-}-Mäuse am d10 ($0,23 \pm 0,02$ mm), bevor sie bis zum d18 wieder abfielen ($0,2 \pm 0,02$ mm). Wt-Tiere hingegen zeigten eine bis weit über den letzten Tag der MC903-Applikation (d8) hinausgehende Zunahme der Ohrdicken ($0,22 \pm 0,02$ mm an d18). Tiere der Kontrollgruppen (*FlgHrrr*^{-/-}(EtOH), Wt(EtOH)) wurden mit Ethanol behandelt, was keine Reaktion hervorrief (**Abb. 8 b**). PBS-Kontrollen zeigten ebenfalls keine Ohrschwellungen. Hierbei wiesen mit MC903 behandelte *FlgHrrr*-defiziente Mäuse signifikant (d8) bis hochsignifikant (d10) stärkere Schwellungen auf als Wt-Mäuse (**Abb. 8 c**). Topischen Anwendung von Ethanol führte auch hier in beiden Mauslinien zu keinerlei Reaktion (**Abb. 8 d**).

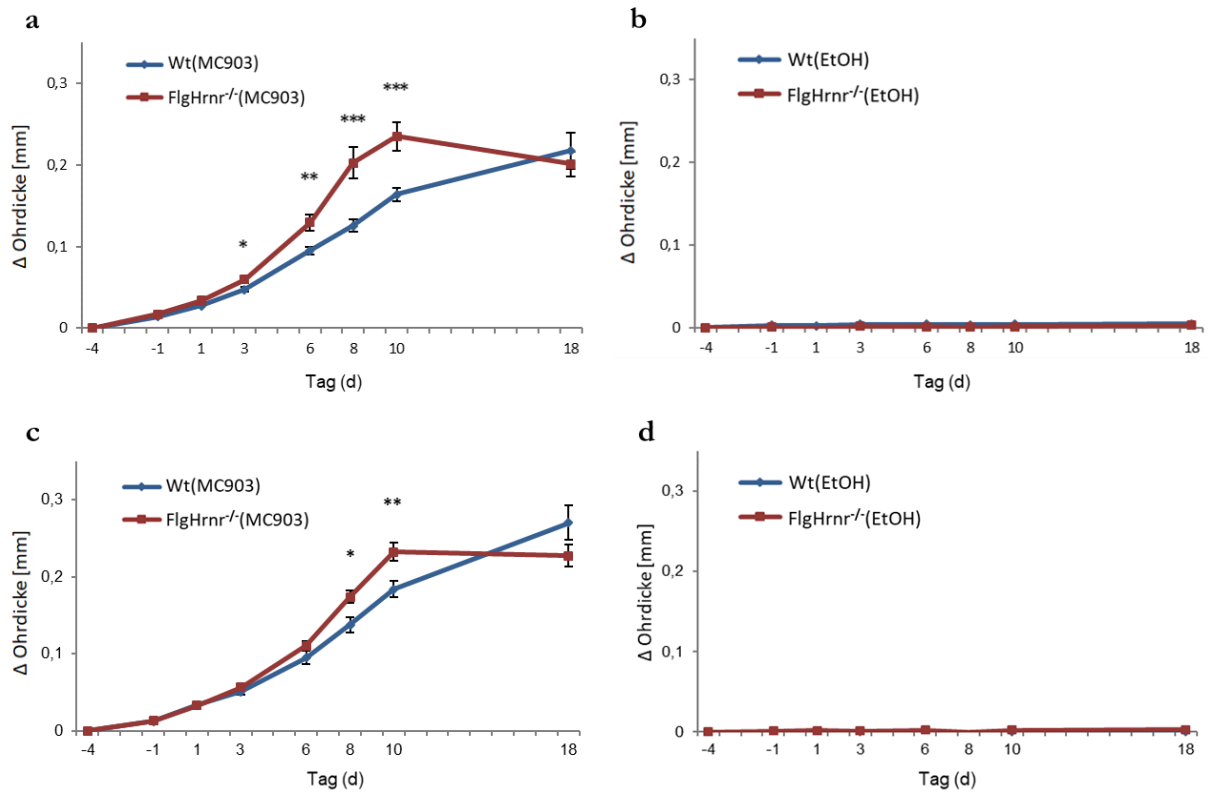


Abbildung 8: Schwellung von Mausohren nach wiederholtem Kontakt mit MC903

Dargestellt sind die Ergebnisse wiederholter Messungen der Ohrdicken der Versuchstiere bei wiederholter topischer Anwendung von MC903 (**a, c**) beziehungsweise EtOH (**b, d**) zu den Zeitpunkten d-4, d-1, d1, d3, d6 und d8 entsprechend des Protokolls in Abb. 2 (Kap. 4.2.4). Parallel zu der Behandlung fand eine Sensibilisierung der Mäuse mit OVA (**a, b**) oder PBS (**c, d**) statt. Die Kurven zeigen die Zunahme ausgehend vom jeweiligen Ursprungswert eines jeden Tieres. Abgebildet sind arithmetische Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzniveaus entsprechen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 17$ (d18 $n = 14$) (**a**); $n = 15$ (d18 $n = 12$) (**b**), $n = 12$ (**c, d**).

3.1.2 *FlgHrrn*⁻¹-Mäuse mit *AD-like*-Läsionen weisen erhöhte Serumspiegel von OVA-IgG₁ und Gesamt-IgE nach systemischer OVA-Sensibilisierung auf

Aus den zu den Zeitpunkten d-4, d18 und d22 entnommenen Blutproben wurden die Serumspiegel von OVA-spezifischem IgG₁ und Gesamt-IgE durch ELISA bestimmt. Ziel war eine Verfolgung des Sensibilisierungs-Status der Mäuse.

Die Sensibilisierung durch intraperitoneale OVA-Injektionen hatte zunächst in allen Versuchstieren einen Anstieg des OVA-spezifischen IgG₁ zur Folge. Zusätzlich mit MC903 behandelte Tiere wiesen bis zum d18 einen insgesamt stärkeren Anstieg der Serumspiegel auf als ihre EtOH-Kontrollen. Zum d22 nahmen die IgG₁-Konzentrationen weiter zu (**Abb. 9 a**). Dieser Effekt stellte sich sowohl bei Wt- als auch bei *FlgHrrn*⁻¹-Mäusen ein. Bei den mit EtOH behandelten Tiere wiesen *FlgHrrn*⁻¹- zum d18 leicht höhere Werte auf als Wt-Mäuse (1172 ± 223 ng/ml vs. 777 ± 115 ng/ml). Diese Tendenz setzte sich zum d22 fort, war insgesamt jedoch nur gering ausgeprägt. Die höchsten Werte wurden in der Gruppe der

mit MC903 behandelten *FlgHrrr*-defizienten Mäuse beobachtet. Hier zeigte sich bereits zum d18 ein stärkerer Anstieg des OVA-spezifischen IgG₁ (3310 ± 590 ng/ml bei *FlgHrrr*^{-/-}- vs. 1402 ± 270 ng/ml bei ebenfalls mit MC903 behandelten Wt-Mäusen) (**Abb. 9 a**). Nach viermaliger inhalativer OVA-Provokation stieg der OVA-IgG₁-Serumspiegel bei *FlgHrrr*^{-/-}(MC903)-Mäusen erneut stark an (6460 ± 1690 ng/ml), während die Serumspiegel der Wt(MC903)-Mäuse nur geringfügig zunahmen. Die Messwerte streuten stark (**Abb. 9 b**). Kontrollgruppen zeigten nach zweimaliger intraperitonealer Applikation von PBS keinen Anstieg ihrer OVA-spezifischen IgG₁-Serumspiegel (**Abb. 9 c, d**).

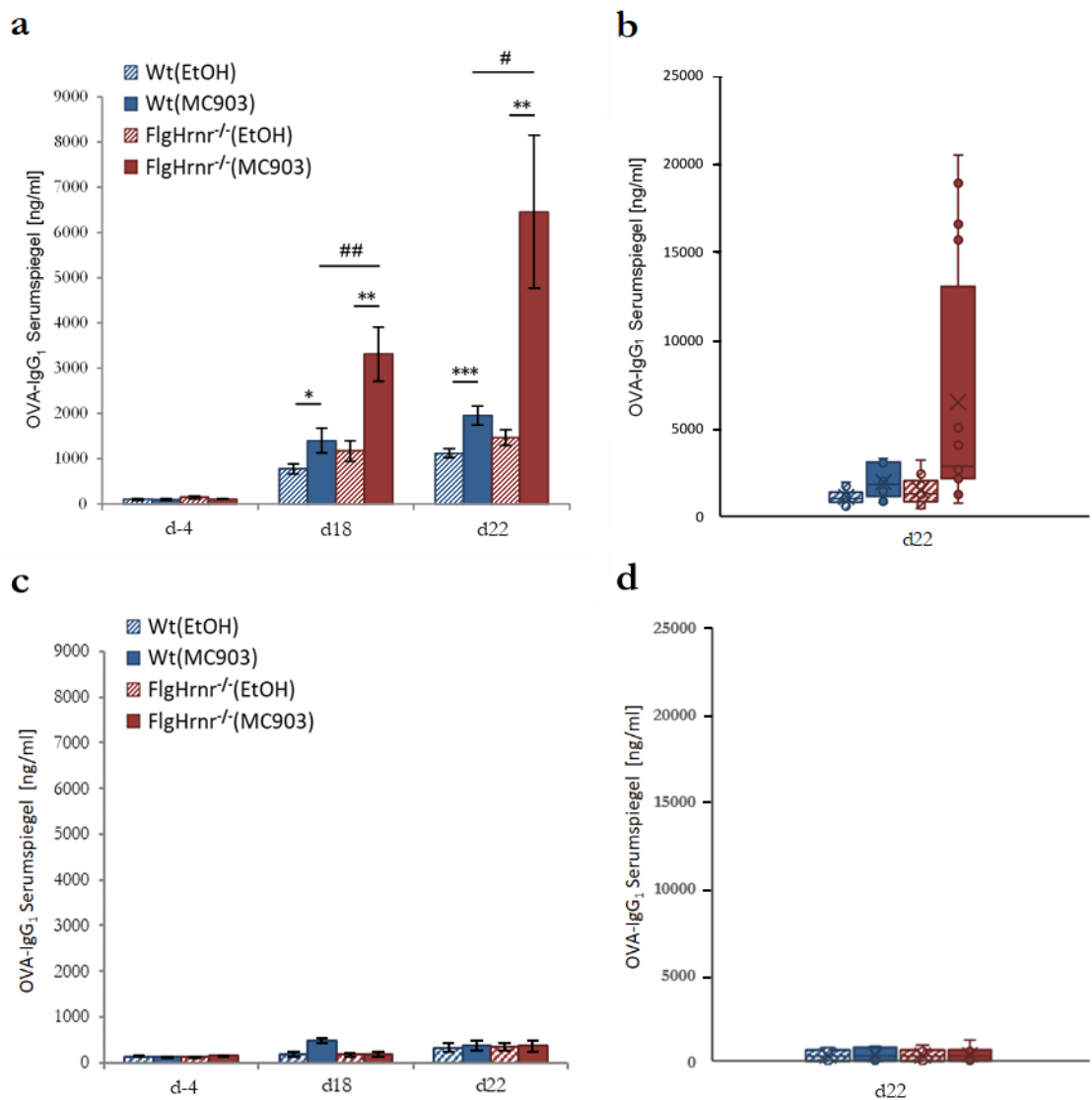
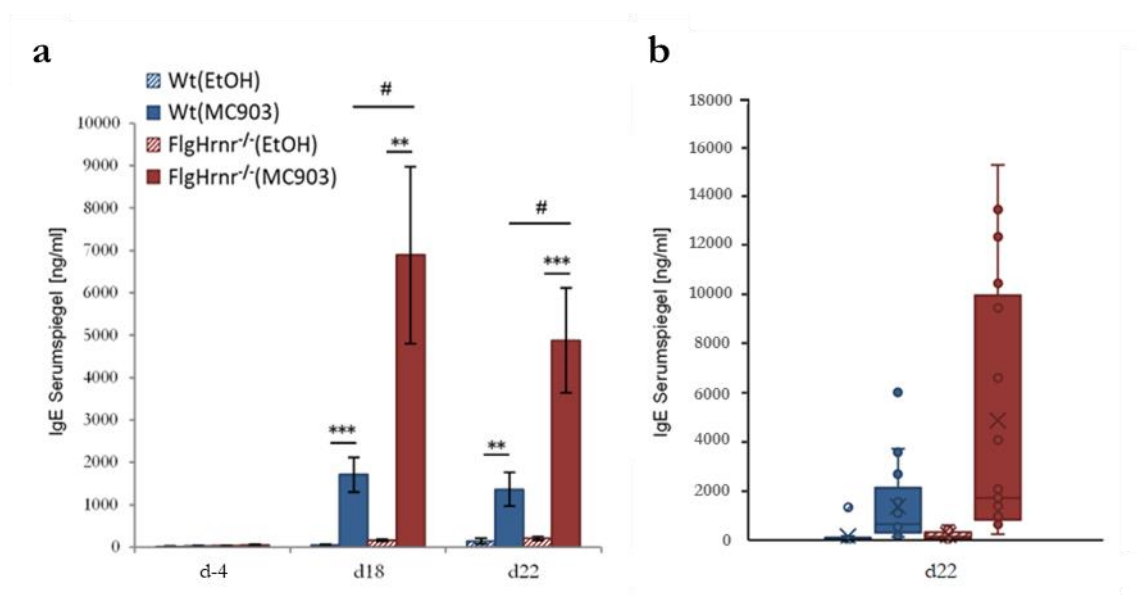


Abbildung 9: OVA-IgG1-Serumspiegel bei mit OVA oder PBS sensibilisierten Mäusen

Den Mäusen zu insgesamt drei Zeitpunkten (d-4, 18, 22) entnommene Serumproben wurden mittels ELISA auf den Gehalt von OVA-spezifischem IgG₁ überprüft. Dargestellt sind die OVA-IgG₁-Serumspiegel der mit OVA (**a, b**) oder PBS (**c, d**) behandelten Versuchstiere. Die Balken zeigen arithmetische Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzniveaus entsprechen: * oder # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Boxen im Boxplot-Diagramm geben den Datensatz wieder, in dem sich 50% aller Werte befinden. Der horizontale Strich markiert die Lage des Medians. X = Mittelwert. Die Grenzen der Box entsprechen den Werten für das untere und obere Quartil (25 beziehungsweise 75%). $n = 16$ (a, b); $n = 12$ (c, d).

Ein Anstieg des Gesamt-IgE ließ sich nach abgelaufener intraperitonealer OVA-Sensibilisierung insbesondere bei den zusätzlich mit MC903 behandelten Mäusen beobachten. Die Gesamt-IgE-Spiegel der EtOH-Kontrollgruppen veränderten sich über den Messzeitraum nur minimal. *FlgHrrr*^{-/-}(EtOH)- und Wt(EtOH)-Mäuse zeigten zum d18 lediglich einen geringfügigen Anstieg der IgE-Serumkonzentrationen. Zum d22, also nach repetitiver inhalativer OVA-Provokation, wiesen diese Gruppen ebenfalls nur eine leichte zusätzliche Erhöhung der entsprechenden IgE-Konzentrationen auf. Es zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den Mauslinien Wt(EtOH) und *FlgHrrr*^{-/-}(EtOH) bei ausschließlich topischer Behandlung mit Ethanol. Starke Anstiege der Gesamt-IgE-Konzentrationen ließen sich nur bei Tieren feststellen, die aufgrund ihrer Behandlung mit MC903 Symptome einer *AD-like*-Dermatitis ausgebildet hatten. Sowohl *FlgHrrr*^{-/-}(MC903)- als auch Wt(MC903)-Mäuse wiesen zum d18 ihre höchsten IgE-Serumspiegel auf (6900 ± 2100 ng/ml beziehungsweise 1710 ± 710 ng/ml) (**Abb. 10 c**). Anschließend sanken die Konzentrationen in beiden Gruppen leicht ab. Die Serumspiegel der mit MC903-behandelten *FlgHrrr*^{-/-}-Mäuse waren zu beiden Zeitpunkten (vor d18 und nach inhalativer OVA-Provokation zu d22) signifikant höher als die der Wt-Mäuse. Kontrollgruppen zeigten nach zweimaliger intraperitonealer Injektion von PBS nur geringe Abweichungen von den an d-4 ermittelten Ausgangswerten (**Abb. 10 c**). Leichte Zunahmen zeigten sich bei den mit MC903 behandelten Tieren, hier vor allem in der Gruppe *FlgHrrr*^{-/-}(MC903). **Abb. 10 d** gibt die starke Streuung der Einzelwerte mitsamt statistischen Ausreißern wieder.



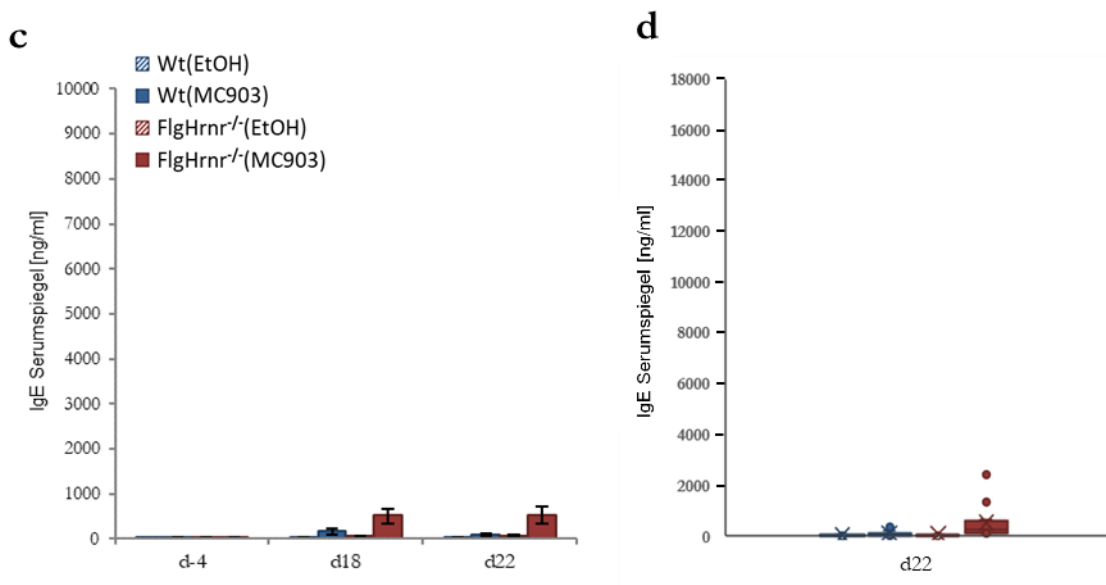


Abbildung 10: IgE-Konzentrationen im Serum OVA- oder PBS-sensibilisierter Mäuse

Den Mäusen an d-4, d18 und d22 entnommene Serumproben wurden mittels ELISA auf den Gehalt von IgE überprüft. Dargestellt sind die Serumspiegel der mit OVA (a, b) oder PBS (c, d) behandelten Versuchstiere. Die Balken zeigen arithmetische Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzniveaus entsprechen: * oder # $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Boxen im Boxplot-Diagramm geben den Datensatz wieder, in dem sich 50% aller Werte befinden. Der horizontale Strich markiert die Lage des Medians. X = Mittelwert. Die Grenzen der Box entsprechen den Werten für das untere und obere Quartil (25 beziehungsweise 75%). Punkte außerhalb der Whisker stellen Ausreißer dar. $n = 16$ (a, b); $n = 12$ (c, d).

3.1.3 Zeitgleiche Auslösung einer Hautentzündung und Antigen-Sensibilisierung bewirkt eine Zunahme von Entzündungszellen in der BAL

FlgHrrn⁻¹-sowie Wt-Mäuse wurden intraperitoneal zweimal mit OVA sensibilisiert (d0, d7). Durch anschließende Provokation der Atemwege mit zerstäubtem OVA entwickelten die Tiere Zeichen einer allergischen Atemwegserkrankung. Luminales Entzündungsinfiltrat wurde am Versuchsende (d22) durch BAL gewonnen und die darin enthaltenen Entzündungszellen bestimmt. Die Behandlung führte zum Anstieg des Zellgehalts in den BAL-Flüssigkeiten aller Versuchstiere (Abb. 11 a). Insgesamt wiesen Mäuse nach MC903-Behandlung und ungeachtet ihres genetischen Hintergrundes signifikant höhere Zellzahlen auf als Mäuse, die lediglich mit EtOH behandelt wurden (Abb. 11 a). Bei lediglich mit EtOH behandelten Mäusen (*FlgHrrn*⁻¹(EtOH), Wt(EtOH)) zeigten sich nur minimal höhere Werte in der Gruppe der *FlgHrrn*⁻¹-Tiere ($3.400.000 \pm 381.000$ Zellen) verglichen mit Wt-Mäusen ($2.854.000 \pm 336.000$ Zellen). Auch zwischen den beiden mit MC903 behandelten Gruppen waren nur geringe Unterschiede feststellbar ($6.382.000 \pm 658.000$ Zellen bei mit MC903 behandelten *FlgHrrn*⁻¹-Tieren und $5.833.000 \pm 518.000$ Zellen bei Wt-Tieren).

Ähnliche Signifikanzverhältnisse zeigten sich auch bei Eosinophilen, die in allen vier Gruppen vorherrschten (Abb. 11 c). Der Eosinophilen-Anteil betrug bei *FlgHrrn*⁻¹(MC903)-

Mäusen $76,5 \pm 1,9 \%$, bei Wt(MC903)-Mäusen $71,6 \pm 1,9 \%$, bei *FlgHrrn*^{-/-}(EtOH)-Mäusen $67,3 \pm 1,6 \%$ und bei Wt(EtOH)-Mäusen $57,9 \pm 2,1$. Alveolarmakrophagen waren in allen vier Gruppen der zweithäufigste Zelltyp und machten bei *FlgHrrn*^{-/-}(MC903)-Mäusen $14,9 \pm 5,2\%$, bei Wt(MC903)-Mäusen $18,0 \pm 4,6\%$, bei *FlgHrrn*^{-/-}(EtOH)-Mäusen $19,5 \pm 1,1\%$ und bei Wt(EtOH)-Mäusen $25 \pm 1\%$ aller Zellen aus. Lavageflüssigkeiten von mit PBS/Alum (i. p.) exponierten Kontrollgruppen enthielten durchschnittlich lediglich 87.000 ± 19.000 Zellen (zu >98% Makrophagen; Mittelwert aller vier Gruppen; **Abb. 11 b** und **d**).

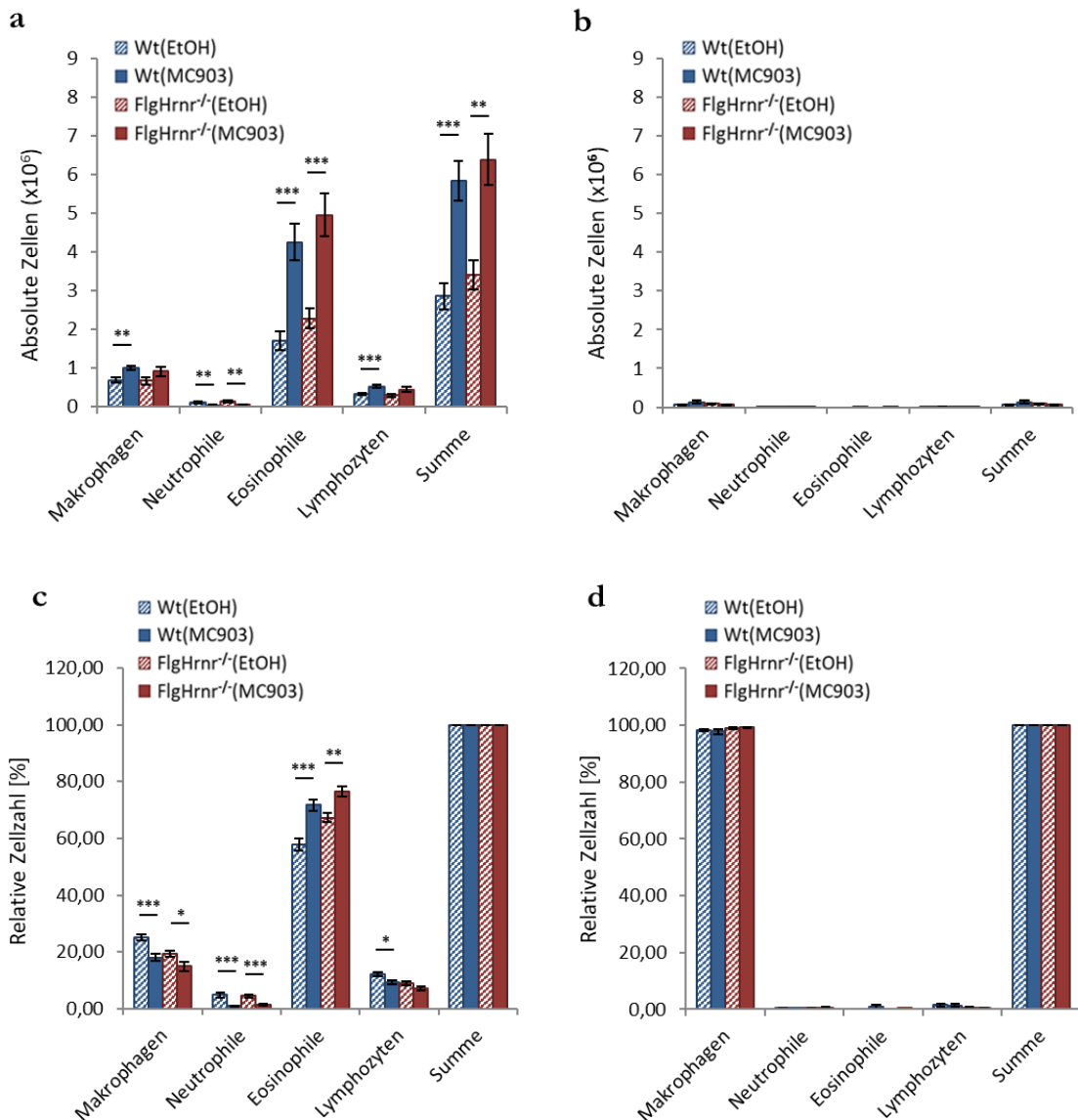


Abbildung 11: Zellzählungen in BAL nach OVA- und PBS-Provokation

Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellzählungen aus den am Versuchsende (d22) gewonnenen Lavageflüssigkeiten (absolute (**a, c**) und relative Zellzahlen (**b, d**). Abgebildet sind die arithmetischen Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzniveaus entsprechen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 12$ (a, b), $n = 6$ (c, d).

3.1.4 *AD-like*-Dermatitis induziert eine leicht erhöhte Becherzellhyperplasie nach inhalativer OVA-Provokation

Die histologische Auswertung der Lungenpräparate erfolgte semiquantitativ mit einem Punktesystem für Becherzellhyperplasien (Kap. 4.2.7.1, Tab. 12). Hierbei zeigten, mit Ausnahme einiger Wt(EtOH)-Mäuse, alle intraperitoneal mit OVA sensibilisierten Tiere nach viermaliger inhalativer OVA-Provokation eine moderate bis schwere pulmonale Entzündung (**Abb. 12 a**). Die Werte der mit MC903 behandelten Tiere (*FlgHrrn*^{-/-}(MC903), Wt(MC903)) waren etwas höher als die der korrespondierenden Kontrollgruppen. Mit MC903 behandelte *FlgHrrn*-defiziente Tiere (*FlgHrrn*^{-/-}(MC903)) erreichten mit 2,6 Punkten einen insgesamt etwas höheren Wert als die Wt-Gruppe (2,3 Punkte). Tiere der lediglich mit PBS/Alum behandelten Vergleichsgruppen zeigten hingegen kaum reaktive Becherzellhyperplasie (durchschnittlich < 0,2 Punkte; **Abb. 12 b**).

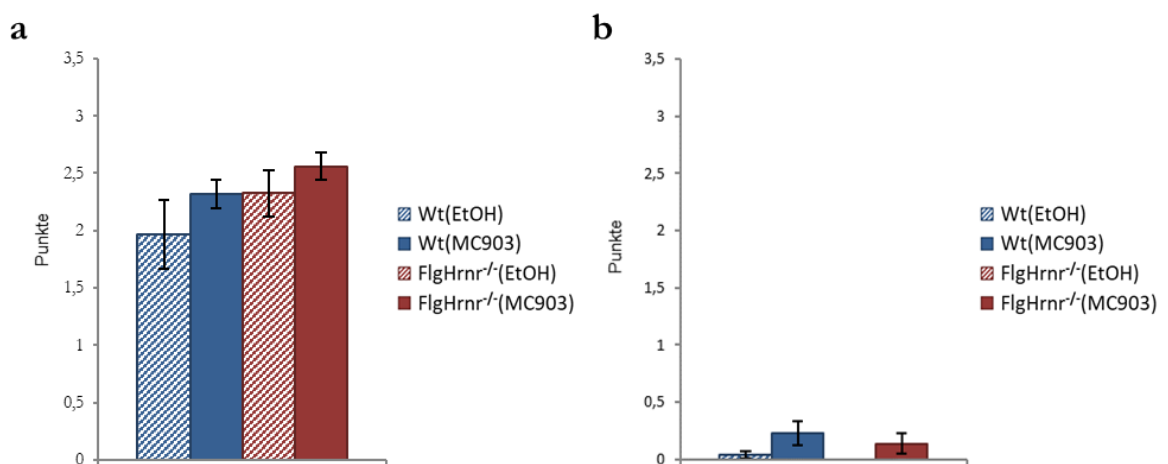


Abbildung 12: Becherzellhyperplasie nach inhalativer OVA- oder PBS-Provokation

Ausgewählte Lungenpräparate wurden mit einem Punktesystem für Becherzellhyperplasie bewertet. Beurteilt wurden pro Maus jeweils fünf Bronchioli mit einem Mindestdurchmesser von 200 µm. Je nach Verhältnis von Becherzellen zu übrigen Zellen im angeschnittenen Bronchiolus werden bis zu drei Punkte vergeben (für leichte, moderate oder schwere Erkrankung). Sensibilisierung und Provokation erfolgten mittels OVA (**a**) oder PBS (**b**). Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte + SEM. n = 5 (a); n = 6 (b).

3.1.5 Kein vermehrtes pulmonales Infiltrat nach inhalativer OVA-Challenge

Die histologische Auswertung der pulmonalen Infiltrate erfolgte wieder durch ein Punktesystem (Kap. 4.2.7.2, Tab. 13). Sämtliche sensibilisierten Tiere zeigten nach viermaliger inhalativer OVA-Provokation eine moderate bis schwere Entzündung (2 bis 3 Punkte; **Abb. 13 a**). Mit MC903 behandelte Tiere wiesen hierbei keine höheren Werte auf als EtOH-Kontrollgruppen. Beim Vergleich beider Mauslinien präsentierten unter den mit EtOH behandelten Tieren Wt mit $2,44 \pm 0,24$ Punkten etwas höhere Werte als *FlgHrrn*^{-/-}-Tiere ($2,06 \pm 0,23$ Punkte). Bei den mit MC903 behandelten Mäusen wiesen *FlgHrrn*^{-/-}- nur geringfügig höhere Werte auf als Wt-Tiere. Mit PBS/Alum behandelte Mäuse wiesen kaum Anzeichen einer pulmonalen Entzündung auf (< 0,5 Punkte; **Abb. 13 b**).

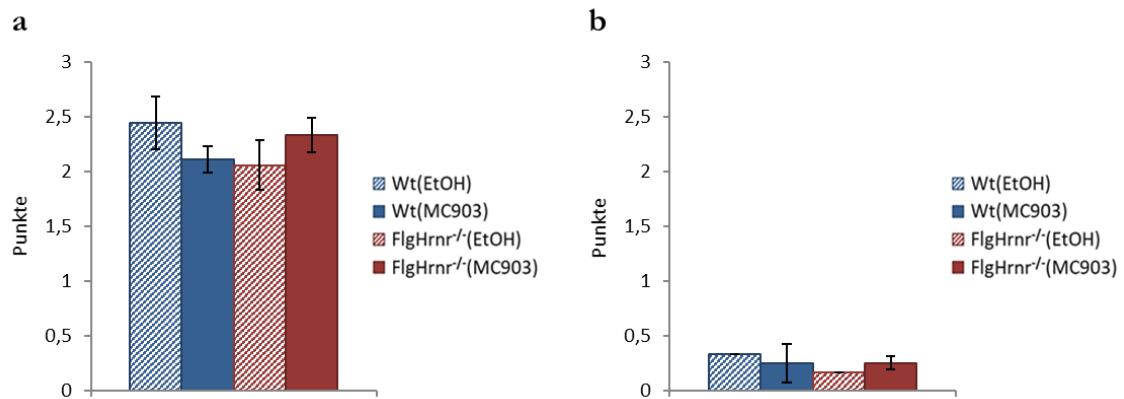


Abbildung 13: Pulmonales Infiltrat nach inhalativer OVA- oder PBS-Provokation

Pulmonale Infiltrate wurde mit einem Punktesystem bewertet (Kap. 4.2.7.1 (Tab. 13). Sensibilisierung und Provokation erfolgten mit OVA **(a)** oder PBS **(b)**. Gezeigt sind Mittelwerte + SEM. $n = 3$ (a); $n = 2$ (b).

3.1.6 Anstieg des TSLP-Serumspiegels nach inhalativer OVA-Challenge

Serumspiegel von TSLP wurden ebenfalls durch ELISA bestimmt. Messwerte von d-4 und d18 liegen dabei vor der ersten topischen Anwendung von MC903 beziehungsweise dem Beginn der *Challenge*-Phase. Blutentnahmen am d22 erfolgten nach Abschluss der *Challenge*. Die Kombination aus topischer Anwendung von MC903 und intraperitonealer OVA-Sensibilisierung hatte zunächst nur geringe Veränderungen der TSLP-Serumkonzentration zur Folge (**Abb. 14 a**). Eine signifikante Zunahme fand erst zum d22 nach repetitiver OVA-Challenge statt. Deutliche Anstiege zeigten sich bei *FlgHrrr*⁻¹(MC903)- und Wt(MC903)-Mäusen bei insgesamt starker Varianz der Einzelwerte (**Abb. 14 b**). In den Gruppen der mit Ethanol behandelten Tiere wiesen *FlgHrrr*⁻¹ zum d22 mit 367 ± 102 pg/ml verglichen zu 155 ± 35 pg/ml leicht höhere Werte auf als korrespondierende Wt. Die höchsten Werte ließen sich zum Versuchsende (d22) bei mit MC903 behandelten *FlgHrrr*-defizienten Tieren (697 ± 166 pg/ml) und Wt-Mäusen (589 ± 151 pg/ml) beobachten. Kontrollgruppen beider Mauslinien zeigten nach zweimaliger i. p.-Injektion von PBS in Kombination mit topischer Anwendung von MC903 oder Ethanol keine Erhöhung der TSLP-Serumkonzentrationen (**Abb. 14 c, d**).

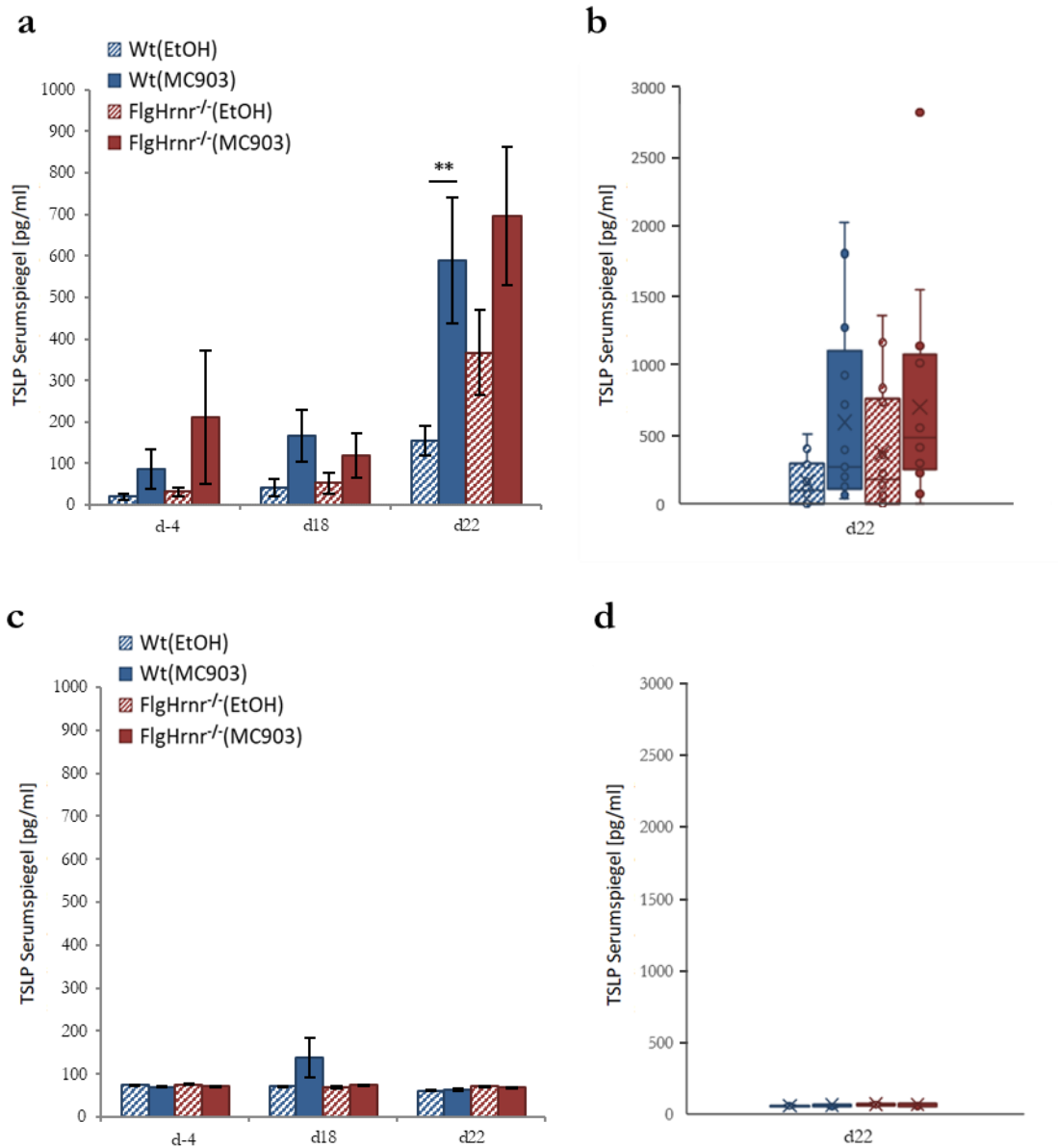


Abbildung 14: TSLP-Serumspiegel

Dargestellt sind die Serumkonzentrationen von TSLP an d-4, d18 und d22. *FlgHrrr*^{-/-}- und *Wt*-Mäuse wurden jeweils parallel zur i. p. OVA-Sensibilisierung topisch mit MC903 oder EtOH behandelt (**a, b**). Daten aus **c** und **d** entsprechen den PBS-Kontrollen. Abgebildet sind arithmetische Mittelwerte + SEM. Das Signifikanzniveau entspricht ** $p < 0,01$. Boxen im Boxplot-Diagramm geben den Datensatz wieder, in dem sich 50% aller Werte befinden. Der horizontale Strich markiert die Lage des Medians. X = Mittelwert. Die Grenzen der Box entsprechen den Werten für das untere und obere Quartil (25 beziehungsweise 75%). Punkte außerhalb der Whisker stellen Ausreißer dar. $n = 16$ (a und b), $n = 6$ (c und d).

3.2 AD-like-Dermatitis in der Challenge-Phase

3.2.1 Ausgeprägtere Reaktion von *FlgHrrr*^{-/-} im Mouse-ear-swelling-Test auch bei Kurzzeitanwendung von MC903

Parallel zur inhalativen OVA-Provokation wurden Mäuse an vier aufeinander folgenden Tagen topisch mit MC903 behandelt (4 nmol auf jedes Ohr). Sowohl *FlgHrrr*^{-/-} als auch Wt-Mäuse zeigten die typische Rötung und Schwellung am Applikationsort. Lichenifikation und Schuppung blieben wegen des kurzen Messzeitraumes aus. Bereits nach 24 h (d19) ließen sich leichte Dickenunterschiede zwischen Wt ($\Delta 0,0035 \pm 0,001$ mm) und *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen ($\Delta 0,058 \pm 0,002$ mm) erkennen (**Abb. 15 a**). Der Kurvenverlauf war bei *FlgHrrr*^{-/-} etwas steiler als bei Wt-Mäusen. Am Versucheende wurden $\Delta 0,031 \pm 0,003$ mm (Wt(MC903)) und $\Delta 0,04 \pm 0,002$ mm (*FlgHrrr*^{-/-}(MC903)) ermittelt. PBS-Kontrollen hatten einen ähnlichen Verlauf. Mittelwerte der *FlgHrrr*-defizienten Mäuse überstiegen jene der Wt jedoch erst ab dem dritten Tag nach Beginn der MC903-Behandlung (d21) (**Abb. 15 c**). Topische Anwendungen von Ethanol bewirkten in beiden Mauslinien keine Reaktion (**Abb. 15 b, d**).

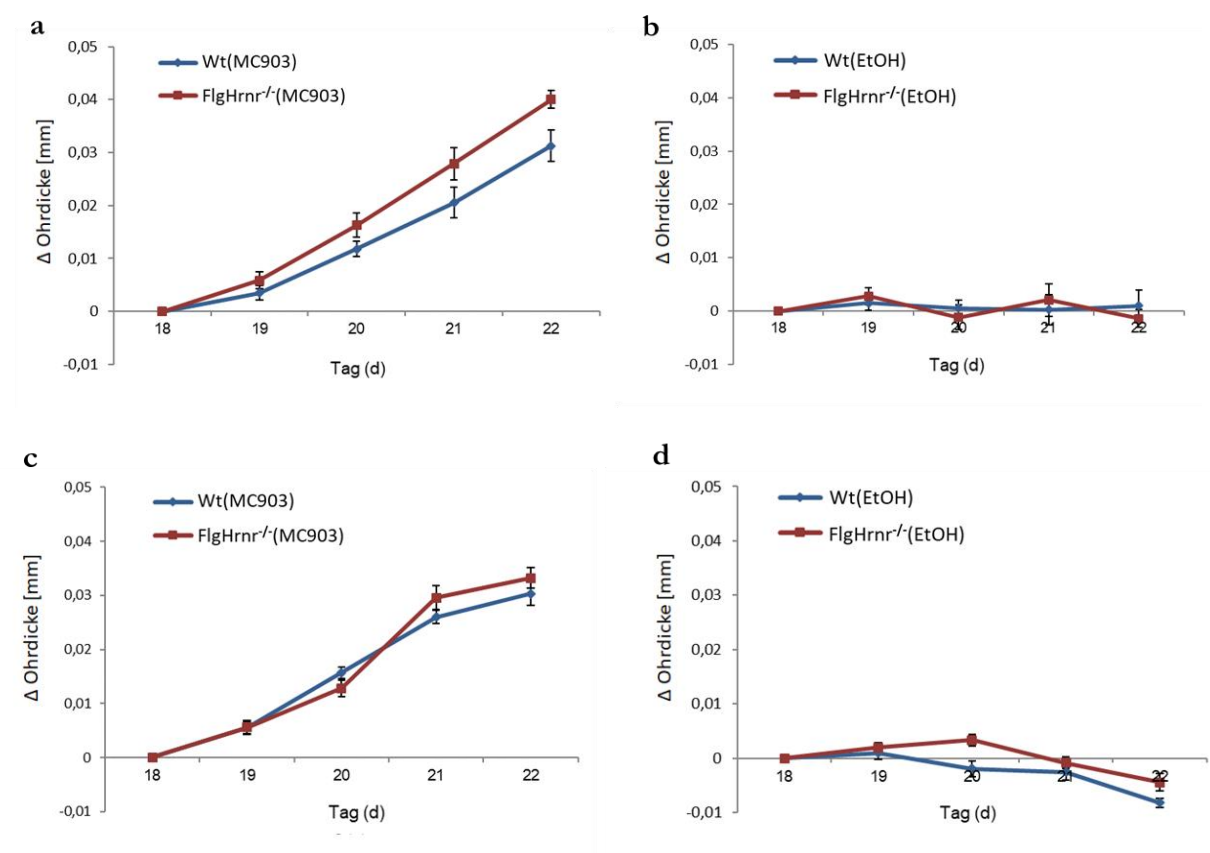


Abbildung 15: Schwellung von Mausohren nach wiederholtem Kontakt mit MC903

Dargestellt sind die Ohrdicken von Mäusen bei wiederholter topischer Anwendung von MC903 (**a, c**) oder EtOH (**b, d**) an d18, d19, d20 und d21 entsprechend des Protokolls in Abb. 3 (Kap. 4.2.4). Parallel zu der Behandlung fand eine Provokation der Mäuse mit OVA (**a, b**) oder PBS (**c, d**) statt. Die Kurven spiegeln die Zunahme ausgehend vom jeweiligen Ursprungswert eines jeden Tieres wider. Abgebildet sind arithmetische Mittelwerte + SEM. n = 12.

3.2.2 Geringer Anstieg der Serumspiegel von OVA-spezifischem IgG1 und Gesamt-IgE nach systemischer OVA-Sensibilisierung

Zur Bestimmung des Sensibilisierungs-Status der Mäuse wurden zu den Zeitpunkten d-4, d18 und d22 die Serumspiegel von OVA-spezifischem IgG₁ und Gesamt-IgE mittels ELISA gemessen. Die Sensibilisierung durch intraperitoneale OVA-Injektionen hatte bereits zum d18 in allen Versuchstieren einen Anstieg des OVA-spezifischen IgG₁ zur Folge (**Abb. 16 a**). Sämtliche Mäuse waren bis zu diesem Zeitpunkt der gleichen Behandlung unterzogen worden. MC903 wurde erst nach der Blutentnahme zwischen d18 und d21 appliziert. Dennoch stiegen die Serumspiegel für OVA-spezifisches IgG₁ in *FlgHrrr*^{-/-}(MC903)- und Wt(MC903)-Mäusen im Vergleich zu den EtOH-Kontrollgruppen leicht an, ohne dass dieser Unterschied signifikant wurde. Zum d22 nahm die IgG₁-Konzentrationen in allen Gruppen weiter zu und die Werte der mit MC903 und EtOH behandelten Mäuse glichen sich an. Mit EtOH behandelte *FlgHrrr*-defiziente Mäuse wiesen zum d18 nur geringfügig höhere Werte auf als Wt-Mäuse (1258 ± 143 ng/ml und 989 ± 197 ng/ml). Diese Tendenz setzte sich bis zum d22 fort. Unterschiede zwischen den mit MC903 behandelten Mäusen waren ebenfalls gering. *FlgHrrr*^{-/-}(MC903)-Mäuse hatten zum d18 leicht höhere Werte als Wt-Mäuse (1749 ± 80 ng/ml und 1385 ± 353 ng/ml). Zum d22 glichen sich die Werte beider Linien an. Kontrollgruppen zeigten nach zweimaliger intraperitonealer Injektion von PBS keinen relevanten Anstieg ihrer OVA-spezifischen IgG₁-Serumspiegel (**Abb. 16 b**).

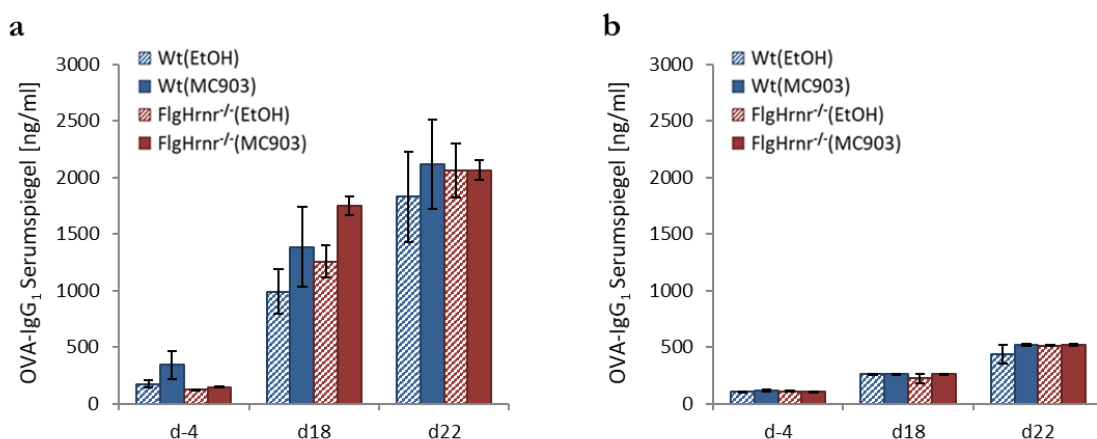


Abbildung 16: OVA-IgG1-Serumkonzentrationen nach intraperitonealer Sensibilisierung mit OVA oder PBS

Den Mäusen zu insgesamt drei Zeitpunkten (d-4, 18, 22) entnommene Serumproben wurden mittels ELISA auf den Gehalt von OVA-spezifischem IgG₁ geprüft. Dargestellt sind die OVA-IgG₁-Serumspiegel der mit OVA (**a**) oder PBS (**b**) behandelten Versuchstiere. Abgebildet sind arithmetische Mittelwerte + SEM. n = 12 (a); n = 6 (b).

Ein Anstieg des Gesamt-IgE blieb nach intraperitonealer OVA-Sensibilisierung weitgehend aus (**Abb. 17 a**). Unterschiede zwischen Tieren, die im Zeitraum d18-d21 topisch mit MC903 behandelt wurden und EtOH-Kontrollgruppen bestanden nicht. Bei ausschließlicher Aufbringung von EtOH zeigten beide Mauslinien vergleichbare Gesamt-IgE-Spiegel. Am

d22 betragen diese 237 ± 75 ng/ml (*FlgHrrn*^{-/-}(EtOH)) sowie 99 ± 18 ng/ml (Wt(EtOH)), was im Vergleich zu d18 nahezu unverändert war. Die mit MC903 behandelten Mäuse wiesen an d22 ebenfalls nur geringfügige Unterschiede auf. Bei *FlgHrrn*^{-/-}(MC903)-Mäusen betrug der IgE-Serumspiegel 241 ± 38 ng/ml und bei Wt(MC903)-Mäusen 130 ± 6 ng/ml. (Zum Vergleich: Im „Sensibilisierungsmodell“ betragen IgE-Serumkonzentrationen bei *FlgHrrn*^{-/-}(MC903)-Mäusen 6900 ± 2100 ng/ml beziehungsweise 1710 ± 710 ng/ml bei Wt(MC903)-Mäusen (d18).) Kontrollgruppen beider Linien zeigten nach zweimaliger intraperitonealer Injektion von PBS und topischer Anwendung von MC903 oder Ethanol keine Erhöhung ihrer IgE-Serumkonzentrationen (**Abb. 17 b**).

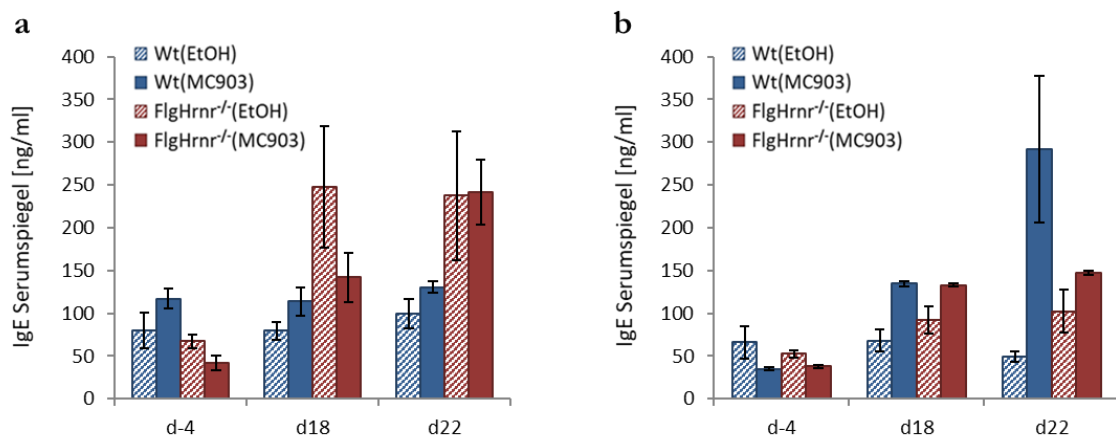


Abbildung 17: IgE-Serumkonzentrationen bei mit OVA oder PBS sensibilisierten Mäusen

An d-4, d18 und 22 entnommene Serumproben wurden mittels ELISA auf den Gehalt von IgE überprüft. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM der IgE-Serumspiegel der mit OVA (**a**) oder PBS (**b**) behandelten Versuchstiere. n = 12 (a); n = 6 (b).

3.2.3 Parallel zur OVA-Challenge verlaufende Hautkontakte zu MC903 haben einen geringen Anstieg von Entzündungszellen in der BAL zur Folge

Nach intraperitonealer Sensibilisierung und inhalativer Provokation durch OVA (d22) wurden die im luminalen Infiltrat enthaltenen Entzündungszellen analysiert. Zunächst stiegen die Zellzahlen in der Lavageflüssigkeiten aller Versuchsgruppen an (**Abb. 18 a**). Zusätzliche topische Anwendung von MC903 führte nicht zu höheren Zellzahlen als bei den mit EtOH behandelten Kontrolltieren. Mit EtOH behandelte *FlgHrrn*-defiziente Mäuse erreichten Werte um $2.350.000 \pm 256.000$ Zellen und überstiegen damit die Zellzahlen aller anderen Gruppen. Bei lediglich mit EtOH behandelten Mäusen (*FlgHrrn*^{-/-(EtOH)}, Wt(EtOH)) zeigten sich entsprechend höhere Werte in der Gruppe der *FlgHrrn*^{-/-}-Tiere ($2.350.000 \pm 256.000$ Zellen) verglichen mit Wt-Mäusen (971.000 ± 476.000 Zellen). Zwischen den beiden mit MC903 behandelten Gruppen bestanden keine Unterschiede.

In den Lavageflüssigkeiten dominierten Eosinophile in allen Versuchsgruppen deutlich (**Abb. 18 c**). Im Vergleich zu EtOH bewirkte die topische Anwendung von MC903 in beiden Mauslinien keinen signifikanten Anstieg des Eosinophilen-Anteils. Die mit EtOH

behandelten *FlgHrrr*^{-/-}-Tiere hatten mit $78,4 \pm 1,1$ % höhere Werte als Wt-Mäuse. Die mit MC903 behandelten Mäuse zeigten hingegen nur geringe Unterschiede des Eosinophilen-Anteils. Insgesamt bestand auch hier eine negative Korrelation zwischen Alveolarmakrophagen und Eosinophilen. Die Lavageflüssigkeiten von mit PBS/Alum (i. p.) exponierten Kontrollgruppen enthielten lediglich 73.000 ± 6.000 Zellen (Mittelwert aller vier Untergruppen). Mehr als 98% davon waren Alveolarmakrophagen (**Abb. 18 b**). Lymphozyten und Neutrophile machten in allen Versuchsgruppen nur einen kleinen Teil des Entzündungsinfiltrates aus (**Abb. 18 c und d**).

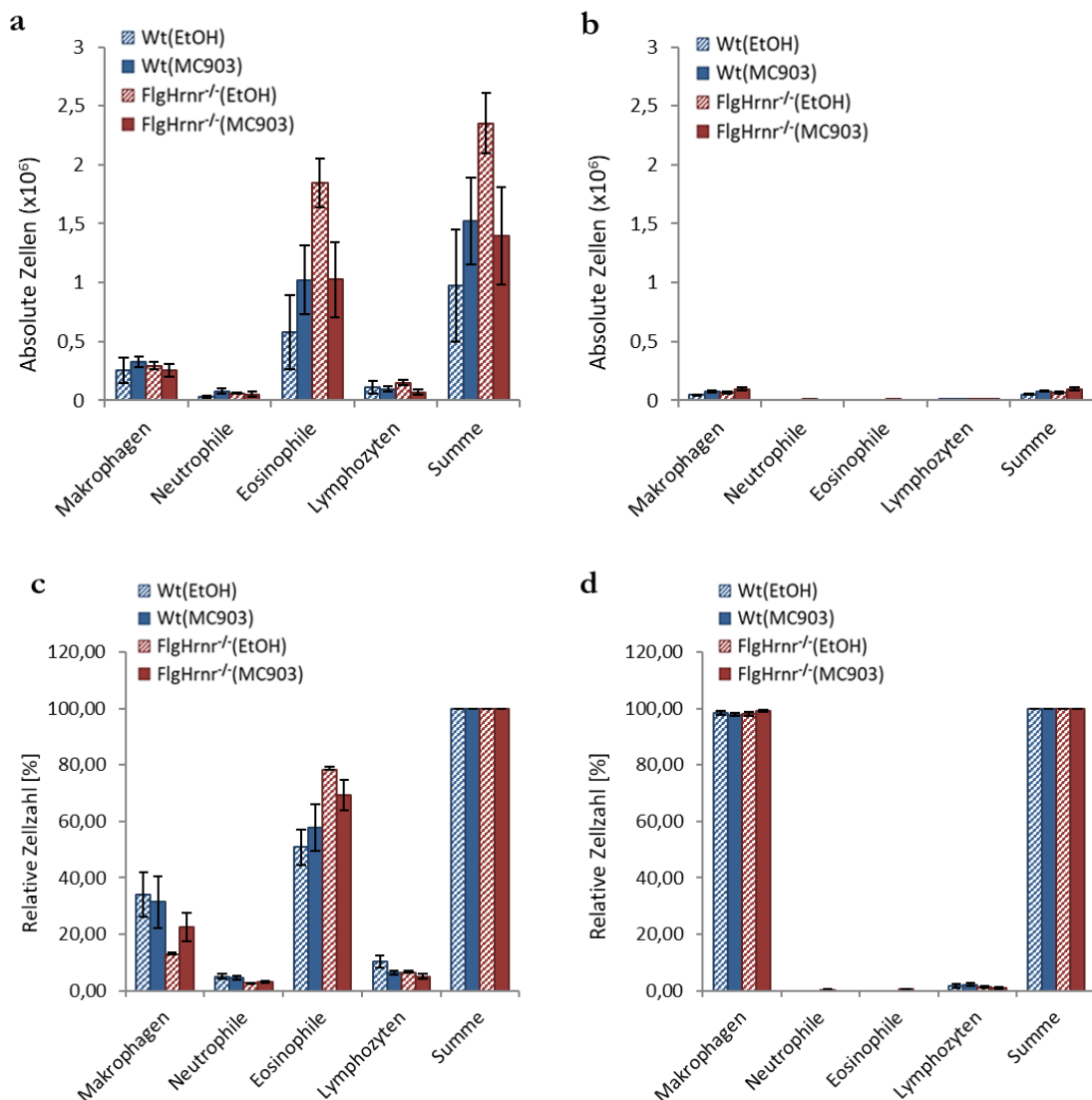


Abbildung 18: Zellzählungen in BAL nach intrapulmonaler OVA- oder PBS-Provokation

Zum Versuchsende (d22) wurden Zellen in den Lavageflüssigkeiten gezählt. Zuvor wurde MC903 ausschließlich an den Tagen der OVA-Provokation appliziert. Gezeigt sind Mittelwerte + SEM der absoluten (**a, b**) und relativen Zahlen (**c, d**) der vier dominierenden Zellpopulationen. $n = 6$.

4 Diskussion

Die Induktion AD-ähnlicher Läsionen durch MC903, einem niedrig-calcämischen Vitamin D-Derivat, ist ein etabliertes Modell zur Erforschung der atopischen Dermatitis. Frühere Arbeiten konnten bereits aufzeigen, dass durch MC903 ausgelöste Ekzeme aggravierend auf die Ausprägung einer sich parallel entwickelnden allergischen Atemwegserkrankung wirken können (Zhang et al. 2009; Leyva-Castillo et al. 2013b). Unter Berücksichtigung dieser Entdeckungen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modell entwickelt, um den Fokus auf die Rolle genetischer Hautbarrierestörungen in diesem Geschehen legen zu können. Getestet wurden hierzu *FlgHrmr*-defiziente Mäuse und Wildtyp-Tiere des Stammes *C57BL/6*. Mäuse mit Verlust von *Flg* und *Hrmr*, zwei für Strukturproteine der Epidermis kodierende Gene, wiesen nach repetitiver Anwendung von MC903 stärker und früher ausgeprägte Reaktionen am Auftragungsort auf als Wt-Mäuse. Bei simultaner i. p. Injektion von OVA zeigten *FlgHrmr*-defiziente Tiere erhöhte Sensibilisierungsparameter, gemessen an ihren OVA-IgG₁- und Gesamt-IgE-Serumkonzentrationen. Darüber hinaus wiesen die Tiere tendenziell mehr pulmonale Entzündungszellen sowie eine bronchioläre Becherzellhyperplasie auf. Dies belegt eine insgesamt stärkere Manifestation des Asthma bronchiale. Die beschriebenen Effekte von MC903 ließen sich mehrheitlich bei einer Anwendung in der OVA-Sensibilisierungsphase, nicht aber während der Provokationsphase, beobachten. Diese Resultate stützen damit die These eines aggravierenden Einflusses AD-ähnlicher Ekzeme auf die Asthmaentwicklung bei Individuen mit (genetischen) Hautbarrieredefekten.

4.1 Folgen einer barrieregeschädigten Haut für das lokale Entzündungsgeschehen

Die wiederholte topische Anwendung von MC903 führt insbesondere über die Ausschüttung von epidermalem TSLP zur Ausprägung AD-ähnlicher Läsionen auf Mäusehaut (Li et al. 2006). Barrieregeschädigte *FlgHrmr*-defiziente Mäuse hatten eine stärker ausgeprägte Reaktionsbereitschaft als Wt-Mäuse. Diese wurde anhand der Ohrschwellungen über mehrere Tage erfasst.

Die veränderte Beschaffenheit der Epidermis mit erhöhter Durchlässigkeit für Reizstoffe (Mildner et al. 2010) ist eine naheliegende Erklärung für die stärkere lokale Entzündung *FlgHrmr*-defizienter Tiere. Rahrig et al. charakterisierten *FlgHrmr*-defiziente Mäuse und wiesen eine veränderte Permeabilität des Stratum corneum für kolloidales Lanthan nach (Rahrig et al. 2019). Ferner konnten Versuche mit Kontaktallergenen wie Oxazolon, DNFB, DNCB und FITC die stärkere Reaktionsbereitschaft *FlgHrmr*-defizienter Tiere nachweisen. Insbesondere bei Schwellenwert-Konzentrationen, also solchen Mengen des verabreichten Haptens, unterhalb derer keine Reaktionen mehr messbar sind, fielen die Unterschiede zwischen *FlgHrmr*^{-/-}- und Wt-Mäusen besonders deutlich aus. Wie in der vorliegenden Arbeit wurden die Reaktionen im *Mouse-ear-swelling*-Test erfasst und äußerten sich in früher

einsetzenden und insgesamt stärker ausgeprägten Ohrschwellungen bei *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen (Rahrig et al. 2019). Zusätzlich gestützt wird die Hypothese veränderter Penetrationsbedingungen durch Experimente an *ft*-Mäusen (*flaky tail*), welche infolge einer Spontanmutation einen absoluten Filaggrin-Mangel aufweisen. Hierbei bewirkten epikutan applizierte Allergene (OVA) in geringen Dosen zwar bei den barrieregeschädigten Tieren eine Entzündungsreaktion oder einen Anstieg von Sensibilisierungsparametern, nicht jedoch bei Wt-Mäusen (Fallon et al. 2009). Die beschriebenen Beobachtungen lassen eine herabgesetzte Entzündungsschwelle infolge erleichterter Penetration bei Organismen mit *Flg*- oder *FlgHrrr*-Defizienz gegenüber topischen Reizstoffen vermuten. Weshalb jedoch der Defekt intrazellulärer Proteine eine erhöhte extrazelluläre Permeabilität zur Folge hat, bleibt zunächst unbeantwortet. Frühere histologische und histomorphometrische Analysen konnten auch strukturelle Auffälligkeiten *FlgHrrr*-defizienter Haut nachweisen. Hierzu gehörte ein deutlich abgeflachtes Stratum corneum sowie eine reduzierte Zahl von Keratohyalingranula im Stratum granulosum (Rahrig et al. 2019). Diese Befunde decken sich mit denen an Menschen mit Filaggrin-Mangel (Gruber et al. 2011). Ergänzt werden sie durch Beobachtungen, dass aus der *Flg*-Defizienz resultierende Anomalien des Zytoskeletts die Sekretion von Lamellenkörperchen behindern. Lamellenkörperchen beinhalten verschiedene Lipide, wie Phospholipide, Sterole oder Glycosphingolipide, aber auch unterschiedliche Enzyme (Schmitz und Müller 1991). Der so erzeugte Lipidmangel im Extrazellularraum könnte zur leichteren Penetration hydrophiler Substanzen durch die Epidermis führen (Fallon et al. 2009; Scharschmidt et al. 2009). Metabolische Konsequenzen der Defizienz von *Flg* und dessen saurem Derivat Urocaninsäure könnten die Erhöhung des pH-Wertes im Stratum corneum bewirken und konsekutiv zur abnormen Aktivität mehrerer Serinproteasen und Ceramide-erzeugender Enzyme führen. Die derart gestörte Homöostase des SC könnte schließlich die gesteigerte Permeabilität der Haut bewirken (Elias und Schmuth 2009).

Das Fehlen epidermaler Strukturproteine scheint durch mechanische Prozesse, gestörte Enzymaktivität und/oder veränderte Lipidzusammensetzung zu erleichterter Penetration von Antigenen und stärker ausgeprägten immunologischen Reaktionen zu führen. Darüber hinaus verursacht MC903 über die Ausschüttung von TSLP aus Keratinozyten einen Th2-gewichteten Entzündungstyp (Li et al. 2006; Liu 2006). Zugleich scheinen Th2-Zytokine ihrerseits entscheidenden Einfluss auf die Beschaffenheit des Stratum corneum zu haben. So führen insbesondere IL-4 und IL-13 zur Herabregulierung der *Flg*-Expression (Howell et al. 2009). Dies lässt sich sowohl bei Menschen ohne Mutationen in *Flg* als auch bei solchen mit heterozygoten *Flg*-Mutationen und herabgesetzter Expression des Strukturproteins beobachten (Howell et al. 2009). Interessanterweise finden sich innerhalb akuter Läsionen von AD-Patienten mit *Flg*-Mutationen geringere Mengen an Filaggrin als in nicht-betroffener Haut derselben Patienten, sodass angenommen werden kann, dass die Entzündung über den Weg einer reduzierten Genexpression zu einer weiteren Schädigung der Hautbarriere beiträgt (Howell et al. 2009). Folglich lässt sich schlussfolgern, dass auch wiederholte Kontakte mit den in der AD-Forschung häufig verwendeten Substanzen Oxazolon und MC903 durch die

Induktion einer Th2-gerichteten Immunreaktion die Filaggrin-Expression beeinflussen (Howell et al. 2009). Dieser Effekt könnte auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Wt-Mäusen zum Tragen gekommen sein. Dass durch defekte Hautbarrieren eingedrungene Umweltstoffe Entzündungen hervorrufen können, während Entzündungen selbst die Integrität der Hautbarriere verändern, führt zu einem Dilemma, bei dem die eindeutige Zuordnung von Ursache und Wirkung nicht zweifelsfrei möglich ist. Schwierigkeiten bei der Verwendung solcher Mausmodelle lägen folglich insbesondere darin, dass jede experimentelle Induktion einer AD-ähnlichen Läsion ihrerseits eine verminderte *Flg*-Expression zur Folge haben könnte.

Jedenfalls führte die Anwendung von MC903 bei Mäusen mit LOF-Mutationen in den Genen *Flg* und *Hrrr* zu stärkeren und frühzeitiger einsetzenden Reaktionen im *Mouse-ear-swelling*-Test als bei Wt-Mäusen. Ob dieses intensivere Ansprechen der *FlgHrrr*-defizienten Mäuse auf die topische Anwendung von MC903 tatsächlich Folge einer beschleunigten Resorption und damit einhergehend erhöhter Konzentration der Substanz am Wirkort ist, bleibt jedoch zu diskutieren. Zur weiteren Klärung könnte man Schwellenwert-Bestimmungen durchführen, bei denen MC903-Verdünnungsreihen vergleichend auf Mäuseohren von Wt- und *FlgHrrr*^{-/-}-Tieren aufgetragen würden. Das Ziel eines solchen Experiments bestünde darin, eine Konzentration zu identifizieren, die zwar bei barriere-defizienten, nicht aber bei gesunden Tieren eine Entzündungsreaktion hervorruft.

4.2 Sensibilisierung von *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen im OVA-Asthma-Modell

Die intraperitoneale Verabreichung von OVA/Alum hat sich in zahlreichen Arbeiten als potente Form der Sensibilisierung bewährt (Hessel et al. 1995; Chang et al. 2005; Zosky et al. 2008). Zum Nachweis einer erfolgreichen Sensibilisierung des Organismus mit dem Modellantigen wird insbesondere die humorale Immunantwort, wie etwa die Produktion von allergenspezifischem IgG und IgE herangezogen (Zhang et al. 2009). Beiden Ig-Klassen gemein ist ihre insbesondere IL-4-abhängige Produktion durch B-Zellen (Siebenkotten Gregor et al. 2005). Folglich werden sie meist als Zeichen einer Th2-dominierten Immunreaktion betrachtet und erfüllen als solche wichtige Funktionen auch bei experimentell induzierten Allergien von Mäusen (Chang et al. 2005).

Es konnte hier gezeigt werden, dass sämtliche Tiere nach intraperitonealer Gabe von OVA, gemessen an ihren allergenspezifischen IgG₁-Spiegeln, erfolgreich sensibilisiert wurden. Bei zusätzlich mit MC903 behandelten Mäusen ließen sich dabei höhere OVA-IgG₁-Konzentrationen feststellen. Dies stand im Einklang mit thematisch verwandten Forschungsarbeiten (Leyva-Castillo et al. 2013b) und lässt sich als gesteigerte Immunreaktion gegenüber Allergenen infolge der durch MC903 bewirkten systemisch-immunologischen Wirkung interpretieren. Dieser Einfluss von MC903 war bei *FlgHrrr*-defizienten Mäusen stärker ausgeprägt als bei Wt-Mäusen. Dies belegte die Verstärkung der Sensibilisierung durch *FlgHrrr*-Defizienz. In dieser Arbeit erfolgten alle OVA-Injektionen intraperitoneal,

also unter Umgehung der Hautbarriere. Da Filaggrin und Hornerin im Peritoneum nicht exprimiert werden, ließen sich die deutlich erhöhten Immunglobulin-Konzentrationen der mutierten Mäuse nicht unmittelbar auf ihre Barrieredefizienz zurückführen.

Das Gesamt-IgE stieg insbesondere bei kombinierter Anwendung von MC903 und OVA an. In weitaus geringerem Umfang zeigten auch Kontrollgruppen, welche nach Behandlung mit PBS keine allergische Atemwegserkrankung entwickelten, einen Anstieg des Gesamt-IgE als Reaktion auf die topische Anwendung von MC903. Mäuse ohne jeglichen Kontakt zu MC903 wiesen hingegen sowohl vor als auch nach OVA-Provokation keine Veränderung ihrer Gesamt-IgE-Spiegel auf. Auffallend war dabei, dass die IgE-Serumkonzentrationen beider Mauslinien mit dem zeitlichen Abstand zur Sensibilisierung mit OVA und den MC903-Anwendungen abfielen. Serumkonzentrationen des OVA-spezifischen IgG₁ zeigten hingegen nach inhalativer OVA-Provokation einen erneuten Anstieg, am deutlichsten in der Gruppe *FlgHrrr*^{-/-}(MC903). In diesem Zusammenhang muss erläutert werden, dass sich die Wirkung von MC903 maßgeblich über die Ausschüttung von epidermalem TSLP aus Keratinozyten vollzieht (Li et al. 2006; Leyva-Castillo et al. 2013b; Leyva-Castillo et al. 2013a). TSLP_{ep}-defiziente Mäusen entwickeln bei mehrfachem Kontakt zu MC903 (im OVA-Asthma-Modell) zwar alle Anzeichen einer allergischen Atemwegserkrankung, jedoch keinen Anstieg des Gesamt-IgE. Ferner zeigen die entsprechenden Tiere auch kein atopisches Ekzem (Zhang et al. 2009).

Anzumerken ist darüber hinaus, dass die Allergen-Provokation in dieser Arbeit nicht direkt intranasal, sondern durch OVA-haltiges Aerosol in einer Kunststoffkammer erfolgte. Daher wäre prinzipiell auch eine Aufnahme der Antigene über die Haut denkbar, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben könnte. Die sich nahezu auf einem Niveau befindenden Immunglobulin-Spiegel der *FlgHrrr*^{-/-}- und Wt-Mäuse ohne MC903-Kontakt legen jedoch nahe, dass dies nicht wesentlich zur Allergenaufnahme beitrug. Somit kam es insbesondere bei Mäusen mit einer durch MC903 ausgelösten *AD-like*-Dermatitis zu Anstiegen des Gesamt-IgE im OVA-Asthma-Modell und eine *FlgHrrr*-Defizienz aggravierte diesen Effekt.

Folglich stellt sich die praktische Frage, ob epidermale Barriestörungen durch Filaggrin- und/oder Hornerin-Mangel die Wahrscheinlichkeit oder Intensität einer Allergen-Sensibilisierung steigern können. Tatsächlich zeigen bereits jetzt Untersuchungen beim Menschen, dass die Lebenszeitprävalenz allergischer Folgeerkrankungen mit dem Schweregrad der atopischen Dermatitis steigt (Gustafsson et al. 2000). Erhöhte Gesamt-IgE-Spiegel werden meist als Zeichen einer atopischen Disposition gewertet, wobei die höchsten Konzentrationen bei der AD auftreten (Renz et al.) Gesamt-IgE und Schweregrad der AD korrelieren (Laske und Niggemann 2004; Dhar et al. 2005; Vaneckova und Bukač 2016). Die hier erhobenen Daten legen nahe, dass die im Vergleich zu den Kontrollgruppen Wt(MC903) und *FlgHrrr*^{-/-}(EtOH) deutlich höheren IgG₁- und IgE-Spiegel bei *FlgHrrr*^{-/-}(MC903)-Tieren weder allein auf den genetischen Hintergrund noch auf ekzematöse Läsionen der Mäuse zurückzuführen sind. Vielmehr treten diese erst nach dem

Zusammentreffen von Hautbarrierestörung und den durch das MC903 ausgelösten immunologischen Effekten auf. Der adjuvante Effekt des Vitamin-D3-Analogons zeigt sich durch eine Potenzierung der Sensibilisierung bei bestehender Barrieredefizienz.

4.3 Symptomschwere von *FlgHrrr*-defizienten Tieren im OVA-Asthma-Modell

OVA wird Mäusen zur experimentellen Induktion einer asthmaähnlichen Atemwegsallergie meist intraperitoneal verabreicht (Hessel et al. 1995; McMillan et al. 2002; Zosky et al. 2008). Die anschließende inhalative Provokation führt insbesondere über die Ausschüttung von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 durch aktivierte Th2-Lymphozyten zur Reproduktion verschiedener Schlüsselmerkmale des Asthma bronchiale (Deo et al. 2010). Hierzu zählen erhöhte IgE-Spiegel, Eosinophilie, Atemwegsentzündungen, gesteigerte Mukusproduktion sowie Überempfindlichkeit der Atemwege auf bestimmte Stimuli (Nials und Uddin 2008). Die Messung dieser zellulären Effekte dient der Quantifizierung der Atemwegserkrankung. In dieser Arbeit wurden insbesondere das pulmonale Infiltrat und die Becherzell-Hyperplasie als Parameter für den Schweregrad der Asthma-Symptome betrachtet.

Erwartungsgemäß entwickelten die Versuchstiere nach wiederholter inhalativer OVA-Provokation und unabhängig vom genetischen Hintergrund eine allergische Atemwegserkrankung. Auswertungen der am Versuchsende entnommenen Lavageflüssigkeiten belegten deutlich erhöhte Zellzahlen aller OVA-Asthma-Versuchsgruppen verglichen mit PBS-Kontrollgruppen. Zusätzliche topische Anwendung von MC903 während der Sensibilisierungsphase führte sowohl bei Wt- als auch bei *FlgHrrr*-defizienten Tieren zu signifikanter Steigerung der pulmonalen Infiltration. Asthmatypisch dominierten dabei eosinophile Granulozyten (Nials und Uddin 2008). Die Eosinophilie wurde sowohl bei *FlgHrrr*^{-/-} als auch bei Wt-Mäusen ebenfalls durch MC903 verstärkt. Dies deckte sich mit thematisch verwandten Forschungsarbeiten, in denen ein verstärkender Effekt des durch MC903 ausgelösten *AD-like*-Phänotyps auf die Krankheitsausprägung von Mäusen im OVA-Asthma-Modell beschrieben wurde (Zhang et al. 2009; Leyva-Castillo et al. 2013b).

Um der Frage zu begegnen, ob eine epidermale Barrierestörung (hier durch Mangel an Filaggrin und Hornerin) zusätzlichen Einfluss auf *AD-like*-Dermatitis und Asthma hat, wurde die Symptomschwere beider Mauslinien miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich lediglich Tendenzen einer intensiveren pulmonalen Inflammation bei *FlgHrrr*-defizienten Mäusen. Die bronchoalveolären Zellzahlen sowie der prozentuale Anteil von Eosinophilen waren in *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen nur diskret erhöht. Die histomorphologische Beurteilung von Lungenpräparaten lieferte hierzu keine zusätzlich Erkenntnisse. Wie erwartet (Leyva-Castillo et al. 2013b), wiesen zwar sämtliche OVA-Asthma-Tiere starke perivasale, -bronchiale und intraalveoläre Infiltrate auf, allerdings wurde die pulmonale Infiltration durch die während der Sensibilisierungsphase erfolgte Anwendung von MC903 nicht gesteigert. Darüber hinaus ließ sich histologisch kein Unterschied zwischen (*FlgHrrr*^{-/-} und Wt-Mäusen bezüglich des

pulmonalen Infiltrates finden. Auch die pulmonale Becherzellhyperplasie, die Folge einer Sekretion von IL-13 durch CD4⁺ Zellen ist (Izuhara et al. 2009), war zwischen den Versuchsgruppen nur geringgradig verschieden. Die zusätzliche topische Anwendung von MC903 bewirkte nur eine leichte Erhöhung der Mukusproduktion in den Mäuselungen. Auch die defekte Hautbarriere der *FlgHrrr*-defizienten Tiere schlug sich lediglich in einem marginalen Anstieg der Mukusproduktion beim Vergleich mit Wt-Mäusen nieder. Die LOF-Mutationen im hier verwendeten OVA-Asthma-Modell bewirkten nur tendenziell (nicht signifikant) stärker ausgeprägte asthmatische Veränderungen im Vergleich zu Wt-Mäusen. Eine naheliegende Erklärung dafür könnte sein, dass die Reaktionen sämtlicher Tiere womöglich bereits nahe ihres oberen Limits stattfanden. Um dies zu überprüfen, wären Experimente mit reduzierten Wirkstoffdosen von MC903 und/oder OVA denkbar.

4.4 TSLP-Expression in *FlgHrrr*-defizienter Haut und Folgen für die Asthma-Entwicklung

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) wird von Epithelzellen in Haut, Darm, Lunge und Thymus exprimiert. Es fördert Th2-dominierte Immunreaktionen (Indra 2013). MC903 ist ein starker Aktivator von TSLP und kann bei Langzeitanwendung AD-ähnliche Läsionen auf Mäusehaut hervorrufen (Li et al. 2006; Li et al. 2009; Zhang et al. 2009). Um die beschriebene Wirkung zu entfalten bindet MC903 als Ligand an heterodimere RXR/Vitamin D- oder RXR/Retinsäure-Rezeptor- γ im Zellkern von Keratinozyten und steigert so die *TSLP*-Transkription (Li et al. 2006). TSLP bindet an seinen heterodimeren Rezeptor aus TSLPR und dem IL-7-Rezeptor- α auf verschiedenen Immunzellen wie Monozyten, Mastzellen, B-Zellen und insbesondere dendritischen Zellen (DC) (Indra 2013). DC exprimieren TSLPR and IL-7R α am stärksten (Reche et al. 2001). Nach TLR (Toll-like Rezeptor)-Aktivierung können DC das Zytokin auch selbst produzieren (Kashyap et al. 2011). DC, die durch TSLP aktiviert wurden, stimulieren die Differenzierung naiver CD4⁺ T- zu Th2-Zellen (Ito et al. 2005) und die Ausschüttung von IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und TNF- α (Soumelis et al. 2002; Indra 2013). Somit ist TSLP wichtig für Th2-vermittelte Entzündungen.

Die Induktion von TSLP in Keratinozyten durch das Vitamin D-Analogon MC903 eröffnet die Möglichkeit, die Pathogenese der AD experimentell zu imitieren (Li et al. 2006). Zahlreiche weitere *In-vivo*-Studien an Mäusen zeigten, dass die endogene Überproduktion von TSLP, entweder aufgrund einer Genablation in der Haut (Li et al. 2005; Zhang et al. 2009) oder einer transgenen Überexpression (Yoo et al. 2005) zu spontanen ekzematösen Hautläsionen führen kann. Auch in klinischen Studien wurde die Relevanz des Zytokins für den Erkrankungsprozess der AD bestätigt. So zeigten Kinder mit AD signifikant höhere Serum-TSLP-Spiegel als gesunde Gleichaltrige (Lee et al. 2010).

Von besonderer Relevanz ist TSLP auch beim atopischen Marsch. Mausmodelle belegen hierbei seine Schlüsselrolle nicht nur bei einzelnen atopischen Erkrankungen wie AD, eosinophiler Gastritis, allergischer Rhinitis oder Asthma bronchiale (Tsilingiri et al. 2017),

sondern auch beim sogenannten Etagenwechsel von der AD zum Asthma bronchiale (Zhang et al. 2009; Leyva-Castillo et al. 2013b). TSLP aus Keratinozyten bewirkte die Aggravation einer asthmatischen Atemwegserkrankung, wenn Mäuse zeitgleich intraperitoneal mit OVA sensibilisiert wurden (Zhang et al. 2009). Zugleich zeigen TSLPR-defiziente Mäuse im OVA-Asthma-Modell keine nennenswerte Atemwegserkrankung (Al-Shami et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde vor dem Hintergrund dieses Wissens ein MC903-basiertes AD-Modell an *FlgHrrr*-defizienten und Wt-Mäusen verglichen. TSLP-Bestimmungen im Serum sollten dabei die proinflammatorische Wirkung von MC903 über den Lokalbefund hinaus quantifizierbar machen sowie Hinweise auf eine mögliche Beziehung zwischen den AD-ähnlichen Läsionen und der OVA-basierten Atemwegsallergie liefern. Trotz repetitiver MC903-Exposition und deutlicher Ohrschwellung änderte sich in beiden Mauslinien der TSLP-Serumspiegel zunächst (d18) nicht. Ferner bestanden zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede zwischen *FlgHrrr*^{-/-}- und Wt-Mäusen. Trotz signifikanter Unterschiede der durch MC903 verursachten Lokalreaktionen exprimierten Mäuse mit LOF-Mutationen in *Flg* und *Hrrr* nicht mehr TSLP. Möglicherweise liegt dies am großen zeitlichen Abstand zwischen der letzten MC903-Behandlung und der darauffolgenden Blutentnahme (10 Tage). Verglichen damit, zeigten Mäuse in Experimenten von Li et al. an d1, d2 und d3 nach topischer Aufbringung von MC903 drastisch erhöhte TSLP-Serumkonzentrationen, wobei MC903 dabei in einer Dosis von 4 nmol pro Maus aufgetragen wurde (in der vorliegenden Arbeit waren es 8 nmol) (Li et al. 2006). Bei Zhang et al. hatten Mäuse bereits am vierten Tag und nach zwei Anwendungen von MC903 stark erhöhte TSLP-Serumspiegel (ca. 1500 pg/ml), die dann trotz fortgesetzter repetitiver Exposition deutlich abfielen (Zhang et al. 2009). Vor diesem Hintergrund lässt sich nicht rekonstruieren, ob die TSLP-Serumspiegel der in dieser Arbeit untersuchten *FlgHrrr*^{-/-}- und Wt-Mäuse nicht zwischenzeitlich angestiegen und wieder abgefallen waren. Interessanterweise ließen sich hier erst nach Abschluss der inhalativen OVA-Provokation (d22) Anstiege des Serum-TSLP beobachten. Diese Zunahme betraf *FlgHrrr*^{-/-}- und Wt-Mäuse nahezu gleichermaßen. Kontrollgruppen, die anstatt mit OVA mit PBS behandelt wurden, wiesen nach identischen MC903-Anwendungen keine Veränderungen der Serum-TSLP-Spiegel auf. Somit beeinflusste OVA die TSLP-Serumspiegel oder es lag ein synergistischer Effekt von OVA und MC903 vor. Diese Beobachtung deckt sich zumindest in Teilen mit immunhistochemischen und mRNA-Bestimmungen, die eine Erhöhung der pulmonalen TSLP-Expression nach OVA-Provokation der Atemwege zeigten (Li et al. 2010).

Im OVA-Asthma-Modell wurden keine signifikanten Unterschiede der TSLP-Serumkonzentrationen zwischen barrieregeschädigten *FlgHrrr*^{-/-}- und Wt-Mäusen festgestellt. Ob epidermales TSLP im OVA-Asthma-Modell die Sensibilisierung und Krankheitsausprägung beeinflusst, konnte daher nicht abschließend beantwortet werden. Auch dies könnte an den für diese Fragestellung ungünstig gewählten Messzeitpunkten liegen. Darüber hinaus sollte die TSLP-Expression in der Haut geklärt werden, etwa durch Bestimmung epidermaler mRNA. Nachdem TSLP in AD erhöht ist (Soumelis et al. 2002;

West et al. 2012), könnten Untersuchungen im Mausmodell die Frage beantworten, ob *FlgHrrnr*-LOF-Mutationen die MC903-induzierte TSLP-Bildung beeinflussen können.

4.5 Einfluss von MC903 auf die Asthma-Provokationsphase

Topische Anwendung von MC903 parallel zur i. p. OVA-Sensibilisierung führt zu deutlichem Anstieg von Sensibilisierungsparametern und Asthma-Symptomen (Zhang et al. 2009). Dies könnte maßgeblich an der durch MC903 erzeugten Steigerung der Th2-Immunlage liegen (Leyva-Castillo et al. 2013a). In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass eine gestörte Hautbarriere in *FlgHrrnr*-defizienten Tieren den Effekt von MC903 steigert. Der genetische Defekt schlug sich insbesondere im stärkeren Anstieg der Serumspiegel von OVA-spezifischem IgG₁ und Gesamt-IgE nieder. Weniger deutlich war der Einfluss auf die Atemwegsallergie. Um vor diesem Hintergrund einen möglichen Einfluss von MC903 auf die *Challenge*-Phase zu untersuchen, wurden Wt- und *FlgHrrnr*^{-/-}-Mäuse parallel zur inhalativen OVA-*Challenge* topisch mit MC903 behandelt. Bezogen auf die Ergebnisse im *Mouse-ear-swelling*-Test zeigte sich auch hier eine Tendenz *FlgHrrnr*-defizienter Mäuse, nach Applikation von MC903 stärkere Ohrschwellungen zu entwickeln als Wt-Tiere. Die nur geringfügig voneinander abweichenden Reaktionen beider Mauslinien könnten in erster Linie eine Folge des kurzen Behandlungs- und Messzeitraumes sein. Die nahezu gleichen OVA-IgG₁-Konzentrationen aller Versuchsgruppen deuteten darauf hin, dass eine erst nach der OVA-Sensibilisierung erfolgte topische Behandlung mit MC903 keinen messbaren Einfluss auf den Sensibilisierungsstatus hatte. Wie erwartet, waren die OVA-IgG₁-Serumspiegel auf einem ähnlichen Niveau wie bei Tieren im „Sensibilisierungsmodell“, die keinen Kontakt zu MC903 hatten. Darüber hinaus schien der späte Kontakt zu MC903 im „Provokationsmodell“ keine Folgen für die Bildung von Gesamt-IgE zu haben, wie der fehlende Anstieg von Serumkonzentrationen zwischen d18 und d22 deutlich machte. Auch ein Einfluss auf die in der BAL bestimmten Gesamtzellzahlen ließ sich in diesem Modell nicht bestätigen. Daher könnte die lokale Anwendung von MC903 weder bei Wt- noch bei barrieregeschädigten *FlgHrrnr*^{-/-}-Mäusen ausreichen, um die Bildung allergenspezifischer Immunglobuline und die Atemwegsallergie zu beeinflussen.

Zusammenfassend ließ sich im OVA-Asthma-Modell kein Einfluss von Adjuvantien wie MC903 auf die Provokationsphase nachweisen. Auch die *FlgHrrnr*-Defizienz hatte hierauf keinen messbaren Einfluss. Die Ergebnisse unterstreichen daher die Bedeutung der zeitlichen Komponente der MC903-Behandlung und der von einer *AD-like*-Dermatitis ausgehenden systemischen Wirkung. Dies scheint ebenso vor dem Hintergrund einer *FlgHrrnr*-Defizienz zu gelten. Ihr klinische Analogie finden diese Ergebnisse im Verlauf des atopischen Marsches von der AD zu Folgeerkrankungen wie dem Asthma bronchiale (Spergel und Paller 2003).

4.6 Ausblick: Klinische Konsequenzen und Fragen nach Präventionsmöglichkeiten

Die atopische Dermatitis bildet sich meist früh im Leben aus (Williams 2005; Thomsen 2014). Mutationen im *Flg*-Gen gehören zu den bislang bedeutendsten Risikofaktoren (Marenholz et al. 2006; Palmer et al. 2006; Sandilands et al. 2007; Stemmler et al. 2007). Aber auch Mutationen im verwandten *Hrrr*-Gen sind mit einem erhöhten AD-Risiko assoziiert (Esparza-Gordillo et al. 2009). Beide kodieren für epidermale Strukturproteine mit vielfältigen Funktionen. Naheliegend und bereits seit Langem ein wichtiger Baustein der AD-Therapie ist daher die Basispflege der Haut. Bewährt haben sich insbesondere harnstoffhaltige (Urea) Präparate (Fredriksson und Gip 1975; Chylla et al. 2018). Urea augmentiert hierbei NMF und steigert die Expression antimikrobieller Peptide wie LL-37 oder β -defensin-2, aber auch von Enzymen und Strukturproteinen wie Transglutaminase-1, Involucrin, Loricrin und Filaggrin (Grether-Beck et al. 2012).

Bezüglich primärpräventiver Maßnahmen gegen AD (Simpson et al. 2010; Horimukai et al. 2014; Simpson et al. 2014) sind seit 2018 Emollienzien (rückfettende Externa ohne aktive Wirkstoffe) in den europäischen Leitlinien zur AD empfohlen (Wollenberg et al. 2018). Dies geht zurück auf Studien, nach denen die tägliche Ganzkörper-Anwendung von Emollienzien die Auftretswahrscheinlichkeit bei Hochrisikopatienten unter einem Lebensjahr (positive Familienanamnese, *Flg*-Mutationen) deutlich herabsetzten (Simpson et al. 2014). Darüber hinaus häuft sich die Evidenz dafür, dass eine stattgehabte AD oft die Voraussetzung für weitere atopische Erkrankungen wie allergische Rhinitis, Nahrungsmittelallergie oder Asthma bronchiale sein kann (Čepelak et al. 2019). Von besonderer Bedeutung ist daher, ob sich durch Verbesserung der Hautbarriere ebenfalls die Inzidenz der genannten allergischen Erkrankungen senken lässt. Klinische Studien hierzu stehen derzeit aus. Experimentell untermauert wird diese These jedoch durch Arbeiten, die den Einfluss saurer Emollientien (pH 2,8) auf die AD und allergische Atemwegserkrankungen in einem Oxazololon-basierten Modell untersuchten (Lee Hae-Jin et al. 2014). Als Allergen dienten aus der Hausstaubmilbe gewonnene Proteine, die den Tieren zunächst über die Hautoberfläche - in Kombination mit Oxazolololon - und anschließend intranasal verabreicht wurden. Diese Experimente demonstrierten, dass das wiederholte Ansäuern des SC ekzematöse Hautläsionen sowie nachfolgende allergische Atemwegsentzündungen hemmen und eine geeignete Maßnahme gegen den atopischen Marsch sein könnte.

Somit könnte ein optimales Zeitfenster für Primärprävention existieren, die sich besonders auf die Haut richten müsste. Auf diesem Wege ließe sich nicht nur der Ausbruch einer AD abwenden, sondern auch die Gefahr einer transkutanen Sensibilisierung verringern, die von großer Bedeutung für IgE-assoziierte Erkrankungen wie Nahrungsmittelallergie oder allergisches Asthma ist (du Toit et al. 2016). In Bezug auf das Asthma bronchiale konnte dieser Prozess in der vorliegenden Arbeit erfolgreich demonstriert werden. Vor diesem Hintergrund wäre auch eine neue Unterteilung der klassischen extrinsischen AD in Fälle

ohne oder mit genetisch bedingten Hautbarriere-Defekten denkbar. Besonders für Letztere könnte die primärpräventive Behandlung des Integuments das Asthmarisiko senken.

4.7 Fazit

In den vergangenen Jahrzehnten stieg die Prävalenz allergischer Erkrankungen und der AD stark an (Pawankar 2014; Bonamonte et al. 2019). Obwohl zahlreiche Risikofaktoren dafür identifiziert wurden, sind ihr Zusammenwirken sowie wirksame Präventionsansätze noch nicht gut bekannt (Simpson et al. 2014; Gern 2015). Vor diesem Hintergrund, sollte das in dieser Arbeit vorgestellte Mausmodell eine Möglichkeit bieten, die Dynamik des sogenannten „atopischen Marsches“ zu untersuchen. Der Fokus lag dabei auf der Bedeutung genetisch bedingter Hautbarrierestörungen, ausgelöst durch LOF-Mutationen in *Flg* und *Hrrr*.

Es konnte gezeigt werden, dass nicht über die Haut aufgenommene Allergene (OVA) nach inhalativer Provokation zur Ausbildung einer allergischen Atemwegserkrankung führen. Die Abwesenheit der epidermalen Proteine Filaggrin und Hornerin hatte nicht nur einen ausgeprägteren Lokalbefund nach MC903-Kontakt zur Folge, sondern verstärkte auch die Sensibilisierungsphase und die Erkrankungsausprägung des experimentell induzierten Asthma bronchiale. Diese Daten legen nahe, dass eine vom atopischen Ekzem ausgehende Unterhaltung des immunologischen Milieus die intraperitoneale Sensibilisierung anfacht. Diese adjuvante Wirkung des MC903 wurde bereits in anderen Arbeiten demonstriert (Zhang et al. 2009; Leyva-Castillo et al. 2013b). Die hier erarbeiteten Ergebnisse zeigen zudem die Potenzierung dieses Effektes bei *FlgHrrr*-Defizienz und die Prädisposition *Flg*- oder *Hrrr*-defizienter Organismen gegenüber allergischen Atemwegserkrankungen.

Diese Studie kann nicht sämtliche Fragen beantworten, aber als Grundlage für die weitere Erforschung von *Flg* und *Hrrr* im atopischen Prozess dienen. Von besonderer Relevanz erscheinen dabei die folgenden Überlegungen:

(1) „Lebensnähere“ Mausmodelle

Ein Schritt in diese Richtung könnte die Etablierung eines Modells sein, bei dem das Modellallergen (wie OVA) epikutan statt intraperitoneal appliziert wird. So ließe sich die Bedeutung der Haut als Eintrittspforte für Allergene insbesondere vor dem Hintergrund einer Barriere-defizienz untersuchen. Experimente unter dieser Arbeitshypothese fanden bereits an homozygoten *fl*-Mäusen statt (Fallon et al. 2009). Erste Untersuchungen wurden auch von unserer Arbeitsgruppe an Wt-Mäusen durchgeführt.

(2) Optimierung von Messzeitpunkten

Mit Hilfe häufigerer Blutentnahmen, insbesondere zu Beginn des Versuches, ließe sich die Dynamik der Sensibilisierungsparameter detaillierter erfassen. Dabei stellt sich die Frage, ob die Serumkonzentrationen von OVA-IgG₁ und Gesamt-IgE in *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen nicht nur höhere Maximalkonzentrationen erreicht, sondern womöglich auch insgesamt frühzeitiger ansteigt. Dasselbe trifft auf die Bestimmung von TSLP zu. Zu klären gilt, welchen

unmittelbaren Einfluss die topische Anwendung von MC903 auf die lokale TSLP-Expression in *FlgHrrr*^{-/-}- Mäusen hat. Die Bestimmung epidermaler TSLP-mRNA könnte hierbei wegweisend sein.

(3) Dosismodulationen

Insbesondere die krankheitstypischen Befunde wie lokale Schwellung (AD) oder pulmonales Infiltrat und Eosinophilie (Asthma bronchiale) waren sowohl in Wt- als auch in *FlgHrrr*^{-/-}- Mäusen stark ausgeprägt. Eine Reduktion der verwendeten Dosen, bei denen die Tiere keine überschießende Immunreaktion mehr zeigen, könnte daher eine noch bessere Bewertung der Einflussgröße „*FlgHrrr*-Defizienz“ ermöglichen.

(4) Genetischer Hintergrund

Während in thematisch verwandten Forschungsarbeiten hauptsächlich Tiere mit *BALB/c*-Hintergrund verwendet wurden (Al-Shami et al. 2005; Zhang et al. 2009), waren es in der vorliegenden Arbeit Mäuse des Stammes *C57BL/6*. Es wurde bereits mehrfach berichtet, dass letztere zur Th1-gerichteten Immunantwort neigen, während *BALB/c*-Mäuse zur Th2-Antwort prädisponiert sind (Schulte et al. 2008; Gueders et al. 2009). *BALB/c*-Mäuse könnten daher den insgesamt geeigneteren Stamm darstellen, um die typischerweise Th2-basierten atopischen Erkrankungen zu untersuchen (Brandt und Sivaprasad 2011).

(5) Separate Untersuchung der Einflüsse von *Flg* und *Hrrr*

Problematisch in dieser Hinsicht ist, dass sich wegen der Doppeldefizienz die Ergebnisse nicht spezifisch auf das Fehlen des einen oder des anderen Proteins zurückführen lassen.

(6) Weitergehende Untersuchungen

Aufgrund der derzeitigen Forschungsergebnisse erscheint es plausibel, dass MC903 auf *FlgHrrr*-defizienter Haut in höherer Konzentration an seinen Wirkort gelangt und so zu verstärkter TSLP-Ausschüttung führt. Auf das entstehende Th2-dominierte Immunmilieu würden demnach die Ausbildung einer *AD-like*-Dermatitis und die verstärkte Neigung zur Sensibilisierung gegenüber dargereichten Allergenen folgen. Um die Hypothese einer erleichterten Passage von MC903 durch das *Flg*-defiziente Stratum corneum zu untermauern, wären Experimente mit *TSLP_{ep}Flg*-doppeldefizienten Mäusen denkbar. Unter der Annahme des soeben geschilderten Mechanismus dürften solche Tiere trotz topischer Behandlung mit MC903 weder eine AD noch eine stärker ausgeprägten Immunreaktion gegenüber Allergenen aufweisen.

5 Zusammenfassung

Loss-of-function-Mutationen in Proteinen mit Funktionen für die Hautbarriere, wie etwa Filaggrin (*Flg*) und Hornerin (*Hrrn*), sind wichtige Risikofaktoren für die Entstehung einer atopischen Dermatitis (Neurodermitis, AD) sowie für die anschließende Entwicklung eines Asthma bronchiale. Letzterer Prozess ist unter der Bezeichnung „atopischer Marsch“ bekannt.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine sogenannte *AD-like*-Dermatitis in barrieregeschädigten Filaggrin- und Hornerin-defizienten (*FlgHrrn*^{-/-}) Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Mäusen, eine Allergensensibilisierung fördert und die klinischen Zeichen eines Asthma bronchiale verstärkt. Dazu wurden die Mäuse repetitiv topisch mit MC903 (Calcipotriol) behandelt. Wiederholter MC903-Kontakt führte zur Ausbildung eines *AD-like*-Phänotyps, einer der atopischen Dermatitis des Menschen klinisch wie immunologisch ähnelnden Hautreaktion. Gleichzeitig wurden sämtliche Tiere einer Behandlung unterzogen, bei der nach einer initialen systemischen Sensibilisierung durch eine Atemwegsexposition eine allergische Atemwegsentzündung (allergisches Asthma, Typ-I-Allergie) induziert wird. Dieses wurde über eine zweimalige intraperitoneale Injektion von Ovalbumin mit Aluminiumhydroxid (OVA) und einer anschließenden Provokation der Atemwege mit OVA-haltigem Aerosol realisiert. Die Applikation von MC903 erfolgte in zwei Variationen entweder parallel zur OVA-Sensibilisierung oder bei der OVA-Provokation. Kontrollgruppen wurden in gleicher Weise mit dem Vehikel Ethanol behandelt. Derart ließen sich die Einflüsse von MC903 während verschiedener Phasen der Asthmaentwicklung vor dem Hintergrund eines *FlgHrrn*-defizienten Genotyps untersuchen. Es ließ sich zeigen, dass durch MC903 hervorgerufene immunologische Prozesse während der Sensibilisierungsphase, nicht aber während der Provokationsphase, zu einer erleichterten Sensibilisierung, aber auch einer Aggravation des experimentellen Asthmas führten. Dies wurde anhand einer gesteigerten Produktion Th2-typischer Immunglobuline wie IgE und dem OVA-spezifischen IgG₁ sowie einem höheren Anteil inflammatorischer Zellinfiltrate in den Lungen gezeigt (Zunahme absoluter Zellzahlen in der BAL). Diese Parameter waren in *FlgHrrn*^{-/-}-Mäusen zum Teil deutlich erhöht. Es wurde nachgewiesen, dass eine akute *AD-like*-Dermatitis in barrieregeschädigten *FlgHrrn*^{-/-}-Mäusen die Allergensensibilisierung fördert und die klinischen Zeichen eines Asthma bronchiale verstärkt. Daraus lässt sich schließen, dass *Loss-of-function*-Mutationen in den Genen *Flg* und *Hrrn* wichtige Risikofaktoren und zugleich ein Bindeglied für den Zusammenhang der AD und dem Voranschreiten des atopischen Marsches sind. Die dem zugrundeliegenden immunologischen Abläufe sind allerdings noch nicht ganz klar. Ihre Aufdeckung könnte die in Mausmodellen gewonnenen Erkenntnisse für die Humanmedizin nutzbar machen und helfen, neue Behandlungen gegen Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis zu entwickeln.

6 Anhang

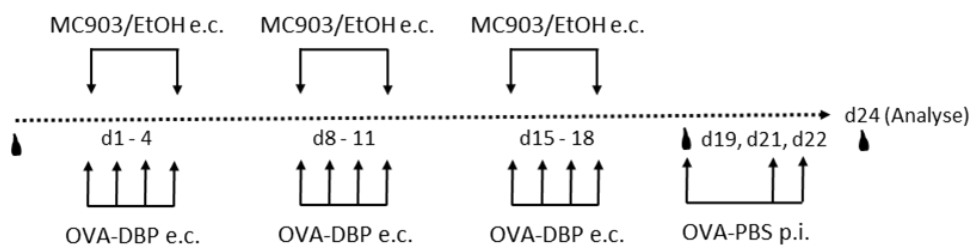


Abbildung A1: Epikutanes OVA-Asthma-Modell

Das abgebildete Versuchsschema umfasst die Tage -2 bis 24 (d-2 – d24). Die Applikation des Allergens (OVA) erfolgte in Vier-Tages-Intervallen auf dem rasierten Rücken der Tiere. Parallel hierzu fand die insgesamt sechsmalige Behandlung der Tiere mit MC903 oder EtOH (Kontrollgruppe) im Bereich der Ohren statt. Tropfensymbole markieren die Zeitpunkte der Blutentnahmen.

Tabelle A1: Epikutanes OVA-Asthma-Modell

Lösung	Volumen	Darreichungsform
4 nmol MC903/EtOH	25 µl/Ohr	e. c.
DBP, 100 µg OVA Protein	40 µl	e. c.
PBS, 1% Aerosol (OVA)	15 ml	inhalativ (p. i.)

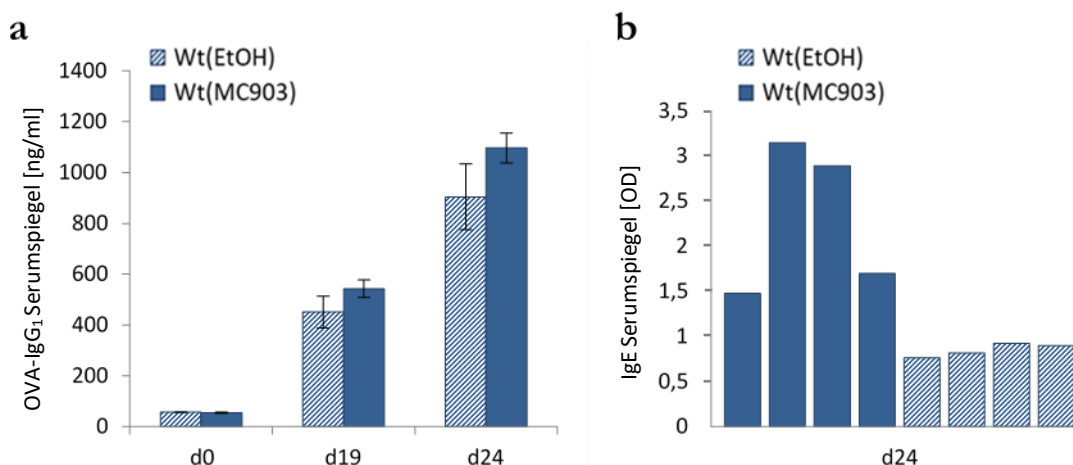


Abbildung A2: OVA-IgG1- und IgE-Serumspiegel im epikutanen OVA-Asthma-Modell

Den Mäusen zu insgesamt drei Zeitpunkten entnommene Serumproben wurden mittels ELISA auf den Gehalt von OVA-spezifischem IgG₁ (a) und Gesamt-IgE (b) überprüft. Dargestellt sind die Serumkonzentrationen von topisch mit MC903 oder EtOH behandelten Wt. Da keine finale Auswertung stattfand, erfolgt die Darstellung der IgE-Konzentrationen anhand ihrer optischen Dichte (OD) im ELISA. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte + SEM. n = 4.

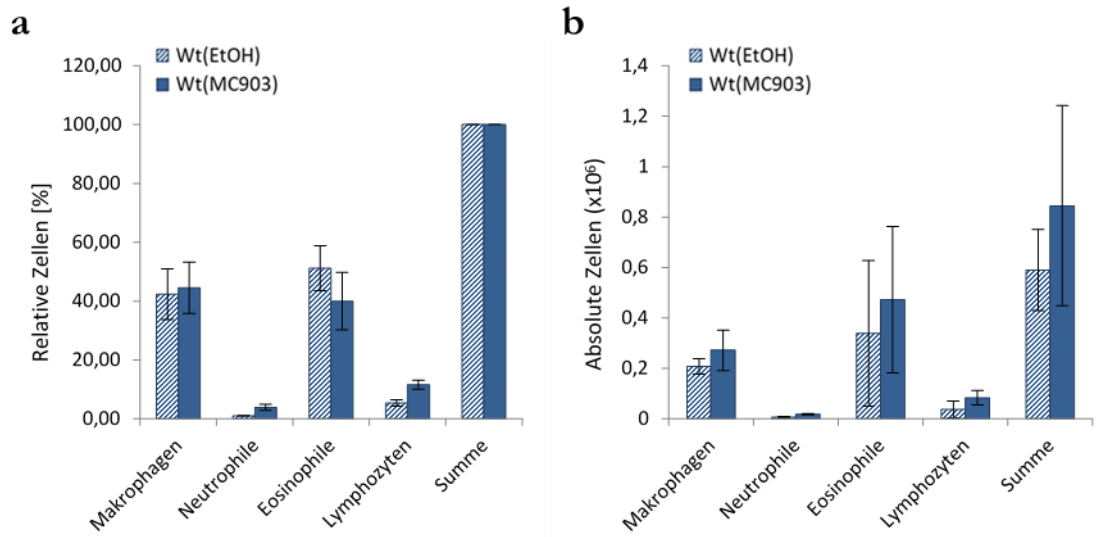


Abbildung A3: BAL im epikutanen OVA-Asthma-Modell

Dargestellt sind die Ergebnisse der Zellzählungen aus den bei den Tieren zum Versuchsende (d24) gewonnenen Lavagenflüssigkeiten. Die Grafiken veranschaulichen sowohl die relativen **(a)** wie auch die absoluten Zellzahlen **(b)**, jeweils aufgeschlüsselt nach den vier, das gewonnene Material dominierenden Zellpopulationen. Dargestellt sind arithmetische Mittelwerte + SEM. n = 4.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ (2005): A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med* 202, 829–839
- Al-Shobaili HA, Ahmed AA, Alnomair N, Alobead ZA, Rasheed Z (2016): Molecular genetic of atopic dermatitis: An Update. *Int J Health Sci* 10, 96–120
- Altmeyers Enzyklopädie - Fachbereich Dermatologie - Atopische Dermatitis (Übersicht).
<https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/atopische-dermatitis-ubersicht-1108>; Zugriff am 27.04.2018
- Altmeyers Enzyklopädie - Fachbereich Dermatologie - Ichthyosis vulgaris autosomal-dominant.
<https://www.altmeyers.org/de/dermatologie/ichthyosis-vulgaris-autosomal-dominante-1914>; Zugriff am 16.12.2020
- Apfelbacher CJ, Diepgen TL, Schmitt J (2011): Determinants of eczema: population-based cross-sectional study in Germany. *Allergy* 66, 206–213
- Arai N, Kondo M, Izumo T, Tamaoki J, Nagai A (2010): Inhibition of neutrophil elastase-induced goblet cell metaplasia by tiotropium in mice. *Eur Respir J* 35, 1164–1171
- Asher I, Pearce N (2014): Global burden of asthma among children. *Int J Tuberc Lung Dis* 18, 1211–1259
- Aun MV, Bonamichi-Santos R, Arantes-Costa FM, Kalil J, Giavina-Bianchi P (2017): Animal models of asthma: utility and limitations. *J Asthma Allergy* 10, 293–301
- Bantz SK, Zhu Z, Zheng T (2014): The atopic march: progression from atopic dermatitis to allergic rhinitis and asthma. *J Clin Cell Immunol* 5, 202
- Barker JNWN, Palmer CNA, Zhao Y, Liao H, Hull PR, Lee SP, Allen MH, Meggitt SJ, Reynolds NJ, Trembath RC, McLean WHI (2007): Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *J Invest Dermatol* 127, 564–567
- Barnes KC (2010): An update on the genetics of atopic dermatitis: scratching the surface in 2009. *J Allergy Clin Immunol* 125, 16–29.e11
- Bergeron C, Tulic MK, Hamid Q (2010): Airway remodelling in asthma: from benchside to clinical practice. *Can Respir J J Can Thorac Soc* 17, e85–e93
- Böhling A, Bielfeldt S, Himmelmann A, Keskin M, Wilhelm K-P (2014): Comparison of the stratum corneum thickness measured in vivo with confocal Raman spectroscopy and confocal reflectance microscopy. *Skin Res Technol* 20, 50–57
- Bonamonte D, Filoni A, Vestita M, Romita P, Foti C, Angelini G (2019): The role of the environmental risk factors in the pathogenesis and clinical outcome of atopic dermatitis. *BioMed Res Int* 2019, 2450605–2450605
- Bonifazi E, L Meneghini C (1989): Atopic dermatitis in the first six months of life. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 144, 20–2
- Brandt EB, Sivaprasad U (2011): Th2 cytokines and atopic dermatitis. *J Clin Cell Immunol* 2, 110

- Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J (1999): aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-Mediated Signaling. *J Immunol* 163, 6448–6454
- Brown SJ, Irwin McLean WH (2012): One remarkable molecule: filaggrin. *J Invest Dermatol* 132, 751–762
- Burbank AJ, Sood AK, Kesic MJ, Peden DB, Hernandez ML (2017): Environmental determinants of allergy and asthma in early life. *J Allergy Clin Immunol* 140, 1–12
- Candi E, Schmidt R, Melino G (2005): The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 328–340
- Cates EC, Fattouh R, Wattie J, Inman MD, Goncharova S, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos J-C, Jordana M (2004): Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism. *J Immunol* 173, 6384–6392
- Chan LS, Robinson N, Xu L (2001): Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 117, 977–983
- Chang Y-S, Kim Y-K, Bahn J-W, Kim S-H, Park H-W, Kim T-B, Cho S-H, Min K-U, Kim Y-Y (2005): Comparison of asthma phenotypes using different sensitizing protocols in mice. *Korean J Intern Med* 20, 152–158
- Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, Bult CJ, Agarwala R, Cherry JL, DiCuccio M, et al. (2009): Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* 7, e1000112–e1000112
- Chylla R, Schnopp C, Volz T (2018): Basistherapie bei atopischer Dermatitis – Neues und Bewährtes. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges* 16, 976–980
- Compton JG, DiGiovanna JJ, Johnston KA, Fleckman P, Bale SJ (2002): Mapping of the associated phenotype of an absent granular layer in ichthyosis vulgaris to the epidermal differentiation complex on chromosome 1*. *Exp Dermatol* 11, 518–526
- Daubeuf F, Frossard N (2013): Acute asthma models to ovalbumin in the mouse. *Curr Protoc Mouse Biol* 3, 31–37
- Deo SS, Mistry KJ, Kakade AM, Niphadkar PV (2010): Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma. *Lung India Off Organ Indian Chest Soc* 27, 66–71
- Dhar Sandipan, Malakar R, Chattopadhyay S, Dhar Subhra, Banerjee R, Ghosh A (2005): Correlation of the severity of atopic dermatitis with absolute eosinophil counts in peripheral blood and serum IgE levels. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 71, 246–249
- du Toit G, Tsakok T, Lack S, Lack G (2016): Prevention of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 137, 998–1010
- Elias PM, Schmuth M (2009): Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9, 437–446
- Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Fölster-Holst R, Bauerfeind A, Ruschendorf F, Patone G, Rohde K, Marenholz I, Schulz F, Kerscher T, et al. (2009): A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. *Nat Genet* 41, 596–601

- Fahy JV (2015): Type 2 inflammation in asthma – present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol* 15, 57–65
- Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Campbell LE, Saunders SP, Mangan NE, Callanan JJ, Kawasaki H, Shiohama A, Kubo A, et al. (2009): A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet* 41, 602–608
- Fredriksson T, Gip L (1975): Urea creams in the treatment of dry skin and hand dermatitis. *Int J Dermatol* 14, 442–444
- Freeman SC, Sonthalia S: Histology, keratohyalin granules. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2019
- Gern JE (2015): Promising candidates for prevention of allergy. *J Allergy Clin Immunol* 136, 23–28
- Ghimire TR, Benson RA, Garside P, Brewer JM (2012): Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro. *Immunol Lett* 147, 55–62
- Grether-Beck S, Felsner I, Brenden H, Kohne Z, Majora M, Marini A, Jaenicke T, Rodriguez-Martin M, Trullas C, Hupe M, et al. (2012): Urea uptake enhances barrier function and antimicrobial defense in humans by regulating epidermal gene expression. *J Invest Dermatol* 132, 1561–1572
- Gruber R, Elias PM, Crumrine D, Lin T-K, Brandner JM, Hachem J-P, Presland RB, Fleckman P, Janecke AR, Sandilands A, et al. (2011): Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function. *Am J Pathol* 178, 2252–2263
- Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Hove CV, Tournoy K, Louis R, Foidart J-M, Noël A, Cataldo DD (2009): Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res* 58, 845
- Gustafsson D, Sjöberg O, Foucard T (2000): Development of allergies and asthma in infants and young children with atopic dermatitis – a prospective follow-up to 7 years of age. *Allergy* 55, 240–245
- Gutermuth J, Ollert M, Ring J, Behrendt H, Jakob T (2004): Mouse models of atopic eczema Critically Evaluated. *Int Arch Allergy Immunol* 135, 262–276
- Halling-Brown M, Pappalardo F, Rapin N, Zhang P, Alemani D, Emerson A, Castiglione F, Duroux P, Pennisi M, Miotto O, et al. (2010): ImmunoGrid: towards agent-based simulations of the human immune system at a natural scale†. *Philos Trans R Soc Math Phys Eng Sci* 368, 2799–2815
- Han H, Roan F, Ziegler SF (2017): The atopic march: current insights into skin barrier dysfunction and epithelial cell-derived cytokines. *Immunol Rev* 278, 116–130
- Han H, Roan F, Johnston LK, Smith DE, Bryce PJ, Ziegler SF (2018): IL-33 promotes gastrointestinal allergy in a TSLP-independent manner. *Mucosal Immunol* 11, 394–403
- Havaux X, Zeine A, Dits A, Denis O (2005): A new mouse model of lung allergy induced by the spores of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum* molds. *Clin Exp Immunol* 139, 179–188

- He J-Q, Chan-Yeung M, Becker AB, Dimich-Ward H, Ferguson AC, Manfreda J, Watson WTA, Sandford AJ (2003): Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes Immun* **4**, 385–389
- Heller-Milev MD, Huber M, Panizzon R, Hohl D (2000): Expression of small proline rich proteins in neoplastic and inflammatory skin diseases. *Br J Dermatol* **143**, 733–740
- Henry J, Hsu C-Y, Haftek M, Nachat R, de Koning HD, Gardinal-Galera I, Hitomi K, Balica S, Jean-Decoster C, Schmitt A-M, et al. (2011): Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. *FASEB J* **25**, 1567–1576
- Hessel EM, Van Oosterhout AJ, Hofstra CL, De Bie JJ, Garssen J, Van Loveren H, Verheyen AK, Savelkoul HF, Nijkamp FP (1995): Bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness after ovalbumin inhalation in sensitized mice. *Eur J Pharmacol* **293**, 401–412
- Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, et al. (2014): Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 824-830.e6
- Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DYM (2009): Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* **124**, R7–R12
- Huang CH, Kuo IC, Xu H, Lee YS, Chua KY (2003): Mite allergen induces allergic dermatitis with concomitant neurogenic inflammation in mouse. *J Invest Dermatol* **121**, 289–293
- Iizuka H (1994): Epidermal turnover time. *J Dermatol Sci* **8**, 215–217
- Indra AK (2013): Epidermal TSLP: A trigger factor for pathogenesis of Atopic Dermatitis (AD). *Expert Rev Proteomics* **10**, 309–311
- Ito T, Wang Y-H, Duramad O, Hori T, Delespese GJ, Watanabe N, Qin FX-F, Yao Z, Cao W, Liu Y-J (2005): TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* **202**, 1213–1223
- Izuhara K, Ohta S, Shiraishi H, Suzuki S, Taniguchi K, Toda S, Tanabe T, Yasuo M, Kubo K, Hoshino T, Aizawa H (2009): The mechanism of mucus production in bronchial asthma. *Curr Med Chem* **16**, 2867–2875
- Janssens T, Ritz T (2013): Perceived triggers of asthma: key to symptom perception and management. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* **43**, 1000–1008
- Jin H, He R, Oyoshi M, Geha R (2009): Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **129**, 31–40
- Johansson SGO, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, Cauwenberge PV, et al. (2001): A revised nomenclature for allergy: An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* **56**, 813–824
- Joshi R (2014): Learning from eponyms: George F. Odland and odland bodies. *Indian Dermatol Online J* **5**, 334–338
- Kabesch M, Carr D, Weiland SK, von Mutius E (2004): Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* **34**, 340–345

- Kantor R, Silverberg JI (2017): Environmental risk factors and their role in the management of atopic dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol* 13, 15–26
- Kashyap M, Rochman Y, Spolski R, Samsel L, Leonard WJ (2011): Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 187, 1207–1211
- Ker J, Hartert TV (2009): The atopic march: what's the evidence? *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol* 103, 282–289
- Kumar RK, Herbert C, Foster PS (2016): Mouse models of acute exacerbations of allergic asthma. *Respirology* 21, 842–849
- Laske N, Niggemann B (2004): Does the severity of atopic dermatitis correlate with serum IgE levels? *Pediatr Allergy Immunol* 15, 86–88
- Lee EB, Kim KW, Hong JY, Jee HM, Sohn MH, Kim K-E (2010): Increased serum thymic stromal lymphopoietin in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 21, e457–e460
- Lee Hae-Jin, Yoon Na Young, Lee Noo Ri, Jung Minyoung, Kim Dong Hye, Choi Eung Ho (2014): Topical acidic cream prevents the development of atopic dermatitis- and asthma-like lesions in murine model. *Exp Dermatol* 23, 736–741
- Lee HJ, Ha SJ, Han H, Kim JW (2001): Distribution of HLA-A, B alleles and polymorphisms of TAP and LMP genes in Korean patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 31, 1867–1874
- Lee KS, Lee KY, Kim SR, Park Hee Sun, Park SJ, Min KH, Cho C-H, Koh GY, Park Ho Sung, Lee YC (2007): Blockade of airway inflammation and hyper-responsiveness by an angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1. *Exp Mol Med* 39, 733–745
- Leyva-Castillo JM, Hener P, Michea P, Karasuyama H, Chan S, Soumelis V, Li M (2013a): Skin thymic stromal lymphopoietin initiates Th2 responses through an orchestrated immune cascade. *Nat Commun* 4, 1–12
- Leyva-Castillo JM, Hener P, Jiang H, Li M (2013b): TSLP produced by keratinocytes promotes allergen sensitization through skin and thereby triggers atopic march in mice. *J Invest Dermatol* 133, 154–163
- Li M, Messaddeq N, Teletin M, Pasquali J-L, Metzger D, Chambon P (2005): Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci* 102, 14795–14800
- Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P (2006): Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci* 103, 11736–11741
- Li M, Hener P, Zhang Z, Ganti KP, Metzger D, Chambon P (2009): Induction of thymic stromal lymphopoietin expression in keratinocytes is necessary for generating an atopic dermatitis upon application of the active vitamin D3 analogue MC903 on mouse skin. *J Invest Dermatol* 129, 498–502
- Li Y-L, Li H-J, Ji F, Zhang X, Wang R, Hao J-Q, Bi W-X, Dong L (2010): Thymic stromal lymphopoietin promotes lung inflammation through activation of dendritic cells. *J Asthma* 47, 117–123
- Liu Y-J (2006): Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med* 203, 269–273

- Lonsdale-Eccles JD, Teller DC, Dale BA (1982): Characterization of a phosphorylated form of the intermediate filament-aggregating protein filaggrin. *Biochemistry* 21, 5940–5948
- Lowe AJ, Carlin JB, Bennett CM, Hosking CS, Abramson MJ, Hill DJ, Dharmage SC (2008): Do boys do the atopic march while girls dawdle? *J Allergy Clin Immunol* 121, 1190–1195
- Lüllmann-Rauch R: *Histologie*. 3., vollständig überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009
- Makino T, Takaishi M, Morohashi M, Huh N (2001): Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *J Biol Chem* 276, 47445–47452
- Man M-Q, Hatano Y, Lee SH, Man M, Chang S, Feingold KR, Leung DYM, Holleran W, Uchida Y, Elias PM (2008): Characterization of a hapten-induced, murine model with multiple features of atopic dermatitis: structural, immunologic, and biochemical changes following single versus multiple oxazolone challenges. *J Invest Dermatol* 128, 79–86
- Marenholz I, Zirra M, Fischer DF, Backendorf C, Ziegler A, Mischke D (2001): Identification of human epidermal differentiation complex (EDC)-encoded genes by subtractive hybridization of entire YACs to a gridded keratinocyte cDNA library. *Genome Res* 11, 341–355
- Marenholz I, Nickel R, Rüschemdorf F, Schulz F, Esparza-Gordillo J, Kerscher T, Grüber C, Lau S, Worm M, Keil T, et al. (2006): Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 118, 866–871
- Masopust D, Sivula CP, Jameson SC (2017): Of mice, dirty mice, and men: using mice to understand human immunology. *J Immunol Baltim Md 1950* 199, 383–388
- Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C (1997): Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* 9, 461–466
- Matsumoto K, Mizukoshi K, Oyobikawa M, Ohshima H, Tagami H (2004): Establishment of an atopic dermatitis-like skin model in a hairless mouse by repeated elicitation of contact hypersensitivity that enables to conduct functional analyses of the stratum corneum with various non-invasive biophysical instruments. *Skin Res Technol* 10, 122–129
- McAleer MA, Irvine AD (2013): The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol* 131, 280–291
- McMillan SJ, Bishop B, Townsend MJ, McKenzie AN, Lloyd CM (2002): The Absence of Interleukin 9 does not affect the development of allergen-induced pulmonary inflammation nor airway hyperreactivity. *J Exp Med* 195, 51–57
- Mildner M, Jin J, Eckhart L, Kezic S, Gruber F, Barresi C, Stremnitzer C, Buchberger M, Mlitz V, Ballaun C, et al. (2010): Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model. *J Invest Dermatol* 130, 2286–2294
- Nials AT, Uddin S (2008): Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech* 1, 213–220
- Nickel RG, Casolaro V, Wahn U, Beyer K, Barnes KC, Plunkett BS, Freidhoff LR, Sengler C, Plitt JR, Schleimer RP, et al. (2000): Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES. *J Immunol Baltim Md 1950* 164, 1612–1616

- Ober C, Yao T-C (2011): The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* 242, 10–30
- Oord RAHM van den, Sheikh A (2009): Filaggrin gene defects and risk of developing allergic sensitisation and allergic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 339
- O'Regan GM, Sandilands A, McLean WHI, Irvine AD (2008): Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 122, 689–693
- Osawa R, Akiyama M, Shimizu H (2011): Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. *Allergol Int* 60, 1–9
- Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJD, et al. (2006): Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38, 441–446
- Pawankar R (2014): Allergic diseases and asthma: a global public health concern and a call to action. *World Allergy Organ J* 7, 1–3
- Peters SP (2014): Asthma phenotypes: nonallergic (intrinsic) asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2, 650–652
- Potten CS, Saffhill R, Maibach HI (1987): Measurement of the transit time for cells through the epidermis and stratum corneum of the mouse and guinea-pig. *Cell Tissue Kinet* 20, 461–472
- Rahrig S, Dettmann JM, Brauns B, Lorenz VN, Buhl T, Kezic S, Elias PM, Weidinger S, Mempel M, Schön MP, Braun A (2019): Transient epidermal barrier deficiency and lowered allergic threshold in filaggrin-hornerin (FlgHrnr^{-/-}) double-deficient mice. *Allergy* 74, 1327–1339
- Rawlings AV, Harding CR (2004): Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17, 43–48
- Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu M, Travis M, Zurawski SM, Johnston J, Liu Y-J, Spits H, et al. (2001): Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol* 167, 336–343
- Renz H, Biedermann T, Bufe A, Eberlein B, Jappe U, Petersen A, Kleine-Tebbe J, Raulf-Heimsoth M, Saloga J, Worm M Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI) unter Beteiligung des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA), der Gesellschaft für Pädiatrische Allergologie und Umweltmedizin (GPA) und der Deutschen Dermatologische Gesellschaft (DDG). *Allergo J* 19, 110–128
- Rodrigues Neves C, Gibbs S: Progress on reconstructed human skin models for allergy research and identifying contact sensitizers. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1–27
- Rodríguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, Irvine AD, Weidinger S (2009): Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1361-1370.e7
- Rogers AJ, Celedón JC, Lasky-Su JA, Weiss ST, Raby BA (2007): Filaggrin mutations confer susceptibility to atopic dermatitis but not to asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120, 1332–1337

- Safronova OG, Vavilin VA, Lyapunova AA, Makarova SI, Lyakhovich VV, Kaznacheeva LF, Manankin NA, Batycho OA, Gavalov SM (2003): Relationship between glutathione S-transferase P1 polymorphism and bronchial asthma and atopic dermatitis. *Bull Exp Biol Med* 136, 73–75
- Salpietro C, Rigoli L, Miraglia Del Giudice M, Cuppari C, Di Bella C, Salpietro A, Maiello N, La Rosa M, Marseglia GL, Leonardi S, et al. (2011): TLR2 and TLR4 gene polymorphisms and atopic dermatitis in Italian children: a multicenter study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24, 33–40
- Sandilands A, O'Regan GM, Liao H, Zhao Y, Terron-Kwiatkowski A, Watson RM, Cassidy AJ, Goudie DR, Smith FJD, McLean WHI, Irvine AD (2006): Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris and predispose individuals to atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 126, 1770–1775
- Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, O'Regan GM, Clayton TH, Watson RM, Carrick T, Evans AT, Liao H, Zhao Y, et al. (2007): Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat Genet* 39, 650–654
- Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WHI (2009): Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 122, 1285–1294
- Sarpong S, Zhang L-Y, R Kleeberger S (2004): A novel mouse model of experimental asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 132, 346–54
- Saunes M, Øien T, Dotterud CK, Romundstad PR, Storror O, Holmen TL, Johnsen R (2012): Early eczema and the risk of childhood asthma: a prospective, population-based study. *BMC Pediatr* 12, 168
- Scharschmidt TC, Man M-Q, Hatano Y, Crumrine D, Gunathilake R, Sundberg JP, Silva KA, Mauro TM, Hupe M, Cho S, et al. (2009): Filaggrin deficiency confers a paracellular barrier abnormality that reduces inflammatory thresholds to irritants and haptens. *J Allergy Clin Immunol* 124, 496-506.e6
- Schiebler TH, Korf H-W: Haut und Hautanhangsorgane. In: Schiebeler TH, Korf H-W (Hrsg.): *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 10. Auflage; Steinkopff, Heidelberg 2007
- Schmitz G, Müller G (1991): Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res* 32, 1539–1570
- Schulte S, Sukhova GK, Libby P (2008): Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. *Am J Pathol* 172, 1500–1508
- Siebenkotten Gregor, Esser Charlotte, Radbruch Andreas, Wabl Matthias (2005): The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur J Immunol* 22, 1827–1834
- Simpson EL, Berry TM, Brown PA, Hanifin JM (2010): A pilot study of emollient therapy for the primary prevention of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 63, 587–593
- Simpson EL, Chalmers JR, Hanifin JM, Thomas KS, Cork MJ, McLean WHI, Brown SJ, Chen Z, Chen Y, Williams HC (2014): Emollient enhancement of the skin barrier from birth offers effective atopic dermatitis prevention. *J Allergy Clin Immunol* 134, 818–823

- Simpson EL, Bieber T, Guttman-Yassky E, Beck LA, Blauvelt A, Cork MJ, Silverberg JI, Deleuran M, Kataoka Y, Lacour J-P, et al. (2016): Two phase 3 trials of Dupilumab versus placebo in atopic dermatitis. *N Engl J Med* 375, 2335–2348
- Smith FJD, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, et al. (2006): Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* 38, 337–342
- Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, et al. (2002): Human epithelial cells trigger dendritic cell–mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3, 673–680
- Spergel JM, Paller AS (2003): Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 112, S118–S127
- Spergel JM, Mizoguchi E, Brewer JP, Martin TR, Bhan AK, Geha RS (1998): Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest* 101, 1614–1622
- Stemmler S, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Epplen JT, Hoffjan S (2007): Two common loss-of-function mutations within the filaggrin gene predispose for early onset of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 127, 722–724
- Steven AC, Bisher M, R Roop D, M Steinert P (1990): Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes* 1. *J Struct Biol* 104, 150–62
- Subbarao P, Mandhane PJ, Sears MR (2009): Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ Can Med Assoc J* 181, E181–E190
- Tao L, Reese TA (2017): Making mouse models that reflect human immune responses. *Trends Immunol* 38, 181–193
- Thomsen SF (2014): Atopic dermatitis: natural history, diagnosis, and treatment. *ISRN Allergy* 2014, 354250
- Tournoy, Kips, Schou, Pauwels (2000): Airway eosinophilia is not a requirement for allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy* 30, 79–85
- Trzeciak M, Sakowicz-Burkiewicz M, Wesserling M, Gleń J, Dobaczewska D, Bandurski T, Nowicki R, Pawelczyk T (2017): Altered expression of genes encoding cornulin and repetin in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 172, 11–19
- Tsilingiri K, Fornasa G, Rescigno M (2017): Thymic stromal lymphopoietin: to cut a long story short. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 3, 174–182
- van der Hulst AE, Klip H, Brand PLP (2007): Risk of developing asthma in young children with atopic eczema: A systematic review. *J Allergy Clin Immunol* 120, 565–569
- van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V, Macleod MR (2010): Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med* 7, e1000245
- Vaneckova J, Bukač J (2016): The severity of atopic dermatitis and the relation to the level of total IgE, onset of atopic dermatitis and family history about atopy. *Food Agric Immunol* 27, 734–741

- Vičanová J, Boelsma E, Mommaas AM, Kempenaar JA, Forslind B, Pallon J, Egelrud T, Koerten HK, Ponc M (1998): Normalization of epidermal calcium distribution profile in reconstructed human epidermis is related to improvement of terminal differentiation and stratum corneum barrier formation. *J Invest Dermatol* 111, 97–106
- Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, et al. (2006): Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* 118, 214–219
- Weidinger S, O'Sullivan M, Illig T, Baurecht H, Depner M, Rodriguez E, Ruether A, Klopp N, Vogelberg C, Weiland SK, et al. (2008): Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1203-1209.e1
- West EE, Kashyap M, Leonard WJ (2012): TSLP: a key regulator of asthma pathogenesis. *Mech Underlying Allerg Asthma* 2, e83–e88
- Wickett RR, Visscher MO (2006): Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control* 34, S98–S110
- Williams HC (2005): Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 352, 2314–2324
- Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, Gieler U, Girolomoni G, Lau S, Muraro A, et al. (2018): Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 32, 657–682
- Yaar M, Gilchrist BA (2001): Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. *Clin Exp Dermatol* 26, 583–591
- Yoo J, Omori M, Gyarmati D, Zhou B, Aye T, Brewer A, Comeau MR, Campbell DJ, Ziegler SF (2005): Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J Exp Med* 202, 541–549
- Zhang Z, Hener P, Frossard N, Kato S, Metzger D, Li M, Chambon P (2009): Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1536–1541
- Ziyab AH, Karmaus W, Zhang H, Holloway JW, Steck SE, Ewart S, Arshad SH (2014): Association of filaggrin variants with asthma and rhinitis: is eczema or allergic sensitization status an effect modifier? *Int Arch Allergy Immunol* 164, 308–318
- Zosky GR, Larcombe AN, White OJ, Burchell JT, Janosi TZ, Hantos Z, Holt PG, Sly PD, Turner DJ (2008): Ovalbumin-sensitized mice are good models for airway hyperresponsiveness but not acute physiological responses to allergen inhalation. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 38, 829–838