

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

Allergische und irritative Kontaktdermatitis in Filaggrin- und
Hornerin-defizienten Mäusen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Judith Maria Dettmann, geb. Petersen

aus

Varel

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Brück

Referent: Prof. Dr. Michael Peter Schön

Korreferent: Prof. Dr. Lutz Walter

Drittreferent: Prof. Dr. Martin Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Allergische und irritative Kontaktdermatitis in Filaggrin- und Hornerin-defizienten Mäusen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 1 -
1.1	Die Epidermis	- 1 -
1.2	Filaggrin und Hornerin.....	- 2 -
1.2.1	Filaggrin (Flg)	- 3 -
1.2.2	Hornerin (Hrnr)	- 5 -
1.3	Barrierestörung der Haut und assoziierte Erkrankungen	- 5 -
1.4	Mäuse mit gestörter epidermaler Barriere	- 7 -
1.4.1	Mausmodelle mit Filaggrin-Defizienz	- 7 -
1.4.2	Die FlgHrnr doppelt defiziente (<i>Knockout</i> -) Maus	- 8 -
1.5	Kontaktekzeme (Kontaktdermatitis).....	- 8 -
1.5.1	Allergisches Kontaktekzem.....	- 9 -
1.5.2	Irritatives Kontaktekzem	- 11 -
1.6	Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	- 11 -
2	Material und Methoden	- 12 -
2.1	Versuchstiere.....	- 12 -
2.2	Material	- 13 -
2.2.1	Chemikalien.....	- 13 -
2.2.2	Verbrauchsmaterial.....	- 13 -
2.2.3	Puffer, Lösung	- 14 -
2.2.4	Geräte	- 14 -
2.2.5	Software.....	- 15 -
2.2.6	Antikörper und Isotypkontrollen für Immunhistochemie.....	- 15 -
2.2.7	Antikörper und Isotypkontrollen für FACS	- 15 -
2.3	Methoden	- 17 -
2.3.1	Messung der Ohrschwellung	- 17 -
2.3.1.1	Allergisches Kontaktekzem (ACD) - Versuchsdurchführung	- 17 -
2.3.1.2	Irritatives Kontaktekzem (ICD) - Versuchsdurchführung	- 18 -

2.3.1.3 Ohrschwellung - Messung und Berechnung	- 18 -
2.3.2 Histologie	- 19 -
2.3.2.1 Gewinnung der Proben.....	- 19 -
2.3.2.2 Gefrierschnitte.....	- 19 -
2.3.2.3 Immunhistochemie (IHC)	- 19 -
2.3.2.4 Paraffinschnitte	- 20 -
2.3.2.5 Fotodokumentation	- 21 -
2.3.3 Durchflusszytometrie	- 21 -
2.3.3.1 Gewinnung der Proben.....	- 21 -
2.3.3.2 Verarbeitung der Ohren	- 22 -
2.3.3.3 Verarbeitung der Lymphknoten	- 24 -
3 Ergebnisse.....	- 27 -
3.1 Allergisches Kontaktekzem in FlgHrnr-defizienten Mäusen.....	- 27 -
3.1.1 Ohrdickenmessung als ein Maß für die Hautentzündung.....	- 27 -
3.1.1.1 Standard-Experiment	- 27 -
3.1.1.2 Erniedrigter Sensibilisierungs-Schwellenwert bei allergischer Kontakt-dermatitis in FlgHrnr-defizienten Mäusen	- 28 -
3.1.1.3 Erniedrigter <i>Challenge</i> -Schwellenwert bei allergischer Kontaktdermatitis in FlgHrnr-defizienten Mäusen	- 30 -
3.1.2 Entzündungsinfiltrat in der Haut allergischer Wildtyp- und FlgHrnr-defizienter Mäuse	- 32 -
3.1.3 Quantitative Analyse des Entzündungsinfiltrats mittels Durchflusszytometrie (FACS)	- 35 -
3.1.3.1 Zellzahlen in Ohren und Lymphknoten	- 35 -
3.1.3.2 Lokales zelluläres Infiltrat in den Ohren.....	- 35 -
3.1.3.3 T-Zellen in den Lymphknoten	- 39 -
3.2 Irritatives Kontaktekzem in FlgHrnr-defizienten Mäusen	- 42 -
3.2.1 Ohrdickenmessung als ein Maß für die Hautentzündung.....	- 42 -
3.2.1.1 Standard-Experiment	- 42 -
3.2.1.2 Schwellenwert-Experiment.....	- 43 -

3.2.2	Entzündungsinfiltrat bei irritativer Kontaktdermatitis	- 44 -
4	Diskussion	- 48 -
4.1	Allergisches Kontaktekzem bei einer Hautbarriere-Störung	- 48 -
4.2	Irritatives Kontaktekzem bei einer Hautbarriere-Störung.....	- 49 -
4.3	Mutationsbedingte Barrierestörungen und atopische Erkrankungen	- 51 -
4.4	Fazit.....	- 52 -
4.5	Ausblick	- 52 -
5	Zusammenfassung	- 53 -
6	Literaturverzeichnis	- 54 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau der Epidermis	- 2 -
Abbildung 2	Anordnung der humanen "S100 <i>fused-type</i> Protein"-Gene.....	- 3 -
Abbildung 3	Synthese von Filaggrin	- 4 -
Abbildung 4	Pathogenese des allergischen Kontaktekzems.....	- 9 -
Abbildung 5	Zeitstrahl – Versuchsdurchführung allergisches Kontaktekzem.	- 17 -
Abbildung 6	Zeitstrahl – Versuchsdurchführung irritatives Kontaktekzem.....	- 18 -
Abbildung 7	Allergisches Kontaktekzem – Standard-Experiment.....	- 27 -
Abbildung 8	Allergisches Kontaktekzem – Kontroll-Experiment	- 28 -
Abbildung 9	Allergisches Kontaktekzem – Dosisfindung der Schwellenwert- Konzentration während der Sensibilisierung.....	- 29 -
Abbildung 10	Schwellenwert-Konzentration während der Sensibilisierung.....	- 30 -
Abbildung 11	Allergisches Kontaktekzem – Dosisfindung der Schwellenwert- Konzentration während der <i>Challenge</i>	- 31 -
Abbildung 12	Schwellenwert-Konzentration während der <i>Challenge</i>	- 31 -
Abbildung 13	HE-Färbungen sowie immunhistochemische Färbungen der zum Zeitpunkt t=36 Stunden gewonnenen Proben des ACD-Modells	- 34 -
Abbildung 14	Absolute Zellzahlen der FACS-Messungen	- 35 -
Abbildung 15	<i>Gating</i> -Strategie für die durchflusszytometrische Messung von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen	- 36 -
Abbildung 16	Absolute Zellzahlen der im Ohr positiv markierten Granulozyten, Monozyten und Makrophagen.....	- 36 -
Abbildung 17	<i>Gating</i> -Strategie für die durchflusszytometrische Messung von CD8 ⁺ - und CD4 ⁺ -T-Zellen	- 37 -
Abbildung 18	Absolute Zellzahlen der im Ohr positiv markierten CD8 ⁺ -Zellen.....	- 38 -
Abbildung 19	Absolute Zellzahlen der CD4 ⁺ -T-Zellen im Ohr sowie der Subpopulationen	- 39 -
Abbildung 20	Absolute Zellzahlen der im LK positiv markierten CD8 ⁺ -Zellen	- 40 -
Abbildung 21	CD4 ⁺ -Zellen im LK, CD4 ⁺ -T _{EM} sowie -T _{CM}	- 41 -
Abbildung 22	Regulatorische CD4 ⁺ CD25 ⁺ - und CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ -Zellen	- 42 -

Abbildung 23 Irritatives Kontaktekzem – Standard-Experiment	- 43 -
Abbildung 24 Irritatives Kontaktekzem – Dosisfindung der Schwellenwert- Konzentration	- 44 -
Abbildung 25 Schwellenwert-Konzentration	- 44 -
Abbildung 26 HE-Färbungen sowie immunhistochemische Färbungen der nach t=6 Stunden gewonnenen Proben des ICD-Modells.....	- 47 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Chemikalien.....	- 13 -
Tabelle 2	Verbrauchsmaterialien.....	- 13 -
Tabelle 3	Geräte.....	- 14 -
Tabelle 4	Software.....	- 15 -
Tabelle 5	Antikörper und Isotypkontrollen für Immunhistochemie.....	- 15 -
Tabelle 6	Antikörper für FACS	- 15 -
Tabelle 7	Isotypkontrollen für FACS	- 16 -
Tabelle 8	FACS: Übersicht LK- und Ohr-Färbungen	- 21 -
Tabelle 9	Pipettierschema FACS: 1. Panel Ohren mit FMO-Kontrollen.....	- 23 -
Tabelle 10	Pipettierschema FACS: 2. Panel Ohren mit FMO-Kontrollen.....	- 23 -
Tabelle 11	Pipettierschema FACS: 1. Panel Lymphknoten mit FMO-Kontrollen.....	- 24 -
Tabelle 12	Pipettierschema FACS: 2. Panel Lymphknoten mit FMO-Kontrollen.....	- 26 -

Abkürzungsverzeichnis

ACD	<i>Allergic Contact Dermatitis</i> (Allergisches Kontaktekzem)
AD	Atopische Dermatitis
APC	Allophycocyanin
BV	Brilliant-Violett
CE	<i>Cornified Envelope</i>
EDC	Epidermaler Differenzierungskomplex
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flg	Filaggrin
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
ft	<i>Flaky Tail</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hmr	Hornerin
ICD	<i>Irritant Contact Dermatitis</i> (Irritatives Kontaktekzem)
IHC	Immunhistochemie
LK	Lymphknoten
LZ	Langerhans-Zellen
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NMF	<i>Natural Moisturizing Factors</i> (Natürliche Feuchtigkeitsfaktoren)
Oxa	Oxazonon
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
T _{CM}	<i>Central Memory T Cells</i> (Zentrale Gedächtnis-T-Zellen)
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
T _{EM}	<i>Effector Memory T Cells</i> (Effektor-Gedächtnis-T-Zellen)
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
Treg	<i>Regulatory T Cells</i> (Regulatorische T-Zellen)
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
Veh	Vehikel
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Die Epidermis

Die Haut ist als äußere Barriere unseres Körpers in die Epidermis, die Dermis und die Subkutis untergliedert. Die Epidermis steht in direktem Kontakt mit der Umgebung. Sie schützt nicht nur vor mechanischen sowie physikalischen Reizen, sondern auch vor dem Eindringen vieler exogener Substanzen und Krankheitserreger. Gleichzeitig reguliert sie den Wasserhaushalt und verhindert einen zu hohen transepidermalen Verlust an Feuchtigkeit (Proksch et al. 2008). Über die Basalmembran steht die Epidermis, die keine Blutgefäße hat und daher per Diffusion versorgt wird, mit der gefäßreichen Dermis in Verbindung. Die Epidermis, ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel, besteht neben Melanozyten, Lymphozyten sowie Merkel- und Langerhans-Zellen zum größten Teil aus Keratinozyten. Im Laufe ihrer terminalen Differenzierung werden diese, ausgehend von proliferierenden Zellen im *Stratum basale* über Zellen des *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum*, letztlich zu kernlosen, abgestorbenen Zellen, den sogenannten Korneozyten, die die Hornschicht bilden (*Stratum corneum*) (Abbildung 1). Läuft dieser Prozess ungestört ab, entspricht die Geschwindigkeit der Proliferation derjenigen der Abschilferung der Hornschuppen, die aus den Korneozyten hervorgehen. Somit findet eine permanente Erneuerung der Epidermis statt (Candi et al. 2005). Der Aufbau der im *Stratum corneum* vorliegenden Korneozyten und der interzellulären Lipide wird als *Brick-and-Mortar-Modell* beschrieben, also einer Mauer, die aus den Steinen (Korneozyten) und dem ebenso wichtigen Mörtel (lipidreiche Interzellulärschicht) besteht und erst in Kombination die skizzierte Barrierefunktion ausüben kann (Nemes und Steinert 1999). Die Korneozyten bestehen überwiegend aus gebündeltem Keratin, umgeben von einem sogenannten *Cornified Envelope* (CE), einem Protein-Lipid-Konstrukt, das während der Zelldifferenzierung entsteht und letztlich die Plasmamembran ersetzt. Zusammen mit den im *Stratum granulosum* in Form von *Lamellar Bodies* existenten und später exozytierten Fetten bilden die CEs eine stabile Barriere (Kalinin et al. 2001).

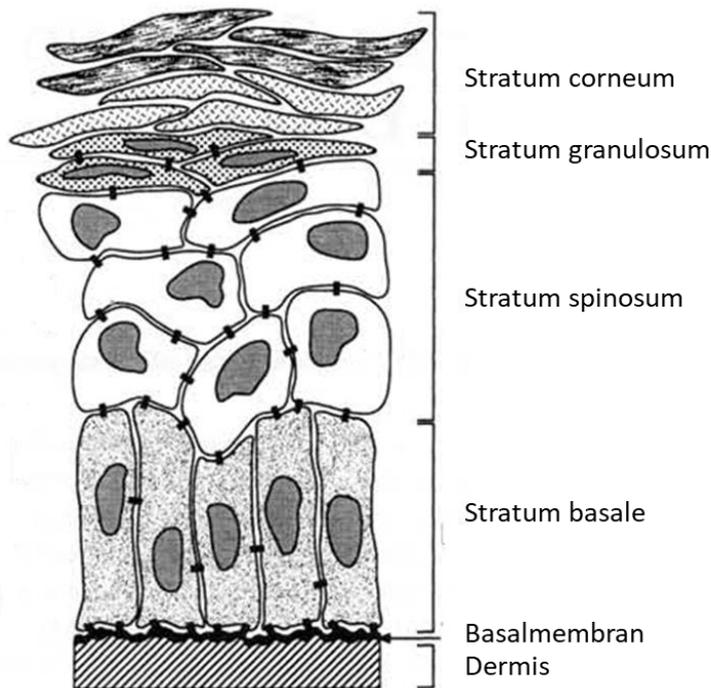


Abbildung 1 Aufbau der Epidermis (modifiziert aus Presland und Dale 2000, die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Verlags).

1.2 Filaggrin und Hornerin

Filaggrin (Flg) und Hornerin (Hnr) weisen einige Gemeinsamkeiten auf. Beide Proteine spielen beim Verhornungsvorgang und der epidermalen Barrierefunktion eine tragende Rolle. Die kodierenden Gene liegen beim Menschen im epidermalen Differenzierungskomplex (EDC) auf Chromosom 1q21 (McKinley-Grant et al. 1989), bei der Maus auf Chromosom 3q (Rothnagel 1994), direkt nebeneinander (Abbildung 2). Filaggrin und Hornerin sind zudem Mitglieder der sogenannten *S100-fused-type*-Proteine. Der Begriff bezieht sich auf die strukturelle Anordnung der zu dieser Gruppe gehörenden Gene mit meist drei Exons. Das jeweilige Proteinprodukt weist in Reihe liegende Motive auf, getrennt durch sogenannte *Linker*-Regionen und flankiert durch das N- und C-terminale Ende. Das N-terminale Ende weist dabei zwei Calcium-bindende *EF-Hand*-Motive auf (Kypriotou et al. 2012). Beide Proteine wurden in den Keratohyalingranula des *Stratum granulosum* sowie in der darüber liegenden Hornschicht nachgewiesen. Sowohl Filaggrin als auch Hornerin liegen im *Stratum granulosum* als Vorläuferproteine vor. Beim Übergang zum *Stratum corneum* erfolgt eine posttranslationale Prozessierung, um die Protein-Monomere freizusetzen (Makino et al. 2001; Sandilands et al. 2009; Henry et al. 2011).

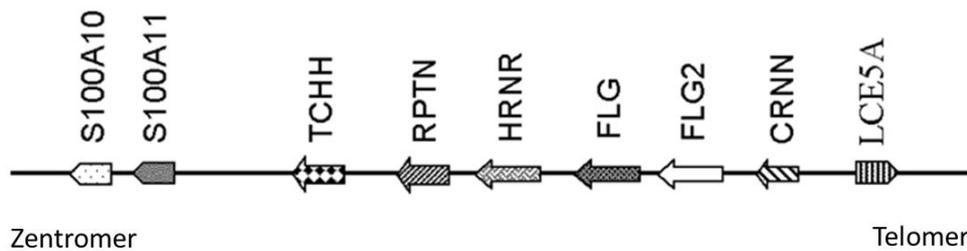


Abbildung 2 Anordnung der humanen “S100 *fused-type* Protein“-Gene auf Chromosom 1q21. TCHH, Trichohyalin; RPTN, Repetin; HRNR, Hornerin; FLG, Filaggrin; FLG2, Filaggrin-2; CRNN, Cornulin; LCE5A, late cornified envelope 5A (modifiziert aus Wu et al. 2009b, die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Verlags).

1.2.1 Filaggrin (Flg)

Die für das *Stratum granulosum* namensgebenden Keratohyalin granula bestehen hauptsächlich aus dem 400 kDa großen Profilaggrin. Dieses setzt sich zusammen aus dem N- und C-terminalen Ende sowie einer speziesabhängigen Anzahl hintereinander liegender Filaggrin-Monomere, die durch *Linker*-Regionen voneinander getrennt sind. Durch Dephosphorylierung und Proteolyse werden die Monomere beim Übergang vom *Stratum granulosum* zur darüber liegenden Hornschicht freigesetzt (Abbildung 3) (McKinley-Grant et al. 1989; Sandilands et al. 2009). Während des Entstehungsprozesses der kernlosen Hornschuppen sind die Filaggrin-Moleküle für die Aggregation der Keratin-Filamente und dadurch für das Zusammenbrechen der Zellstruktur verantwortlich (Dale et al. 1978; Candi et al. 2005). Durch Transglutaminasen entsteht eine dichte Keratin-Matrix, die als Gerüst für die Proteine des CE fungiert. Profilaggrin weist im Gegensatz zu Filaggrin kovalent gebundenes Phosphat auf (Lonsdale-Eccles et al. 1980) und interagiert nicht mit Keratin. Die Synthese der Monomere aus dem Vorläuferprotein muss während der Translation zeitgerecht im Zuge der terminalen Differenzierung stattfinden, damit eine zu frühe Bündelung des Keratins verhindert wird (McKinley-Grant et al. 1989). Schließlich wird Filaggrin in den oberen Schichten des *Stratum corneum* durch Citrullinierung und eine dadurch veränderte Ladung sowie Faltung einer weiteren Proteolyse zugänglich. Das Produkt stellen die freien Aminosäuren Glutamin und Histidin dar. Deren Derivate (Pyrrolidoncarbonsäure und Urocaninsäure) sind hydrophil und bilden die sogenannten *Natural Moisturizing Factors* (NMF). Gemeinsam mit weiteren Komponenten wie Milchsäure, Zuckern, Harnstoff und Citrat sind die NMF für die Bindung von Wasser und somit den Feuchtigkeitsgehalt und die Elastizität des *Stratum corneum* verantwortlich (Jokura et al. 1995; Rawlings und Harding 2004). Urocaninsäure, das enzymatisch entstehende Abbauprodukt von Histidin, absorbiert UV-Licht und schützt die Haut dadurch vor UVB-induzierten Zellschäden

(Mildner et al. 2010). Weiterhin sind die Filaggrin-Abbauprodukte an der Aufrechterhaltung des pH-Wertes der Haut beteiligt (Jungersted et al. 2010). Der physiologische pH-Wert der Haut liegt zwischen 4,1 und 5,8. Der Aufbau eines Säureschutzmantels ist dabei für die Abwehr bakterieller (Fehl-)Besiedlungen der Haut von großer Bedeutung. Das Bakterium *Staphylococcus aureus* kann bei etwa 20% der Gesamtbevölkerung als Teil der natürlichen Bakterienflora nachgewiesen werden. Patienten, die an einer atopischen Dermatitis leiden, weisen zu etwa 90% eine Besiedlung auf. Die gestörte epidermale Barriere und das Fehlen der Filaggrin-Abbauprodukte führen zu einem alkalischeren pH-Wert, der das Bakterienwachstum fördert (Miajlovic et al. 2010; Proksch 2018).

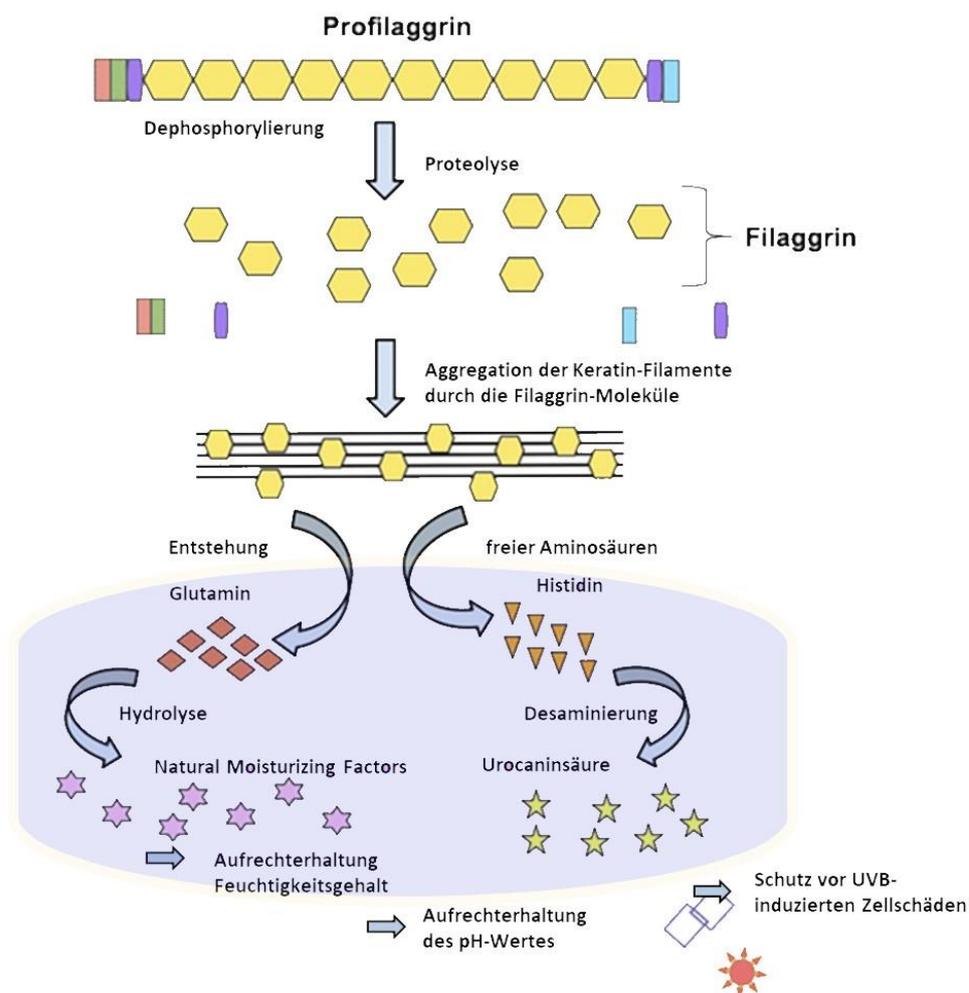


Abbildung 3 Synthese von Filaggrin: Durch Dephosphorylierung und Proteolyse werden die Filaggrin-Monomere aus dem Vorläufermolekül Profilaggrin freigesetzt. Innerhalb des *Stratum corneum* sind die Filaggrin-Moleküle für die Aggregation der Keratin-Filamente verantwortlich. Weitere Prozessierung führt zur Synthese freier Aminosäuren sowie deren Derivate. Die entstehenden NMF sind mitverantwortlich für den Feuchtigkeitsgehalt des *Stratum corneum*. Urocaninsäure schützt die Haut vor UVB-induzierten Zellschäden. Zudem ist Filaggrin an der Aufrechterhaltung des pH-Wertes beteiligt (modifiziert aus Eaaswarkhanth et al. 2016, die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Verlags).

1.2.2 Hornerin (Hnrn)

Das Vorläuferprotein von Hornerin ist etwa 282 kDa groß und ist, wie auch Profilaggrin, durch von *Linker*-Regionen getrennte repetitive Sequenzen gekennzeichnet. Die Monomere von ca. 45 kDa werden im Verlauf der Differenzierung durch enzymatische Prozessierung freigesetzt. Im *Stratum granulosum* wurde Hornerin in der Peripherie der Keratohyalingranula nachgewiesen. In der darüber liegenden Hornschicht ist das Protein am Aufbau und der Stabilität des CE beteiligt. Während Hornerin als Bestandteil des CE in allen Schichten der murinen Hornschicht vorliegt, ist Filaggrin durch den Abbau zu freien Aminosäuren nur in den unteren Schichten des *Stratum corneum* detektierbar. Auch in anderen verhornten Plattenepithelien wie Zunge, Ösophagus und Vormagen wurde Hornerin detektiert (Makino et al. 2003; Henry et al. 2011; Hsu et al. 2017). Wie auch Filaggrin werden Hornerin antimikrobielle Eigenschaften zugesprochen. Erweiternd ist aufgrund des hohen Anteils an Glycin ein Beitrag zur Elastizität der Epidermis anzunehmen (Wu et al. 2009).

Hornerin konnte in gesunder muriner Haut nachgewiesen werden (Makino et al. 2003). Ergebnisse aus Studien mit Menschen sind widersprüchlich. Einerseits wurden im Jahr 2005 experimentelle Ergebnisse veröffentlicht, nach denen Hornerin lediglich in Läsionen der *Psoriasis vulgaris* und in regenerierender Haut, nicht jedoch in gesunder Haut detektiert werden kann (Takaishi et al. 2005). Eine andere Gruppe wies Hornerin in mehreren Regionen intakter menschlicher Haut und eine reduzierte Expression in der Haut von Patienten mit *Psoriasis vulgaris* oder atopischer Dermatitis nach (Henry et al. 2011; Wu et al. 2009a).

1.3 Barrierestörung der Haut und assoziierte Erkrankungen

Unabhängig von der Ursache hat eine gestörte Hautbarriere zur Folge, dass die schützenden Eigenschaften der Epidermis nicht aufrechterhalten werden können. Als Resultat steht einem zu hohen Wasserverlust von innen nach außen ein verringerter Schutz vor physikalischen sowie mechanischen Einflüssen und dem Eindringen exogener Substanzen (Allergene, Toxine, Pathogene) von außen nach innen gegenüber.

Mutationen in Genen, die am Aufbau des ‚*Brick and Mortar*‘-Modells der Epidermis beteiligt sind, können eine primäre Barrierestörung bedingen. Eine solche liegt beispielsweise bei der *Ichthyosis vulgaris* vor. Sekundäre Barrierestörungen sind dadurch gekennzeichnet, dass inflammatorische Prozesse den Erhalt oder den Wiederaufbau einer intakten Barriere

verhindern. Neue Forschungsergebnisse deuten an, dass bei Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis und der *Psoriasis vulgaris* kombinierte Barrieredefekte vorliegen (Schmuth et al. 2015).

Die semidominant vererbte *Ichthyosis vulgaris* hat eine Prävalenz von 1:250-1000 (Oji 2010). Zwei häufig auftretende Mutationen (R510X und 2282del4) innerhalb des humanen Flg-Gens sind für die Erkrankung (mit)verantwortlich (Smith et al. 2006). Diese Mutationen treten bei etwa 9% der europäischen Bevölkerung auf (Palmer et al. 2006). Der Phänotyp ist durch Hautschuppung und palmare Hyperlinearität, häufig begleitet von *Keratosis pilaris*, gekennzeichnet (Smith et al. 2006).

In weiteren Studien wurde nachgewiesen, dass bei Patienten mit *Ichthyosis vulgaris* die genannten Mutationen eine Prädisposition für das Auftreten einer atopischen Dermatitis bedingen. In einer genomweiten Assoziationsstudie konnte ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (rs877776) innerhalb des Hornerin-Gens auf dem Chromosom 1q21 als eigenständiger Risikofaktor für die atopische Dermatitis ausgemacht werden (Esparza-Gordillo et al. 2009). Zudem wird bei Patienten mit atopischer Dermatitis häufig auch allergisches *Asthma bronchiale* beobachtet (Palmer et al. 2006; Weidinger et al. 2008). In Längsschnittstudien wurde außerdem gezeigt, dass lange Persistenz und frühes Auftreten der atopischen Dermatitis mit Flg-Mutationen assoziiert sind (Barker et al. 2007). Die Schätzung, dass mindestens die Hälfte aller Kinder mit moderater bis schwerer atopischer Dermatitis Filaggrin-Nullmutationen tragen und dass etwa 20% dieser Kinder zusätzlich an allergischem Asthma leiden, verdeutlicht die Signifikanz dieser Mutationen (Irvine und Irwin McLean 2006).

Filaggrin-Mutationen sind auch mit vermehrtem Auftreten berufsbedingter irritativer Kontaktekzeme assoziiert (De Jongh et al. 2008). Chronische irritative Kontaktekzeme mit Betonung der Hände werden häufig in bestimmten Berufsgruppen beobachtet, wie in der Gastronomie, im Gesundheitswesen, in der Metallverarbeitung und im *Beauty*-Sektor. Nur bei Patienten, die anamnestisch an einer atopischen Dermatitis erkrankt sind, sind Flg-Mutationen signifikant mit allergischen Kontaktekzemen assoziiert (Thyssen et al. 2013).

1.4 Mäuse mit gestörter epidermaler Barriere

1.4.1 Mausmodelle mit Filaggrin-Defizienz

Die sogenannte *Flaky-Tail* (ft)-Maus weist eine spontane Deletionsmutation des Flg-Gens auf. Sie dient als Tiermodell zur Analyse der funktionellen Eigenschaften des Proteins sowie der durch dessen Fehlen hervorgerufenen Krankheiten. Phänotypisch auffällig sind die trockene, schuppige Haut und die ringförmigen Einschnürungen des Schwanzes. Histologisch werden Fehlen der Keratohyalingranula, dünneres *Stratum granulosum* sowie Hyperkeratose beobachtet (Presland et al. 2000).

Der epidermale Differenzierungskomplex und somit das Flg-Gen befindet sich im Maus-Genom auf dem Chromosomenabschnitt 3QF21 (Fallon et al. 2009). Durch Deletion eines einzigen Basenpaares entsteht ein vorzeitiges Stoppkodon. Das nach Translation vorliegende Profilaggrin weist dann eine deutlich geringere Molekülmasse auf und die posttranslationale Prozessierung zu Filaggrin-Monomeren ist gestört (Presland et al. 2000; Sandilands et al. 2009). Bei der Untersuchung einer gestörten Barrierefunktion wurde gezeigt, dass ft-Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen (wt) nach kutanem Allergenkontakt mit Ovalbumin ein entzündliches Infiltrat (überwiegend Lymphozyten), eine Akanthose sowie einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust (TEWL) im behandelten Bereich aufweisen (Fallon et al. 2009). Zudem wurde bei Mutation und Fehlen der Filaggrin-Abbauprodukte ein erhöhter pH-Wert der Haut beobachtet (Jungersted et al. 2010). Strukturelle Grundlage der erhöhten Permeabilität und gestörten Barriere ist wohl eine beeinträchtigte Sekretion der *Lamellar Bodies* (Scharschmidt et al. 2009).

Obwohl die ft-Maus als Modell zur Erforschung der atopischen Dermatitis dient, konnte Filaggrin mittels *Western Blot*, wenn auch in stark reduzierter Menge, nachgewiesen werden. Der vollständige Verlust von Profilaggrin und Filaggrin wurde in Flg^{-/-}-Mäusen untersucht, die ebenfalls eine gestörte Keratohyalingranula-Synthese und eine trockene, schuppige Haut aufweisen (Kawasaki et al. 2012). Die mangelhafte Ausbildung der Keratin-Matrix wurde als Ursache für die gesteigerte Anfälligkeit gegenüber mechanischem Stress gewertet. Trotz im Vergleich zu wt-Mäusen reduzierter NMF waren TEWL und epidermaler Feuchtigkeitsgehalt nicht reduziert.

Die transepidermale Penetration lipophiler Substanzen bei vollständigem Filaggrin-Verlust wies auf eine gestörte Integrität der Hautbarriere hin. Im Mausmodell wurde bei Fehlen oder reduziertem Vorkommen von Filaggrin ein geringerer Schwellenwert zur Auslösung eines irritativen und allergischen Kontaktekzemes nachgewiesen (Scharschmidt et al. 2009; Moniaga

et al. 2010). Um ein irritatives Kontaktekzem hervorzurufen, wurde Croton-Öl auf die Ohren der jeweiligen Mäuse aufgetragen. Es zeigte sich eine signifikant stärkere Schwellung der Flg^{-/-}-Mausohren. Bei einem allergischen Kontaktekzem durch DNFB (1-Fluor-2,4-dinitrobenzol) wiesen die Ohren der Flg^{-/-}-Mäuse verglichen mit wt-Mäusen ein stärker ausgeprägtes zelluläres Infiltrat und eine signifikant stärkere Ohrschwellung auf (Kawasaki et al. 2012).

1.4.2 Die FlgHrrn doppelt defiziente (*Knockout*-) Maus

Zur Generierung der FlgHrrn-Defizienz (*Doppel-Knockout*) wurde ausgenutzt, dass die kodierenden Gene auf dem murinen Chromosom 3q direkt nebeneinander liegen. Die kodierenden Genabschnitte mitsamt der intergenomischen Sequenz wurden durch TaconicArtemis GmbH (Köln, Deutschland) in Zusammenarbeit mit dem Forschungslabor der Hautklinik (Universitätsmedizin Göttingen UMG) exzidiert. Zur Bestätigung des vollständigen Verlustes beider Genprodukte wurden *Western Blot*-Analysen, Immunhistochemie, DNA-Genotypisierung sowie epidermale mRNA-Analyse durchgeführt. Makroskopischer und mikroskopischer Phänotyp der FlgHrrn^{-/-}-Maus wurden anschließend näher analysiert. Während die noch unbehaarten Jungtiere eine groblamelläre Schuppung aufwiesen, die an das klinische Bild von Ichthyosen erinnern, waren die erwachsenen Mäuse von den wt-Mäusen nur durch einen deutlich kürzeren Schwanz und kleinere Ohren zu unterscheiden. Auf histologischer Ebene wurden bei neugeborenen FlgHrrn^{-/-}-Mäusen ein kompakteres *Stratum corneum* sowie fehlende Keratohyalin granula im *Stratum granulosum* nachgewiesen. Reduzierte Mengen an NMF und eine experimentell nachgewiesene gesteigerte parazelluläre Permeabilität waren das funktionelle Korrelat der gestörten epidermalen Integrität (Rahrig et al. 2019).

1.5 Kontaktekzeme (Kontaktdermatitis)

Ein Kontaktekzem (Kontaktdermatitis) ist eine entzündliche Reaktion des Körpers auf meist von außen auf die Haut einwirkende Substanzen oder Noxen. Der Begriff umfasst allergische und irritative (toxische) Kontaktekzeme, die sich pathophysiologisch unterscheiden. Das Bundesinstitut für Risikobewertung veranstaltete im Jahr 2008 einen *International Workshop on Contact Dermatitis*. Danach leiden etwa 15-20% der Bevölkerung an einem Kontaktekzem (Peiser et al. 2011). Diese Zahl und das Wissen, dass ausgewählte Berufsgruppen besonders häufig betroffen sind, belegt die gesundheitsökonomische Relevanz des Erkrankungsbildes.

1.5.1 Allergisches Kontaktekzem

Zur Ausbildung eines allergischen Kontaktekzems (ACD; engl. ‚*allergic contact dermatitis*‘) führt eine durch spezifische T-Zellen vermittelte verzögerte Immunreaktion vom Spättyp (Typ IV). Die in zwei Phasen ablaufende Reaktion setzt dabei eine adaptive Immunreaktion voraus. Das allergische Kontaktekzem ist im akuten Stadium gekennzeichnet durch Erythem, Papulovesikel und Exsudation. Später kommen Schuppen- und Krustenbildung hinzu.

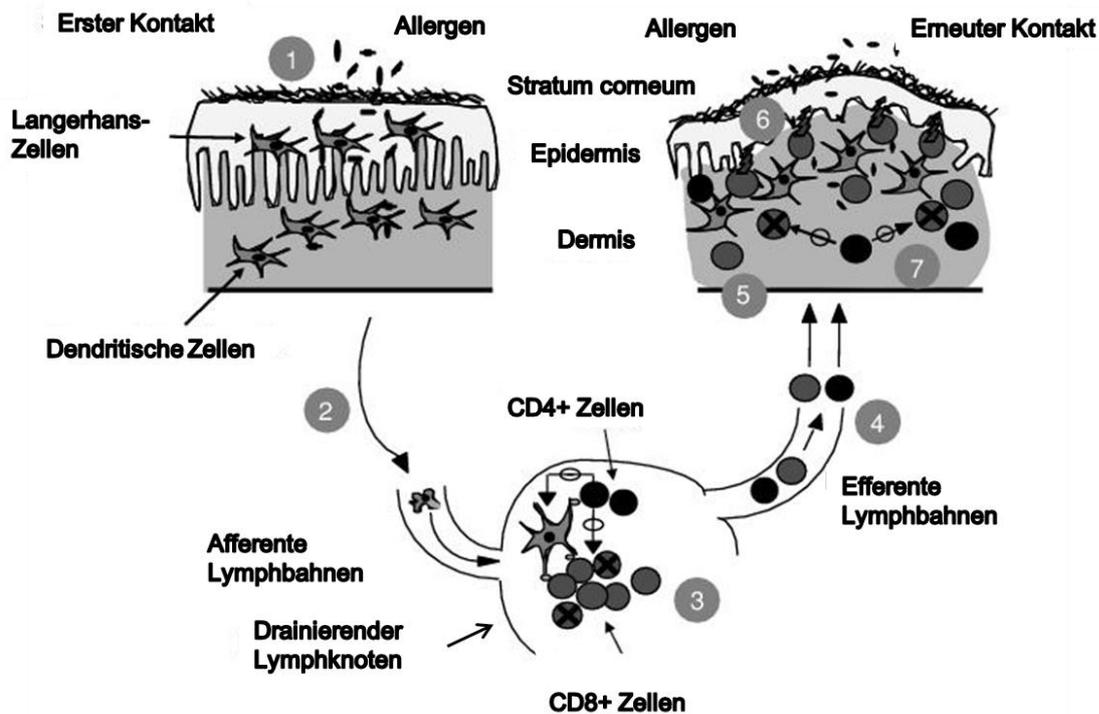


Abbildung 4 Pathogenese des allergischen Kontaktekzems: 1. Die Sensibilisierungsphase beginnt mit dem Hautkontakt des Allergens. 2. Langerhans-Zellen, die nach Phagozytose des Allergen-Protein-Komplexes aktiviert sind, erreichen über afferente Lymphbahnen die Lymphknoten. 3. und 4. Durch Präsentation des (prozessierten) Allergens ausgelöste Aktivierung naiver T-Zellen im Lymphknoten mit nachfolgender Proliferation und Differenzierung der T-Zellen zu T-Gedächtniszellen. 5. Die Auslösephase (*Challenge*) beginnt mit dem erneuten kutanen Allergen-Kontakt. 6. Differenzierung von T-Gedächtniszellen zu zytotoxischen T-Effektorzellen mit konsekutiver Entzündungsreaktion. 7. Am Abklingen der Immunreaktion sind CD4⁺-T-Zellen beteiligt (modifiziert aus Saint-Mezard et al. 2004, die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Verlags).

Initial bedarf es oft eines wiederholten Kontaktes der Haut mit dem auslösenden Agens, dem Allergen. Hierbei handelt es sich um sogenannte Haptene, niedermolekulare Substanzen, die nur in Verbindung mit einem körpereigenen zellgebundenen oder löslichen Protein immunogen sind und dann als (Voll-)Antigen fungieren (Pease et al. 2003). Die Sensibilisierungsphase beginnt mit dem primären Kontakt zwischen Haut und Allergen/Hapten. Der Antigen-Protein-Komplex wird von epidermalen dendritischen Zellen, den Langerhans-Zellen (LZ), phagozytiert (Kimber et al. 2002). Die LZ werden daraufhin aktiviert, einerseits direkt durch Allergen-Kontakt und andererseits indirekt über eine Stimulation durch die mit dem Allergen

ebenfalls in Kontakt getretenen umgebenden Keratinozyten. Die Aktivierung der LZ resultiert in deren Differenzierung von Antigen-prozessierenden Zellen zu reifen Zellen, die das Immunsystem stimulieren. Über afferente Lymphbahnen erreichen die LZ die Lymphknoten (Kimber und Cumberbatch 1992). Über MHC I und II präsentieren sie in den Lymphknoten naiven T-Zellen, die mit den für das Allergen spezifischen T-Zell-Rezeptoren ausgestattet sind, die prozessierten Antigen-Protein-Komplexe. In Verbindung mit Signalen kostimulatorischer Moleküle (B7-1, B7-2, ICAM-1) löst dies eine Proliferation und Differenzierung der T-Zellen zu T-Gedächtniszellen aus (Riemann et al. 2003). Die Gedächtnisfunktion des adaptiven Immunsystems wird von sogenannten zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM} ; engl. ‚*Central Memory T Cell*‘) sowie Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM} ; engl. ‚*Effector Memory T Cell*‘) unterhalten (Sallusto et al. 1999). Während die T_{EM} in peripheren Geweben für die sofortige Effektorfunktion bei erneutem Kontakt mit dem entsprechenden Allergen zur Verfügung stehen, üben die T_{CM} primär keine Effektorfunktion aus. Die Expression von CD62L (L-Selektin) befähigt die T_{CM} , in sekundäre lymphatische Organe einzuwandern. Antigenstimulation verursacht die Proliferation und letztlich die Differenzierung in Effektorzellen, sodass auch die T_{CM} -Zellen Effektorfunktion gewinnen und im Rahmen der erneuten Stimulation eine verstärkte Immunantwort hervorrufen (Sallusto et al. 2004).

Die auf die Sensibilisierung folgende Auslösephase (*Challenge*) beginnt mit dem erneuten kutanen Kontakt mit dem Allergen/Hapten. Die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen aus Keratinozyten sowie die Aktivierung von Endothelzellen ermöglicht den spezifischen T-Gedächtniszellen, die Gefäße zu verlassen und im Gewebe von Antigen-präsentierenden Zellen aktiviert zu werden (Riemann et al. 2003). Als ein Resultat findet eine erneute Differenzierung von T-Gedächtniszellen in sogenannte zytotoxische T-Effektorzellen statt. Diese sind die Initiatoren der Entzündungsreaktion, wohingegen die Zellen des angeborenen Immunsystems (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen) als Exekutoren fungieren und für das klinische Bild (mit-)verantwortlich sind (Riemann et al. 2003). Die sichtbare Entzündung in Form von Erythem, Bläschen und Exsudation dauert bei Mäusen ca. 24 bis 48 Stunden. Menschliche Haut hingegen zeigt noch bis ca. 72 Stunden eine Zunahme der Entzündung (Saint-Mezard et al. 2004). Die $CD8^+$ -zytotoxischen T-Zellen erkennen und lysieren die durch das Antigen modifizierten Keratinozyten und lösen die Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren zur Verstärkung der Immunantwort und die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen aus. Für das Abklingen der Immunreaktion sind unter anderem die nach 24 Stunden nachweisbaren $CD4^+$ -T-Zellen verantwortlich, deren regulatorische Funktion mit der Produktion von IL-4 und IL-10 in Verbindung steht (Xu et al. 1996). Regulatorische $CD4^+$ -T-

Lymphozyten, die CD25 exprimieren, verhindern durch Sekretion von IL-10 die Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen im entzündeten Gewebe. Als direkte Folge wird der Einstrom von CD8⁺-Effektorzellen und dadurch die inflammatorische Antwort supprimiert (Ring et al. 2006).

1.5.2 Irritatives Kontaktekzem

Ganz im Gegensatz zur Genese des allergischen Kontaktekzems löst beim irritativen Kontaktekzem das auf die Haut aufgetragene Irritans durch seine inhärenten toxischen Eigenschaften eine sofortige unspezifische Entzündung durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems aus (Nosbaum et al. 2009). Das klinische Bild ist heterogen und von der Konzentration und der Verweildauer des Auslösers auf der Haut abhängig. Chronische Formen sind vor allem bei berufsbedingtem Kontakt zum jeweiligen Irritans gehäuft sichtbar. Gekennzeichnet ist das klinische Bild durch scharf begrenzte Erytheme, Schuppung einhergehend mit Pruritus, bis hin zu Erosionen, Blasen- und Krustenbildung. Erste Zeichen der akuten Entzündung können bereits wenige Stunden nach Erstkontakt sichtbar werden.

Das Auftragen des Irritans, sein Eindringen zunächst in die Epidermis und darauf folgend der Kontakt mit den dermalen Zellen löst die Produktion und Sekretion von Chemokinen und Zytokinen aus. Diese proinflammatorischen Eigenschaften unterscheiden Irritantien von Allergenen (Nosbaum et al. 2009). Bereits nach erstmaligem Kontakt ist so die Ausbildung eines Ekzems möglich (Willis et al. 1992). Die ablaufende Entzündungsreaktion wird dabei lediglich von Zellen des angeborenen Immunsystems getragen (Nosbaum et al. 2009).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht die durch das Auslösen eines Kontaktekzems verursachte kutane Entzündungsreaktion in Hautbarriere-gestörten FlgHrn-doppeldefizienten Mäusen. Filaggrin und Hornerin sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung einer intakten epidermalen Barriere beteiligt. Mutationen innerhalb der für die Proteine kodierenden Genabschnitte auf dem humanen Chromosom 1q21 sind unabhängig voneinander assoziiert mit einem erhöhten Risiko zur Ausbildung einer atopischen Dermatitis (Palmer et al. 2006; Esparza-Gordillo et al. 2009). Bisher wurden erst wenige Daten zur Assoziation einer Hautbarriere-Störung mit irritativen und allergischen Kontaktekzemen veröffentlicht. Dagegen liegt die Prävalenz der Kontaktekzeme bei etwa 20% (Peiser et al. 2011). Diese Diskrepanz verdeutlicht die große Relevanz weiterer Forschung und führt zu folgenden Fragestellungen:

1. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Verlust von Filaggrin und Hornerin, einer gestörten Hautbarriere und allergischen oder irritativen Kontaktekzemen?
2. Können Unterschiede in der Genese irritativer und allergischer Kontaktekzeme in doppelt defizienten Mäusen beobachtet werden?
3. Unterscheidet sich das zelluläre Entzündungsinfiltrat in den beiden Kontaktekzemen?
4. Verändert die FlgHrnr-Defizienz die Schwellenwerte, bei denen ein Allergen oder Irritans eine Entzündungsreaktion initiieren kann?

Methodisch wurde eine gestörte Hautbarriere durch doppelte Defizienz von Filaggrin und Hornerin (FlgHrnr^{-/-}-Maus) erzeugt. Dabei wurde zunächst die Auswirkung der Mutationen auf das allergische Kontaktekzem untersucht. In einem zweistufigen Modell der allergischen Kontaktdermatitis wurde zunächst die Sensibilisierung und konsekutiv die Auslösung (*Challenge*) mit dem klassischen Hapten Oxazolon durchgeführt. Zur Auslösung irritativer Kontaktekzeme wurde im zweiten Teil das Irritans Croton-Öl verwendet. Das Ausmaß der Entzündung wurde klinisch durch Messung der Ohrdicken bestimmt. Durch Histologie und FACS-Analysen konnten ergänzend die Verteilung, Quantität und Qualität des zellulären Infiltrates untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde in Niedersachsen (LAVES, Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz Niedersachsen) geprüft und genehmigt (Aktenzeichen 12/0836). Sie wurden nach den Bestimmungen des aktuell geltenden Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Für die Versuche wurden Wildtyp (wt)-Mäuse des Stammes C57BL/6J von Jackson Laboratory (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die FlgHrnr-defizienten Mäuse wurden in Zusammenarbeit mit der Firma TaconicArtemis GmbH (Köln, Deutschland) generiert, indem die Gene für Filaggrin und Hornerin inklusive der intergenomischen Sequenz exzidiert wurden (Rahrig et al. 2019).

Die Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und gehalten. Die Käfige wiesen eine gesonderte Frischluftzufuhr auf, die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Der Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden wurde automatisch geregelt. Für die vorliegende Arbeit wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter zwischen 8 und 12

Wochen verwendet. Die Versuchsgruppen waren hinsichtlich Alter und Geschlecht der Mäuse weitestgehend angeglichen.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Tabelle 1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Dako, Glostrup, Dänemark
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Biotin Blocking System	Dako, Glostrup, Dänemark
Croton-Öl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Faramount Eindeckmedium	Dako, Glostrup, Dänemark
FCS (Liberase Blocker)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Foxp3 Buffer Set	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
H ₂ O ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether)	AbbVie, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Liberase TL	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Oxazolone (4-Ethoxymethylen-2-phenyl-2-oxazolin-5-one)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS	PAA, Pasching, Österreich
RPMI	PAA, Pasching, Österreich
Streptavidin-Peroxidase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tissue-Tek Einbettmedium (OCT)	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zombie NIR™ Fixable Viability kit	BioLegend, San Diego, CA, USA

2.2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Cup Filcons (50 µm Porengröße)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Deckgläser	Gerhard Menzel, Braunschweig

Vortexer (Schüttler)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Wärmebad	Medax, Rendsburg, Deutschland

2.2.5 Software

Tabelle 4 Software

Software	Bezugsquelle
AxioVision Rel 4.7	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
FACS Diva	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

2.2.6 Antikörper und Isotypkontrollen für Immunhistochemie

Tabelle 5 Antikörper und Isotypkontrollen für Immunhistochemie

Antikörper	Klon	Ursprungsspezies	Zielspezies	Hersteller
Anti-CD3	500A2	Hamster	Maus	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-CD4	RM4-5	Ratte	Maus	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-CD8 α	53-6.7	Ratte	Maus	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-CD11b	M1/70	Ratte	Maus	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Anti-Ly-6G (Gr1)	RB6-8C5	Ratte	Maus	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Sekundärantikörper anti-Hamster IgG	Polyklonal	Ziege	Hamster	Linaris, Dossenheim, Deutschland
Sekundärantikörper anti-Ratte IgG	Polyklonal	Kaninchen	Ratte	Linaris, Dossenheim, Deutschland
Isotypkontrolle Ratten-IgG		Ratte		Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isotypkontrolle Hamster-IgG		Hamster		Linaris, Dossenheim, Deutschland

2.2.7 Antikörper und Isotypkontrollen für FACS

Tabelle 6 Antikörper für FACS

Antigen	Klon	Ursprungsspezies	Isotyp	Markierung	Konzentration	Hersteller
CD4	H129.19	Ratte	IgG2a κ	FITC	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD8 α	53-6.7	Ratte	IgG2a κ	PerCP	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
FoxP3	MF-14	Ratte	IgG2b κ	PE	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD25	PC61	Ratte	IgG1 λ	BV 421	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA

TCR β chain	H57-597	Hamster	IgG	BV 510	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD44	IM7	Ratte	IgG2b κ	PE	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD62L	MEL-14	Ratte	IgG2a κ	PE-Cy7	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD69	H1.2F3	Hamster	IgG	APC	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD8 α	53-6.7	Ratte	IgG2a κ	APC-CY7	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD45	30-F11	Ratte	IgG2b κ	APC	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
Gr-1	RB6-8C5	Ratte	IgG2b	FITC	1,0 mg/ml	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
CD11c	N418	Hamster	IgG	PE	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
F4/80	BM8	Ratte	IgG2a κ	BV 421	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD11b	M1/70	Ratte	IgG2b κ	BV 510	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA

Tabelle 7 Isotypkontrollen für FACS

Isotyp	Klon	Ursprungsspezies	Markierung	Konzentration	Hersteller
IgG2b κ	RTK4530	Ratte	FITC	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG2b κ	TBE15	Ratte	PE	1,0 mg/ml	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
IgG2a κ	A95-1	Ratte	PerCP	0,2 mg/ml	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
IgG1 κ	RTK2071	Ratte	BV 421	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG	HTK888	Hamster	BV 510	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG2a κ	RTK2758	Ratte	APC	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG2b κ	RTK4530	Ratte	BV510	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG2a κ	RTK2758	Ratte	PE/Cy7	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA
IgG2b κ	RTK4530	Ratte	APC-Cy7	0,5 mg/ml	BioLegend, San Diego, CA, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Messung der Ohrschwellung

2.3.1.1 Allergisches Kontaktekzem (ACD) - Versuchsdurchführung

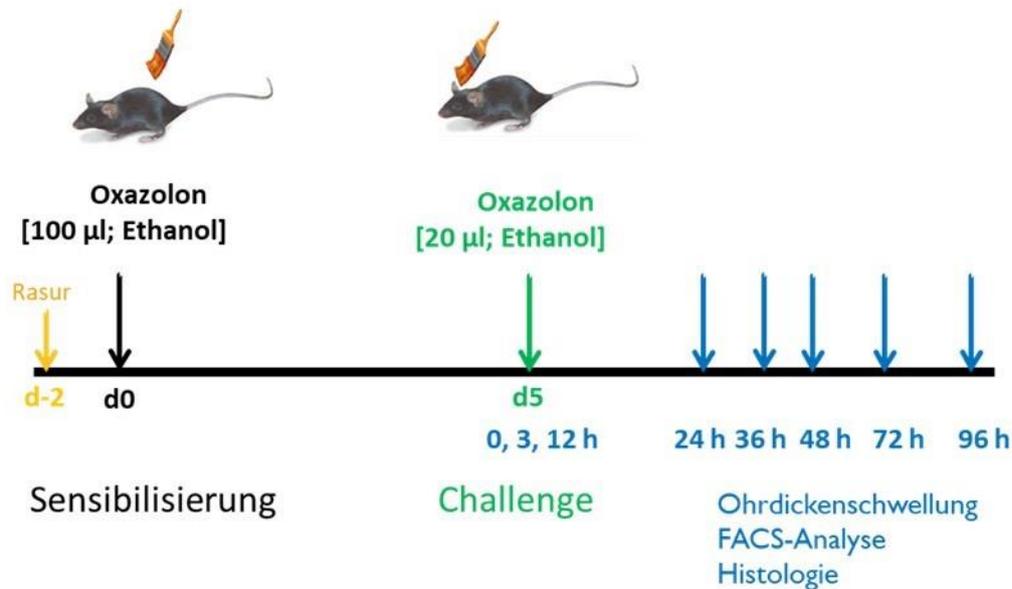


Abbildung 5 Zeitstrahl – Versuchsdurchführung allergisches Kontaktekzem.

Zunächst wurden die Mäuse am unteren Rücken auf einer Fläche von etwa 1 cm² rasiert. Zwei Tage später erfolgte die Sensibilisierung durch Auftragen von 100 µl einer 3%-igen Oxazolol(Oxa)-Lösung (in Ethanol) auf die behandelte Fläche. Nach fünf Tagen wurden für das Standard-Experiment 20 µl einer 1%-igen Oxa-Lösung (jeweils 10 µl) auf Vorder- und Rückseite des rechten Ohres aufgetragen. Dabei wurde das andere (linke) Ohr mit der gleichen Menge des Vehikels (Ethanol) behandelt. Vor der *Challenge* (t=0 Stunden) sowie 3, 12, 24, 36, 48, 72 und 96 Stunden danach wurden die Ohrdicken gemessen.

Zur Bestimmung des Schwellenwertes der Sensibilisierung wurde (bei unveränderter Durchführung der *Challenge*) nach Dosisfindung eine Sensibilisierungs-Konzentration von 0,03% Oxa gewählt. Zuvor erfolgte im Rahmen der Dosisfindung die Austestung an wt-Mäusen mit Sensibilisierungs-Konzentrationen von 0,03 bis 3% Oxa. Für das *Challenge*-Schwellenwert-Experiment wurde (bei unveränderter Durchführung der Sensibilisierung) nach Dosisfindung eine *Challenge*-Konzentration von 0,3% Oxa ausgewählt. Auch hier erfolgte im Rahmen der Dosisfindung zuvor die Austestung an wt-Mäusen mit *Challenge*-Konzentrationen von 0,01 bis 1%. Das Kontroll-Experiment wurde ohne vorangegangene Sensibilisierung mit einer *Challenge*-Konzentration von 1% Oxa durchgeführt.

2.3.1.2 Irritatives Kontaktekzem (ICD) - Versuchsdurchführung

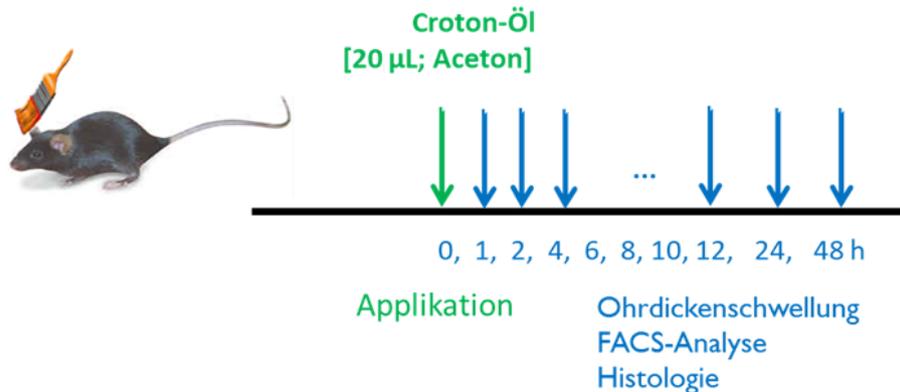


Abbildung 6 Zeitstrahl – Versuchsdurchführung irritatives Kontaktekzem.

Zur Auslösung eines irritativen Kontaktekzems wurde innerhalb des Standard-Experimentes eine 2,5%-ige Croton-Öl-Lösung (in 100% Aceton) verwendet. Das rechte Ohr wurde einmalig, wie im Modell des allergischen Kontaktekzems näher erläutert, mit insgesamt 20 µl der Lösung behandelt, das linke Ohr lediglich mit dem Vehikel (Aceton).

Für das Schwellenwert-Experiment wurde nach der Dosisfindung eine Konzentration von 0,1% Croton-Öl ausgewählt. Zuvor erfolgte im Rahmen der Dosisfindung die Austestung an wt-Mäusen mit Konzentrationen von 0,01 bis 1% Croton-Öl. Vor der Behandlung (t=0 Stunden) sowie 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 und 48 Stunden danach wurden die Ohrdicken gemessen.

2.3.1.3 Ohrschwellung - Messung und Berechnung

Die Mäuse wurden vor Messung der Ohrdicken mittels einer Isofluran-Inhalationsanästhesie für kurze Zeit narkotisiert. Die Ohrdicke wurde zu den angegebenen Zeitpunkten standardisiert an drei Punkten mit einem Präzisionsmessgerät gemessen (ventral, mittig, dorsal) und der Mittelwert gebildet. Die Schwellung der Ohren wurde berechnet durch Subtraktion des Mittelwertes "unbehandeltes Ohr" vom Mittelwert "behandeltes Ohr". Die errechneten Werte wurden gegen den Ausgangswert (Zeitpunkt t=0 Stunden) normiert. In den Abbildungen wird jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben.

2.3.2 Histologie

2.3.2.1 Gewinnung der Proben

Die Proben des ACD-Modells wurden 36 Stunden nach *Challenge* gewonnen, die des ICD-Modells 6 Stunden nach einmaliger Behandlung. Das mit dem Vehikel sowie das mit Oxa oder Croton-Öl behandelte Ohr wurde nach schmerzfreier Tötung der Tiere (durch tiefe CO₂-Narkose und folgendem Genickbruch) abgeschnitten und zweigeteilt. Jeweils eine Hälfte wurde für das spätere Anfertigen von Gefrierschnitten und die jeweils andere für die Anfertigung von Paraffinschnitten verwendet.

2.3.2.2 Gefrierschnitte

Die Proben wurden zunächst in mit Tissue-Tek[®] Einbettmedium gefüllte Eppendorf-Gefäße (1500 µl) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurden die Proben bei -80 °C. Bei einer Schneidetemperatur von -20 °C wurden mit einem Kryostat 10 µm dicke Schnitte der eingebetteten Proben angefertigt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.2.3 Immunhistochemie (IHC)

2.3.2.3.1 Labeled-Streptavidin-Biotin(LSAB)-Methode

Diese Methode nutzt die hohe Bindungsaffinität von Avidin (Glykoprotein aus Hühnereiern) und Streptavidin (von *Streptomyces avidinii* produziertes Protein) zu Biotin aus. Letzteres ist hierbei kovalent an den Sekundärantikörper gekoppelt. Während der Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase bindet die Proteinkomponente des Komplexes an den biotinylierten Sekundärantikörper, der als Brücke zum Primärantikörper fungiert. Das Substrat AEC dient als Indikator.

2.3.2.3.2 Färbeprotokoll für IHC

1. Fixierung in Methanol (100%) für zehn Minuten bei -20°C.
2. Auswaschen der Präparate 3x fünf Minuten in PBS.
3. Inaktivierung der endogenen Peroxidase durch 0,3% H₂O₂ für zehn Minuten bei Raumtemperatur (RT).
4. Auswaschen der Präparate 3x fünf Minuten in PBS.
5. Präparate mit PAP Pen umranden.

6. Inkubation mit Avidin-Lösung für zehn Minuten bei RT, danach abspülen.
7. Inkubation mit Biotin-Lösung für zehn Minuten bei RT, danach abspülen.
8. Auswaschen der Präparate 3x fünf Minuten in PBS.
9. Inkubation mit 5% Kaninchen-Serum in PBS oder 5% Ziegen-Serum in PBS für 40 Minuten bei RT in feuchter Kammer.
10. Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung (Tabelle 5) oder der Isotyp-Kontrolle bei 4°C über Nacht in feuchter Kammer.
11. Auswaschen der Präparate 3x fünf Minuten in PBS.
12. Inkubation mit dem jeweiligen Biotin-markierten Sekundärantikörper in der jeweiligen Verdünnung für 60 Minuten bei RT in feuchter Kammer.
13. Auswaschen der Präparate 3x fünf Minuten in PBS.
14. Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase (1:500 in PBS) für 40 Minuten bei RT in feuchter Kammer.
15. Auswaschen der Präparate 3x fünf Minuten in PBS.
16. Inkubation mit AEC (mikroskopische Kontrolle zur Bestimmung der Inkubationszeit).
17. Wässern für fünf Minuten (Leitungswasser).
18. Gegenfärbung mit Hämalaun.
19. Wässern für fünf Minuten (Leitungswasser).
20. Einbettung mittels Faramount-Eindeckmedium.

2.3.2.4 Paraffinschnitte

Die Proben wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur in PFA fixiert und im Routine-Labor des Instituts für Neuropathologie der UMG in Paraffin eingebettet.

Zur Herstellung der Paraffinschnitte wurden die Paraffinblöcke vorbereitend für eine Stunde auf eine Kühlplatte gelegt. Mit Hilfe des Mikrotoms wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Aufgefangen wurden diese zunächst auf einem Kaltwasserbad. Das nachfolgende Überführen auf ein Warmwasserbad ermöglichte durch Streckung der Schnitte das Aufziehen auf die Objektträger vom Typ Super Frost. Die Schnitte wurden über Nacht bei 40-44°C getrocknet. Die für die HE-Färbung obligatorische Entparaffinierung wurde durch dreimalige Inkubation für jeweils zehn Minuten in Xylol erreicht. Die anschließende Rehydrierung erfolgte durch Inkubation zunächst in 100% Isopropanol und danach in einer absteigenden Ethanolreihe (von 100% bis 50%) für jeweils zehn Minuten. Nach einmaligem Waschen in PBS wurde die HE-Färbung im Institut für Neuropathologie der UMG durchgeführt.

2.3.2.5 Fotodokumentation

Die Fotos wurden an einem Axioskop 2-Mikroskop mit der AxioCam MRc und dem Programm Axio Vision Rel 4.7 (alle von Zeiss) in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Der eingefügte Messbalken entspricht einer Länge von 100 µm.

2.3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS; *Fluorescence-activated Cell Scanning*) mit Fluorochrom-markierten Antikörpern dient der quantitativen Erfassung von Zellen und deren Zuordnung aufgrund physikalischer Eigenschaften zu bestimmten Zellreihen. Verwendet wurde das BD FACS Canto II und die zugehörige Software BD Diva.

In Suspension vorliegende Zellen werden zunächst mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern inkubiert. Die Antikörper richten sich dabei gegen für bestimmte Zellen charakteristische Antigene. Die Fluorochrome unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Anregungs- und Emissionsspektren. Bei Auftreffen des Lichtes der installierten Laser auf die in einem Flüssigkeitsstrom passierenden Zellen wird durch Messung der Emissionsspektren und der Fluoreszenzintensität ein Rückschluss auf die markierten Zellen ermöglicht. Zusätzlich wird das Licht der Laser bei Passieren der Zellen gestreut. Zur zellulären Identifikation trägt das Auffangen des Vorwärts- und des Seitwärtsstreulichtes und eine dadurch ermöglichte Bestimmung der relativen Zellgröße sowie der Granularität bei.

2.3.3.1 Gewinnung der Proben

Zur Betrachtung der Verhältnisse in sensibilisierten Tieren ohne *Challenge* (t=0 Stunden) wurden jeweils sechs Mäuse beider Mauslinien rasiert sowie durch Auftragen von 100 µl einer 3%-igen Oxa-Lösung (in 100% Ethanol) sensibilisiert. Fünf Tage später erfolgte die Analyse. Für die Betrachtung des zellulären Infiltrates zum Zeitpunkt t=36 Stunden wurden ebenfalls jeweils sechs Mäuse zunächst rasiert sowie sensibilisiert. Fünf Tage später wurden insgesamt 20 µl einer 1%-igen Oxa-Lösung auf Vorder- und Rückseite eines Ohres aufgetragen. Dabei wurde das andere Ohr mit der gleichen Menge, jedoch lediglich dem Vehikel (Ethanol) behandelt. Nach 36 Stunden wurden die Mäuse getötet und untersucht.

Beidseits wurden die aurikulären Lymphknoten (LK) und die Ohren entnommen. Bei der Verarbeitung der t=36 Stunden-Proben wurde aufgrund der unterschiedlichen Behandlung (Oxa/Veh) auf eine strikt getrennte Verarbeitung der Proben geachtet.

Lymphknoten	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	BV 421	BV 510
1. Panel	CD4	CD44	7-AAD	CD62L	CD69	CD8a	CD25	TCR ab
2. Panel	CD4	FoxP3	CD8 α			Zombie NIR	CD25	TCR ab
Ohr	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7	BV 421	BV 510
1. Panel	Gr1	CD11c	7-AAD		CD45		F4/80	CD11b
2. Panel	CD4	CD44	7-AAD	CD62L	CD45	CD8a	CD25	TCR ab

2.3.3.2 Verarbeitung der Ohren

1. Auftrennen der Ohren in Vorder- sowie Rückseite.
2. Überführen in ein mit 0,5 ml Liberase-Lösung befülltes Kulturgefäß.
3. Zerkleinerung mit anatomischer Schere.
4. Inkubation für 90 Minuten bei 37°C im Brutschrank.
5. Zugabe von 50 μ l FCS pro Kulturgefäß.
6. Suspendieren, in ein FACS-Röhrchen filtrieren und mit jeweils 500 μ l RPMI diesen Schritt wiederholen.
7. Röhrchen auf Eis stellen.
8. Überstand bei 1300 rpm für sieben Minuten zentrifugieren, danach absaugen.
9. Sedimentierte Zellen in jeweils 1 ml PBS resuspendieren.
10. Zellzahl ermitteln mittels Trypanblau (1:2 Verdünnung).
11. 1. Panel Ohren: 300.000 Zellen/FACS-Röhrchen, für die FMO-Färbung 100.000 Zellen/FACS-Röhrchen;
2. Panel Ohren: 1×10^6 Zellen/FACS-Röhrchen, für die FMO-Kontrollen ebenfalls 1×10^6 Zellen/FACS-Röhrchen.
12. Jeweils 10 μ l Fc-Block (1:50 in PBS) für fünf Minuten bei 4°C inkubieren.
13. FMO-Färbung und Oberflächenfärbung nach Pipettierschema durchführen (Tabelle 9 und Tabelle 10).
14. Inkubation für 30 Minuten bei 4°C.
15. Waschen mit jeweils 1,25 ml PBS, zentrifugieren (1300 rpm für sieben Minuten), Überstand absaugen.
16. In PBS resuspendieren (0,6 ml bei 1×10^6 Zellen; 0,3 ml bei 1×10^5 sowie bei 3×10^5 Zellen).
17. Vor der FACS-Messung Inkubation mit 7-AAD (je nach Zellzahl) für zehn Minuten.

18. FACS-Messung.

Tabelle 9 Pipettierschema FACS: 1. Panel Ohren mit FMO-Kontrollen.

1. Panel Ohren	Vol & Dilution	ungefärbt	FMO-FITC	FMO-PE	7-AAD	FMO-APC	FMO-BV 421	FMO-BV 510	Messproben
Gr1 FITC	30 µl 1:200	-	-	+	+	+	+	+	+
CD11c PE	40 µl 1:100	-	+	-	+	+	+	+	+
7-AAD	30 µl 1:20	-	+	+	-	+	+	+	+
CD45 APC	30 µl 1:200	-	+	+	+	-	+	+	+
F4/80 BV 421	40 µl 1:100	-	+	+	+	+	-	+	+
CD11b BV 510	50 µl 1:100	-	+	+	+	+	+	-	+

Tabelle 10 Pipettierschema FACS: 2. Panel Ohren mit FMO-Kontrollen.

2. Panel Ohren	Vol & Dilution	ungefärbt	FMO-FITC	FMO-PE	7-AAD	FMO-PE-Cy7	FMO-APC	FMO-APC-Cy7	FMO-BV 421	FMO-BV 510	Messproben
CD4 FITC	10 µl 1:20	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD44 PE	10 µl 1:2	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
7-AAD	100 µl 1:20	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CD62L PE-Cy7	10 µl 1:40	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
CD45 APC	10 µl 1:20	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CD 8α APC-Cy7	10µl 1:2	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
CD25 BV 421	60 µl 1:100	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
TCR β chain BV 510	10 µl 1:2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

2.3.3.3 Verarbeitung der Lymphknoten

1. Die LK werden getrennt in Eppendorf-Gefäßen mit jeweils 500 µl PBS auf Eis gesammelt.
2. Homogenisieren, filtrieren.
3. Zellzahl ermitteln mittels Trypanblau (1:10 Verdünnung).
4. Verteilung von je 500.000 Zellen/FACS-Röhrchen für das 1. Panel Lymphknoten, je 100.000 Zellen/FACS-Röhrchen für die zugehörige FMO-Färbung.
5. Jeweils 25 µl Fc-Block (1:50 in PBS) für 1×10^5 Zellen und jeweils 50 µl für 500.000 Zellen für fünf Minuten bei 4°C inkubieren.
6. Oberflächenfärbung und FMO-Färbung nach Protokoll durchführen (Tabelle 11),
7. Inkubation für 30 Minuten bei 4°C.
8. Waschen mit jeweils 1,25 ml PBS, zentrifugieren (1300 rpm für sieben Minuten), Überstand absaugen.
9. In 0,25 ml PBS resuspendieren.
10. Vor der FACS-Messung Inkubation mit 10 µl 7-AAD für zehn Minuten,
11. FACS-Messung.

Tabelle 11 Pipettierschema FACS: 1. Panel Lymphknoten mit FMO-Kontrollen.

1. Panel LK	Vol & Dilution	ungefärbt	FMO-FITC	FMO-PE	7-AAD	FMO-PE-Cy7	FMO-APC	FMO-APC-Cy7	FMO-BV 421	FMO-BV 510	Messproben
CD4 FITC	30 µl 1:100	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD44 PE	50 µl 1:20	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
7-AAD	50 µl 1:20	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CD62L PE-Cy7	50 µl 1:400	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
CD69 APC	50 µl 1:50	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
CD 8α APC-Cy7	50 µl 1:20	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
CD25 BV 421	30 µl 1:100	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
TCR β chain BV 510	50 µl 1:20	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Für das 2. Panel Lymphknoten sowie die zugehörige FMO-Färbung erfolgt vor der Färbung die Zombie-NIR-Inkubation (Schritte 1-4 siehe oben)

5. Verteilung je 1×10^6 Zellen/FACS-Röhrchen für das 2. Panel Lymphknoten und je 500.000 Zellen/FACS-Röhrchen für die zugehörige FMO-Färbung.
6. Inkubation der vorgesehenen FACS-Röhrchen (nicht auf Eis) mit 200 μ l Zombie NIR (1:100 in PBS) für 30 Minuten bei RT im Dunkeln.
7. Waschen (aller FACS-Röhrchen) mit 2 ml PBS + 0,1% FCS.
8. Zentrifugieren (1300 rpm für sieben Minuten), Überstand absaugen.
9. Jeweils 50 μ l Fc-Block (1:50 in PBS) pro 500.00 Zellen für fünf Minuten bei 4°C inkubieren.
10. Oberflächenfärbung und FMO-Färbung nach Protokoll durchführen (Tabelle 12).
11. Inkubation für 30 Minuten bei 4°C.
12. Waschen mit jeweils 1,25 ml PBS, zentrifugieren (1300 rpm für sieben Minuten), Überstand absaugen.
13. Unter Schütteln (*Vortex*) Zugabe von 2 ml des verdünnten Fixans (1:20 in PBS) aus dem *Foxp3 Buffer Set*.
14. Inkubation für 30 Minuten bei 4°C.
15. Zentrifugieren (2000 rpm für zehn Minuten), Überstand absaugen.
16. Schütteln (*Vortex*) und Zugabe von 2 ml des verdünnten Permeabilisierungsreagens (1:5 in PBS) aus dem *Foxp3 Buffer Set*.
17. Zentrifugieren (2000 rpm für zehn Minuten), Überstand absaugen.
18. Schritt 17 wiederholen.
19. Inkubation für 30 Minuten bei 37°C im Trockenschrank.
20. Zentrifugieren (2000 rpm für zehn Minuten), Überstand absaugen.
21. Waschen mit jeweils 2 ml PBS, zentrifugieren (2000 rpm für zehn Minuten), Überstand absaugen.
22. Jeweils 50 μ l Fc-Block (1:50 in PBS) pro 500.00 Zellen für fünf Minuten bei 4°C inkubieren.
23. Foxp3- oder FMO-Färbung.
24. Inkubation für 30 Minuten bei RT im Dunkeln.
25. Waschen mit jeweils 1,25 ml PBS, zentrifugieren (2000 rpm für zehn Minuten), Überstand absaugen.
26. Schritt 26 wiederholen.

27. In 0,5 ml PBS resuspendieren.

28. FACS-Messung.

Tabelle 12 Pipettierschema FACS: 2. Panel Lymphknoten mit FMO-Kontrollen.

2. Panel LK	Vol & Dilution	ungefärbt	FMO-FITC	FMO-PE	FMO-PerCP	FMO-APC-Cy7	FMO-BV 421	FMO-BV 510	Messproben
CD4 FITC	10 µl 1:20	-	-	+	+	+	+	+	+
Foxp3 PE	5 µl pur	-	+	-	+	+	+	+	+
CD8α PerCP	40 µl 1:10	-	+	+	-	+	+	+	+
Zombie NIR APC-Cy7	200 µl 1:100	-	+	+	+	-	+	+	+
CD25 BV 421	60 µl 1:100	-	+	+	+	+	-	+	+
TCR β chain BV 510	10 µl 1:2	-	+	+	+	+	+	-	+

3 Ergebnisse

3.1 Allergisches Kontaktekzem in FlgHrnr-defizienten Mäusen

Um ein allergisches Kontaktekzem (ACD-Modell) auszulösen, wurde Oxa als starkes Allergen initial auf den zuvor rasierten Rücken (Sensibilisierung) und folgend auf das jeweils rechte Ohr (*Challenge*) der Mäuse aufgetragen. Die Ohrdicke wurde als Surrogat-Parameter für die Hautentzündung gemessen. Dabei ließ sich die Dynamik der Ohrdicken-Entwicklung über die Zeit hinweg beobachten. Erkenntnisse zur Verteilung des zellulären Infiltrates wurden mittels Histologie und Immunhistochemie gewonnen. Die Durchflusszytometrie (FACS) wurde als ergänzende Methode angewandt, um eine Aussage bezüglich der Quantität und der Subpopulationen dieser Zellen treffen zu können.

3.1.1 Ohrdickenmessung als ein Maß für die Hautentzündung

3.1.1.1 Standard-Experiment

Sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den FlgHrnr-defizienten Tieren konnte bereits 12 Stunden nach der *Challenge* eine deutliche Ohrschwellung gemessen werden (Abbildung 7). Der Anstieg verlief bei den FlgHrnr-defizienten Mäusen schneller, sodass nach 24 Stunden ein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet werden konnte (* $p < 0,05$). In beiden Mauslinien war die Schwellung nach 36 Stunden maximal. Zu diesem Zeitpunkt bestand kein Unterscheid mehr. Daraufhin nahm die Ohrdicke wieder ab. Im Gesamtbild zeigten beide Mauslinien eine ähnliche Dynamik.

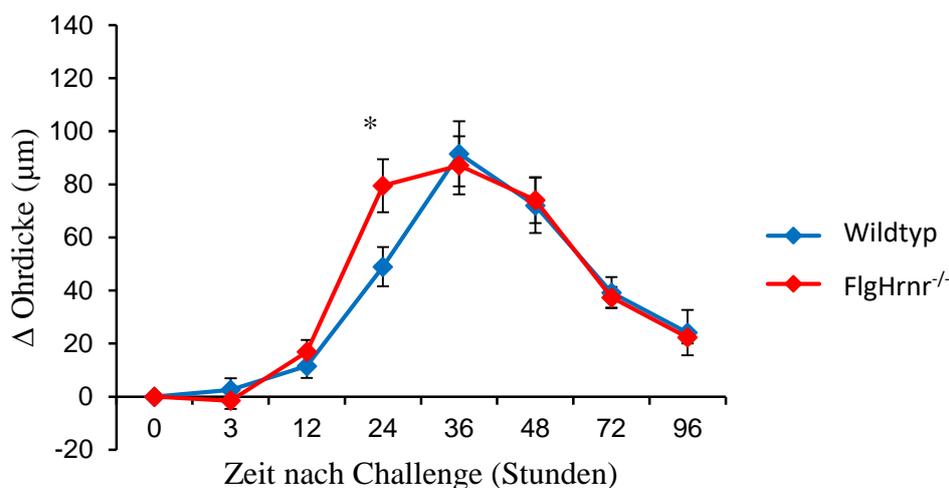


Abbildung 7 Allergisches Kontaktekzem - Standard-Experiment: Ohrschwellung nach Sensibilisierung mit 3% und *Challenge* mit 1% Oxazolol (n=13 Mäuse pro Genotyp; Daten zusammengefasst aus zwei unabhängigen Experimenten; * $p < 0,05$).

Zum Ausschluss einer unspezifischen (irritativen) Wirkung des Allergens wurde ohne vorherige Sensibilisierung lediglich die *Challenge* mit 1% Oxa durchgeführt. Dabei wurde keine Zunahme der Ohrdicken gemessen (Abbildung 8); es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Mauslinien. Das Allergen wirkte also nicht irritativ.

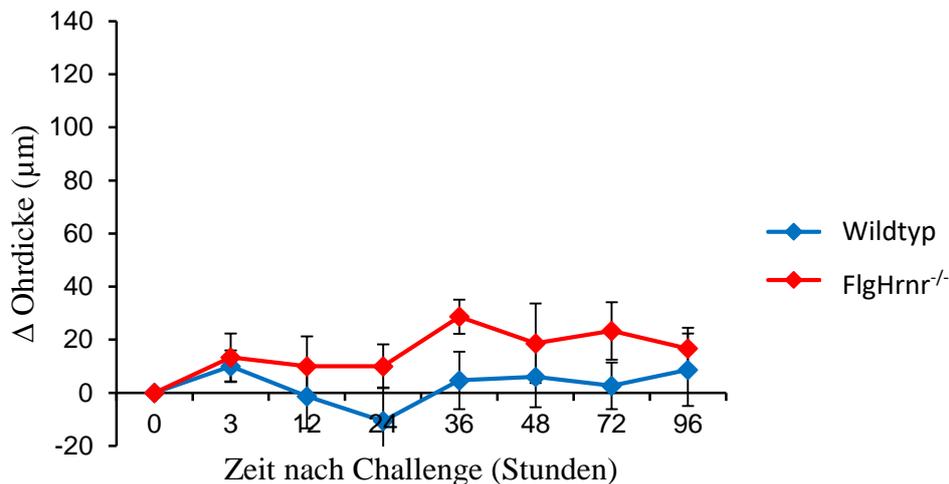


Abbildung 8 Allergisches Kontaktekzem – Kontroll-Experiment: *Challenge* ohne vorherige Sensibilisierung (n=5 Mäuse pro Genotyp).

3.1.1.2 Erniedrigter Sensibilisierungs-Schwellenwert bei allergischer Kontaktdermatitis in FlgHrrn-defizienten Mäusen

Die folgenden Experimente überprüften, ob der Schwellenwert der allergischen Sensibilisierung durch die FlgHrrn-Defizienz beeinflusst wird.

Zunächst wurde in Konzentrationsreihen die minimale Sensibilisierungs-Konzentration für Oxa bestimmt, die eine geringe, gerade noch messbare Ohrschwellung in den wt-Mäusen auslöste (Abbildung 9). Hierfür wurden wt-Tiere mit Oxa in verschiedenen Konzentrationen sensibilisiert. Die *Challenge* erfolgte immer mit 1% Oxa. Die Verwendung von 1% Oxa führte zu einer vergleichbaren Reaktion wie mit der ursprünglichen Sensibilisierung-Konzentration von 3% Oxa. Eine deutliche Schwellung war jeweils bereits nach 12 Stunden detektierbar. Die Schwellung stieg weiter an bis zu einem Maximum bei 48 Stunden. Daraufhin nahm die Schwellung wieder ab. Eine geringere, aber eine immer noch deutliche Ohrschwellung konnte bei Verwendung von 0,3% Oxa gemessen werden. Hier zeigte die Schwellung bis zum Zeitpunkt 36 Stunden eine vergleichbare Dynamik, zum Zeitpunkt 48 Stunden nahm die Schwellung jedoch bereits wieder ab. Die Verwendung von 0,03% und 0,1% führten im Vergleich zu den höheren Konzentrationen zu schwächeren, aber noch messbaren

Schwellungen der behandelten Ohren. Erst nach 24 Stunden war eine erste deutliche Zunahme der Ohrschwellung mit flachem Anstieg zu verzeichnen. Für die vergleichenden Experimente mit den beiden Mauslinien wurde auf Basis dieser Befunde eine Sensibilisierungskonzentration von 0,03% Oxa gewählt.

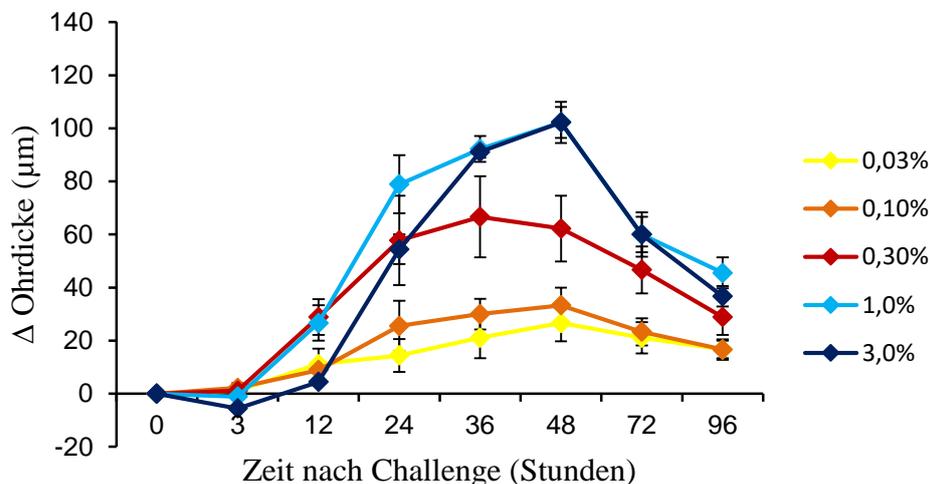


Abbildung 9 Allergisches Kontaktekzem – Dosisfindung der Schwellenwert-Konzentration während der Sensibilisierung. Ohrschwellung nach Sensibilisierung mit den angegebenen Konzentrationen an Oxazolone und *Challenge* mit 1% Oxa (n=3 Mäuse).

Im Vergleich zu den wt-Mäusen zeigten die Ohren der FlgHrnr-defizienten Mäuse bei Verwendung der Schwellenwert-Konzentration (0,03% Oxa) während der Sensibilisierung eine deutliche inflammatorische Antwort (Abbildung 10). Zu den Messzeitpunkten 24, 36, 48 und 72 Stunden lagen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien vor (* $p < 0,05$ *** $p < 0,001$). Nach 12 Stunden wiesen die Ohren der Mäuse beider Linien eine geringe, aber vergleichbare Schwellung auf. In den folgenden 12 Stunden nahm die Schwellung der FlgHrnr-defizienten Mausohren jedoch deutlich stärker zu als bei den wt-Mäusen. Der signifikante Unterschied der Schwellungen war noch nach 72 Stunden messbar. Danach nahmen die Ohrdicken in beiden Mauslinien wieder ab und näherten sich nach 96 Stunden aneinander an.

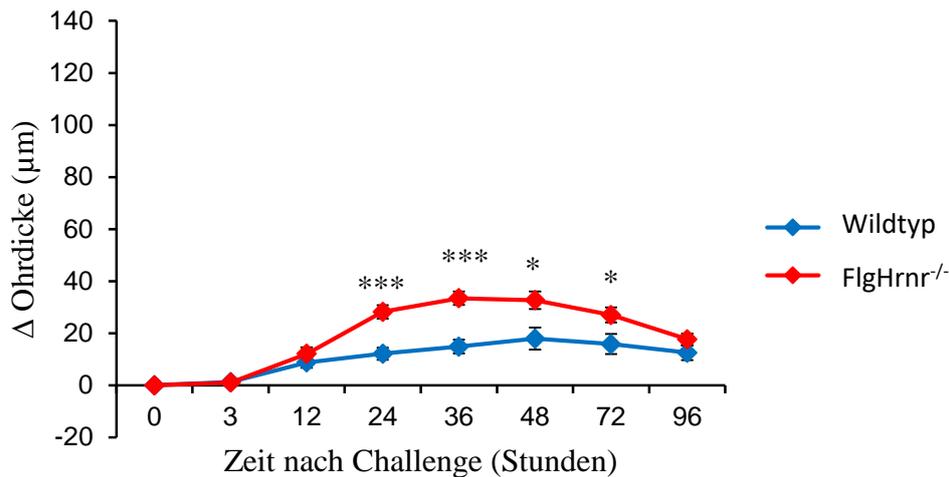


Abbildung 10 Schwellenwert-Konzentration während der Sensibilisierung: Ohrdickenmessung nach Sensibilisierung mit 0,03% Oxazolone (bis t=36 Std. B6J n=11 Mäuse, FlgHrnr^{-/-} n=13, ab t=48 Std. B6J n=8, FlgHrnr^{-/-} n=10; Daten zusammengefasst aus zwei unabhängigen Experimenten; *p<0,05 ***p<0,001).

3.1.1.3 Erniedrigter *Challenge*-Schwellenwert bei allergischer Kontaktdermatitis in FlgHrnr-defizienten Mäusen

Die folgenden Experimente adressierten die Frage, ob in sensibilisierten Mäusen eine geringere Konzentration des Allergens bei der *Challenge* unterschiedlich starke Entzündungsreaktionen in Wildtyp- und FlgHrnr-defizienten Mäusen hervorruft.

Um zu bestimmen, welche *Challenge*-Konzentration des Allergens mindestens nötig ist, um eine messbare Reaktion in wt-Mäusen auszulösen, wurden zunächst verschiedene Oxa-Konzentrationen getestet (Abbildung 11). Die Sensibilisierung wurde unverändert mit 3% Oxa durchgeführt. Oxa-Konzentrationen von 0,01%, 0,02%, 0,04% und 0,1% bewirkten keine Ohrschwellung. Bei einer Konzentration von 0,6% hingegen war kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Konzentration von 1% auszumachen. Die Oxa-Konzentration von 0,3% jedoch führte einerseits zu einer messbaren Schwellung der Ohren, andererseits fiel die Schwellung deutlich geringer aus als bei 1% oder 0,6%. Daher wurde Oxa in einer Konzentration von 0,3% für die *Challenge* in den beiden Mausstämmen verwendet.

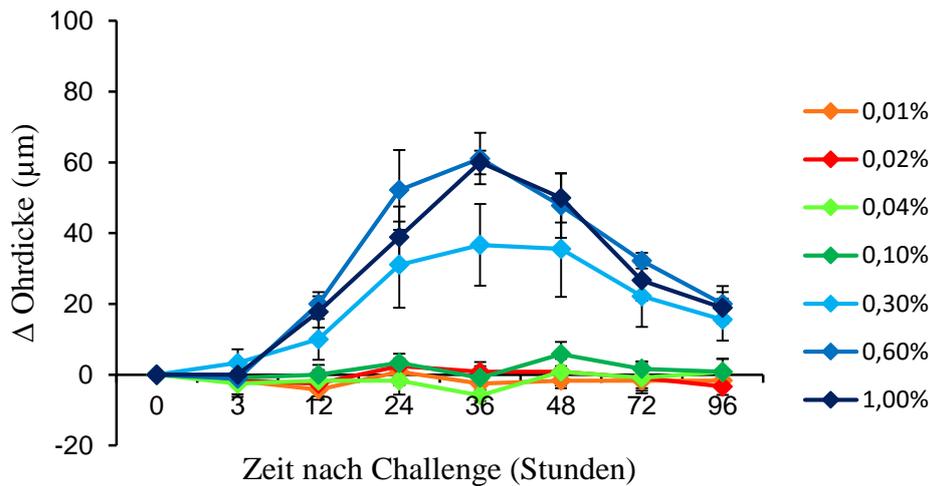


Abbildung 11 Allergisches Kontaktekzem - Dosisfindung der Schwellenwert-Konzentration während der *Challenge*. Ohrschwellung nach Sensibilisierung mit 3% Oxazolone und *Challenge* mit den angegebenen Konzentrationen an Oxazolone (n=3-4 Mäuse).

Es wurden drei unabhängige Einzelexperimente durchgeführt. Die Schwellung der Ohren der FlgHrnr-defizienten Mäuse war über den gesamten Messzeitraum deutlich stärker als bei den wt-Mäusen (Abbildung 12). Bereits nach 12 Stunden konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Mauslinien verzeichnet werden. Während der folgenden 36 Stunden waren die Ohren der FlgHrnr-defizienten Mäuse signifikant dicker. Zwischen den Messzeitpunkten t=48 Stunden und 72 Stunden nahm die Ohrschwellung der FlgHrnr-defizienten Mäuse steil ab und näherte sich den Werten der wt-Mäuse an. Wie bereits während des Dosisfindungs-Experimentes zeigte die Kurve der wt-Mäuse im zeitlichen Verlauf lediglich eine geringere Zunahme der Ohrdicke.

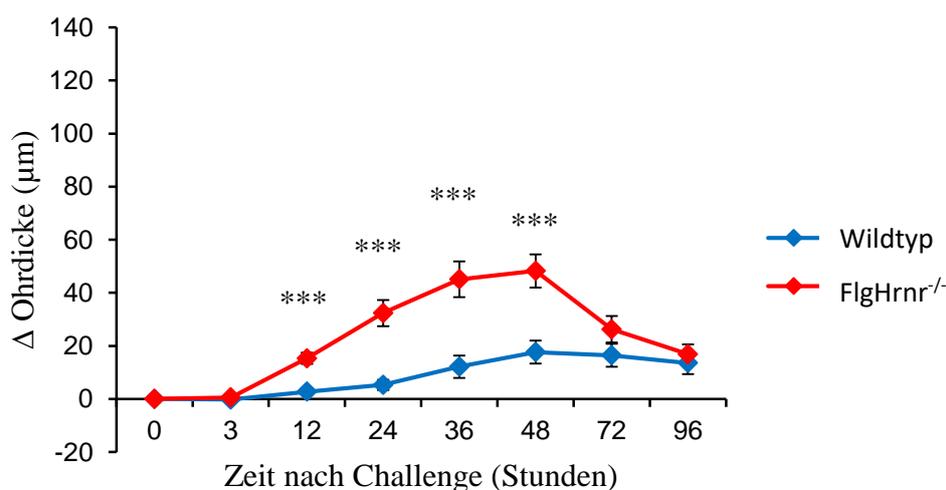


Abbildung 12 Schwellenwert-Konzentration während der *Challenge*: Ohrdickenmessung nach Sensibilisierung mit 3% und *Challenge* mit 0,3% Oxazolone (n=17 Mäuse pro Genotyp, Daten zusammengefasst aus drei unabhängigen Experimenten; ***p<0,001).

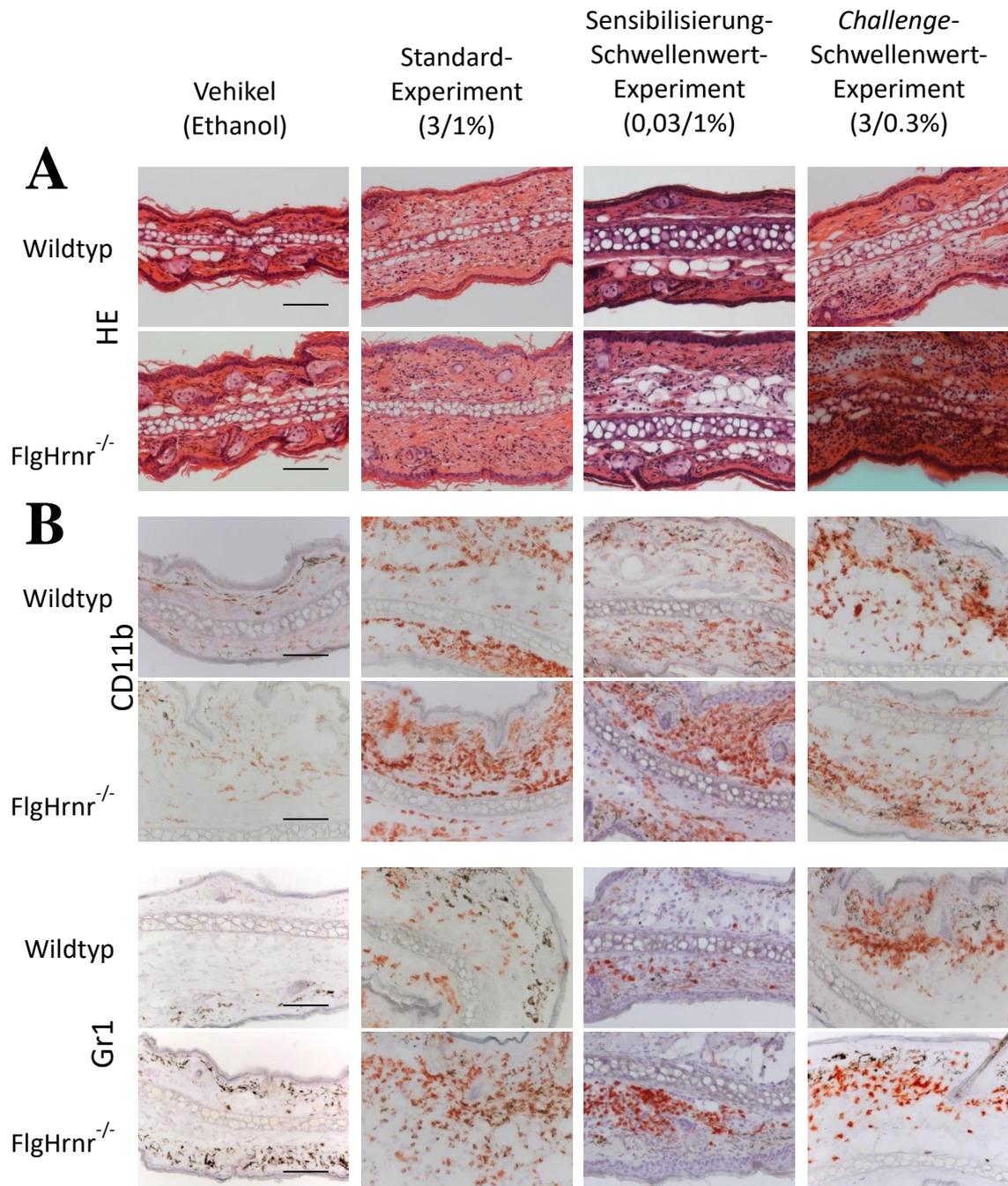
3.1.2 Entzündungsinfiltrat in der Haut allergischer Wildtyp- und FlgHrnr-defizienter Mäuse

HE- und immunhistochemische Färbungen wurden an zum Zeitpunkt der stärksten Ohrschwellung nach 36 Stunden entnommenen Geweben durchgeführt (Abbildung 13). Die HE-Färbung gibt Auskunft über das Ausmaß der Ohrschwellung und über Zusammensetzung und Verteilung des zellulären Infiltrats.

Im Vergleich zu den vehikelbehandelten Ohren wiesen die Ohren beider Mauslinien im Standard- wie auch in den Schwellenwert-Experimenten eine deutliche Schwellung auf. Parallel dazu nahmen Zahl und Dichte der Immunzellen in den mit Oxa behandelten Ohren zu. Die Standard- und die Schwellenwert-Experimente zeigten zudem, dass die Schwellung wie auch das Infiltrat in den FlgHrnr-defizienten Mäusen stärker ausfiel als in den wt-Mäusen. In den vehikelbehandelten Ohren beider Mauslinien waren kaum Zellen nachweisbar. Unabhängig von der Mauslinie wiesen die Ohren in den Schwellenwert-Experimenten eine weniger ausgeprägte Schwellung als in den Standard-Experimenten auf. In allen Experimenten überwog das dermale Infiltrat; Epidermotropismus wurde kaum beobachtet.

Die vehikelbehandelten Ohren beider Mauslinien wiesen ein geringes Infiltrat an CD11b⁺-Zellen auf. CD11b wird von Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen exprimiert. Die Standard- und die Schwellenwert-Experimente zeigten unabhängig von der Mauslinie ein dichteres Infiltrat. Als ein weiterer Marker für (neutrophile und eosinophile) Granulozyten sowie Makrophagen wurde Gr1 (Ly-6G) verwendet. Das *Challenge*-Schwellenwert-Experiment zeigte unabhängig von der Mauslinie ein dichtes dermales Infiltrat an Gr1⁺-Zellen. Die Ohren der FlgHrnr-defizienten Mäuse im Standard-Experiment und Sensibilisierung-Schwellenwert-Experiment wiesen mehr Gr1⁺-Zellen auf. In den vehikelbehandelten Ohren beider Mauslinien waren keine Gr1⁺-Zellen nachweisbar. Die Gesamtheit der T-Zellen ließ sich durch den Oberflächenmarker CD3 darstellen. Ein geringes Infiltrat an CD3⁺-Zellen zeigte sich unabhängig von der Mauslinie in den vehikelbehandelten Ohren und im *Challenge*-Schwellenwert-Experiment. Das Standard-Experiment wie auch das Sensibilisierungs-Schwellenwert-Experiment wies ein stärkeres, quantitativ vergleichbares Infiltrat an CD3⁺-T-Zellen auf. Hier lag ebenfalls kein Unterschied zwischen den Mauslinien vor. Anhand des Oberflächenmarkers CD8 konnten zytotoxische T-Zellen detektiert werden. In den mit vehikelbehandelten Ohren beider Mauslinien war kein CD8⁺-Infiltrat nachweisbar. Unabhängig von der für die *Challenge* oder Sensibilisierung verwendeten Oxa-Dosis zeigten auch die Ohren der wt-Mäuse kein Infiltrat zytotoxischer T-Zellen. Nur die Ohren der FlgHrnr-defizienten Mäuse wiesen ein schwaches Infiltrat in Standard- und Schwellenwert-

Experimenten auf. Als weitere Subpopulation der CD3⁺-Zellen wurde das CD4⁺-Infiltrat untersucht. In den Schwellenwert-Experimenten wie auch im Standard-Experiment ließ sich unabhängig von den Mauslinie ein im Ausmaß vergleichbares CD4⁺-Infiltrat nachweisen. Im Gegensatz dazu lagen in den Ohren der wt- und der FlgHrnr-Mäuse keine CD4⁺-Zellen vor.



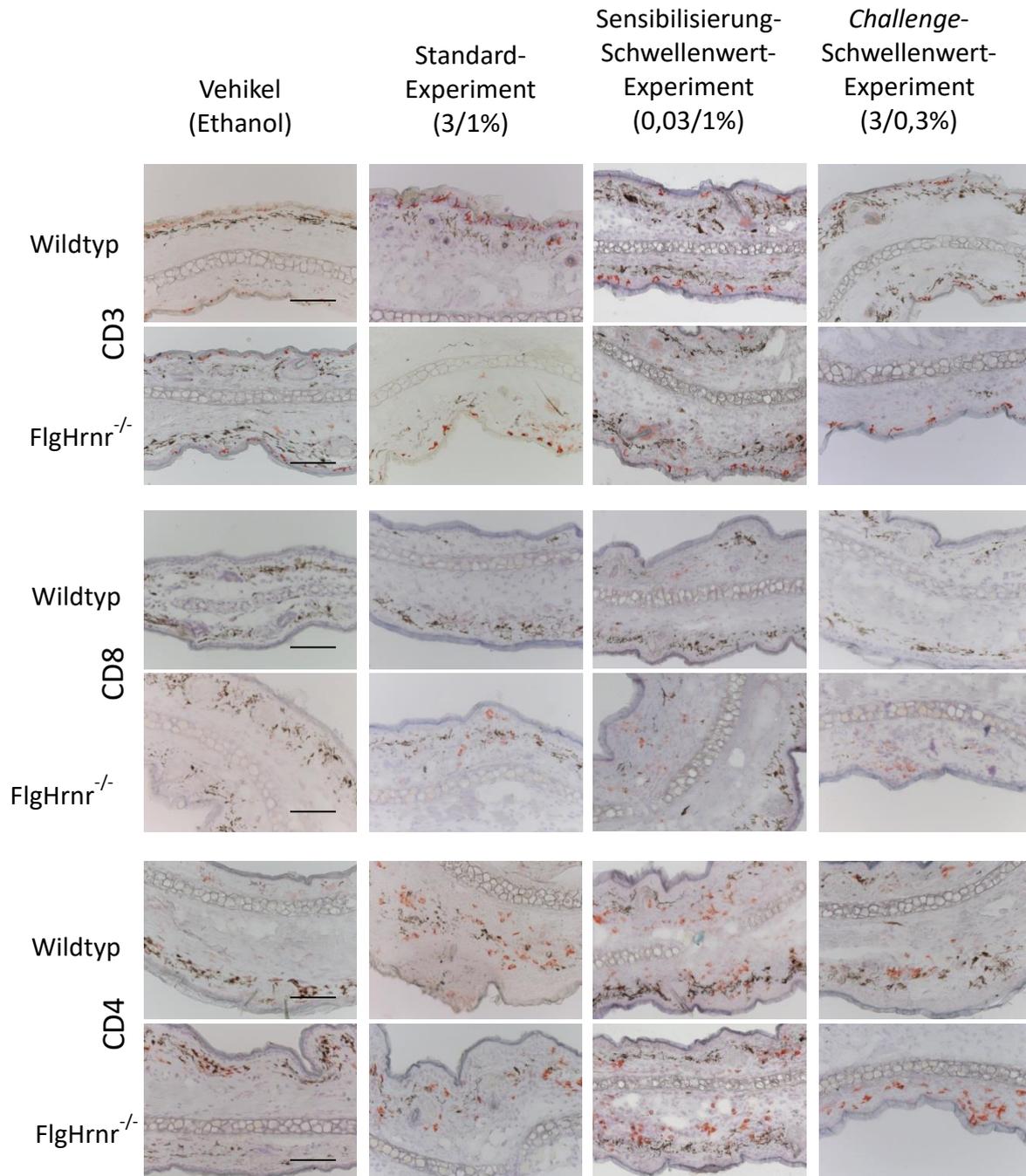


Abbildung 13 HE-Färbungen (A) sowie immunhistochemische Färbungen (B: gegen CD11b, Gr1, CD3, CD8 α , CD4) der zum Zeitpunkt t=36 Stunden gewonnenen Proben des ACD-Modells. Links Färbungen der mit dem Vehikel behandelten Ohren. Mitte links Darstellung des Standard-Experimentes (Sensibilisierung 3%, *Challenge* 1% Oxa). Mitte rechts Ergebnisse des Sensibilisierung-Schwellenwert-Experimentes (Sensibilisierung 0,03%, *Challenge* 1% Oxa). Rechts Ergebnisse des *Challenge*-Schwellenwert-Experimentes (Sensibilisierung 3%, *Challenge* 0,3% Oxa). Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 μ m.

3.1.3 Quantitative Analyse des Entzündungsinfiltrats mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie diente in der vorliegenden Arbeit als eine ergänzende Methode, um das Infiltrat im Standard-Experiment genauer zu untersuchen. Somit konnte eine genaue Aussage über Subpopulationen und die Quantität von Zellen getroffen werden.

3.1.3.1 Zellzahlen in Ohren und Lymphknoten

Die Zellzahl in den Ohren beider Mauslinien nahm 36 Stunden nach Oxa- oder Vehikel-Behandlung nur wenig zu (Abbildung 14). Ganz im Gegensatz dazu zeigte sich 36 Stunden nach Oxa-Behandlung in den LK eine zweieinhalbfach (Wildtyp) bis dreifach (FlgHrnr^{-/-}) gesteigerte Zellzahl. In den LK der vehikelbehandelten Mäuse beider Linien ließ sich keine gesteigerte Zellzahl nachweisen. Signifikante Unterschiede bestanden dabei nicht.

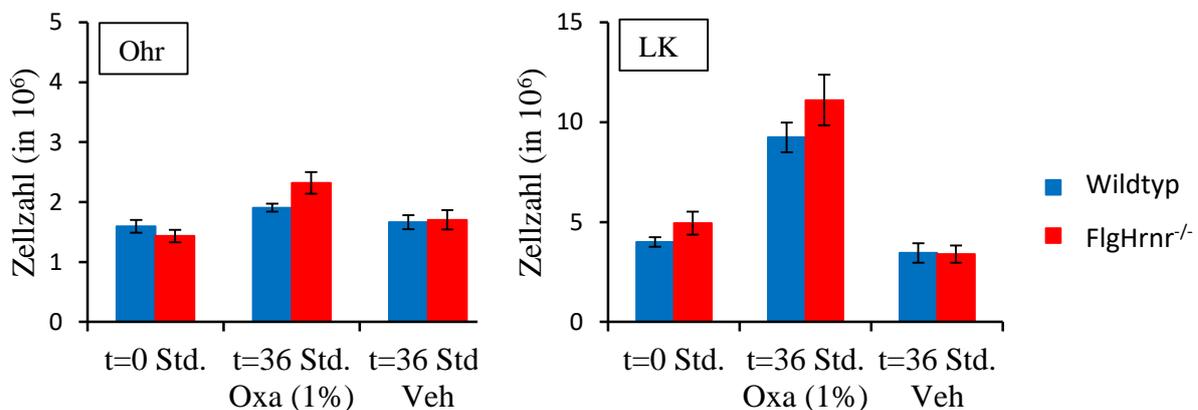


Abbildung 14 Absolute Zellzahlen der FACS-Messungen (in 10⁶). Links: Zellen pro Ohr. Rechts: Zellen pro Lymphknoten (LK). Vergleichende Darstellung der absoluten Zellzahlen zu den Zeitpunkten t=0 Std. (5 Tage nach Sensibilisierung, keine *Challenge*) und t=36 Std. (36 Stunden nach *Challenge* – jeweils ein Ohr behandelt mit 1% Oxa, das jeweils andere lediglich mit dem Vehikel (Ethanol)) (n=6 Mäuse pro Genotyp).

3.1.3.2 Lokales zelluläres Infiltrat in den Ohren

3.1.3.2.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimieren den Oberflächenmarker CD45 (Abbildung 15). Anhand weiterer spezifischer Marker war die Differenzierung der Zellpopulationen möglich.

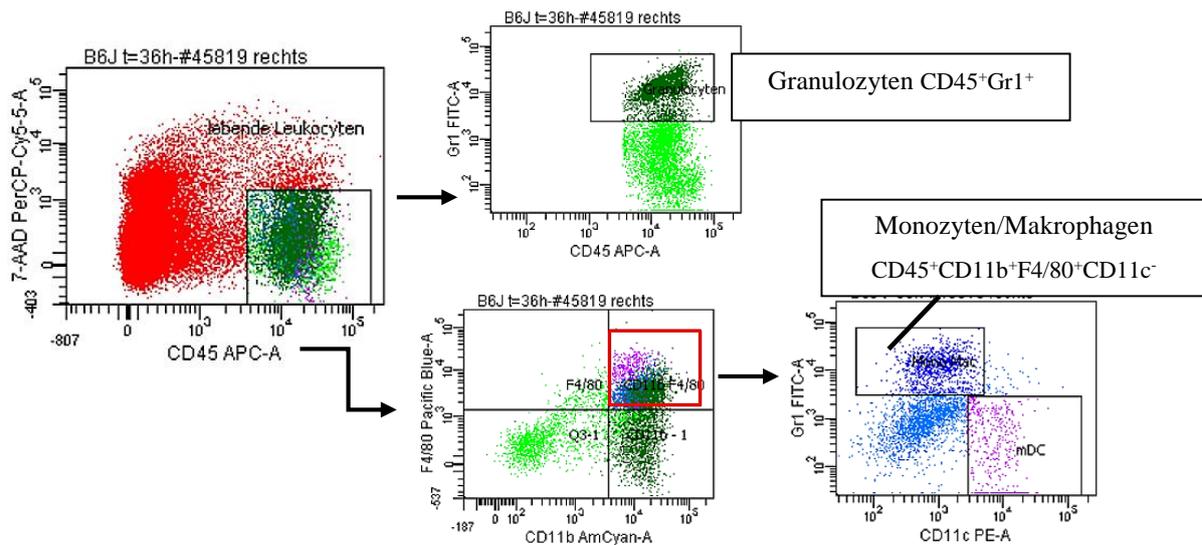


Abbildung 15 Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Messung von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Links: *Dot Plot* zur Darstellung der lebenden Leukozyten (7-AAD (PerCP) gegen CD45 (APC)). Mitte oben: *Dot Plot* zur Darstellung der Granulozyten als Subpopulation der lebenden Leukozyten (Gr1 (FITC) gegen CD45 (APC)). Mitte unten: *Dot Plot* zur Darstellung der CD11b⁺F4/80⁺-Fraktion der lebenden Leukozyten (F4/80 (BV421) gegen CD11b (BV510)). Rechts: *Dot Plot* zur Darstellung der Monozyten und Makrophagen als weitere Subpopulation der lebenden Leukozyten (Gr1 (FITC) gegen CD11c (PE)).

Im Ohr zeigte sich 36 Stunden nach Oxa-Behandlung eine deutliche Zunahme an Granulozyten (Abbildung 16 links). In den Ohren der FlgHrn^{-/-}-defizienten Mäuse waren signifikant mehr Granulozyten als in denen der wt-Mäuse nachweisbar. Nach Vehikel-Behandlung stiegen die Zellzahlen nicht an. Ähnlich waren die Monozyten und Makrophagen verteilt (Abbildung 16 rechts). Auch hier lag eine signifikant höhere Zellzahl an Monozyten und Makrophagen nach der *Challenge* mit Oxa in den Ohren der FlgHrn^{-/-}-defizienten Mäuse vor.

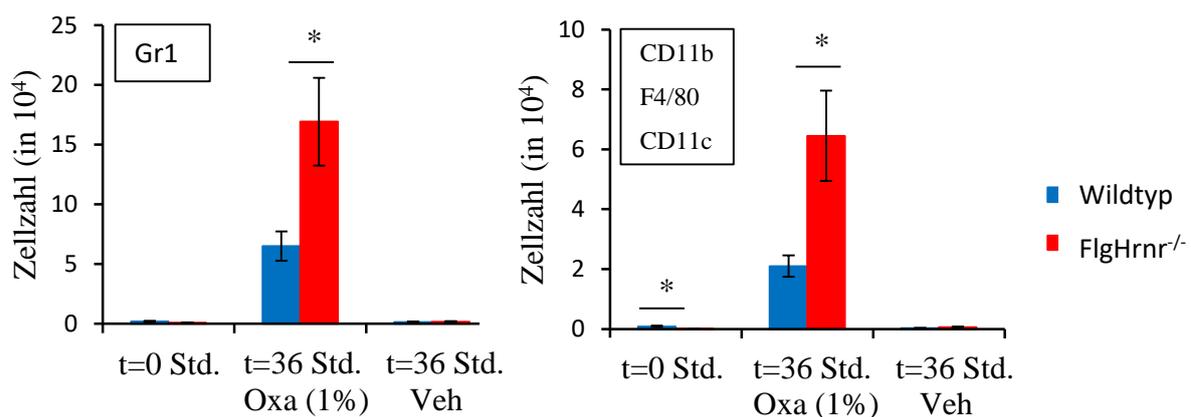


Abbildung 16 Absolute Zellzahlen der im Ohr positiv markierten Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Links: Absolute Zellzahlen der im Ohr positiv markierten Granulozyten (CD45⁺Gr1⁺-Zellen) (in 10⁴) zu den Zeitpunkten t=0 Std. und t=36 Std. (n=6 Mäuse pro Genotyp; *p<0,05). Rechts: Absolute Zellzahlen der im Ohr positiv markierten Monozyten und Makrophagen (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁻-Zellen) (in 10⁴) zu den Zeitpunkten t=0 Std. und t=36 Std. (n=6 Mäuse pro Genotyp; *p<0,05).

3.1.3.2.2 Zellen des adaptiven Immunsystems

Bei der durchflusszytometrischen Messung von CD8⁺- und CD4⁺-Zellen wurden T-Zell-Rezeptor (TCR)-exprimierende T-Zellen betrachtet (Abbildung 17). Subpopulationen der CD4⁺-Zellen wurden ebenfalls untersucht: CD4⁺CD25⁺-regulatorische T-Zellen, Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) sowie Zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}).

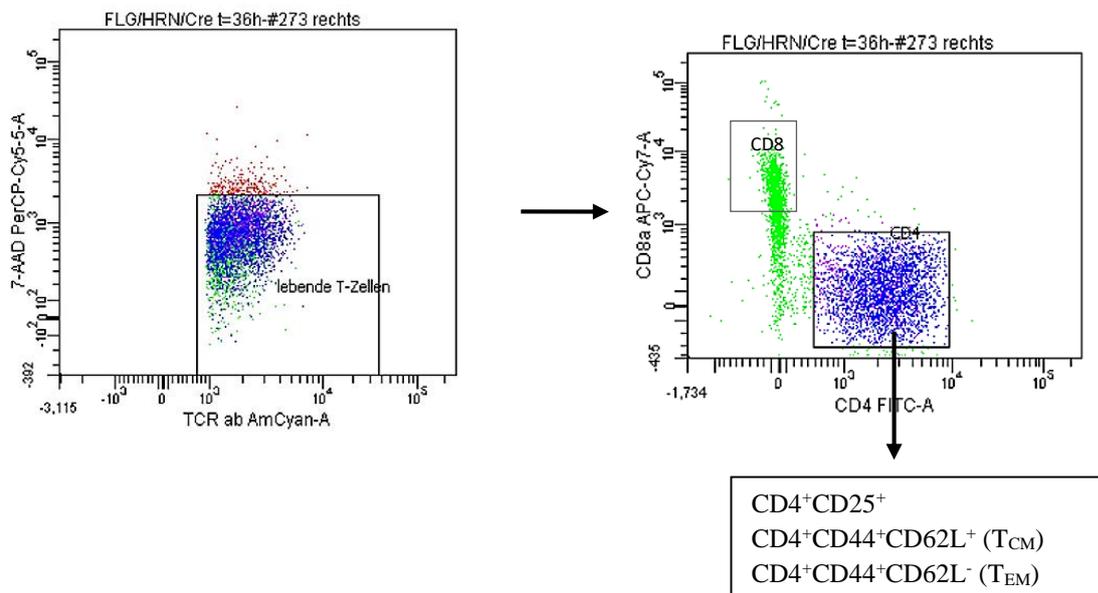


Abbildung 17 Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Messung von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen. Links: *Dot Plot* zur Darstellung der lebenden T-Zellen (7-AAD (PerCP) gegen TCR β chain (BV510)). Rechts: *Dot Plot* zur Darstellung der lebenden T-Zellen aufgetrennt in die Subpopulationen CD4 sowie CD8 (CD8α (APC-Cy7) gegen CD4 (FITC)). Anhand der CD4⁺-markierten Zellen wurden die Subpopulationen CD4⁺ T_{CM}, T_{EM} sowie CD4⁺CD25⁺ untersucht.

Die CD8⁺-T-Lymphozyten gelten zum einen als die Initiatoren der Entzündungsreaktion, zum anderen erkennen und lysieren sie durch Allergene modifizierte Zellen. Letzteres führt auch zu dem Begriff CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten. In den Ohren beider Mauslinien war 36 Stunden nach Oxa-Behandlung eine deutliche Zunahme an CD8⁺-Zellen zu detektieren (Abbildung 18). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich allerdings nicht. In den unbehandelten und mit Vehikel behandelten Ohren der wt-Mäuse lagen signifikant mehr CD8⁺-Zellen als in den Ohren der FlgHrn⁻-defizienten Mäuse vor.

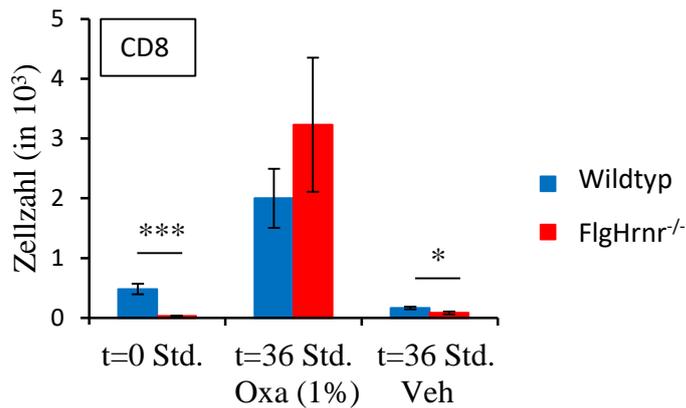


Abbildung 18 Absolute Zellzahlen der im Ohr positiv markierten CD8⁺-Zellen (in 10³) zu den Zeitpunkten t=0 Std. und t=36 Std. (n=6 Mäuse pro Genotyp; *p<0,05 ***p<0,001).

Ähnlich waren die CD4⁺-Zellen in den Ohren verteilt (Abbildung 19). In beiden Mauslinien waren sie 36 Stunden nach der *Challenge* mit Oxa deutlich zahlreicher als zum Zeitpunkt t=0 und als in den mit Vehikel behandelten Ohren. Die T_{EM}-CD4⁺-Zellen liegen vorwiegend im peripheren Gewebe vor; 36 Stunden nach Oxa-Behandlung war ihre Zahl mehr als zehnfach so hoch wie die der T_{CM}-CD4⁺-Zellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mauslinien lag nicht vor.

Die in eher geringer Zellzahl im Ohr vorkommenden T_{CM}-Zellen waren in unbehandelten Ohren der FlgHrnr-defizienten Mäuse signifikant zahlreicher als in wt-Mäusen. Ansonsten war die Verteilung der Zellzahlen mit der der T_{EM}-Zellen vergleichbar.

CD4⁺CD25⁺-regulatorische T-Zellen waren in unbehandelten Ohren der wt-Mäuse und 36 Stunden nach Oxa-Behandlung signifikant häufiger als in den Ohren der FlgHrnr-defizienten Mäuse. Die höchsten absoluten Zellzahlen wurden in beiden Linien nach Oxa-Behandlung verzeichnet.

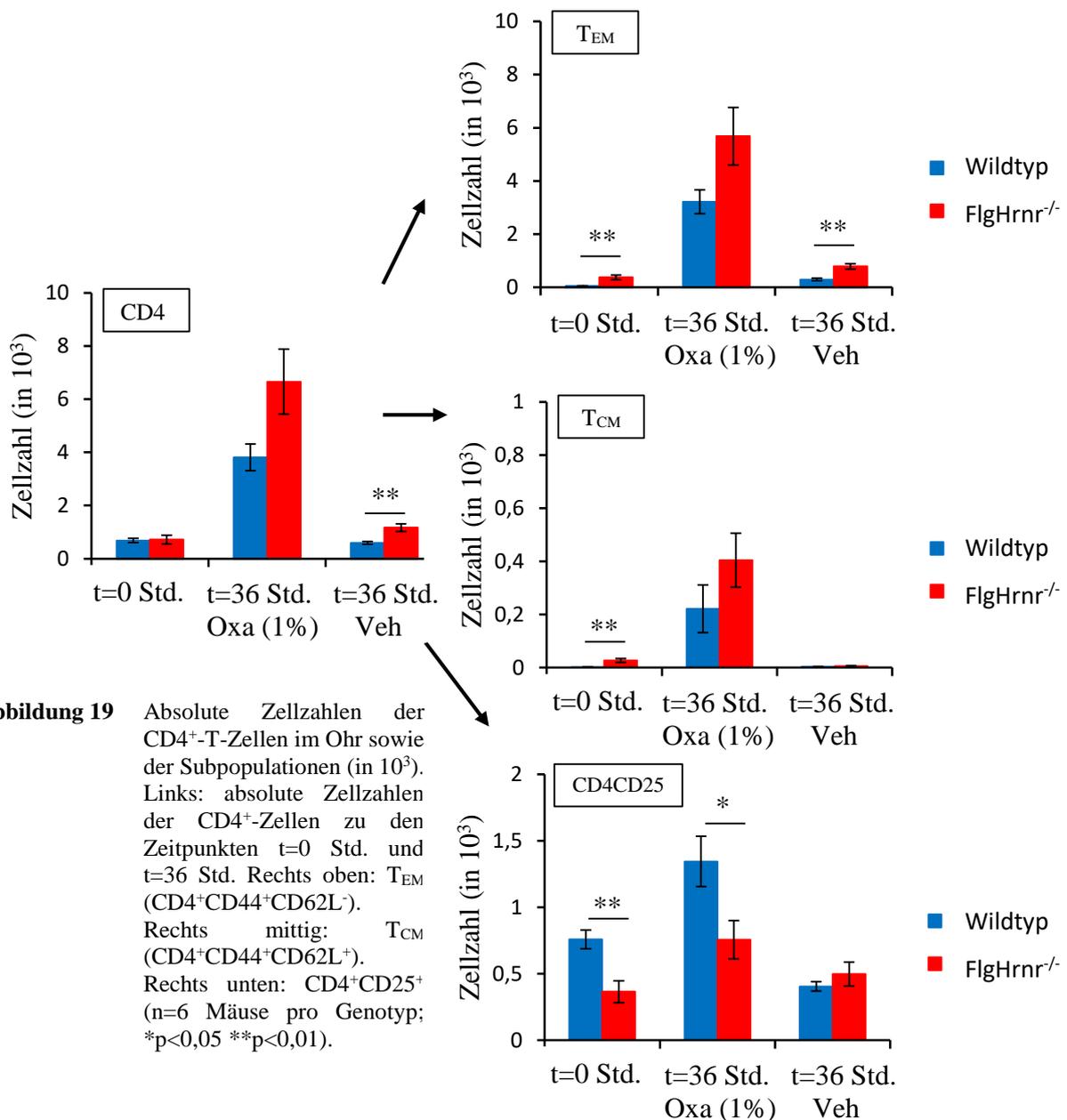


Abbildung 19 Absolute Zellzahlen der CD4⁺-T-Zellen im Ohr sowie der Subpopulationen (in 10^3). Links: absolute Zellzahlen der CD4⁺-Zellen zu den Zeitpunkten t=0 Std. und t=36 Std. Rechts oben: T_{EM} (CD4⁺CD44⁺CD62L⁻). Rechts mittig: T_{CM} (CD4⁺CD44⁺CD62L⁺). Rechts unten: CD4⁺CD25⁺ (n=6 Mäuse pro Genotyp; *p<0,05 **p<0,01).

3.1.3.3 T-Zellen in den Lymphknoten

Im Gegensatz zur Verteilung von CD8⁺-Zellen in den Ohren zeigte sich 36 Stunden nach Oxa-Behandlung in den Lymphknoten der FlgHrnr-defizienten und wt-Mäuse nur eine geringe Zunahme der Zellzahl (Abbildung 20). Signifikante Unterschiede waren zu keinem Zeitpunkt zu beobachten.

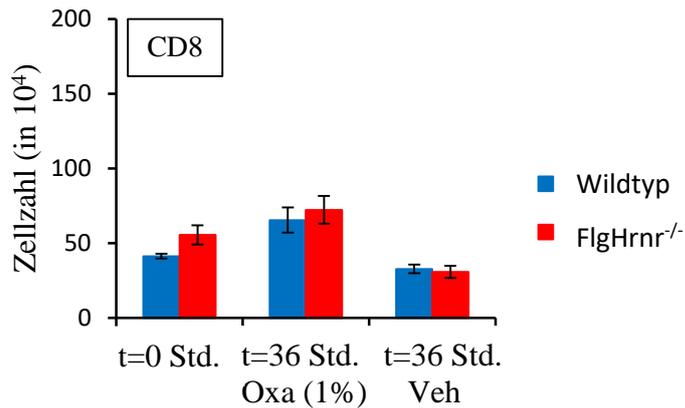


Abbildung 20 Absolute Zellzahlen der im LK positiv markierten CD8⁺-Zellen (in 10⁴) zu den Zeitpunkten t=0 Std. und t=36 Std. (n=6 Mäuse pro Genotyp; *p<0,05).

In den LK der FlgHrnr-defizienten Mäuse fiel die CD4⁺-Zellzahl 36 Stunden nach der *Challenge* mit Oxa höher aus als nach Vehikel-Behandlung und zum Zeitpunkt t=0 (Abbildung 21). In den LK der wt-Mäuse unterschieden sich die Zellzahlen zu allen Zeitpunkten kaum. 36 Stunden nach Oxa-Behandlung wiesen die LK der FlgHrnr-defizienten Mäuse signifikant mehr CD4⁺-Zellen auf.

Ähnlich zeigte sich die Verteilung der T_{EM}- und T_{CM}-Zellen. Etwa 80% der CD4⁺-Zellen in den LK waren T_{CM}-Zellen. Sie lagen 36 Stunden nach Oxa-Behandlung in den LK der FlgHrnr-defizienten Mäuse signifikant häufiger als in den LK der wt-Mäuse vor.

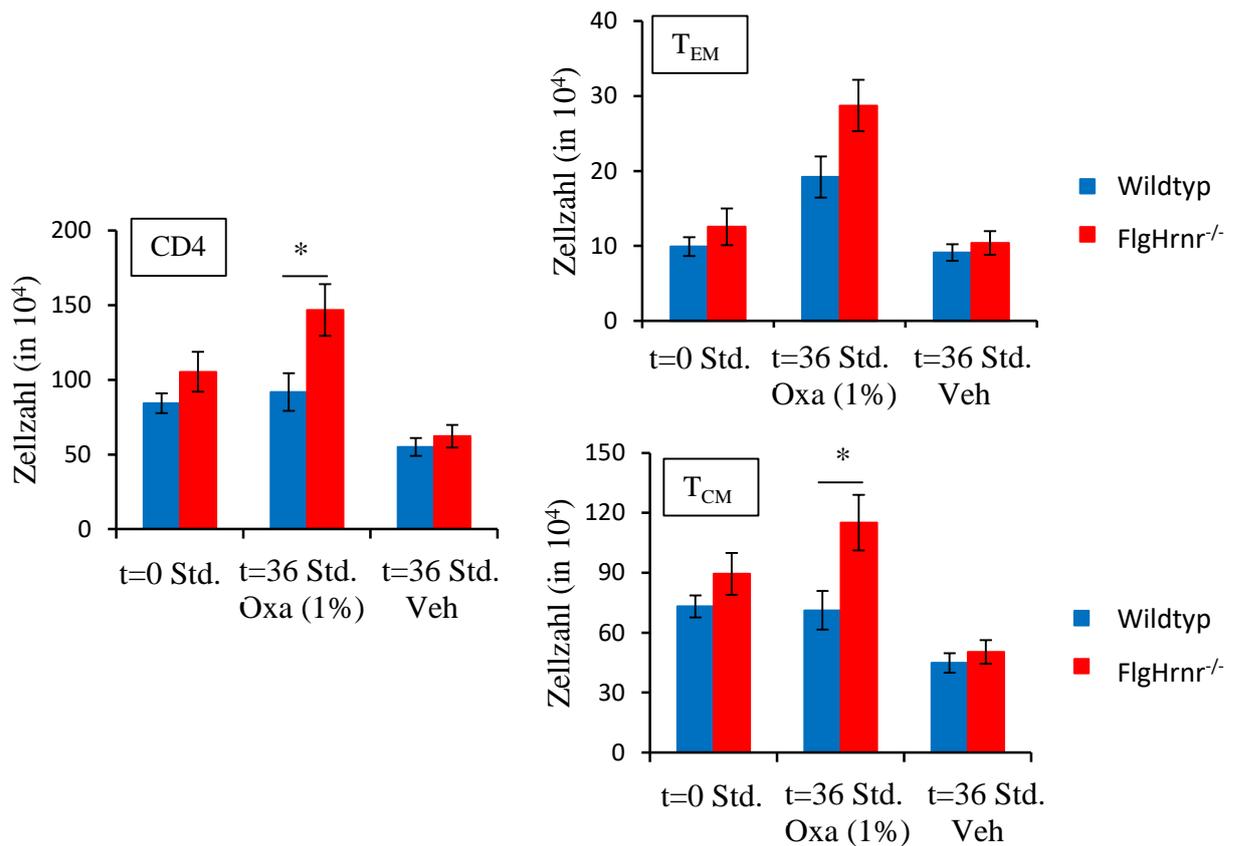


Abbildung 21 CD4⁺-Zellen im LK, CD4⁺-T_{EM} sowie -T_{CM} Links: CD4⁺-Zellen (in 10⁴) zu den Zeitpunkten t=0 Std. und t=36 Std. Rechts oben: T_{EM} (CD4⁺CD44⁺CD62L⁻). Rechts unten: T_{CM} (CD4⁺CD44⁺CD62L⁺) (n=6 Mäuse pro Genotyp; *p<0,05).

3.1.3.3.1 Foxp3 regulatorische Zellen in Haut-drainierenden Lymphknoten

Die höchsten absoluten Zellzahlen an CD4⁺CD25⁺- und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-Zellen lagen in beiden Mauslinien 36 Stunden nach *Challenge* mit Oxa vor (Abbildung 22). Das Genprodukt des Foxp3-Gens ist Scurfin, das als intranukleärer Transkriptionsfaktor fungiert. Der Transkriptionsfaktor bewirkt eine negative Regulierung der T-Zellen und verhindert eine überschießende Immunantwort. Tiere, in denen Scurfin überexprimiert wird, weisen einerseits reduzierte Zahlen an T-Lymphozyten auf, andererseits zeigen die T-Zellen ein abgeschwächtes Proliferationsvermögen und eine reduzierte Zytokinproduktion (Kasprowicz et al. 2003). Zum Zeitpunkt t=0 waren signifikant mehr Foxp3⁺-Zellen in den Lymphknoten der wt-Mäuse nachweisbar. 36 Stunden nach Oxa-Behandlung wiesen die Lymphknoten der FlgHrnr-defizienten Mäuse eine signifikant höhere CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-Zellzahl auf.

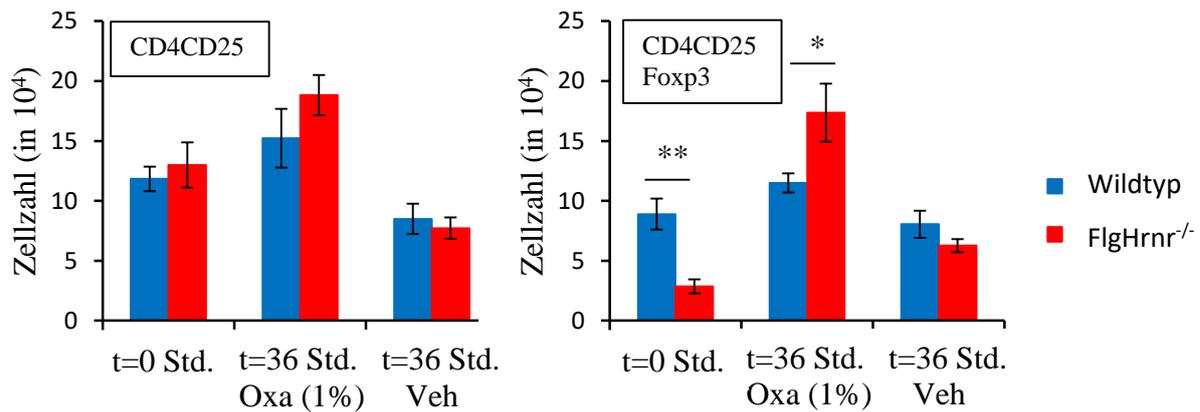


Abbildung 22 Regulatorische CD4⁺CD25⁺- und CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-Zellen in Haut-drainierenden LK nach t=0 Std. und t=36 Std. Links: Zahl der CD4⁺CD25⁺-Zellen. Rechts: absolute Zellzahl der CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-Zellen (n=6 Mäuse pro Genotyp; *p<0,05 **p<0,01).

3.2 Irritatives Kontaktekzem in FlgHrnr-defizienten Mäusen

Zur Auslösung eines irritativen Kontaktekzemes (ICD-Modell) im Mausmodell wurde Croton-Öl einmalig auf das jeweils rechte Ohr der Mäuse appliziert. Analog zum ACD-Modell wurde die Ohrdicke als Surrogat-Parameter für die Hautentzündung gemessen. Die Dynamik der Ohrdicken-Entwicklung ließ sich über die Zeit hinweg beobachten. Erkenntnisse zur Verteilung des zellulären Infiltrates wurden mittels Histologie und Immunhistochemie gewonnen.

3.2.1 Ohrdickenmessung als ein Maß für die Hautentzündung

3.2.1.1 Standard-Experiment

Bereits eine Stunde nach Applikation des Croton-Öls trat bei beiden Mauslinien eine deutliche Schwellung der Ohren auf, die nach 8 Stunden ihr Maximum erreichte (Abbildung 23). Danach nahm die Schwellung ab. Die Mauslinien zeigten einen nahezu identischen Verlauf.

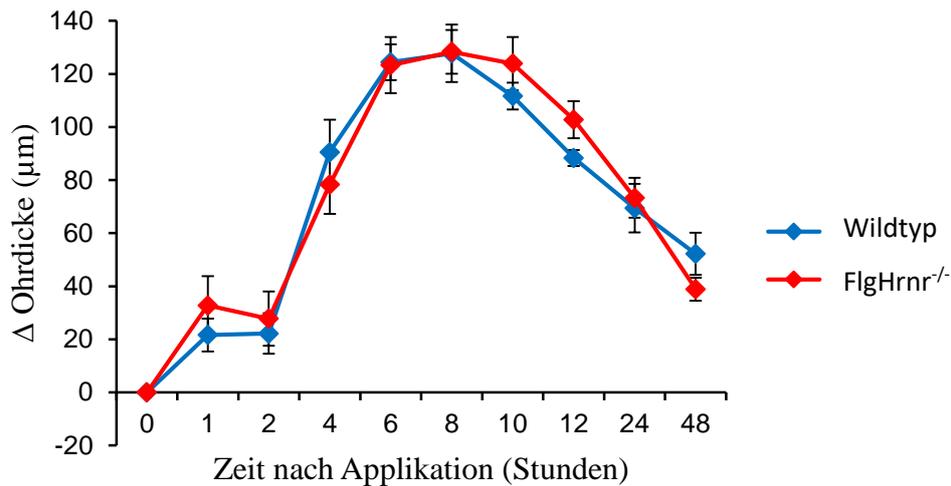


Abbildung 23 Irritatives Kontaktekzem – Standard-Experiment: Ohrschwellung nach Applikation von 2,5% Croton-Öl (n=6 Mäuse pro Genotyp).

3.2.1.2 Schwellenwert-Experiment

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob der Schwellenwert zur Auslösung eines irritativen Kontaktekzems ebenfalls durch die FlgHrnr-Defizienz beeinflusst wird.

Um zu bestimmen, welche Konzentration an Croton-Öl mindestens nötig ist, um eine messbare Entzündung in wt-Mäusen auszulösen, wurden verschiedene Konzentrationen getestet (Abbildung 24). Konzentrationen von 0,01% und 0,03% führten zu einer sehr geringen Ohrschwellung. Bei einer Konzentration von 1% Croton-Öl zeigte sich ein im Vergleich zu der Standard-Konzentration von 2,5% ähnlicher, wenn auch im Ausmaß der Ohrschwellung abgeschwächter Kurvenverlauf. Eine geringe, aber immer noch deutliche Ohrschwellung konnte bei Verwendung von 0,3% und 0,1% Croton-Öl gemessen werden. Dabei führte die Verwendung von 0,1% einerseits zu einer messbaren Schwellung der Ohren, andererseits fiel die Schwellung noch geringer als bei 0,3% aus. Daher wurde für die Schwellenwert-Experimente eine Konzentration von 0,1% Croton-Öl verwendet.

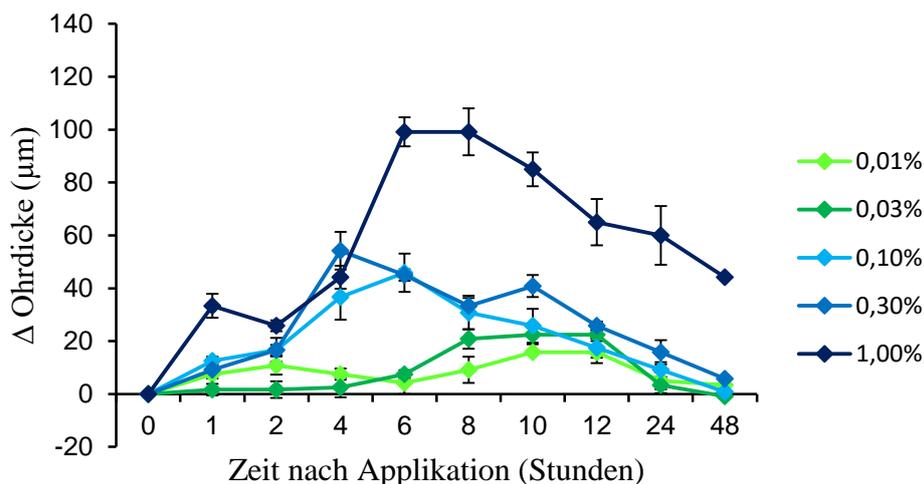


Abbildung 24 Irritatives Kontaktekzem – Dosisfindung der Schwellenwert-Konzentration. Ohrschwellung nach Applikation der angegebenen Konzentrationen an Croton-Öl (n=4 Mäuse).

Es wurden drei unabhängige Einzelerperimente durchgeführt. Die Schwellung der Ohren beider Mauslinien fiel über den gesamten Zeitraum fast identisch aus, ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht (Abbildung 25). Bis zum Zeitpunkt der maximalen Schwellung nach 6 Stunden war ein stetiger Anstieg zu verzeichnen. Im Verlauf nahm die Schwellung langsam wieder ab.

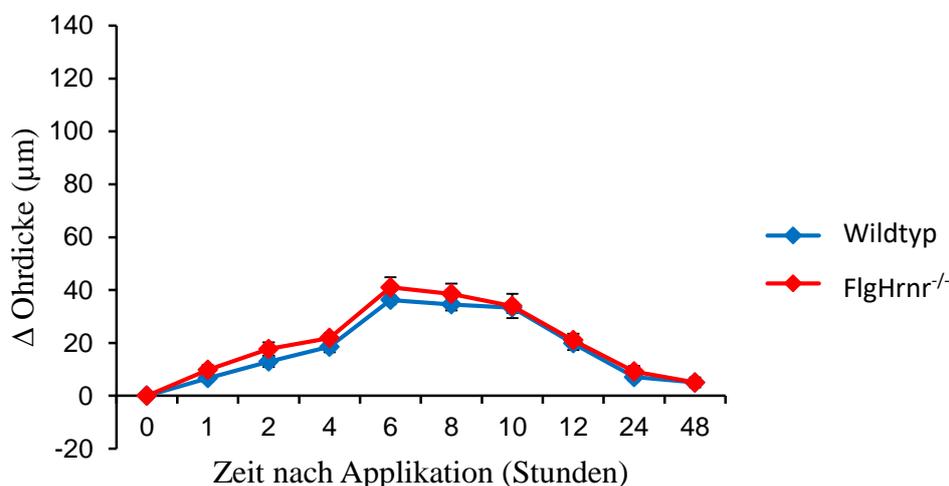


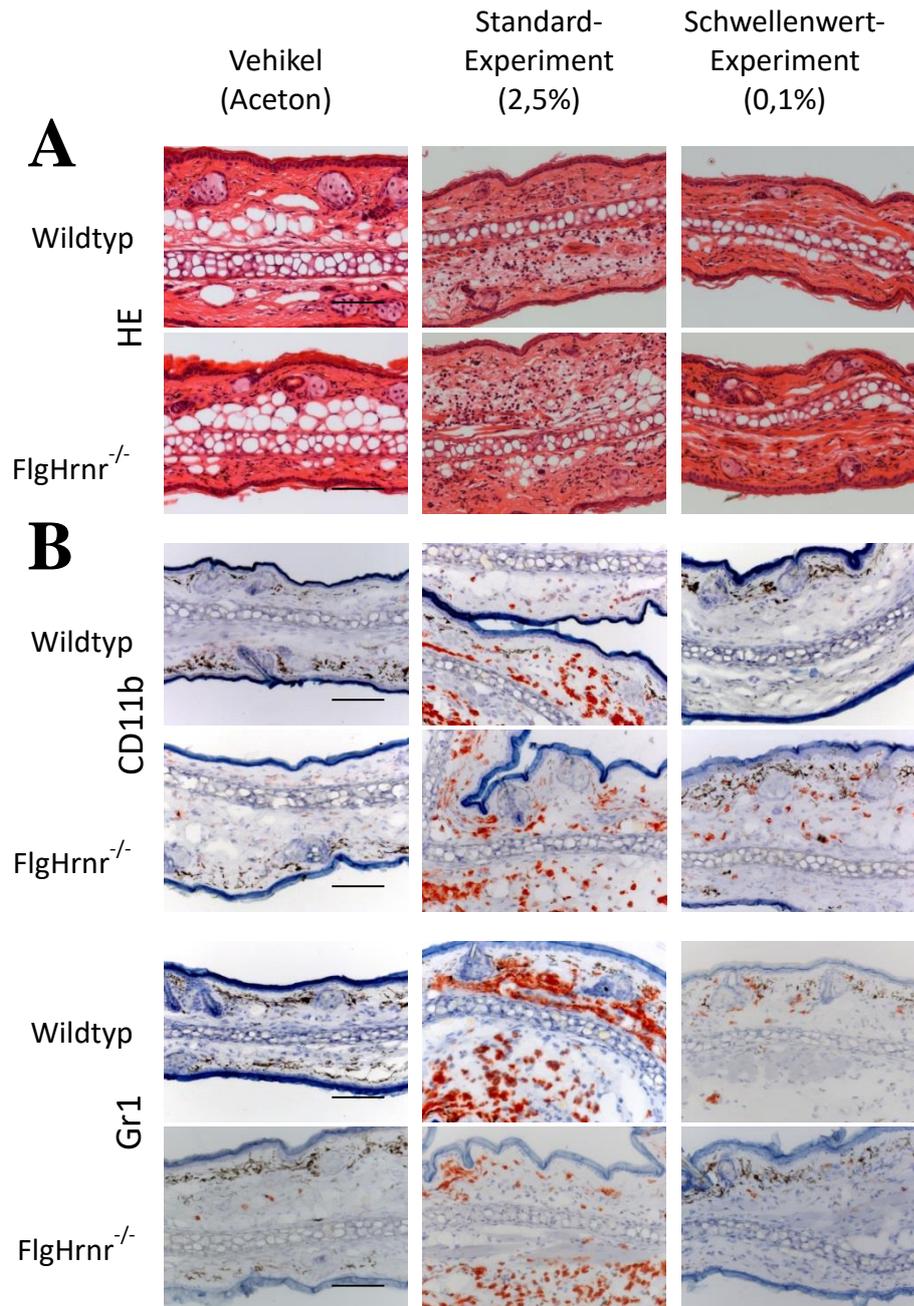
Abbildung 25 Schwellenwert-Konzentration: Applikation von 0,1% Croton-Öl (n=16 Mäuse pro Genotyp, Daten zusammengefasst aus drei unabhängigen Experimenten).

3.2.2 Entzündungsinfiltrat bei irritativer Kontaktdermatitis

HE- und immunhistochemische Färbungen wurden an Geweben durchgeführt, die zum Zeitpunkt der stärksten Ohrschwellung nach sechs Stunden entnommen wurden (Abbildung

26). In den unbehandelten Ohren beider Mauslinien zeigte sich ein geringes Zellinfiltrat in der Dermis. Im Vergleich war im Schwellenwert-Experiment ein stärker ausgeprägtes Infiltrat jedoch keine Zunahme der Schwellung zu verzeichnen. Im Standard-Experiment lagen eine deutliche Ohrschwellung und ein noch dichteres zelluläres Infiltrat in den wt- und den FlgHrnr-defizienten Mäusen vor.

In den mit Vehikel behandelten Ohren beider Mauslinien und den Ohren der wt-Mäuse im Schwellenwert-Experiment waren keine CD11b⁺-Zellen nachweisbar. Ein moderates Infiltrat zeigte sich in den FlgHrnr-defizienten Mäusen im Schwellenwert-Experiment. Ein sehr dichtes und im Ausmaß vergleichbares Infiltrat lag dagegen in den Ohren beider Mauslinien im Standard-Experiment vor. Gr1⁺-exprimierende Granulozyten (neutrophile und eosinophile) sowie Makrophagen ließen sich auch nicht in den unbehandelten Ohren beider Mauslinien nachweisen. Im Schwellenwert-Experiment lag nur ein schwaches Infiltrat in den Ohren der wt-Mäuse vor. Nach Applikation der Standard-Konzentration an Croton-Öl zeigten die Ohren beider Linien ein dichtes dermales Gr1⁺-Infiltrat. Sowohl in den vehikelbehandelten Ohren beider Mauslinien als auch im Schwellenwert- und Standard-Experiment zeigten sich vereinzelte CD3⁺-markierte Zellen in der Dermis. Quantitative Unterschiede waren nicht zu erkennen. Dagegen waren weder in den unbehandelten Ohren beider Linien noch nach Behandlung mit Croton-Öl (unabhängig vom Experiment) CD8⁺-Zellen nachweisbar. Ganz vereinzelt zeigten sich CD4⁺-Zellen nach Applikation des Vehikels oder Croton-Öl (Standard- und Schwellenwert-Konzentration) in der Dermis der wt- und FlgHrnr-defizienten Mäuse. Auch hier zeigten sich zahlenmäßig keine Unterschiede.



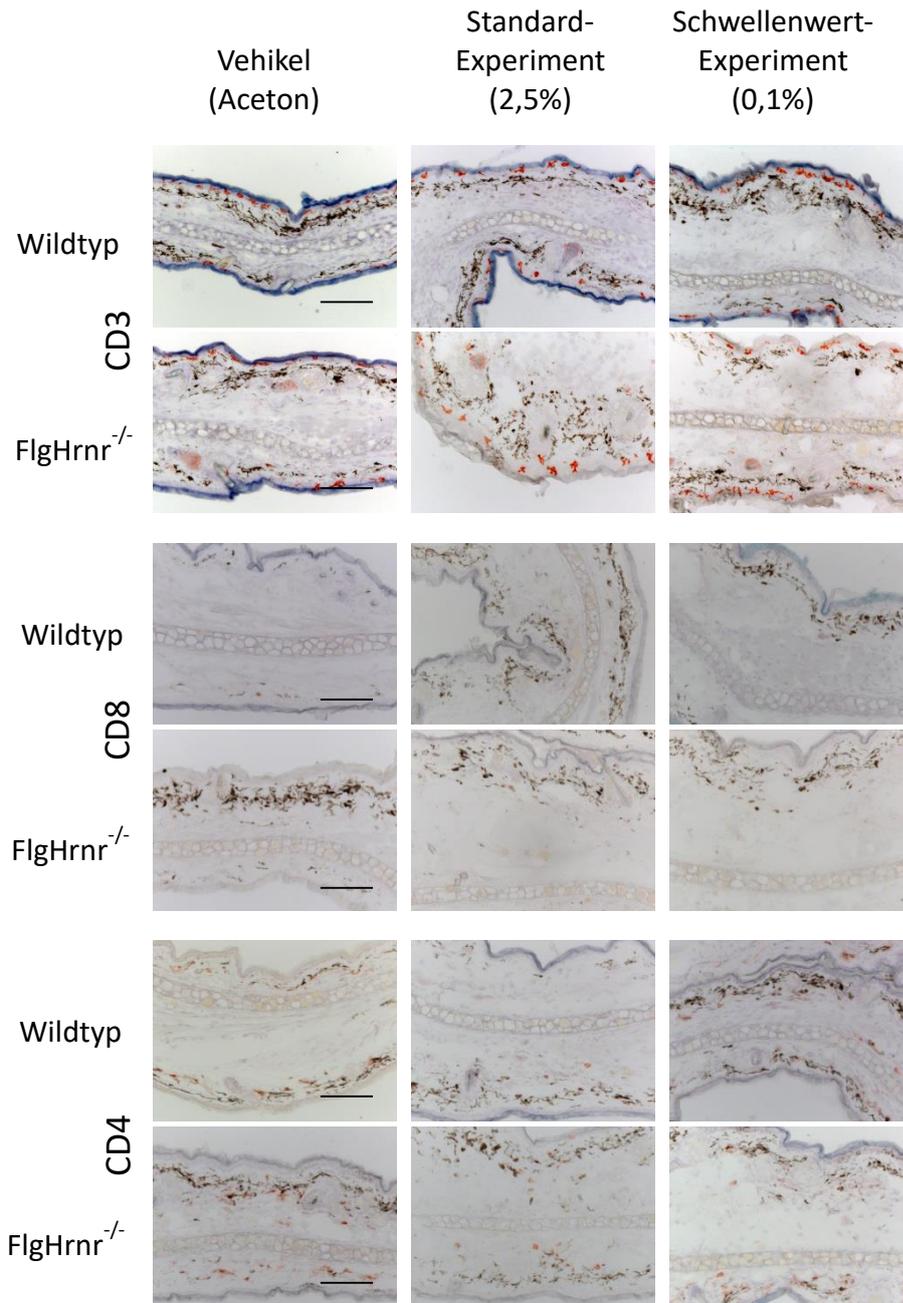


Abbildung 26 HE-Färbungen (A) sowie immunhistochemische Färbungen (B: gegen CD3, CD8 α , CD4, CD11b, Gr1) der nach t=6 Stunden gewonnenen Proben des ICD-Modells. Links Färbungen der mit dem Vehikel behandelten Ohren. Mitte Ergebnisse des Standard-Experimentes (Applikation von 2,5% Croton-Öl). Rechts Darstellung des Schwellenwert-Experimentes (Applikation von 0,1% Croton-Öl). Die Messbalken entsprechen einer Länge von 100 μ m.

4 Diskussion

4.1 Allergisches Kontaktekzem bei einer Hautbarriere-Störung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die doppelte Defizienz von Filaggrin und Hornerin bei Mäusen zu erhöhter Suszeptibilität für eine allergische Kontaktdermatitis führt. Dies zeigte sich daran, dass bei den mutierten Tieren die Schwellenwerte für Sensibilisierung und Auslösung der allergischen Kontaktdermatitis signifikant vermindert waren. In ähnlichen früheren Untersuchungen, in denen wt- und ft-Mäuse mit Oxa (2% zur Sensibilisierung, 0,5% zur *Challenge*) behandelt wurden, trat kein signifikanter Unterschied der Ohrdicken auf (Scharschmidt et al. 2009). Allerdings wurde in Schwellenwert-Experimenten (*Challenge*-Dosis von 0,02% Oxa) bei ft-Mäusen eine signifikant stärkere Ohrschwellung als bei wt-Mäusen beobachtet. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte bei reduzierter Sensibilisierungs-Dosis jedoch kein Unterschied nachgewiesen werden. Trotz der leicht abweichenden Versuchsanordnung (unterschiedliche Sensibilisierung-/*Challenge*-Konzentrationen und Sensibilisierung der Mäuse am zuvor rasierten unteren Rücken) dieser Arbeit sind die Ergebnisse vergleichbar.

Als Erklärung könnte die gestörte Sekretion der *Lamellar Bodies* in ft-Mäusen dienen (Scharschmidt et al. 2009). Ein reduzierter extrazellulärer Lipidgehalt könnte auch in FlgHrnr-defizienten Mäusen eine gesteigerte Allergen-Penetration und konsekutiv gesteigerte Langerhanszell-Aktivierung und stärkere Hautentzündung ermöglichen.

Nach Auslösung einer allergischen Kontaktdermatitis durch Oxazolol wurde sowohl in wt- als auch in FlgHrnr-defizienten Mäusen ein vorwiegend aus Gr1⁺- und CD11b⁺-Zellen bestehendes Infiltrat nachgewiesen. Die Antigene charakterisieren Granulozyten und Makrophagen des angeborenen Immunsystems. In den Ohren der FlgHrnr-defizienten Mäuse waren sie signifikant stärker vermehrt als in wt-Mäusen. Diese als eigentliche Exekutoren fungierenden und damit für das klinische Bild des allergischen Kontaktekzems verantwortlichen Zellen sind von den CD8⁺-T-Zellen als Initiatoren der Entzündungsreaktion abhängig (Riemann et al. 2003). Am Abklingen der Immunreaktion sind CD4⁺-T-Lymphozyten durch Produktion der regulatorisch wirkenden Interleukine IL-4 und IL-10 beteiligt (Xu et al. 1996). In den Ohren beider Mauslinien war tatsächlich eine ausgeprägte Zunahme an CD4⁺-Zellen nach Applikation von Oxa (dosisunabhängig) zu erkennen. Ein signifikanter Unterschied der Gesamtzahl der CD4⁺-Zellen bestand dabei zwischen den beiden Mauslinien nicht. Allerdings wiesen die Ohren der wt-Mäuse 36 Stunden nach Applikation der Oxa-Standarddosis eine signifikant höhere Zahl CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen auf. Diese Zellen führen durch Sekretion von IL-10 zu

einem reduzierten Einstrom von CD8⁺-T-Zellen, folglich zu einer supprimierten Immunantwort (Ring et al. 2006). Diese Ergebnisse weisen auf gestörte Regulationsmechanismen bei FlgHnr-defizienten Mäusen hin und legen die Existenz einer funktionellen Achse von gestörter epidermaler Barriere zu gestörter adaptiver Immunregulation nahe. Wahrscheinlich spielen geringere Zahlen regulatorischer T-Zellen und die dann erwartete reduzierte IL-10 Produktion auch bei den Schwellenwert-Experimenten eine wichtige Rolle. Erwähnenswert ist auch, dass in den Ohren der ausschließlich sensibilisierten und mit dem Vehikel behandelten FlgHnr-defizienten Mäuse durchflusszytometrisch eine signifikant höhere Anzahl an T_{EM} detektiert wurde. Die dadurch implizierte verstärkte „Effektorbereitschaft“ bei Zweitkontakt mit dem Allergen trägt möglicherweise zur stärker ausfallenden Ohrschwellung der FlgHnr-defizienten Mäuse in den Schwellenwert-Experimenten bei. Eine *Challenge*-Konzentration des Allergens, die in wt-Mäusen lediglich zu geringer Hautentzündung führt, würde in den FlgHnr-defizienten Mäusen dann eine stärkere Immunantwort auslösen. In den drainierenden Lymphknoten der FlgHnr-defizienten Mäuse wurden 36 Stunden nach *Challenge* auch signifikant mehr T_{CM} nachgewiesen. Die Immunantwort in FlgHnr-defizienten Mäusen würde durch die Differenzierung der T_{CM} zu Effektor-Zellen weiter verstärkt. Dies unterstützt damit die aufgestellte Hypothese.

Bei einer Prävalenz von 15-20% in der Gesamtbevölkerung (Peiser et al. 2011) ist die Kontaktallergie eine die gesamte Gesellschaft betreffende ernstzunehmende Krankheit. Eine gestörte Hautbarriere gilt dabei als wichtiger pathogenetischer Faktor. In einer großen Kohorte (1502 Probanden) wurde eine Assoziation der beiden häufigen Filaggrin-Mutationen R501X und 2282del14 mit Nickel-Sensibilisierungen und allergischen Kontaktekzemen nach Nickel-Kontakt festgestellt (Novak et al. 2008). Diese Beobachtung passt zur Aussage, dass nur einige der exponierten Individuen im Epikutantest positiv reagieren und wiederum ein Bruchteil dieser Menschen klinische Symptome präsentiert (Kimber et al. 1999). Vor diesem Hintergrund unterstreicht die erniedrigte Allergieschwelle der FlgHnr-defizienten Mäuse die wichtige Funktion der Hautbarriere beim Schutz vor der Entstehung einer Kontaktallergie.

4.2 Irritatives Kontaktekzem bei einer Hautbarriere-Störung

Irritative Kontaktekzeme sind gekennzeichnet durch Allergen-unspezifische Reaktionen, die durch Zellen des angeborenen Immunsystems unterhalten werden. In dieser Arbeit setzte sich das polymorphe Infiltrat sechs Stunden nach Auftragen des Irritans im Standard-Experiment fast ausschließlich aus Zellen des angeborenen Immunsystems zusammen. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit übereinstimmend zeigten frühere Untersuchungen, dass die proinflammatorischen

Eigenschaften des Irritans zu einer unspezifischen, von T-Zellen unabhängigen Entzündungsreaktion führen (Nosbaum et al. 2009). Die Ergebnisse zeigen auch, dass anders als beim ACD ein vorangegangener Kontakt mit dem Irritans zur Auslösung eines ICD nicht notwendig ist. Die inhärenten toxischen Eigenschaften des Irritans sind für die unspezifische Entzündungsreaktion verantwortlich. Das adaptive Immunsystem ist nicht an der Reaktion beteiligt und folglich kommt es nicht zur Differenzierung von T-Zellen in T-Gedächtniszellen. Es ist davon auszugehen, dass ein erneuter Kontakt mit dem Irritans nicht zu einer gesteigerten Hautentzündung führt.

Unsere Ergebnisse in Standard- und im Schwellenwert-Experimenten zeigten, dass die doppelte Defizienz von Filaggrin und Hornerin bei Mäusen nicht zu einer höheren Suszeptibilität für irritative Kontaktekzeme führt. Ähnliche frühere Untersuchungen, in denen wt- und ft-Mäuse mit dem Irritans TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) behandelt wurden, konnten im Standard-Experiment ebenfalls keinen Unterschied hinsichtlich der Ohrschwellungen nachweisen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde jedoch nach Applikation einer Schwellenwert-Konzentration von TPA eine signifikant stärkere Ohrschwellung der ft-Mäuse beobachtet (Scharschmidt et al. 2009). Es ist zu vermuten, dass in der vorliegenden Arbeit das Irritans in der gewählten Schwellenwert-Konzentration zu einer vom Zustand der Epidermis unabhängigen Entzündungsreaktion führte. Diese Annahme schließt das Vorliegen einer gestörten Hautbarriere nicht aus. In unserem Experiment wurde nach einer Schwellenwert-Konzentration gesucht, die in den Ohren der wt-Mäuse eine noch messbare Entzündung hervorruft. In der zum Vergleich herangezogenen Arbeit wurde jedoch eine Konzentration gewählt, die keine messbare Ohrschwellung in den wt-Mäusen auslöste. Ein entsprechender Versuchsansatz könnte durch eine gesteigerte Penetration des Irritans bei Vorliegen einer Barriestörung einen Unterschied bezüglich der Ohrschwellung zum Vorschein bringen.

Unabhängig von den hier dargestellten Ergebnissen darf nicht außer Acht gelassen werden, dass das Auslösen eines ICD beim Menschen in der Regel eine mehrmalige (chronische) Exposition mit dem Irritans voraussetzt. In dieser Arbeit wurde nicht mehr als eine einmalige Applikation vorgenommen. Zudem sind unter anderem die Konzentration sowie das Volumen des Irritans und die Dauer der Exposition weitere Faktoren, die für die Pathogenese des ICD ausschlaggebend sind (Slodownik et al. 2008). So stellt eine berufsbedingte chronische Exposition gegenüber einem Irritans einen Risikofaktor zur Ausbildung von chronisch irritativen Kontaktekzemen mit Betonung der Hände dar. Die Assoziation einer Filaggrin-Mutation mit dem vermehrten Auftreten von berufsbedingten irritativen Kontaktekzemen wurde nachgewiesen (De Jongh et al. 2008).

4.3 Mutationsbedingte Barrierestörungen und atopische Erkrankungen

Filaggrin-Mutationen werden beim Menschen sowohl mit *Ichthyosis vulgaris* (Smith et al. 2006) als auch mit atopischer Dermatitis (AD) in Zusammenhang gebracht (Palmer et al. 2006; Weidinger et al. 2008). Inzwischen wurden mehrere Arbeiten veröffentlicht, die das Fehlen von Filaggrin mit weiteren Erkrankungen des atopischen Formenkreises beleuchten. In einer Studie wurden 3099 Schulkinder zwischen neun und elf Jahren aus Dresden und München auf Filaggrin-Mutationen und atopische Erkrankungen untersucht. Unabhängig von der Assoziation mit AD bestand ein ebenso signifikanter Zusammenhang mit allergischer Rhinitis. Allergisches Asthma wies nur in Verbindung mit AD eine signifikante Assoziation auf (Weidinger et al. 2008). Lediglich 20% aller Patienten mit AD und 50% mit schwerer AD weisen eine Filaggrin-Mutation auf (Guttman-Yassky et al. 2009). Diese Daten legen nahe, dass andere Gene sowie Umweltfaktoren an der multifaktoriellen Pathogenese beteiligt sind. Hornerin-Mutationen sind ebenfalls mit AD assoziiert (Wu et al. 2009a). Reduzierte Hnrn-Expression bei anderen atopischen Erkrankungen wurde nicht beschrieben.

Zur Funktion der Hautbarriere während der Pathogenese des AD existieren zwei unterschiedliche Modelle. Wie bereits erläutert, wird beim *Outside-in*-Modell die gestörte epidermale Barriere als ursächlich betrachtet (Silverberg und Silverberg 2015). Als Folge kommt es zu erhöhter kutaner „Entzündlichkeit“, was wiederum einen negativen Einfluss auf die Hautbarrierefunktion hat (*outside-in-outside*) (Elias und Steinhoff 2008). Das *Inside-out*-Modell hingegen basiert auf der Annahme, dass aufgrund einer gesteigerten Immunreaktion, wie erhöhter IgE-Produktion und Ausbildung einer Th2-Antwort, vordergründig immunologische Faktoren auslösend sind (Man et al. 2008). Bei der dadurch verursachten Entzündung wird die für die Barrierefunktion wichtige Expression von Strukturproteinen herunterreguliert (Pellerin et al. 2013). Die strukturelle Anomalie erleichtert das Eindringen der Antigene und führt sekundär zu veränderten Immunreaktionen. Durch indirekte Immunfluoreszenz und *Western-Blot*-Experimente wurde nachgewiesen, dass Hornerin und Profilaggrin in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Patienten, die an einem AD leiden aber keine Mutationsträger sind, reduziert sind (Henry et al. 2011). Abgesehen von Filaggrin und Hornerin wurde mittels *DNA-Microarrays* die relativ verminderte Expression weiterer Gene des EDC in läsionaler Haut von an AD leidenden Patienten bewiesen (Sugiura et al. 2005). Das Fehlen dieser für die Barrierefunktion wichtigen Strukturproteine spielt womöglich auch bei der Auslösung eines allergischen Kontaktekzemes eine Rolle.

4.4 Fazit

Diese Arbeit untersucht erstmalig die durch FlgHrnr-Doppeldefizienz hervorgerufene gestörte epidermale Barriere in Zusammenhang mit der Induktion eines allergischen und irritativen Kontaktekzems. Die doppelte Defizienz von Filaggrin und Hornerin führt zu einer erhöhten Suszeptibilität für allergische Kontaktekzeme. Das neue Mausmodell leistet dadurch einen Beitrag zum Verständnis des *Outside-in*-Modells und untermauert und erweitert die Ergebnisse früherer Forschung. Beim irritativen Kontaktekzem zeigte sich weder in der klinisch messbaren Entzündung noch im zellulären Infiltrat ein Unterschied. Es ist unklar, inwieweit auch die durch die doppelte Defizienz von Filaggrin und Hornerin neu gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragbar sind. Die Assoziation von Barrierestörungen mit atopischen Erkrankungen einerseits und Kontaktekzemen andererseits belegt die Notwendigkeit, weitere Forschungen mit den hier charakterisierten Doppelmutanten vorzunehmen. Die genannten Erkrankungen belasten die betroffenen Patienten und verursachen bei zunehmender Prävalenz sehr hohe Kosten für das Gesundheitssystem. Daher ist das Verständnis der Pathophysiologie auch im Hinblick auf neue therapeutische Interventionsmöglichkeiten wichtig.

4.5 Ausblick

Es besteht ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen einer dysfunktionalen epidermalen Barriere und der AD. Mausmodelle mit genetischen Defekten von Strukturproteinen können wertvolle Beiträge zur Grundlagenforschung auf diesem Gebiet liefern. So wurde durch wiederholte Applikationen von Oxa eine wie bei der AD vorliegende Th2-dominante Immunantwort ausgelöst (Man et al. 2008). Ähnlich könnten auch mit den FlgHrnr-defizienten Mäusen weitere Erkenntnisse zur Pathogenese der AD gewonnen werden.

Weiterhin wäre auf dem Gebiet der humanen Forschung auch die Bestimmung der Häufigkeit von Mutations-Trägern wichtig. Zudem wäre von großem Interesse, inwieweit auch die doppelte Defizienz mit anderen atopischen Erkrankungen assoziiert ist. Schließlich könnten ergänzende Experimente auf dem Gebiet der ACD-Forschung klären, ob bei Doppelmutation mehr positive Epikutantest-Ergebnisse mit klinischem Korrelat ausgewertet werden würden.

5 Zusammenfassung

Die Proteine Filaggrin und Hornerin sind als Bestandteile der Epidermis maßgeblich an der Aufrechterhaltung einer intakten Hautbarriere beteiligt. Das mutationsbedingte Fehlen dieser Proteine hat eine Barrierestörung zur Folge. Unabhängig voneinander sind Mutationen in den kodierenden Genabschnitten mit Erkrankungen assoziiert, die eine gestörte Barriere aufweisen. Ein Beispiel sind die atopischen Erkrankungen. Zur Assoziation mit Kontaktekzemen liegen nur wenige Daten vor. Bei einer geschätzten Prävalenz von 15-20% in der Bevölkerung ist das Kontaktekzem allerdings eine gesellschaftlich ernstzunehmende Krankheit. Ätiologisch werden zwei Formen des Kontaktekzems unterschieden. Das allergische Kontaktekzem ist gekennzeichnet durch eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion vom Spättyp, die die Aktivierung des adaptiven Immunsystems voraussetzt. Das irritative Kontaktekzem beruht auf einer unspezifischen Entzündungsreaktion des angeborenen Immunsystems.

In Filaggrin/Hornerin-defizienten Mäusen untersucht diese Arbeit den Zusammenhang einer gestörten epidermalen Barriere mit allergischen und irritativen Kontaktekzemen. Die Ohrdicke wurde als Parameter für die ausgelöste Entzündung zu mehreren Zeitpunkten gemessen. In den Mutanten wurde im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ein niedrigerer Schwellenwert zur Auslösung und somit eine gesteigerte Suszeptibilität für das allergische Kontaktekzem nachgewiesen. Mittels Histologie, Immunhistochemie und Durchflusszytometrie wurden Verteilung, Quantität und Qualität des zellulären Infiltrates untersucht. Die Ergebnisse zum allergischen Kontaktekzem weisen auf gestörte Immun-Regulationsstörungen als Basis der gesteigerten spezifischen Reaktion hin. Beim irritativen Kontaktekzem wurde hingegen weder ein Unterschied in der klinisch messbaren Entzündung, noch im zellulären Infiltrat detektiert. Die durch das neue Mausmodell gewonnenen Erkenntnisse tragen zum Verständnis des *Outside-in*-Modells des allergischen Kontaktekzems bei. Inwieweit diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, muss zukünftig untersucht werden. Bei zunehmender Prävalenz von mit einer Barrierestörung assoziierten Erkrankungen und steigenden Kosten für das Gesundheitssystem, ist jedoch weitergehende Forschung zur Pathophysiologie auch mit dem Ziel therapeutischer Interventionsmöglichkeiten unverzichtbar.

6 Literaturverzeichnis

- Barker J, Palmer C, Zhao Y, Liao H, Hull PR, Lee SP, Allen MH, Meggitt SJ, Reynolds NJ, Trembath RC, Irwin McLean WH (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
- 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
- Dale BA, Holbrook KA, Steinert PM (1978): Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in microfibrils. *Nature* 276, 729–731
- De Jongh CM, Khrenova L, Verberk MM, Calkoen F, Van Dijk FJH, Voss H, John SM, Kezic S (2008): Loss-of-function polymorphisms in the filaggrin gene are associated with an increased susceptibility to chronic irritant contact dermatitis: a case–control study. *Br J Dermatol* 159, 621–627
- Eaaswarkhanth M, Xu D, Flanagan C, Rzhetskaya M, Hayes MG, Blekhman R, Jablonski NG, Gokcumen O (2016): Atopic Dermatitis Susceptibility Variants in Filaggrin Hitchhike Hornerin Selective Sweep. *Genome Biol Evol* 8, 3240–3255
- Elias PM, Steinhoff M (2008): “Outside-to-Inside” (and Now Back to “Outside”) Pathogenic Mechanisms in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 128, 1067–1070
- 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
- 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
- Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Chiricozzi A, Nograles KE, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Lin P, Bergman R, Bowcock AM, Krueger JG (2009): Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1235-1244.e58
- Henry J, Hsu C-Y, Haftek M, Nachat R, Koning HD de, 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
- Hsu C-Y, Gasc G, Raymond A-A, Bulet-Schiltz O, Takahara H, Serre G, Méchin M-C, Simon M (2017): Deimination of Human Hornerin Enhances its Processing by Calpain-1 and its Cross-Linking by Transglutaminases. *J Invest Dermatol* 137, 422–429
- Irvine AD, Irwin McLean WH (2006): Breaking the (Un)Sound Barrier: Filaggrin Is a Major Gene for Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* 126, 1200–1202

- Jokura Y, Ishikawa S, Tokuda H, Imokawa G (1995): Molecular Analysis of Elastic Properties of the Stratum Corneum by Solid-State ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Invest Dermatol* 104, 806–812
- Jungersted JM, Scheer H, Mempel M, Baurecht H, Cifuentes L, Høgh JK, Hellgren LI, Jemec GBE, Agner T, Weidinger S (2010): Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy* 65, 911–918
- Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM (2001): Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci* 114, 3069–3070
- Kasprowicz DJ, Smallwood PS, Tyznik AJ, Ziegler SF (2003): Scurfin (FoxP3) Controls T-Dependent Immune Responses In Vivo Through Regulation of CD4+ T Cell Effector Function. *J Immunol* 171, 1216–1223
- Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M (2012): Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol* 129, 1538-1546.e6
- Kimber I, Cumberbatch M (1992): Dendritic cells and cutaneous immune responses to chemical allergens. *Toxicol Appl Pharmacol* 117, 137–146
- Kimber I, Gerberick GF, Basketter DA (1999): Thresholds in Contact Sensitization: Theoretical and Practical Considerations. *Food Chem Toxicol* 37, 553–560
- Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Dearman RJ (2002): Allergic contact dermatitis. *Int Immunopharmacol* 2, 201–211
- Kypriotou M, Huber M, Hohl D (2012): The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the ‘fused genes’ family. *Exp Dermatol* 21, 643–649
- Lonsdale-Eccles JD, Haugen JA, Dale BA (1980): A phosphorylated keratohyalin-derived precursor of epidermal stratum corneum basic protein. *J Biol Chem* 255, 2235–2238
- Makino T, Takaishi M, Morohashi M, Huh N -h. (2001): Hornerin, a Novel Profilaggrin-like Protein and Differentiation-specific Marker Isolated from Mouse Skin. *J Biol Chem* 276, 47445–47452
- Makino T, Takaishi M, Toyoda M, Morohashi M, Huh N (2003): Expression of Hornerin in Stratified Squamous Epithelium in the Mouse: A Comparative Analysis with Profilaggrin. *J Histochem Cytochem* 51, 485–492
- 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
- McKinley-Grant LJ, Idler WW, Bernstein IA, Parry DA, Cannizzaro L, Croce CM, Huebner K, Lessin SR, Steinert PM (1989): Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 4848–4852

- Miajlovic H, Fallon PG, Irvine AD, Foster TJ (2010): Effect of filaggrin breakdown products on growth of and protein expression by *Staphylococcus aureus*. *J Allergy Clin Immunol* 126, 1184
- 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
- Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, et al. (2010): Flaky Tail Mouse Denotes Human Atopic Dermatitis in the Steady State and by Topical Application with *Dermatophagoides pteronyssinus* Extract. *Am J Pathol* 176, 2385–2393
- Nemes Z, Steinert PM (1999): Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 31, 5–19
- Nosbaum A, Vocanson M, Rozieres A, Hennino A, Nicolas J-F (2009): Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 19, 325–332
- Novak N, Baurecht H, Schäfer T, Rodriguez E, Wagenpfeil S, Klopp N, Heinrich J, Behrendt H, Ring J, Wichmann E, et al. (2008): Loss-of-Function Mutations in the Filaggrin Gene and Allergic Contact Sensitization to Nickel. *J Invest Dermatol* 128, 1430–1435
- Oji DV (2010): Klinik und Ätiologie der Ichthyosen. *Hautarzt* 61, 891–905
- 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
- Pease S, K C, Basketter DA, Patlewicz GY (2003): Contact allergy: the role of skin chemistry and metabolism. *Clin Exp Dermatol* 28, 177–183
- Peiser M, Tralau T, Heidler J, Api AM, Arts JHE, Basketter DA, English J, Diepgen TL, Fuhlbrigge RC, Gaspari AA, et al. (2011): Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. *Cell Mol Life Sci* 69, 763–781
- Pellerin L, Henry J, Hsu C-Y, Balica S, Jean-Decoster C, Méchin M-C, Hansmann B, Rodriguez E, Weindinger S, Schmitt A-M, et al. (2013): Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* 131, 1094–1102
- Presland RB, Dale BA (2000): Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 383–408
- Presland RB, Boggess D, Lewis SP, Hull C, Fleckman P, Sundberg JP (2000): Loss of Normal Profilaggrin and Filaggrin in Flaky Tail (ft/ft) Mice: an Animal Model for the Filaggrin-Deficient Skin Disease Ichthyosis Vulgaris. *J Invest Dermatol* 115, 1072–1081
- Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M (2008): The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17, 1063–1072

- Proksch E (2018): pH in nature, humans and skin. *J Dermatol* 45, 1044-1052
- 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 (FlgHnr^{-/-}) double-deficient mice. *Allergy* 74, 1327-1339
- Rawlings AV, Harding CR (2004): Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17, 43-48
- Riemann H, Schwarz T, Grabbe S (2003): Pathomechanismen der Auslösephase der allergischen Kontaktdermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges* 1, 613-619
- Rothnagel J (1994): Characterization of the Mouse Loricrin Gene: Linkage with Profilaggrin and the Flaky Tail and Soft Coat Mutant Loci on Chromosome 3. *Genomics* 23, 450-456
- Saint-Mezard P, Rosieres A, Krasteva M, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas J-F (2004): Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 14, 284-295
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004): Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, 745-763
- 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
- 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
- Schmuth M, Blunder S, Dubrac S, Gruber R, Moosbrugger-Martinz V (2015): Epidermale Barriere bei hereditären Ichthyosen, atopischer Dermatitis und Psoriasis. *J Dtsch Dermatol Ges* 13, 1119-1124
- Silverberg NB, Silverberg JI (2015): Inside Out or Outside In: Does Atopic Dermatitis Disrupt Barrier Function or Does Disruption of Barrier Function Trigger Atopic Dermatitis? *Cutis* 96, 359-361
- Slodownik D, Lee A, Nixon R (2008): Irritant contact dermatitis: A review. *Australas J Dermatol* 49, 1-11
- 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
- Sugiura H, Ebise H, Tazawa T, Tanaka K, Sugiura Y, Uehara M, Kikuchi K, Kimura T (2005): Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of

- an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope. *Br J Dermatol* 152, 146–149
- Takaishi M, Makino T, Morohashi M, Huh N (2005): Identification of Human Hornerin and Its Expression in Regenerating and Psoriatic Skin. *J Biol Chem* 280, 4696–4703
- Thyssen JP, Linneberg A, Ross-Hansen K, Carlsen BC, Meldgaard M, Szecsi PB, Stender S, Menné T, Johansen JD (2013): Filaggrin mutations are strongly associated with contact sensitization in individuals with dermatitis. *Contact Dermatitis* 68, 273–276
- 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
- Willis CM, Stephens CJM, Wilkinson JD (1992): Differential Effects of the Structurally Unrelated Chemical Irritants on the Density of Proliferating Keratinocytes in 48h Patch Test Reactions. *J Invest Dermatol* 99, 449–453
- Wu Z, Meyer-Hoffert U, Reithmayer K, Paus R, Hansmann B, He Y, Bartels J, Gläser R, Harder J, Schröder J-M (2009a): Highly Complex Peptide Aggregates of the S100 Fused-Type Protein Hornerin Are Present in Human Skin. *J Invest Dermatol* 129, 1446–1458
- Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, Gläser R, Schröder J-M (2009b): Molecular Identification and Expression Analysis of Filaggrin-2, a Member of the S100 Fused-Type Protein Family. *PloS One* 4, e5227
- Xu H, DiIulio NA, Fairchild RL (1996): T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8⁺ T cells and interleukin (Il) 4/Il-10-producing (Th2) negative regulatory CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 183, 1001–1012

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. M. P. Schön für die freundliche Überlassung des Themas, die gute Betreuung und fachliche Unterstützung meiner Doktorarbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. A. Braun, die mich mit dem Thema vertraut und in die Methoden eingearbeitet hat. Bei allen Fragen und Problemen hatte sie über die gesamte Zeit hinweg ein offenes Ohr und stand mir mit konstruktiven Ratschlägen stets zur Seite.

Vielen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe aus dem Forschungslabor der Hautklinik der Universitätsmedizin Göttingen für die tatkräftige Unterstützung. Dabei möchte ich stellvertretend insbesondere K. Zachmann und A. Bennemann danken.