Untersuchung von epidermalen Ca²⁺-Gradienten in einem Mausmodell für Atopische Dermatitis unter Verwendung von 2-Photonen-Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christian Börnchen

aus Hamburg

HAMBURG 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. J. BRANDNER Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. C. LOHR Tag der Disputation: 22. November 2013

Hamburg, den 07. November 2013

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung	1
	1.1	Aufbau und Funktion der Haut	1
	1.2	Calcium als Botenstoff und seine Homöostase	5
	1.3	Calcium in der Haut	7
	1.4	2-Photonen-Mikroskopie (2-PM)	9
	1.5	2-Photon-Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (2P-FLIM)	. 12
	1.6	Tight Junctions in der Haut	. 13
	1.7	Atopische Dermatitis	. 15
	1.8	Zielsetzung der Arbeit	. 19
2	Mat	terial	20
2	2.4		20
	2.1	Antikorper	.20
	2.2	Chemikalien	.21
	2.3	Kits	.21
	2.4	Tiere und Gewebe	.22
	2.5	Software	. 22
	2.6	Statistik	.22
	2.7	Zellkulturmaterialien	.23
	2.8	Zellkultur	.23
3	Me	thoden	24
	2 1	Atonische Dermatitis – Mausmodell (AID)	24
	3.1.1	Sensibilisierung der Mäuse gegen Ovalbumin	25
	3.1.2	Induzierung eines Ekzems durch intradermale Ovalbumin-Iniektion	25
	3.1.3	Induzierung eines Ekzems durch dreimalige intradermale Ovalbumin-Injektionen	26
	3.1.4	Behandlung der Haut mit Calcium-Green-5N	26
	3.1.5	Messung der Barriereintegrität durch Bestimmung des Transepidermalen	
	Wass	serverlusts (TEWL) und der Hydratisierung des Stratum corneums	.27
	3.	1.5.1 Messung des Transepithelialen Wasserverlusts (TEWL)	.27
	3.	1.5.2 Messungen der Hydratisierung des Stratum corneums	.28
	3.1.6	Big Haut- und Blutentnahme	.28
	3.	1.6.1 Hautentnahme und Fixierung	.28
	3.	1.6.2 Blutentnahme und Serumgewinnung	.29
	3.	1.6.3 Bestimmung der serologischen IgE- und OVA-spezifischen IgE-	
	Ar	htikorperkonzentrationen mittels ELISA	.30

	3.1.7	Anfertigung von Gefrierschnitten	31
	3.1.8	Anfertigung von Paraffinschnitten	31
	3.1.	8.1 Entparaffinierung der Paraffinschnitte	31
	3.1.9	HE-Färbungen von Gefrier- und Paraffinschnitten	32
	3.2 I	mmunhistochemische Färbungen	33
	3.3 Z	Zellkultur	35
	3.3.1	Porcines ex vivo Hautmodell (Patent-Nr. DE10317400)	35
	3.3.2	Kultivierung von HaCat-Zellen	36
	3.4	Mikroskopie	
	341	FLIM-Detektorenvergleich	38
	3.4.	1.1 Time-Correlated Single-Photon Counter – Detektor (TCSPC)	
	3.4.	1.2 PicoStar (Multibeam-FLIM-Detektor)	
	3.4.	1.3 Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer	40
	3.4.2	FLIM-Kalibrierung von Calcium Green-5N (CG5N)	40
	3.4.3	Evaluation des Brechungsindex (n) in muriner Haut	40
	3.4.4	Bestimmung der Punktspreizfunktion der FLIM-Detektoren	41
	3.4.5	Tiefenabhängiges Signal-zu-Rausch-Verhältnis und maximale FLIM-Messtie	efe.42
	3.4.	5.1 Präparation der Hirnschnitte von Thy1-Mäusen	43
	3.4.	5.2 Präparation des ex vivo Hautmodells	44
	3.4.6	FLIM-Calcium-Messungen und Bestimmung der epidermale Dicke des AlD	-
	Mode	lls	44
	3.4.7	FLIM-Calcium-Messung an HaCat-Zellen	45
	3.4.8	Bestimmung der Infiltrathöhe	45
	3.4.9	Evaluation von Filaggrin, Keratin 6, Keratin 14, Keratin 10, Claudin-1, ZO-1 und Ki	57-
	Färbur	ngen	46
4	Ergel	onisse	48
	4.1 Г)etektorvergleich	
	4.1.1	Bestimmung der Punktspreizfunktion (PSF) durch Bead-Messungen in lateraler u	nd
	axialer	r Richtung	
	4.1.2	Tiefenabhängiges Signal-zu-Rausch-Verhältnis und maximale FLIM-Messtiefe	50
	4.2 F	valuation des Brechungsindex (n) muriner Haut	54
			50
	4.3 F	LIM-Kalibrierung von Calcium Green-5N (CG5N)	58
	4.3.1	Extra- und Intrazellulare Ca -Konzentrationen von HaCat-Zellen	59
	4.4 E	rgebnisse des AlD-Mausmodells	63
	4.4.1	Parameter der Atopischen Dermatitis im AlD-Modell	63
	4.5 2	P-FLIM-Calcium-Messungen an Hautproben des AlD-Modells	67
	4.5.1	2P-FLIM-Calcium-Messungen von Kontrollhaut und Ekzem in die Tiefe	67
	4.5.2	Extra- & intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentrationen im Stratum granulosum	77
	4.6 E	pidermale Differenzierungs- und Proliferationsmarker im AID-Modell	79
	4.6.1	Keratin 14	80
	4.6.2	Keratin 10	81
	4.6.3	Filaggrin	82
	4.6.4	Keratin 6	83
	4.6.5	Ki67	83

4	1.7	Tight Junction-Proteine im AID-Modell	.84
	4.7.1	ZO-1	.85
4 C	1.8 Differe 4.8.1 4.8.2 4.8.3 Hype 4.8.4 Clauc	Korrelationen von Calcium-Parametern mit Parametern des AlD-Modells, der nzierungsmarker, Tight Junction-Proteinen und Proliferationsmarker Korrelationen von Calcium-Parametern mit Parametern der Atopischen Dermatitis Korrelationen von Calcium-Parametern mit Differenzierungsmarkern Korrelation von Calcium-Parametern mit Markern für Proliferation und rproliferation Korrelationen von Calcium-Parametern mit der Lokalisation der Tight Junction-Prote	. 87 .88 .89 .92 eine .93
5	Disk	ussion	95
5	5.1 5.2 5.2.1 5.2.2	2P-FLIM Detektorvergleich	. 95 . 95 .96
5	5.3	Der Brechungsindex muriner Haut hat Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdaue 98	r
5	5.4	FLIM-Kalibrierung von Calcium-Green 5N	.98
5	5.5 5.5.1 5.5.2 5.5.3 5.5.4	Untersuchungen in der murinen Haut Parameter des AlD-Maus-Modells 2P-FLIM-Calcium-Messungen in gesunder Maushaut	. 99 .99 100 101
	5.5.5 Prolit 5.5.6	Korrelation der Calcium-Parameter mit Parametern des Ekzems und der Barnere Korrelationen von Calcium-Parametern mit Differenzierungs- und erationsmarkern Korrelation von Calcium-Parametern mit Tight Junction Parametern	102 103 104
6	5.5.5 Prolif 5.5.6 Zus a	Korrelation der Calcium-Parameter mit Parametern des Ekzems und der Barnere Korrelationen von Calcium-Parametern mit Differenzierungs- und Ferationsmarkern	102 103 104 06
6 7	5.5.5 Prolif 5.5.6 Zusa	Korrelation der Calcium-Parameter mit Parametern des Ekzems und der Barnere Korrelationen von Calcium-Parametern mit Differenzierungs- und Ferationsmarkern	102 103 104 .06 .09
6 7 8	5.5.5 Prolif 5.5.6 Zusa Lite Abb	Korrelation der Calcium-Parameter mit Parametern des Ekzems und der Barnere Korrelationen von Calcium-Parametern mit Differenzierungs- und Ferationsmarkern	102 103 104 .06 .09 .17
6 7 8 9	5.5.5 Prolif 5.5.6 Zusa Lite Abb	Korrelation der Calcium-Parameter mit Parametern des Ekzems und der Barnere Korrelationen von Calcium-Parametern mit Differenzierungs- und Ferationsmarkern	102 103 104 .06 .09 .17 .20
6 7 8 9 10	5.5.5 Prolif 5.5.6 Zusa Lite Abb Forr Tabo	Korrelation der Calcium-Parameter mit Parametern des Ekzems und der Barnere Korrelationen von Calcium-Parametern mit Differenzierungs- und Ferationsmarkern	102 103 104 .06 .09 .17 20 21
6 7 8 9 10 Pu	5.5.5 Prolif 5.5.6 Zusa Lite Abb Forr Taba blikat	Korrelation der Calcium-Parameter mit Parametern des Ekzems und der Barnere Korrelationen von Calcium-Parametern mit Differenzierungs- und Ferationsmarkern	102 103 104 .06 .09 .17 .20 .21 .22

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	Arbitray units
AD	Atopische Dermatitis
AJ(s)	Adherens Junction(s)
AID	Atopisches Dermatitis Mausmodell (Atopic Dermatits like allergic
	D ermatitis)
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser (<i>aqua bidestillata</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
са	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
Calcium-Baseline	Horizontalen Strecke der niedrigen Ca ²⁺ -Konzentration
Calcium-SG	Ca ²⁺ -Konzentration im Stratum granulosum
CCD	Charge-coupled Device
CE	Cornified envelope
CG5N	Calcium Green-5N
Cldn	Claudin
DAPI	4´,6-Diamidino-2´-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
EM-CCD	Electron multiplying CCD
et al.	Und andere (<i>et alteri/alii</i>)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (Fluorescence lifetime
	imaging microscopy)
FWHM	Halbwertsbreite (Full width at half maximum)
g	Gramm
GOI	Gated operated intensifier (PicoStar)
h	Stunde (<i>hour</i>)
HaCAt	Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes
HE	Hämatoxilin-Eosin
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
lgE	Immunglobulin E
lgG	Immunglobulin G
JAM	Junctional Adhesion Molecule
kDa	Kilo Dalton
LB	Lamellar body

M	Molar
MCP	Multi-Channel-Plate
MeC	Mittlere Ca ²⁺ -Konzentrationen der Gesamtepidermis
MHz	Megahertz
min	Minute
mM	Millimol
NADP(H)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
ng	Nanogramm
NGS	Normales Ziegen Serum (normal goat serum)
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
OVA	Ovalbumin
P/S	Penicillin / Streptomycin
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PIXE	Proton-induzierte Röntgenemission (Proton Induced X-ray
	Emission)
PMT	Photomultiplier-Tube
ps	Picosekunde
PSF	Punktspreizfunktion
ROI	Region of Interest
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SB	Stratum basale
SC	Straum corneum
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
SG	Stratum granulosum
SHG	Second-Harmonic-Generation
SNR	Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (signal to noise ratio)
SS	Stratum spinosum
TCSPC	zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (time-correlated single
	photon counting)
TEC	Tris-EDTA-Citrat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust (transepidermal water loss)
Ti:Sa	Titan:Saphir
TJ(s)	Tight Junction(s)
ü.N.	Über Nacht
2-PM	2-Photonenmikroskopie
ZO-1	Zonula Occludens Protein 1
μm	Mikrometer
μM	Mikromol/l

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist mit der Fläche von ca. 2 m² das größte Organ des menschlichen Körpers und stellt seine Abgrenzung gegenüber der Umwelt dar. Sie erfüllt lebenswichtige Aufgaben, wie die Verhinderung von unkontrolliertem Wasser- und Mineralstoffverlust und des Eindringens von Pathogenen und ist somit eine der wichtigsten Adaptionen der Säugetiere für ein Leben an Land (Kalinin *et al.*, 2001; Steven & Steinert, 1994). Gleichzeitig ist sie an der Wahrnehmung äußerer Umweltreize beteiligt und ist ein wichtiger Bestandteil der Thermoregulation des Körpers, die über die Schweißdrüsen und das Gefäßsystem der Haut gewährleistet wird (Lüllmann-Rauch, 2006).

Die Haut (Kutis) besteht aus verschiedenen Schichten (s. Abbildung 1-1A), die sich in drei Bereiche unterteilen lassen (von außen nach innen):

Die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subkutis (Unterhaut). Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel und besteht zu 90% aus Keratinozyten. Die Epidermis ist in 4 Schichten unterteilt (s. Abbildung 1-1B): Das *Stratum basale* (Basalschicht, SB) ist die der Hautoberfläche entfernteste epidermale Schicht und besteht aus einer einlagigen Schicht prismatischer Zellen, die der Basallamina direkt aufsitzen und mit Hemidesmosomen an dieser verankert sind. Ausschließlich im *Stratum basale* finden sich in gesunder Haut proliferative Zellen, die einer Stammzellpopulation entstammen. Durch weitere Mitosen in der Basalschicht werden die so gebildeten Keratinozyten von nachfolgenden Zellen in höher gelegene Schichten "geschoben". Das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht, SS) zeichnet sich in humaner Epidermis durch eine polygonale Zellschicht aus, die ihren Namen artifiziellen Schrumpfungsartefakten in Schnittpräparaten verdankt. Hierbei werden die zahlreichen desmosomalen Kontakte der Zellen untereinander besonders sichtbar (Stachelzellen) und es treten erstmals sogenannte Lamellar bodies (LBs) auf, die die Vorläufersubstanzen der epidermalen Lipide in Form von scheibenförmig (lamellar) angeordneten Doppellipidmembranen beinhalten. In den LBs befinden sich neben Lipiden auch die Enzyme, die die Lipide nach der Freisetzung der LBs im Extrazellularraum zwischen Stratum granulosum und Stratum corneum prozessieren (Elias et al., 2006). Im Stratum granulosum (Granularzellschicht, SG) finden sich neben den bereits erwähnten LBs abgeflachte, noch zellkernhaltige Keratinozyten mit charakteristischen Keratohyalingranula, die einen hohen Anteil an Profilaggrin enthalten, welches eng mit dem Verhornungsprozess und Aufbau der Hornschicht verknüpft ist (Proksch et al., 2008). Weiterhin kommen im oberen Stratum granulosum gesunder Haut Tight Junctions (TJs) vor, welche in Kapitel 1.6 näher vorgestellt werden. Das Stratum corneum (Hornschicht, SC) besteht aus Korneozyten, die charakterisiert sind durch den Verlust von Zellkern und Organellen. Das Stratum corneum ist durch eine hohe Dehydration gekennzeichnet und bildet die äußerste Schicht der Epidermis. Die verhornten Korneozyten besitzen statt einer Zellmembran einen sogenannten "cornified envelope" (CE). Sie sind mit 0,2 – 0,5 μm sehr flach und liegen in unterschiedlich-starken Schichten von ca. 30 (Felderhaut) oder ca. 100 (Fußsohle und Handinnenfläche) Schichten vor. Die Korneozyten sind in eine Lipidmatrix eingebettet und gemeinsam mit dieser bilden sie die erste physikalische Barriere der Haut (für eine Übersicht Fritsch, 1983; Lüllmann-Rauch, 2006; Moll, 2010).



Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau der Haut. (A) Haut im Querschnitt: Epidermis, Dermis und Subkutis. (B)

Vergrößerung der Epidermis: Unterteilung der Epidermis in 4 verschiedene Schichten (verändert nach Fritsch, 1983).

Die Epidermis bildet eine Grenze für die Richtungen "outside-in" als auch "inside-out". Dies bedeutet, dass die Haut eine Grenze für pathogene Mikroorganismen wie Pilze und Bakterien darstellt und ebenso den Körper vor dem unkontrollierten Verlust von Wasser und Mineralstoffen schützt (Madison, 2003; Proksch *et al.*, 2008; Proksch *et al.*, 2009). Die Exkrete aus Schweiß- und Talgdrüsen bilden zusätzlich einen Schutzfilm auf der Haut (Säureschutzmantel) mit einem pH-Wert von ca. 5 (Dikstein & Zlotogorski, 1994), der das Wachstum von Mikroorganismen (Bakterien & Pilze) stark einschränkt. Weiterhin schützt die Epidermis sich selbst und die tiefer liegenden Schichten gegen ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung), die zum Teil direkt im *Stratum corneum* reflektiert oder absorbiert wird. Auch das von Melanozyten gebildete Melanin absorbiert UV-Strahlung (D'Orazio *et al.*, 2013). Neben den Keratinozyten und Melanozyten finden sich in der Epidermis Antigenpräsentierende Langerhans-Zellen und neuroendokrine Merkel-Zellen (Lüllmann-Rauch, 2006).

Die Epidermis unterliegt einer permanenten Erneuerung und ihre Keratinozyten durchlaufen auf ihrem Weg durch die vier epidermalen Schichten eine komplexe Differenzierung, an deren Abschluss der Korneozyt entsteht. Hierbei verändern sich die Kompositionen der Intermediärfilamente der Keratinozyten von Keratin 5 und 14 (ausschließlich im *Stratum basale*) zu Keratin 1 und 10 in suprabasalen Schichten, die den Beginn der Differenzierung anzeigen (Candi *et al.*, 2005). In der Wundheilung (Wong & Coulombe, 2003) oder Ekzemen (Jensen *et al.*, 2004) ist im *Stratum spinosum* und *granulosum* das Hyperproliferation assoziierte Keratin 6 (Ekanayake-Mudiyanselage *et al.*, 1998), neben den eben genannten Keratin 10, zu finden. Im Laufe der Differenzierung werden auch die Proteine sukzessiv prozessiert, die den CE bilden. So findet man im mittleren und oberen *Stratum spinosum* bereits Involucrin, das dadurch auch als intermediärer Differenzierungsmarker bezeichnet wird. Im oberen *Stratum spinosum / Stratum granulosum* werden Filaggrin und Loricrin gebildet, die man als späte Differenzierungsmarker bezeichnet. Die Proteine Involucrin, Loricrin und Filaggrin sind Strukturproteine, die an der Plasmamembran durch Transglutaminasen mit den

Keratinfilamenten quervernetzt werden und später die Plasmamembran vom Korneozyten ersetzen. Im *Stratum corneum* ist die Differenzierung der vormals Keratinozyten abgeschlossen (terminale Differenzierung) (Abbildung 1-2).



Epidermale Differenzierung

Abbildung 1-2: Epidermale Differenzierung der Keratinozyten. Die Expressionsmuster der Keratine verändern sich im Zuge der Differenzierung. Lipide werden von den Keratinozyten des *Stratum spinosum* und *granulosum* synthetisiert und durch Lamellar bodies in das *Stratum corneum* abgegeben. Das in den Keratohyalingranula enthaltene Profilaggrin wird im *Stratum corneum* zu Filaggrin prozessiert und dort zusammen mit Involucrin und Loricrin quervernetzt mit den Keratinfilamenten zu dem sog. Cornified envelope (verändert nach Proksch *et al.,* 2009).

In der Hornschicht werden die Korneozyten durch mechanische Belastungen abgeschilfert und durch nachrückende Zellen ersetzt. Dieser komplexe Zyklus dauert ca. 30 Tage und findet bei gesunder Haut permanent statt.

Direkt unter der Epidermis schließt sich die Dermis an. Beide sind durch die Basallamina voneinander getrennt. Da die Epidermis fest durch Hemidesmosomen an der Dermis verankert ist, werden sämtliche Zug- und Scherkräfte von der Epidermis auf die Dermis übertragen. Diese physikalischen Kräfte werden durch die flexible Struktur der Dermis abgefangen. Dafür verantwortlich ist die extrazelluläre Matrix der Dermis, die zum Großteil aus Kollagenen und elastischen Fasern besteht. Diese Matrix wird von den Fibroblasten stetig auf- und abgebaut und unterliegt so einem dynamischen Prozess. In der Dermis befindlich sind, neben Nervenzellen, auch Blut- und Lymphgefäße, die zum einen die Nährstoffversorgung der Epidermis über Diffusion sicherstellen und zum anderen

Lymphozyten die Möglichkeit geben, in unmittelbarer Nähe der Epidermis zu patrouillieren.

1.2 Calcium als Botenstoff und seine Homöostase

Zellen können auf ihre Umgebung und deren Veränderungen reagieren. Dazu gehören z.B. mechanische Stimuli oder extrazelluläre Signalmoleküle, die einen membranständigen Rezeptor aktivieren und diese Stimuli über intrazelluläre Signalproteine in die Zelle leiten. Diese Stimuli haben einen Anstieg des zytosolischen Calciumspiegels zur Folge, wodurch Calcium an Effektor-Proteine bindet, diese aktiviert und so verschiedene Funktionen oder Zustände der Zelle beeinflusst. Diese Konzentrationsänderungen des intrazellulären Calciums können, in ihrem zeitlichen Verlauf und je nach Zelltyp, Unterschiede in ihrer Wirkung erzielen. Hierzu gehören (geordnet nach aufsteigender Dauer, s. Abbildung 1-3) z.B. die Exozytose von Vesikeln, die Transkription von genetischen Informationen oder die Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Berridge et al., 2000; Carafoli et al., 2001). Als Folge dessen unterliegt der Calciumspiegel im Zytosol mehreren Regulationsmechanismen, die den Calciumspiegel senken als auch erhöhen können. Ist die Zelle im Ruhezustand, liegt die zvtosolische Ca²⁺-Konzentration bei ca. 100 nM, dies ist signifikant niedriger, als die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, die bei ca. 1 mM liegt und somit ein hoher Calciumgradient über der Zellmembran anliegt. Des Weiteren kann die Ca²⁺-Konzentrationen im Golgi-Apparat und Endoplasmatischen Retikulum 300 μM- 400 μM erreichen (Pinton et al., 1998; Rizzuto et al., 2009b). Die Erhaltung dieser Gradienten wird durch Pump- und Transportsysteme aufrechterhalten.

Der Ruhezustand des Calciumspiegels wird zum einen dadurch gewährleistet, dass Calcium-Ionen aus dem Zytosol in interne Calciumspeicher, als auch aus der Zelle in den extrazellulären Raum gepumpt werden. Zu den zellinternen Calciumspeichern gehört neben dem Golgi-Apparat und den Mitochondrien hauptsächlich das Endoplasmatische Retikulum (ER) und das Äquivalent der Muskelzellen, das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) (Berridge *et al.*, 2000; Rizzuto *et al.*, 2009a). In beiden Letzteren wird das intrazelluläre Calcium mit der "Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Calcium ATPase" (SERCA) in das Lumen des ERs gepumpt. Gleichzeitig sind weitere Ca²⁺-ATPasen in der Plasmamembran (Plasma membrane Ca²⁺-ATPase; PMCA) der Zelle aktiv und pumpen ihrerseits Calcium-Ionen aus dem Zytosol in den Extrazellularraum. Es existieren noch zwei weitere Calcium-Transportsysteme: Zum einen der zellmembranständige "Na⁺ / Ca²⁺ Exchanger" (NCX) in der Plasma- und Mitochondrien-Membran und zum anderen der mitochondriale Calcium Uniporter (MCU), der Ca²⁺-Ionen aus dem Zytosol in das Mitochondrium transportiert.

Intrazelluläres Calcium kann durch i) das Mobilisieren der internen Calcium-Speicher oder durch ii) das Einströmen von Calcium aus dem extrazellulären Milieu erhöht werden. Die Steuerung der Freisetzung der internen Calciumspeicher erfolgt meist über den Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor (IP₃R), einem transmembranständigen Rezeptor des ER und Golgi.



Abbildung 1-3: Die Dynamik der Calcium Signalgebung. Die intrazellulare Calcium Konzentration kann durch den Einstrom von extrazellulärem Calcium sowie die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern wie dem sarco-/endoplasmatischen Retikulum mit Hilfe sekundärer Botenstoffe erhöht werden. Freies Calcium bindet an

Effektorproteine, die zahlreiche Prozesse mit unterschiedlicher Dynamik in Gang setzen. Das Calcium-Signal wird abgeschaltet, indem Calcium aus der Zelle gepumpt und intrazelluläre Calcium-Speicher wieder aufgefüllt werden. Endoplasmatisches/sarkoplasmatisches Retikulum (ER/SR); Inositol-1,4,5 - Trisphosphatrezeptor (Ins(1,4,5)P3R); Na+/Ca 2+-Austauscher (NCX); Plasmamembran Calcium-ATPase (PMCA); Ryanodinrezeptor (RYR); sarco-/endoplasmatische Retikulum-ATPase (SERCA) (verändert nach Berridge *et al.*, 2003).

Durch die intrazelluläre Erhöhung des Calciums werden zudem sogenannte "stored operated Calcium entry" (SOCE) Kanäle geöffnet, die einen weiteren Einstrom von Calcium-Ionen verursachen. Zu diesen gehören z.B. Orai1 (Numaga-Tomita & Putney, 2013). Wie wichtig die Regulierung von intrazellulärem Calcium ist, zeigt sich auch in Fällen, wo diese gestört ist. So beruhen beispielsweise die Hautkrankheiten Morbus Hailey-Hailey und Morbus Darier, die beide durch deutlich sichtbare Hautläsionen gekennzeichnet sind, auf einem Gendefekt, der die Codierung der Ca²⁺-ATPase des Golgis (ATP2C1, Morbus Hailey-Hailey und somit maßgeblich an der Regulierung des intrazellulären Milieus beteiligt ist.

1.3 Calcium in der Haut

Seit den 80er Jahren ist bekannt, dass in vitro kultivierte Keratinozyten, sowohl murin als auch human, bei niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen (0,05 – 0,1 mM) in einschichtigen Zelllagen wachsen und schnell proliferieren. Erhöht man jedoch die Ca²⁺-Konzentration des Wachstumsmediums auf 1,2 mM, beginnen die Keratinozyten umgehend mit der Bildung von Zell-Zellverbindungen und differenzieren aus, wobei sie innerhalb von drei bis vier Tagen ihre Morphologie ändern und stratifizieren. Dieser "Calcium-switch" ist durch Reduzierung der Ca²⁺-Konzentration reversibel (Hennings *et al.*, 1980; Yuspa *et al.*, 1989). *In* vitro Experimente an Keratinozyten haben gezeigt, dass die extrazelluläre Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration von Keratinozyten starken Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten hat. So exprimieren humane und murine Keratinozyten in geringen Ca²⁺-Konzentrationen die Keratine 5 und 14, die nach Calcium-switch durch die frühen Differenzierungsmarker Keratin 1 und 10 ersetzt werden. In hohen Ca²⁺-Konzentrationen kultivierte Keratinozyten exprimieren zunächst intermediäre Differenzierungsmarker, wie Involucrin und Transglutaminasen, zu späteren Zeitpunkten auch die späten Differenzierungsmarker Loricrin und Filaggrin (Bikle et al., 1996; Hennings *et al.*, 1980; Yuspa *et al.*, 1989). Weiter besitzen die Proteine Transglutaminase-1, -3 und -5, die an der Quervernetzung der Keratinfilamente maßgeblich beteiligt sind, EF-Hand Motive (Candi *et al.*, 2005; Sandilands *et al.*, 2009) und sind somit in Ihrer Funktion von Ca²⁺-Anwesenheit abhängig. Auch Profilaggrin (400 kDa) besitzt eine dem EF-Hand Motiv ähnliche Bindungsdomäne am N-Terminus für zwei Calcium-Ionen (das 35 kDa-große Filaggrin-Monomer jedoch nicht) und wird unter Dephosphorylierung und proteolytischen Schritten zu Filaggrin prozessiert.

Da sich nach Ca²⁺-Entfernung Profilaggrin einer Konformationsänderung unterzieht, wird Calcium einer Funktion in der Prozessierung von Profilaggrin zu Filaggrin unterstellt (Presland *et al.*, 1995). Auch eine Signalfunktion durch die Calcium-Bindungsstelle von Profilaggrin für Differenzierungsprozesse wird vermutet (Markova *et al.*, 1993). *In vivo*-Experimente zeigten, dass Calcium die Aufrechterhaltung und Reparatur der Hautbarriere und Etablierung von Zell-Zellverbindungen (Behne *et al.*, 2003; Candi *et al.*, 2005; Leinonen *et al.*, 2009; Tu *et al.*, 2011) steuert.

Epidermale Calcium-Messungen haben sich bis vor kurzem auf drei Methoden beschränkt:

- <u>PIXE (Proton induced X-Ray Emission)</u>: Durch den Beschuss einer fixierten Hautprobe mit einem Protonenstrahl werden die in der Probe enthaltenen Atome zur Aussendung einer Röntgenstrahlung angeregt, deren Charakteristik und Intensität Aufschluss über die enthaltenen Atome und deren Konzentration der Probe gibt. Diese Methode misst die Gesamtcalciumkonzentration der Hautprobe über eine Minimalfläche von ca. 15 μm² und 5 μm Dicke. Mit PIXE ist es zwar möglich die geschnittene Epidermis von basal nach apikal zu messen, jedoch ist durch die Schnittdicke und des Durchmessers der Protonenstrahls eine Unterscheidung von extra- und intrazellulär nicht möglich.
- 2. <u>TEM-Immuno-Gold-Labeling</u>: Hierbei wird die konventionelle Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit der Immunhistochemie verbunden. Die Calcium Ionen werden am Ultradünnschnitt mit Goldnanopartikel gekoppelten Sekundärantikörpern gelabelt und können anschließend am TEM analysiert und quantitativ ausgewertet werden. Diese Methode kann sehr gut zwischen extra- und intrazellulär unterscheiden, dies jedoch nur auf einem sehr kleinen Flächenbereich.

8

3. <u>Fluoreszenz-Calcium-Farbstoffe in Zellkultur und Geweben</u>: Ein Calcium-sensitiver Farbstoff wird in die noch lebenden Zellen bzw. Gewebe eingebracht und mittels Fluoreszenz detektiert. Hierbei wird die Intensität der Fluoreszenz als Indikator für die Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen genutzt. Eine weitere Methode für die Quantifizierung von Ca²⁺-Ionen ist die Nutzung von ratiometrischen Calcium-Farbstoffen, die zwei Emissionswellenlängen emittieren, die je nach Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen ein unterschiedliches Verhältnis aufweisen. Bei beiden Methoden ist die Nähe zur *in vivo* Situation am besten gewährleistet. Jedoch unterliegen beide Methoden Farbstoffartefakten, die durch unterschiedliche Verteilung des Farbstoffes in der Probe auftreten können und somit verfälschte Ca²⁺-Konzentrationen wiedergeben.

Mit den in 1. & 2. genannten Methoden (PIXE & TEM) konnte ein Calcium-Gradient in der Epidermis gemessen werden, der von der Basalschicht in Richtung Hautoberfläche bis zum *Stratum granulosum* ansteigt und in den ersten Schichten des *Stratum corneums* abrupt abfällt (Behne *et al.*, 2003; Mauro *et al.*, 1998; Menon *et al.*, 1992). Beiden ist gemeinsam, dass diese Methoden nicht zwischen gebundenem und freiem Calcium unterscheiden können und sämtliche Daten auf fixiertem Gewebe beruhen, so dass nicht bekannt ist, ob diese Ergebnisse tatsächlich die *in vivo*-Situation widerspiegeln.

1.4 2-Photonen-Mikroskopie (2-PM)

Die 2-Photonen-Mikroskopie (2-PM) basiert auf einem Effekt den Marie Göppert-Mayer 1931 in Ihrer Dissertation vorhergesagt und beschrieben hat (Göppert-Mayer, 1931). Hierbei wird ein Molekül nahezu zeitgleich (10⁻¹⁵ s) durch die Absorption zweier Photonen mit der doppelten Wellenlänge (z.B. 800 nm) angeregt, die ein einzelnes Photon (z.B. 400 nm) zur Anregung des Fluorophors benötigen würde. Nachdem das Molekül sich im angeregten Zustand befindet, versucht es die ihm zugeführte Energie durch Rotation oder Vibration zu kompensieren und in seinen energetischen Grundzustand zurückzukehren (Relaxationsphase, Zeitrahmen ca. 10⁻¹² s), bevor es durch die Aussendung eines Photons erneut seinen Grundzustand erreicht. Die Aussendung des Photons ist die Fluoreszenz, die man sich in der Fluoreszenzmikroskopie detektiert und zu Nutze macht und findet in einem Zeitrahmen von Nanosekunden statt (s. Abbildung 1-4).



Abbildung 1-4: Prinzip des 2-Photonen-Effekts im Jablonski-Diagramm. Links: Das Jablonski-Diagramm zeigt die Ein-Photon-Anregung, durch die ein Molekül durch die Absorption eines Photons (blauer Pfeil) in den angeregten Zustand überführt wird; Rechts: Die Zwei-Photon-Anregung, bei der zwei Photon halber Energie simultan vom Fluorophor (Molekül) absorbiert werden (rote Pfeile) und den gleichen Anregungseffekt wie ein Photon doppelter Energie erzielen. *excitation* = Anregung des Moleküls, *relaxation* = Relaxationsphase des angeregten Moleküls, *fluorescence* = Emission eines Fluoreszenzphotons (Quelle: http://www.med.upenn.edu/twopcenter/whatis.shtml).

Durch die Anregung zweier Photonen steigt die Emissionsintensität quadratisch zur Anregungsintensität an, wobei man in der 2-PM auch von "nicht-linearer Mikroskopie" spricht (Denk *et al.*, 1990). Um die simultane Absorption der Photonen zu gewährleisten, werden in der 2-PM gepulste Laser eingesetzt, die in der Lage sind Pulse von 100 Femtosekunden (10⁻¹⁵ s) Länge mit einer Wiederholungsrate von 80 MHz zu erzeugen. Diese Laserpulse sind so dicht mit Photonen besetzt, dass die Wahrscheinlichkeit der simultanen Absorption zweier Photonen des Fluorophors stark erhöht wird, aber dennoch die durchschnittliche Anzahl der Photonen bei einem kontinuierlichen Laserstrahl (Abbildung



Abbildung 1-5: Mittlere Photonendichte im Vergleich: Oben ein kontinuierlicher Laser, unten ein gepulster Laser (Stutzmann & Parker, 2005).

1-5) nicht überschritten wird (Stutzmann & Parker, 2005).

Wird dieser Laserstrahl nun durch ein Objektiv gelenkt und in einer zu untersuchenden Probe fokussiert, steigt die Anregungswahrscheinlichkeit um ein Vielfaches. Der Anregungseffekt findet daher nur in der Fokusebene des Objektivs statt und dies ist der entscheidende Unterschied gegenüber der Ein-Photon-Anregung herkömmlicher Mikroskope. Über und unter der Fokusebene ist die Photonendichte nicht groß genug und es kommt daher nicht zu Anregungseffekten (Abbildung 1-6) (Denk *et al.*, 1990; Stutzmann & Parker, 2005). Dies hat zur Folge, dass unerwünschte Strahlung, die nicht aus der Fokusebene stammt und somit störende Streustrahlung darstellt, bei der 2-PM nicht entsteht und auch nicht detektiert wird, wie es in der Ein-Photon-Anregung der Fall ist. Dies ermöglicht ein "optisches Schneiden" der untersuchten Probe in Z-Richtung.





Abbildung 1-6: Vergleich der Anregungsvolumina von Ein-Photon- (links) und 2-Photon-Anregung (rechts) (verändert nach Stutzmann & Parker, 2005).

Ein weiterer positiver Effekt der 2-PM ist die Anregungswellenlänge, die im nahen Infrarotbereich liegt und somit energieärmer als die Ein-Photon-Anregung ist. Dies hat zwei Vorteile: Zum einen dringt rotes Licht tiefer in die Probe ein, da es weniger streuungsanfällig ist. Zum anderen wirkt

das Licht weniger phototoxisch, da der Infrarot-Wellenlängenbereich, wie bereits erwähnt, wesentlich energieärmer ist und die untersuchte Probe gegenüber konventioneller Ein-Photon-Anregung geschont wird (Denk *et al.*, 1990; Svoboda & Yasuda, 2006).

In der 2-PM können alle gängigen synthetischen Fluorophore angeregt werden, die je nach Durchstimmbarkeit des Lasers, in dessen Wellenlängenbereich liegen. Weiter gibt es neben den synthetisch hergestellten Fluorophoren auch natürlich vorkommende, intrinsische Fluorophore, die in der Zelle angeregt werden können. Dazu gehören z.B. NADP(H) und Flavine (Konig & Riemann, 2003). Eine weitere Besonderheit der 2-PM ist die Erzeugung sogenannter Second-Harmonic-Generation Signale (SHG-Signal). Die SHG-Signale werden an Molekülen erzeugt, wie z.B. Kollagen, Elastin und Muskelfilamenten (Zipfel *et al.*, 2003). Das eingestrahlte Licht wird hierbei nicht absorbiert, wie es bei einem Fluorophor der Fall ist, sondern wird in seiner Richtung und Wellenlänge verändert. Dieser Vorgang verhält sich wie eine Art Echo und erfolgt *ad hoc.* Durch die oben genannten Vorzüge der 2-PM ist es ein ideales Instrument, um Untersuchung in der Haut vorzunehmen. Alle Ansprüche, wie geringe Streuungsanfälligkeit (dadurch hohe Messtiefe), geringe Phototoxizität und die Möglichkeit intrinsische Fluorophore darstellen zu können, sind in der 2-PM gegeben.

1.5 2-Photon-Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (2P-FLIM)

Eine spezielle Methode der 2-PM stellt die Messung der Fluoreszenzlebensdauer dar (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy; FLIM). Hierbei wird die Zeit gemessen, die zwischen der Anregung des Lasers und der dadurch entstandenen Fluoreszenz vergeht. Dieser Prozess findet im Bereich von 10⁻⁹ s statt (s. Abbildung 1-4). Da die Emission der Fluoreszenzphotonen ein statistischer Vorgang und somit nicht immer zur exakt gleichen Zeit stattfindet, werden die Photonen über mehrere Messwiederholungen detektiert und nach ihrer Detektionszeit in ein Diagramm sortiert. Der Detektionsverlauf besitzt einen exponentiellen Verlauf (Fluoreszenzlebensdauer), der mit entsprechender Software berechnet werden kann (s Abbildung 1-7).



Abbildung 1-7: Prinzip der Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer. Die nach unterschiedlichen Zeitpunkten detektieren Fluoreszenzphotonen (grün) werden der Detektionszeit nach einem Laserpuls (rot) gegen die Zeit aufgetragen. Die Ausgleichsfunktion (schwarz) im Diagramm zeigt deutlich einen exponentiellen Abfall, der durch Analysesoftware in Lebensdauern umgerechnet wird. (Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Fluoreszenzlebensdauer)

Fluoreszenzlebensdauer Die eines Moleküls ist für jedes Molekül einzigartig und wird Umgebungsparameter durch Ca²⁺-Konzentration, pHwie Wert oder Bindungsstatus verändert und kann somit Aufschluss über den Status des Moleküls oder dessen Umgebung geben (Gadella Jr et al., 1993; Periasamy et al., 1996). Die Tatsache, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer aufgrund von Umweltparametern eines Moleküls ändert, kann man sich beispielweise bei der Messung der Fluoreszenzlebensdauer in unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen einer Lösung zu Nutze machen. Durch die Kalibrierung ist man anschließend in der Lage direkte Aussagen über die Ca²⁺⁻Konzentration einer Probe zu machen. Grundlegend für diese Messmethode ist, dass sie nicht Intensitäts-abhängig ist, sondern allein auf der statistischen Auswertung beruht und nur durch das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (Signal-to-Noise-Ration; SNR) beschränkt ist. Artefakte wie z.B. eine heterogene Farbstoffverteilung in Zellen oder Geweben und demzufolge unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten, die zu scheinbar unterschiedlichen Werten führen, sind damit ausgeschlossen. Die 2P-FLIM-Methode vereint alle Vorteile, die für *in vivo*-Messungen von Nöten sind und ist somit die Methode der Wahl, um in Geweben quantitative Ionenmessungen vorzunehmen. FLIM stellt hohe Ansprüche an die Detektoren und wird über hochsensible Photomultiplier-Systeme (PMT) oder EM-CCD (electron multiplying charge-coupled device) gemessen.

1.6 Tight Junctions in der Haut

Tight Junctions (TJs) sind Zell-Zellverbindungen, die sowohl funktionell als auch morphologisch im *Stratum granulosum* (SG) zu finden sind. Im *Stratum granulosum* bilden TJs sogenannte *kissing-points* aus, die durch die TJ-Proteine zweier Zellen gebildet werden und die Zellmembranen beider Zellen verbinden. Funktionelle TJs sind zusammengesetzt aus Transmembran-Proteinen und sogenannten Plaque-Proteinen. Zu den Transmembran-Proteinen gehören z.B. Proteine der Familie der Claudine (Cldn), der TAMPs (tight-junction-associated marvel proteins) sowie der JAMs (junctional adhesion molecules), die die Zellen extrazellulär miteinander verknüpfen. Im intrazellulären Raum werden die Tansmembran-Proteine an das Aktin-Zytoskelett der Zellen mit Plaque-Proteinen verankert. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind die *Zonula occludens*-Proteine ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Aijaz *et al.*, 2006; Schneeberger & Lynch, 2004) und MUPP-1 sowie Cingulin (Brandner *et al.*, 2006; Niessen, 2007) (Abbildung 1-8). Das oben beschriebene Zusammenspiel dieser extra- und intrazellulären Proteine ergibt eine funktionelle Einheit, die die bereits genannten *kissing-points* im *Stratum granulosum* ausbildet und den parazellulären Fluss von Makromolekülen

und Ionen kontrolliert (Barrierefunktion). Es wird vermutet, dass TJs darüber hinaus der Zelle Polarität verleihen, indem sie die Zellmembran in einen apikalen und basolateralen Teil unterteilen (Zaunfunktion) (Furuse *et al.*, 2002; Schneeberger & Lynch, 2004). TJs befinden sich i.d.R. apikal von Adhärenzverbindungen (adherens junctions, AJ), die neben Desmosomen für den mechanischen Zusammenhalt der Zellen untereinander verantwortlich sind. Während der Ausbildung von Zell-Zellkontakten werden zuerst AJs und anschließend TJs aufgebaut (Mertens *et al.*, 2006).



Abbildung 1-8: Übersicht des Aufbaus des Tight Junction-Komplex. Links: Typische Kissing-point Strukturen, die ringförmig die komplette Plasmamembran durchziehen. Rechts: Vergrößerung der Kissing-points mit schematischen Aufbau der Transmembran- und Plaque-Proteinen zwischen zwei benachbarten Epithelzellen. (verändert nach Quelle: http://www.nastech.com/nastech/junctions_biology).

Interessanterweise zeigen TJ-Proteine eine heterogene Verteilung innerhalb der Epidermis. So finden sich beispielsweise JAM-A und Claudin-1 in allen lebenden Schichten, wogegen Occludin, ZO-1 und Claudin-4 in den suprabasalen Schichten zu finden sind (Brandner *et al.*, 2002; Brandner *et al.*, 2006). Da die eben genannten TJ-Proteine auch außerhalb von TJ-Strukturen zu finden sind, scheinen diese Moleküle weitere Funktionen zu besitzen. Aus Zylinderepithelzellen ist bekannt, dass das TJ-Protein ZO-1 in die Regulierung der Zellproliferation involviert ist (Balda *et al.*, 2003). Darüber hinaus führt der knockdown von Cldn-1 in Keratinozyten unter bestimmten Kulturbedingungen zur gesteigerten Proliferation (De Benedetto *et al.*, 2011). Die Ausbildung von TJs ist Ca²⁺-abhängig und reversibel. Hierbei aktiviert bei Calcium-Anwesenheit E-Cadherin des Cadherinkomplexes einen Polaritätskomplex, der die Verankerung von JAM mit dem Plaque-Protein ZO-1 über aPKC vermittelt. TJs bilden sich bei Calcium-Abwesenheit aus diesem Grund nicht aus, bzw. nach Calcium-Entzug zurück. Der Beweis, dass TJs eine entscheidende Rolle für die Hautbarriere besitzen, wurde anhand der Cldn-1-Knockout Mäuse gezeigt, die am Tag der Geburt an übermäßigen Wasserverlust sterben (Furuse *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen an ausdifferenzierten Keratinozyten *in vitro* zeigten, dass die Induktion von TJs einen erhöhten transepithelialen Widerstand zur Folge hat (Helfrich *et al.*, 2007; Yuki *et al.*, 2007).

Weiter haben Tracer-Experimente an kultivierten Keratinozyten mit FITC-Dextranen verschiedener Größen gezeigt (3, 4 und 40 kDa), dass diese durch TJs gestoppt werden (Kirschner *et al.*, 2011; Mertens *et al.*, 2005). Frühere Tracer-Experimente in Haut zeigten eine Barriere für Moleküle der Größe von 557 Da (Furuse *et al.*, 2002; Kirschner *et al.*, 2010b). Messungen des parazellulären Flusses kultivierter Keratinozyten ergaben eine Barrierefunktion für Na⁺, Cl⁻ und Ca²⁺-Ionen, die sich reziprok zum transepithelialen Widerstands verhält (Kirschner *et al.*, 2013) und somit in die Regulation der oben genannten Ionen involviert sind. Ein weiterer Hinweis für das Zusammenspiel von Barriereintegrität und Ca²⁺-Ionen erbrachte der Knockdown von den TJ-Proteinen Cldn1 und ZO-1 in differenzierten Keratinozyten: Durch den Knockdown konnte eine reduzierte Barrierefunktion für Ca²⁺-Ionen (Kirschner *et al.*, 2013) nachgewiesen werden.

1.7 Atopische Dermatitis

Die Atopische Dermatitis (AD, auch Atopisches Ekzem oder Neurodermitis genannt) ist eine chronische, inflammatorische und juckende Hautkrankheit, die durch eine Vielfalt klinischer Merkmale, wie Rötungen, Schuppungen und trockene Hautläsionen zu erkennen ist (Leung & Bieber, 2003). Die Prävalenz liegt bei 10-20 Prozent im Kindesalter und beträgt im Erwachsenenalter 1-3 Prozent und ist damit eine der häufigsten Hautkrankheiten der westlichen Gesellschaft (Alanne *et al.*, 2011; Mozaffari *et al.*, 2007). Die Zahl der an Atopischer Dermatitis erkrankten Menschen stieg in den letzten drei bis vier Dekaden stark

an, was auf geänderte Umwelteinflüsse zurückzuführen sein könnte (Proksch *et al.*, 2009; Segre, 2006). Die Krankheit tritt in Schüben auf und kann, wenn sie bereits im Kindesalter auftritt, im Verlaufe der Pubertät verschwinden. Histologisch ist die AD durch eine Parakeratose (verdicktes und zellkernhaltiges *Stratum corneum*), eine Akanthose (Verdickung des *Stratum spinosums*), eine Spongiose (vergrößerter Interzellularraum des *Stratum spinosums*) und einem dermalen Infiltrat gekennzeichnet. Des Weiteren erhöht sich die Zahl der IgE-Antikörper-tragenden Mastzellen in der Epidermis, ebenso wie die serologische IgE-Antikörper-Konzentration.



Abbildung 1-9: Vergleich zwischen einer intakten (links) und einer gestörten Hautbarriere (rechts). In der gesunden Haut ist es den Antigenen nicht möglich die Hautbarriere zu überwinden und der Wasserverlust ist gering. In läsionaler Haut (rechts) ist es den Antigenen möglich durch die gestörte Barriere in Kontakt mit dendritischen Zellen (Langerhans-Zellen) zu treten und eine TH2-Antwort auszulösen. Auch ist der epidermale Wasserverlust deutlich erhöht (verändert nach Proksch *et al.*, 2009).

Der Auslöser der AD war und ist noch immer Forschungsschwerpunkt in der Dermatologie

und wurde bislang auf eine Dysfunktion des Immunsystems zurückgeführt. 2006 entdeckte eine schottische Arbeitsgruppe um McLean (2006), dass bei 20% der an AD erkrankten und untersuchten Patienten ein Gendefekt in dem Strukturprotein Filaggrin vorlag, welches für die Quervernetzung der Keratinfilamente in den Keratinozyten verantwortlich ist und einen entscheidenden Einfluss auf die Hautbarriere nimmt (Palmer et al., 2006). Gleichzeitig ist Filaggrin an der Hydratisierung der Epidermis beteiligt (Ginger et al., 2005), und sein Fehlen ist somit an der für die AD charakteristischen Austrocknung der Haut und Induzierung des Juckreizes involviert. Durch die Erkenntnis, dass ein Gendefekt die Hautbarriere beeinträchtigt, wurde zum ersten Mal die Sichtweise auf den Defekt in der Hautbarriere (inside-out-Barriere) gelenkt und die überschüssige Immunantwort als sekundäre Folge der gestörten Hautbarriere angesehen. Durch die gestörte Hautbarriere gelingt es Allergenen, wie Pollen und Bakterien deutlich öfter mit epidermalen Immunzellen in Kontakt zu treten und somit eine Immunantwort zu provozieren (Jensen et al., 2004; Proksch et al., 2008; Proksch et al., 2009) (Abbildung 1-9). Hierbei werden die Allergene von den Langerhans-Zellen erkannt und lösen eine TH₂-Immunantwort aus, die in der Inflammation der Epidermis und Dermis endet und schließlich das Ekzem induziert (Novak & Bieber, 2005). Durch die TH₂-Immunantwort wird die IgE-Antiköper-Produktion verstärkt und gleichzeitig werden TH₁-Helferzellen inhibiert, welche für die Produktion von IgG-Antikörper verantwortlich sind. Folglich dominieren IgE-Antikörper in dem inflammatorischen Areal und der IgG-Antikörper-Spiegel sinkt. Dies hat zur Folge, dass zum einem die Allergene durch die erhöhte Zahl der dendritischen Langerhans-Zellen und IgE-Antikörper detektiert werden und die Inflammationsreaktion, und damit das Ekzem, verstärken und zum anderen werden Bakterien durch die geringere Anzahl von IgG-Antikörpern weniger stark detektiert.

Da der Filaggrin-Gendefekt aber nur bei einem Teil der Patienten vorliegt, gibt es darüber hinaus noch mehr Einflussgrößen, die an der Entstehung der Atopischen Dermatitis durch einen Barrieredefekt beteiligt sein könnten. Hierbei ist es von Interesse zu erwähnen, dass man bereits in unbeteiligter Haut von Atopikern Veränderungen der Lipide (Janssens *et al.*, 2013; Janssens *et al.*, 2011; van Smeden *et al.*, 2013), Veränderungen der CE-Proteine Involucrin und Loricrin (Jensen *et al.*, 2004) und des TJ-Proteins Cldn1 (De Benedetto *et al.*, 2011) beobachtet. Für die ekzematöse Haut von Neurodermitikern wurde eine noch ausgeprägtere Veränderung für die Lipide (Janssens *et al.*, 2013) und CE-Moleküle (Jensen *et al.*, 2004) beschrieben. Eine Beschreibung für Cldn1 erfolgt in dieser Arbeit.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Haut von Säugetieren und besonders die des Menschen stellt die erste Barriere gegen Umwelteinflüsse (mechanisch oder physikalischer Art) dar. Gleichzeitig verhindert sie den unkontrollierten Wasserverlust des Körpers und ist somit für das Überleben an Land essentiell. Viele Indizien deuten darauf hin, dass Calcium an der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Epidermis und deren Barriere eine große Rolle spielt. Zum einen reguliert es in vitro die Differenzierung von Keratinozyten zum anderen ist es an der TJ-Barriere beteiligt, deren Ausbildung zumindest in vitro durch Calcium induziert wird. Darüber hinaus geht man davon aus, dass höhere Ca²⁺-Konzentrationen die Proliferation von Zellen verhindert. In Hautkrankheiten wie dem atopischen Ekzem sind Proliferation und Differenzierung der Haut verändert und die Hautbarriere ist beeinträchtigt. Bisher ist es jedoch unklar, welche Rolle Calcium in der Haut als dreidimensionalem Gewebe in vivo spielt. So vermutet man einen Calcium-Gradienten in der Haut, der die Reifung der Keratinozyten steuert und dadurch den komplexen Prozess der Differenzierung der Keratinozyten zu Korneozyten kontrolliert. Dieser Calciumgradient wurde bisher allerdings nur auf fixierten Proben beschrieben. Ziel dieser Arbeit ist es die Verteilung von epidermalen Ca²⁺-Konzentration gesunder und gestörter Haut anhand eines murinen Models der Atopischen Dermatitis zu bestimmen. Da die Atopische Dermatitis (atopisches Ekzem) in den Industrieländern eine der häufigsten Hautkrankheiten ist, wurde der Fokus auf diese Krankheit gelegt. Die Messungen der Ca²⁺-Konzentrationen sollen möglichst nah an der in vivo Situation stattfinden. Dieses wird mit der sofortigen Messung von ex vivo Proben mit der in Kapitel 1.5 beschrieben 2-PM-FLIM möglich, wobei zu Beginn der Arbeit zwei FLIM-Detektoren für deren Eignung der FLIM-Messungen in Haut und anderem Gewebe miteinander verglichen werden sollen. Weiterhin soll untersucht werden, welche Korrelationen zwischen den Parametern der Calcium-Verteilung mit Parametern des Ekzems, der Proliferations- und Differenzierungsmarkern und Tight Junction-Proteinen besteht, um eine mögliche Rolle von Calcium detaillierter zu untersuchen.

2 Material

2.1 Antikörper

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antiköper inklusive deren Verdünnung, Epitop-Demaskierung, Blockschritt der unspezifischen Bindungsstellen und Bezugsquelle. Alle primären Antikörper wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Antikörper (Spezies)	Verdünnung	Mikrowellenleistung / Puffer	Block	Bezugsquelle
Keratin 6 (Maus)	1:15	600 WATT / TEC	0,001% Trypsin 5 % Magermilch 2 % NGS 0,1 % Triton	Abcam (Cambridge, UK), <i>KatNr.: ab</i> 18586
Keratin 10 (Maus)	1:80	600 WATT / TEC	0,001 % Trypsin 2 % NGS 0,1 % Triton	Abcam (Cambridge, UK), <i>KatNr.: ab9026</i>
Keratin 14 (Maus)	1 : 150	600 WATT / TEC	0,001 % Trypsin DAKO-Block	Quartett (Berlin, Deutschland), KatNr.: 2110502701
Claudin-1 (Kaninchen)	1 : 5000	360 WATT / TEC	0,001 % Trypsin DAKO	Zymed / life technologies (Carlsbad, CA, USA), <i>KatNr.:</i> 71-7800
Claudin-4 (Kaninchen)	1:50	600 WATT / TEC	0,001 % Trypsin 2 % NGS 0,1 % Triton	Zymed / life technologies (Carlsbad, CA, USA), <i>KatNr.:</i> 18-7341
Filaggrin (Maus)	1 : 150	600 WATT / TEC	0,001 % Trypsin DAKO-Block	Biomedical Technologies Inc. (Stoughton, MA, USA), Clone BT-576
Involucrin (Kaninchen)	1 : 100	600 WATT / TEC	0,0015 % Trypsin DAKO-Block	Abcam (Cambridge, UK), <i>KatNr.: ab24722</i>
Ki-67 (Kaninchen)	1:350	600 WATT / Citratpuffer	3 % BSA	Abcam (Cambridge, UK), <i>KatNr.: ab1558</i>
Loricrin	1:8000	600 WATT / TEC	0,001 %	Covance

(Kaninchen)			Trypsin 2 % NGS 0,1 % Triton	(Princeton, USA), <i>KatNr.:</i> <i>PRB-145P-100</i>
ZO-1 (Kaninchen)	1 : 500	360 WATT / TEC	0,001 % Trypsin 5 % Magermilch 2 % NGS 0,1 % Triton	Zymed / life technologies (Carlsbad, CA, USA), <i>KatNr.:</i> 61-7300

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die sekundären Antikörper von der Firma Molecular Probes (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Diese waren mit dem Fluorochrom Alexa 594 (Verdünnung 1:1250), Alexa 488 (1:600) oder Cy3 (1:600) gekoppelt. Als Negativkontrollen dienten die entsprechenden Antikörper-Isotypen von der Firma DAKO (Hamburg, Deutschland).

2.2 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Baker (Deventer), Bio-Rad (München), Geyer (Hamburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen und in analytischem Reinheitsgrad eingesetzt. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden in *Aqua bidest*. angesetzt und wenn nötig mithilfe von 25 % HCl der pH-Wert justiert. Alle Lösungen die in der Zellkultur angewandt wurden, sind mit sterilem PBS der Firma Biochrom (Berlin) hergestellt worden.

2.3 Kits

Zur Bestimmung der serologischen IgE- & IgE-Ovalbumin-Antikörperkonzentrationen des nach Versuchsende entnommenen Mäusebluts wurden folgende Kits verwendet:

- Mouse Total IgE (IgEa and IgEb) Detection Kit (Chondrex, Redmond, USA)
- Mouse Serum Anti-OVA IgE Antibody Assay Kit (Chondrex, Redmond, USA)

2.4 Tiere und Gewebe

Alle Mäuse, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammten aus der Mauslinie Balb/c (Charles River, Sulzfeld) und waren zu Versuchsbeginn 5 – 6 Wochen alt und ausschließlich weiblichen Geschlechts. Die amtliche Tierversuchsgenehmigung der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz - Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen in Hamburg lautet FL 109/09. Das porcine *ex vivo* Hautmodell entstammte aus Hautbiopsien der Plicae von Schweineohren von für den Verzehr geschlachteten Schweinen (*Sus scrofa domestica*, Kreuzung zwischen Yorkshireschwein und deutschem Edelschwein). Es handelt sich somit um keinen Tierversuch. Die Ohren stammten aus der Schlachterei Hoose (22941 Hammoor), wobei zwischen der Schlachtung und Anlieferung der Schweineohren in das Institut i.d.R. nicht mehr als 3 Stunden vergangen waren.

2.5 Software

Für die Bildaquisition und Berechnung der Fluoreszenzlebensdauern des 2-PM-Systems wurde die Software Imspector Pro (Ver. 1.79) der Firma LaVision Biotec (Bielefeld) verwendet. Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit der Software Openlab 4.0.9 (Improvision, Cobentry, UK) getätigt. Die weitere Analyse der Daten und deren Aufbereitung wurden mit der Opensource Software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) vorgenommen.

2.6 Statistik

In dem Statistik Programm SPSS wurden gemischte Modelle gerechnet, um die Abhängigkeitsstrukturen geeignet zu berücksichtigen. Kategoriale Variablen, wie Filaggrin, Keratin 6 und ZO-1 wurden in der Software SAS in einem verallgemeinerten, linearen gemischten Modell (logistische Regression) gerechnet.

2.7 Zellkulturmaterialien

Die allgemeinen Zellkulturmaterialen stammten von der Firma Falcon/Becton-Dickinson (Heidelberg). Fötales Kälberserum wurde von der Firma PAA (Cölbe) bezogen. Für die Kultivierung der HaCat-Linie wurde das DMEM-Medium der Firma Biochrom (Berlin) verwendet und mit 10 % FCS, Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin supplementiert (Biochrom, Berlin).

2.8 Zellkultur

Die aus spontan immortalisierten Keratinozyten stammende HaCat-Zelllinie wurde freundlicherweise von dem Labor von Professor Fusenig aus Heidelberg zur Verfügung gestellt.

3 Methoden

3.1 Atopische Dermatitis – Mausmodell (AID)

Als Atopisches Dermatitis Mausmodell wurde das in der Gruppe von PD Dr. Eva Peters etablierte Mausmodell (Pavlovic *et al.*, 2008) verwendet, welches auf der Sensibilisierung der Tiere gegen das Hühnereiweiß Ovalbumin basiert. Dabei werden an den Tieren zwei zeitlich getrennte systemische Sensibilisierungsinjektionen gegen Ovalbumin vorgenommen. Anschließend wird an einem gewünschten Hautareal durch eine lokale intradermale Injektion des Allergens Ovalbumin eine Immunreaktion verursacht, die die Ausbildung eines Ekzems nach sich zieht. Da es sich bei diesem Mausmodell um ein auf einer allergischen Reaktion beruhendes Modell der Atopischen Dermatits handelt, wird dieses Modell AlD (Atopic Dermatits like allergic Dermatitis) genannt.



Abbildung 3-1: Übersicht der Behandlungsprozedur des AlD-Modells. Bis zu den farbigen Kästchen ist die Behandlung identisch und ändert sich erst durch die Anzahl der durchgeführten Provokationen (Grün: einfache Provokation, Rot: 3-fache Provokation).

3.1.1	Sensibilisierung	der Mäuse	gegen Ovalbumin
-------	------------------	-----------	-----------------

Tahalla 2. Ansatz c	lar Sancihiliciarunge	löcung für die syst	emische Annlikation (les Antigens Ovalhumin
	ici ochonomorungo	iosung iui uic syst	спизене дррикацон (aca Antigena Ovalbumm

	2 ml Ansatz
Ovalbumin Grade VI (0,4 mg/ml in PBS)	1 ml
Alum-Inject (40 mg/ml in H_20)	1 ml

 Tabelle 3: Ansatz des Mäuse-Narkotikums

	2 ml Ansatz
Ketamin (50 mg/ml)	1,2 ml
Xylazin (2 %)	0,8 ml
Isotonische Kochsalzlsg. (0,9 %)	8 ml

100 μl der Sensibilisierungslösung (s. Tabelle 2) wurden am ersten Tag den Balb/c-Mäusen mit einer intraperitonealen Injektion verabreicht. Die Prozedur wurde an Tag 14 wiederholt, um den Effekt der Sensibilisierung zu verstärken. An Tag 18 wurde die Maus mit einer intraperitonealen Injektion einer Kombination aus Xylazin und Ketamin narkotisiert (10 μl Narkosemittel/g Körpergewicht, s. Tabelle 3) und anschließend die Flanken der Mäuse mit einem Langhaarschneider (Favorita II, Aesculap) grob und abschließend mit einem handelsüblichen Elektrorasierer (Braun) glatt rasiert (s. Abbildung 3-1).

3.1.2 Induzierung eines Ekzems durch intradermale Ovalbumin-Injektion

	2 ml Ansatz
Ovalbumin Grade V (1 mg/ml in PBS)	0,5 ml
PBS	0,5 ml

An Tag 21 wurde in die Flanke der Maus eine intradermale Injektion gesetzt, um durch das Antigen Ovalbumin eine inflammatorische Immunantwort zu provozieren. Die Maus wurde über ein Wärmeakku (37°C) vor Auskühlung geschützt und mit einer intraperitonealen Injektion narkotisiert. Weiter wurden 100 μl einer Provokationslösung (s. Tabelle 4) mittels einer Insulinspritze in das zu provozierende Hautareal injiziert. Die erfolgreiche intradermale Platzierung der Injektion ließ sich durch typische "Quaddel-Bildung" überprüfen (s. Abbildung 3-2), die bei zu tiefer Injektion außerhalb dermalen Gewebes nicht auftritt. Pro Maus wurden jeweils zwei Areale zu 100 μl mit der Provokationslösung auf jeder Flanke oberhalb des Oberschenkels provoziert und die behandelten Areale mit einem permanenten Marker punktförmig um das Areal markiert.



Abbildung 3-2: Balb/c Maus mit deutlicher Quaddel-Bildung (Pfeil) nach intradermaler Injektion.

3.1.3 Induzierung eines Ekzems durch dreimalige intradermale Ovalbumin-Injektionen

Das Behandlungsschema gleicht dem der einmaligen Provokation mittels intradermaler Provokationsinjektion. Jedoch wird die Provokationsinjektion an Tag 25 wiederholt, um den Schweregrad der Inflammation, respektive des Ekzems, zu verstärken. Die Markierung der behandelten Areale wurde bei jeder weiteren intradermalen Provokationsinjektion erneuert, um die Wiedererkennung des behandelten Areals zu gewährleisten, das bei späterer Exzision entfernt wurde.

3.1.4 Behandlung der Haut mit Calcium-Green-5N

Um den Calcium-Gehalt in der murinen Epidermis messbar zu machen, wurden sowohl die

provozierten als auch die unbehandelten Hautareale mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff Calcium-Green-5N (CG5N) behandelt. Die Farbstoffkonzentration wurde in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) auf 100 μ M eingestellt und jeweils 30 μ l auf zwei Hautareale topisch appliziert. Die Farbstoffbehandlung fand 18 h vor Entnahme der Hautbiopsie statt. Sowohl auf makroskopischen als auch auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte kein Unterschied zwischen DMSO- und unbehandelter Haut 18 h nach der Farbstoffapplikation gefunden werden (Behne *et al.*, 2010).

3.1.5 Messung der Barriereintegrität durch Bestimmung des Transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) und der Hydratisierung des *Stratum corneums*

Am Tag der Messung der Hautproben wird vor der Hautentnahme die Bestimmung des transepidermalen Wasserverlusts und der Hydratisierung des *Stratum corneums* vorgenommen. Das hierfür verwendete Gerät von Courage & Khazaka (TEM 300, Courage & Khazaka, Köln) ist mit den Sonden Tewameter® TM 300 (TEWL) und Corneometer® CM 825 (Hydratisierung des SCs) ausgestattet. Hierzu wird die Maus mit einer intraperitonealen Injektion der Narkoselösung (s. Kapitel 3.1.2) narkotisiert und in einen klimatisierten Raum überführt, in der die Messungen bei gleichbleibender Temperatur durchgeführt wurden. Um die Maus vor Auskühlung zu schützen, wurde ein Wärmeakku (37°C) benutzt. Für die Akklimatisierung der Maus, bzw. der Maushaut an die Umgebungstemperatur und Raumfeuchtigkeit, wurde die Messung der beiden Parameter erst nach 15 Minuten gestartet.

3.1.5.1 Messung des Transepithelialen Wasserverlusts (TEWL)

Die Mess-Sonde Tewameter[®] TM 300 wurde zum Zeitpunkt der Akklimatisierung ebenfalls auf den Wärmeakku platziert, um den Temperaturunterschied bei Messbeginn von Maus und Mess-Sonde so gering wie möglich zu halten. Nach der Akklimatisierungsphase wurde die Sonde auf das Kontroll- und anschließend auf das Ovalbumin-behandelte Hautareal gesetzt, wobei jeweils eine Messung ca. 120 Sekunden in Anspruch nahm (beide Areale waren mit CG5N behandelt). Während der Messung wurde die Sonde nicht mehr bewegt. Für die Auswertung der Messdaten wurden nur die Werte in die Auswertung einbezogen, in der die zu Messbeginn normalen Schwankungen nicht mehr vorhandenen waren (ab ca. 30 – 40 s).

3.1.5.2 Messungen der Hydratisierung des Stratum corneums

Um die Hydratisierung des *Stratum corneums* zu messen, wurde die Mess-Sonde Corneometer[®] CM 825 auf die zuvor für den TEWL gemessenen Hautareale gesetzt und jeweils drei kurz aufeinander folgende Messungen durchgeführt. Für die Datenanalyse wurde der Mittelwert der Messwerte benutzt.

3.1.6 Haut- und Blutentnahme

3.1.6.1 Hautentnahme und Fixierung

Nach Abschluss der Messungen der Hydratisierung des *Stratum corneums* und des TEWLs wurde die noch immer narkotisierte Maus umgehend durch zervikale Dislokation getötet. Sowohl die Kontroll- als auch die ekzematösen Hautareale, die mit CG5N behandelt worden waren, wurden entnommen. Dabei wurde während der gesamten Prozedur besonders darauf geachtet, die Hautproben nur an einer Stelle mit der Pinzette zu berühren, um mechanische Einflüsse auf die Hautprobe so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurden beide Hautproben auf einen Tropfen PBS (calciumfrei) in eine Petrischale gelegt und dunkel bei 4°C bis zur Messung gelagert, die ca. 30 min nach der Tötung der Maus durchgeführt wurde. Für spätere histologische Untersuchungen wurde das zweite provozierte Hautareal so exzidiert, dass ein vergleichbar großes unbehandeltes Hautareal an der provozierten Haut verblieb. In einem Klappprozess wurden beide Areale mit zugewandter Hautoberfläche (Klapppräparat) in flüssigen Stickstoff für die spätere Anfertigung von Gefrierschnitten eingefroren. Die behandelten als auch die Kontrollareale auf der anderen Flanke der Maus wurden für die Herstellung von Paraffinschnitten benutzt. Hierzu wurden ebenfalls die Hautareale vorsichtig exzidiert und bei 4°C über Nacht in 4 % Formaldehydlösung (gepuffert) fixiert. Anschließend sind die Hautproben über einen Einbettautomaten Citadel 2000 (Shandon, MA, USA) dehydratisiert und paraffiniert worden (s. Tabelle 5):

Station	Reagenz	Dauer [h]
1	Formaldehyd (4 %)	1
2	EtOH (70 %)	1
3	EtOH (80 %)	1
4	EtOH (96 %)	1
5	EtOH (96 %)	1
6	EtOH (100 %)	1
7	EtOH (100 %)	1
8	Хую	2
9	Хую	2
10	Хую	2
11	Paraffin	2
12	Paraffin	2

Tabelle 5: Übersicht über die Inkubationszeiten und Reagenzien der Paraffinierung der Maushaut.

3.1.6.2 Blutentnahme und Serumgewinnung

Nach der Exzision der Hautareale für die 2-Photonenmikroskopie und Histologie wurde die Maus auf einem Korkbrett fixiert, der Thorax der Maus eröffnet und durch den rechten Ventrikel ca. 0,6 - 0,8 ml Blut durch eine Kanüle (27G) entnommen. Um die Blutgerinnung zu hemmen, wurde die Spritze (1 ml Gesamtvolumen) vor Blutentnahme mit einer 5 % EDTA-Lösung aufgezogen und entleert, wobei das verbleibende Restvolumen EDTA ausreichte, um die Blutgerinnung zu verhindern. Das Blut ist anschließend in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 4°C und 300 g für 10 min abzentrifugiert worden. Das nach der Zentrifugation oben im Gefäß befindlich Serum wurde abpippetiert und bei -80 °C für die später erfolgende IgE- und IgE-OVA-Antikörperbestimmung eingefroren.
3.1.6.3 Bestimmung der serologischen IgE- und OVA-spezifischen IgE-Antikörperkonzentrationen mittels ELISA

Über die kommerziell erhältlichen ELISA-Kits der Firma Chondrex (Redmond, USA) wurde zuerst die Gesamt-IgE-Antikörperkonzentration des Mäuseserums und anschließend die Menge der im Serum enthaltenen Antikörper, die spezifisch gegen das Antigen Ovalbumin gerichtet sind, bestimmt. Beide Kits beruhen auf der ELISA-Sandwich-Methode. Als Capture-Antikörper wurde ein monoklonaler IgE-Antikörper (Ratte – Anti-Maus, Klon 77-1) bei 4°C ü.N. auf eine 96-Well-Platte gekoppelt. Daraufhin wurde das auf Eis aufgetaute Serum 1:200 (Gesamt-IgE) bzw. 1:20 (IgE-OVA) in dem Kit-Probenpuffer verdünnt und 100 µl dieser Lösung in das 96-Well pipettiert und ü.N. bei 4°C inkubiert. Bis auf die Verdünnung der Proben sind beide Protokolle der IgE und IgE-OVA bis hierher identisch. Der weitere Verlauf ist jedoch unterschiedlich und wird in der folgenden Tabellenform dargestellt:

Gesamt IgE	IgE-OVA
 Waschschritt: 3x mit 300 μl 	 Waschschritt: 3x mit 300 μl
Waschpuffer	Waschpuffer
 Kopplung des biotinylierten 	Kopplung des biotinylierten
Detektionsantikörpers (Klon 345-2) mit	Ovalbumins mit 100 μl (1 μg/ml) für 90
100 μl (0,1 mg/ml) für 1 h bei RT	min bei RT
 Waschschritt: 3x mit 300 μl 	 Waschschritt: 3x mit 300 μl
Waschpuffer	Waschpuffer
 Kopplung des biotinylierten IgE- 	Kopplung des biotinylierten
Antikörpers mit Streptavidin-	Ovalbumins mit Streptavidin-
Peroxidase-Komplex: 100 μl pro Well	Peroxidase-Komplex: 100 μl pro Well
(50 ng/ml) für 1 h bei RT	(50 ng/ml) für 1 h bei RT
 Waschschritt: 3x mit 300 μl 	 Waschschritt: 3x mit 300 μl
Waschpuffer	Waschpuffer
Hinzufügen des Farbstoffes der von der	Hinzufügen des Farbstoffes der von der
Peroxidase umgesetzt wird: 100 μl	Peroxidase umgesetzt wird: 100 μl
TMB-Lösung pro Well (1 mM) für 25	TMB-Lösung pro Well (1 mM) für 30
min bei RT	min bei RT
Abstoppen der Peroxidaseaktivität	Abstoppen der Peroxidaseaktivität
durch 50 µl Schwefelsäure (2 M)	durch 50 µl Schwefelsäure (2 M)
Detektion der OD am Magellan-Plate-	Detektion der OD am Magellan-Plate-
Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz):	Reader (Tecan, Männedorf, Schweiz):

Tabelle 6: ELISA-Protokoll für die IgE- und IgE-OVA-Antikörperbestimmung.

Detektierte Wellenlänge 450 nm,	Detektierte Wellenlänge 450 nm,
Referenzwellenlänge 620 nm	Referenzwellenlänge 620 nm

3.1.7 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Hautproben, die in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert wurden, sind in einem Kryostaten LM 3050 (Leica, Wetzlar) bei einer Blocktemperatur von -24°C, einer Kammertemperatur von -21°C mit einer Schnittstärke von 6 µm geschnitten worden. Die Schnitte wurden auf Superfrost/Plus-Objektträger (Assitent, Sondheim) übertragen und mindestens 30 min bei RT luftgetrocknet. Die anschließende Fixierung erfolgte entweder in -20°C-kaltem Aceton für 10 min oder für 30 min bei 4°C in 95% EtOH mit anschließender 1minütiger Inkubation in Aceton bei RT. Die so gewonnenen Gefrierschnitte sind anschließend direkt verwendet worden oder wurden bei -20°C bis zur späteren Benutzung gelagert.

3.1.8 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die zuvor in Paraffin eingebetteten Hautproben wurden mit einem Mikrotom RM 2165 (Leica, Wetzlar) mit einer Schnittstärke von 5 µm geschnitten und in ein mit destilliertem Wasser gefülltes und auf 46°C erwärmtes Schnittstreckerbad 1025 (GFL, Burgwedel) überführt. In regelmäßigen Abständen wurde der zu schneidende Paraffinblock auf einer Kälteplatte TBS 88.420 (Medite, Burgdorf) bei -10°C gelegt, um die Ausdehnung des Blockes bei RT zu verlangsamen und somit eine durchgängig gleichmäßige Schnittstärke zu gewährleisten. Anschließend sind die Schnitte auf einen Superfrost/Plus-Objektträger (Assitent, Sondheim) überführt und für mindestens 1 h auf einer Heizplatte mit einer Temperatur von 48°C getrocknet und abschließend in einem Wärmeschrank bei 60 °C ü.N. inkubiert worden.

3.1.8.1 Entparaffinierung der Paraffinschnitte

Um die Paraffinschnitte für die HE- oder immunhistochemischen Färbungen verwenden zu

können, müssen diese entparaffiniert und rehydratisiert werden. Hierzu werden die Paraffinschnitte mit dem in der folgenden Tabelle zu entnehmenden Protokoll behandelt.

Reagenz	Zeit [min]
Xylol I	10
Xylol II	10
EtOH absolut	3
EtOH absolut	3
EtOH (96 %)	1
EtOH (80 %)	1
Aqua bidest.	kurz waschen

Tabelle 7: Zeit- und Behandlungsschema für das Entparaffinieren/Rehydratisieren von Paraffinschnitten.

3.1.9 HE-Färbungen von Gefrier- und Paraffinschnitten

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wird in der Histologie verwendet um wichtige Strukturen des Gewebes so hervorzuheben, dass diese voneinander unterscheidbar sind. Bei der HE-Färbung werden Kerne blau angefärbt. Das Zytoplasma und Kollagenfasern erhalten eine rote Färbung, wogegen elastische Fasern blass-rot oder gar nicht angefärbt werden (Lüllmann-Rauch, 2006).

Reagenz	Zeit [min]				
Hämalaunlösung nach Mayer (filtriert)	10				
Leitungswasser fließend	10				
Aqua bidest.	3x tauchen				
Eosin G (wässrig, 0,5 %)	1				
Aqua bidest.	3x tauchen				
EtOH (70 %)	kurz tauchen				
EtOH (80 %)	kurz tauchen				
EtOH (96 %)	kurz tauchen				
EtOH (99 %)	kurz tauchen				
EtOH (99 %)	5				
Хую	10				
Хую	10				

Tabelle 8: Zeit- und Behandlungsschema der HE-Färbung von Gefrier- und Paraffinschnitten.

Nach der letzten Differenzierung in Xylol wird der Schnitt mit drei Tropfen Eukitt beschickt und mit einem Deckglas eingedeckt. Nach einer Trocknungsphase ü.N. ist das Eukitt ausgehärtet und der Schnitt bereit zur mikroskopischen Begutachtung.

3.2 Immunhistochemische Färbungen

Proteine können in Geweben und Zellen durch immunhistochemische Färbung detektiert werden. Hierbei werden fluoreszenzfarbstoffmarkierte Antikörper benutzt. Der Antikörper besitzt eine Affinität zu einem bestimmten Epitop des Antigens und bildet im Idealfall eine spezifische Verbindung mit dem Epitop aus. Um das durch die Formaldehydfixierung verdeckte Epitop auf den Paraffinschnitten zu demaskieren, wurden die Schnitte, je nach Antiköper, mit unterschiedlichen Puffern und Mikrowellenleistungen behandelt. Um die Spezifität der primären Antikörper zu erhöhen, wurden die Schnitte vor der Antiköpermarkierung einer Kombination mit aus Blockierungsund Permeabilisierungslösung behandelt, die je nach Primärantikörper variiert. Anschließend wird der gewünschte Antikörper auf die Probe gegeben, der durch seine spezifische

Affinität zu einem Epitop, die unspezifischen belegten Proteine verdrängt und die zu detektierenden Epitope markiert. Die unterschiedlichen Behandlungen und Antikörperkonzentrationen sind in der Tabelle 1 (s. Kapitel 2.1) aufgeführt. Die sekundären Antikörper wurden von der Firma Molecular Probes (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Diese waren mit dem Fluorochrom Alexa 594 (Verdünnung 1:1250), Alexa 488 (1:600) oder Cy3 (1:600) gekoppelt. Als Negativkontrollen dienten die entsprechenden Antikörper-Isotypen von der Firma DAKO (Hamburg, Deutschland), welche mit derselben Konzentration der Primärantikörper eingesetzt wurden.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Porcines ex vivo Hautmodell (Patent-Nr. DE10317400)

Reagenzien	100 ml Ansatz
DMEM	99 ml
FCS	2 ml
P/S (10.000 U/ml)	1 ml
Hydrocortison (5 mg/ml)	400 μl

 Tabelle 9: Zusammensetzung des Kulturmediums des porcinen ex vivo Hautmodells.

Die Schweineohren wurden unter fließendem Wasser gesäubert und die Haare der Ohr-Innenfläche mit einer Schere befreit. Eine mit Sterillium getränkte Mullbinde wurde für 10 Minuten auf die Ohr-Innenfläche gelegt. Anschließend wurden die Ohren mit steriler Kochsalzlösung abgespült. Unter einer sterilen Werkbank wurden entlang der Plicae 6 mm Stanzen entnommen und anschließend in eine mit Gaze-Stücken beschickten 6 cm Petrischale gesetzt, so dass die Dermis mit Medium in Kontakt war, aber die Epidermis trocken blieb. Die Hautmodelle wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

3.3.2 Kultivierung von HaCat-Zellen

Tabelle 10: Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für HaCat-Zellen.

Reagenzien	100 ml Ansatz
DMEM	87 ml
FCS	10 ml
L-Glutamin (200 mM)	2 ml
P/S (10.000 U/ml)	1 ml

Tabelle 11: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums für HaCat-Zellen (1,8 mM Calcium).

Reagenzien	100 ml Ansatz
HaCat-Kultivierungsmedium	100 ml
CaCl ₂ (500 mM, steril, Promocell)	360 μl

Die adhärent wachsenden HaCat-Zellen wurden in Petrischalen in Kultivierungsmedium (s. Tabelle 10) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 70% erreichen, wurden sie in einer 0,25% / 0,02% EDTA Lösung 5 min bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert, anschließend mithilfe einer Pasteurpipette vom Boden der Petrischale gelöst und in eine 10% FCS-Lösung überführt, um das Trypsin zu inaktivieren. Anschließend wird die Zellsuspension abzentrifugiert (5 min, 800 x g) und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen in einer Konzentration von 0,6 x 10^6 – 1 x 10^6 Zellen/ml ausgesät und kultiviert. Dreimal in der Woche wurde das Kultivierungsmedium mit frischem Kulturmedium ersetzt.

3.4 Mikroskopie

FLIM-Messungen wurden mit einem speziell angepassten Setup der Firma LaVision-Biotec (Bielefeld) durchgeführt, das auf dem aufrechten Olypmus BX 51 IS (Hamburg) basiert. Das Mikroskop wird durch einen gepulsten Ti:Sa-Laser gespeist (Fa. Spectra-Physics - MaiTai, durchstimmbar von 700 nm – 960 nm, 100 fs Pulsbreite, 80 MHz Repititionsrate) und über einen kommerziell verfügbaren Strahlenteiler mit integriertem Scan-Kopf (TrimScope, LaVision-Biotec, Bielefeld) in das Mikroskop eingekoppelt. Über den Strahlenteiler besteht die Möglichkeit den Laser als Einzelstrahl oder 2, 4, 8, 16, 32 oder 64 Strahlen zu generieren und in das Mikroskop zu lenken. Der Gesamtaufbau des Systems ist in Abbildung 3-3 zu sehen.



Abbildung 3-3: Aufbau des 2-Photonen-Systems mit Detektoren und optischen Substraten. Oben: Schematischer Aufbau; Abkürzungen: DM: Dichroitischer Spiegel, SL: Scannerlinse, TL: Tubuslinse, F: Bandpass-Filter, PMT: Photomultiplier, PicoStar(GOI: gated optical intensifier), M: Spiegel (aus (Rinnenthal *et al.*, 2013). **Unten:** Foto des 2-Photonensystems.

3.4.1 FLIM-Detektorenvergleich

3.4.1.1 Time-Correlated Single-Photon Counter – Detektor (TCSPC)

Der im Einzelstrahl-Modus betriebene TCSPC (FLIM-x₁₆, LaVision-Biotec, Bielefeld) besteht aus einem Multianoden-PMT, gefolgt von analoger Elektronik, deren Signale anschließend in einer Doppelgruppe von parallel geschalteten Konvertersystemen digitalisiert und einer Detektionszeit und Signalstärke zugeordnet werden. Die digitalen Informationen aus Zeit und Signal werden anschließend in einem Histogramm-Modul zusammengefasst und ausgegeben. Diese Methode wird auch "Time-Domain-FLIM" bezeichnet. Das Besondere an diesem System ist die Geschwindigkeit, mit der das Signal bzw. die Emissionsphotonen aus einem einzelnen Messpunkt detektiert und verarbeitet werden. Der Detektor erreicht dabei eine durchschnittliche Zählrate von 80 Mhz und hat eine "Totzeit" von nur 5,5 ns. Dadurch ist der Detektor in der Lage, alle Laserpulse (80 Mhz, entspricht alle 12,5 ns einen Laserpuls) zu verarbeiten und die detektierten Emissionsphotonen in Hinblick auf den Laserpuls, bzw. dessen Triggersignal, zeitlich zuzuordnen. Mit diesen Informationen generiert der TCSPC ein Histogramm aus Signalstärke und Zeit, mit dessen Hilfe die Lebensdauer eines Fluorophors bestimmt werden kann (Abbildung 3-4).



Abbildung 3-4: Schematische Signalverarbeitung des TCSPC: Fluoreszenzabklingkurve wird in Histogrammform dargestellt (schwarze Linien). Anschließend kann per Software ein Fit (rot) über das Histogramm gelegt werden.

3.4.1.2 PicoStar (Multibeam-FLIM-Detektor)

Die PicoStar wird, im Gegensatz zum TCSPC, im Multistrahl-Modus verwendet. Die Probe wird nicht Punkt-für-Punkt, sondern über einen multifocales-Strahlensystem gescannt. Die Fluoreszenzphotonen treffen auf die Photokathode der PicoStar. Die erzeugten Photoelektronen werden durch ein dahinterliegendes "multi channel plate" (MCP) beschleunigt, wenn dort wird eine Spannung angelegt. Hinter dem MCP treffen die so beschleunigten Photoelektronen auf einen Phosphorschirm und werden erneut zu Photonen transformiert. Diese Photonen werden durch eine CCD-Kamera detektiert. Der Zeitpunkt des Anlegens und die Dauer der Spannung des MCP (200 bis 1000 ps) sind variabel und werden durch den Laserpuls getriggert. Das Spannungsfenster (gate) wird nach jedem Laserpuls in der Zeitachse verschoben und somit die Fluoreszenzphotonen zu einem späteren Zeitpunkt erfasst. Dadurch kann die exponentiell abklingende Fluoreszenzkurve variabel interpoliert und genau bestimmt werden (Abbildung 3-5).



Abbildung 3-5: Schematische Signalverarbeitung der PicoStar: Fluoreszenzabklingkurve wird durch mehrere variabel gesetzte Spannungsfenster (gate1 & 2) innerhalb eines Laserpulses interpoliert und anschließend gefittet (rot).

3.4.1.3 Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer

Die Berechnung der Lebensdauer Tau (τ) wurde mit der Analysesoftware Imspector Pro 1.79 (La Vision Biotec, Bielefeld) berechnet. Folgende Formel wurde für beide Detektoren zu Berechnung von τ benutzt:

$$I(t) = I(0)e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Formel 1 : I = Fluoreszenzintensität, I(0) = Fluoreszenzintensität zu t₀, t = Zeit, τ = mittlere Lebensdauer.

3.4.2 FLIM-Kalibrierung von Calcium Green-5N (CG5N)

Für die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer von CG5N in Anwesenheit unterschiedlicher Ca²⁺-Konzentrationen wurden kommerziell verfügbare Calcium-Kalibrierungskits in folgenden Ca²⁺-Konzentrationen (μ M) verwendet:

0	0,038	0,065	0,1	0,15	0,225	0,358	0,602	1,35	2,85	5	10	20	30	50
---	-------	-------	-----	------	-------	-------	-------	------	------	---	----	----	----	----

Die Messungen wurden in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt und anschließend sind die gemessen Werte in OriginPro (OriginLab, Northampton, MA) gemittelt und mit einem Hill-Algorithmus gefittet worden.

3.4.3 Evaluation des Brechungsindex (n) in muriner Haut

Um den Brechungsindex muriner Haut zu bestimmen wurde eine exzidierte Hautprobe in einer 50 µM Fluorescein-DermaLife K Lösung bei 4°C ü.N. inkubiert, so dass Dermis und Epidermis mit der Lösung Kontakt hatten. Die anschließende Mikroskopie wurde mit der Anregungswellenlänge von 770 nm durchgeführt und Emissionsphotonen wurden durch einen Bandpass-Filter von 510-50 nm geleitet, bevor sie auf den TCSPC trafen. Die mit Fluorescein gefärbte Maushaut wurde an jeweils drei verschiedenen Lokalisationen vermessen, wobei die räumlichen Abstände der einzelnen Messungen möglichst weit voneinander entfernt gewählt wurden, um ein repräsentativeres Ergebnis zu erzielen. Die FLIM-Messungen wurden mit identischer Auflösung von 100 x 100 μ m² (486 x 486 Pixel) und der gleichen Schrittweite in der Z-Achse (1 μ m), bis in eine Tiefe von 25 μ m, durchgeführt. Anschließend wurde aus den Intensitätsbildern eine ROI (region of interest) festgelegt und auf die FLIM-Bilder übertragen, über deren Fläche die mittlere Fluoreszenzlebensdauer bestimmt wurde. Die Formel für die Berechnung des Brechungsindex aus der ermittelten Lebensdauer beruht auf der Strickler-Berg Formel (Strickler & Berg, 1962), die für Farbstoffe mit hoher Quanteneffizienz in einer vereinfachten Form gültig ist (Hanson *et al.*, 2002; Niesner *et al.*, 2005):

$$\frac{\tau_{Haut}}{\tau_{L\ddot{o}sung}} = \frac{(n_{L\ddot{o}sung})^2}{(n_{Haut})^2}$$

Formel 2: Formel zur Brechung des Brechungsindex der Haut. τ_{Haut} = gemessene Lebensdauer von Fluorescein in der Haut, $\tau_{Lösung}$ = gemessene Lebensdauer von Fluorescein in wässriger Lösung, n_{Haut} = Brechungsindex der Haut, $n_{Lösung}$ = Brechungsindex der wässrigen Lösung.

3.4.4 Bestimmung der Punktspreizfunktion der FLIM-Detektoren

Die PSF (Punktspreizfunktion) gibt darüber Aufschluss, wie gut die Abbildung eines idealisierten Körpers durch ein Mikroskop ist und gibt die Untergrenze an, in der ein Objekt als Einzelnes, sowohl in X-, Y- und Z-Achse, aufgelöst werden kann. Je kleiner die PSF, desto besser ist die Auflösung. Für die Messungen wurde ein 2 %iges Agarose-Gel verwendet, in das Polystyrol Beads (200 nm Durchmesser, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) beigemengt wurden, die bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm Photonen mit 515 nm emittieren. Die Fluoreszenz der Beads wurde mit dem TCSPC und der PicoStar durch einen Interferenzfilter von 528/38 nm detektiert. Für die Messungen beider Detektoren wurde ein Linienprofil sowohl in XY- als auch in der XZ-Achse des Beads gelegt und die Daten zur weiteren Statistikanalyse in OriginPro (OriginLab, Northampton, MA) exportiert und ausgewertet (Abbildung 3-6).



Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF: Bei der Hälfte der Maximalintensität $(1/2*f_{max})$ der Fluoreszenz wird die Breite des Profils gemessen (Halbwertsbreite). X₁: Startwert der Profilmessung, X₂: Endpunkt der Profilmessungen (Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Halbwertsbreite).

3.4.5 Tiefenabhängiges Signal-zu-Rausch-Verhältnis und maximale FLIM-Messtiefe

Ein wichtiger Bestandteil der 2P-Mikroskopie sind Tiefenmessungen in Geweben, da genau hier die Vorteile der 2-Photonenanregung liegen. Hierfür ist es notwendig, die Maximalmesstiefe für die Intensität und für das FLIM-Signal zu bestimmen. Dazu wird für die Intensität das Signal-zu-Rauschen (SNR) Verhältnis gemessen. Das SNR-Verhältnis für Intensitätsmessungen wird über die Formel

$$SNR = \frac{Signal}{Noise}$$

Formel 3: Formel zur Berechnung des Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR). Signal: Anzahl der detektierten Photonen, Noise: Grundrauschen der Elektronik des Detektors.

berechnet. Erreicht das SNR-Verhältnis den Wert 1, so ist das Signal gleich dem Rauschen und die Maximalmesstiefe ist erreicht. In der praktischen Messung wird dabei ein Bereich außerhalb der Probe gewählt (meist oberhalb der Probe) und dessen Intensitätswert ermittelt. Dieser Wert wird dem Rauschen, also dem Wert gleichgesetzt, in dem der Detektor nicht mehr das Signal vom Grundrauschen unterscheiden kann. Für die SNR-Messungen wurde zum einen ein nicht-homogenes, streuendes Gewebe, d.h. das *ex vivo* Hautmodell (Kapitel 3.3.1), und zum anderen ein homogenes, nicht-streuendes Gewebe, d.h. *Thy1*-Maus-Hippocamups-Schnitte, verwendet. *Thy1*-Mäuse exprimieren eGFP (enhanced green fluorescent protein). Die Anregungswellenlänge lag bei 850 nm und Emissionsphotonen passierten einen 525-50 nm Bandpass-Filter. Das verwendete Objektiv besaß eine 20x Vergrösserung und war für Messungen in Lösung optimiert (Olympus XLUMPLFL20xW/0.95 SP). Für Ermittlung der maximalen FLIM-Messtiefe wurde die Tatsache berücksichtigt, dass sich mit abnehmendem Signal die Lebensdauer verbreitet, bzw. länger als im Idealfall darstellt. Daher wurde heuristisch eine mittlere Verbreiterung der Verteilung der Lebensdauer von 1000 ps als Grenze für valide FLIM-Daten festgelegt.

3.4.5.1 Präparation der Hirnschnitte von Thy1-Mäusen

Reagenzien	Konzentration		
NaCl	124 mM		
NaH ₂ PO4	1.25 mM		
NaHCO ₃	26 mM		
KCI	3 mM		
CaCl ₂	1.6 mM		
MgCl ₂	9,5 mg		
MgSO ₄	1.8 mM		
D-Glucose	10 mM		
Anschließend auf pH 7.35 einstellen			

Tabelle 12: Zusammensetzung des ACSF-Puffers für die Mikroskopie der Hirnschnitte von *Thy1*-Mäusen.

Gehirne wurden von 6-8 Wochen alten *Thy1*-Mäusen (Feng *et al.*, 2000) entnommen und direkt in Carbogen-begasten 4 °C-kalten ACSF Puffer gegeben. Zunächst wurden 300 µm Schnitte mit einem Vibratom (VT 1200 S, Leica) angefertigt und daraus wurde der Hippocampus isoliert. Anschließend erfolgte eine Regenerierung über 45 min bei RT bevor die Schnitte für die Mikroskopie in eine 37°C-beheizte selbsthergestellte Inkubationskammer überführt wurden. Die Inkubationskammer würde stetig mit warmen Carbogen-begasten ACSF Puffer versorgt.

Tabelle 13: Ansatz und Zusammensetzung des Hepes-Puffers für die Mikroskopie der ex vivo Hautmodelle.			
Reagenzien	100 ml Ansatz		
NaCl	812 mg		
Hepes	476 mg		
CaCl ₂	18 mg		
KCI	14,8 mg		
MgCl ₂	9,5 mg		
D-Glucose	108 mg		
Anschließend mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen			

3.4.5.2 Präparation des ex vivo Hautmodells

Das *ex vivo* Hautmodell wurde in Kulturmedium mit 50 μM FITC (Fluorescein Isothiocyanat, Invitrogen, Deutschland) für ca. 16 - 18h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Modell mit sterilem PBS gespült und auf dem Boden einer 3,5 cm Pertischale mit einem Tropfen Histoacryl[®]-Gewebekleber (Braun, Melsungen) fixiert. Daraufhin wurde das Modell mit Hepes-Puffer komplett bedeckt und mikroskopiert.

3.4.6 FLIM-Calcium-Messungen und Bestimmung der epidermale Dicke des AID-Modells

Die exzidierten und mit CG5N behandelten Hautproben (Kapitel 3.1.4 & 3.1.6) wurden auf einem Objektträger platziert und mit einem Deckglas bedeckt, ohne jedoch die Probe zu quetschen. Zwischen Deckglas und Probe wurde anschließend Calcium-freies PBS pipettiert, um die Probe vor Austrocknung zu schützen. Zur Messung wurde ein 40x Objektiv (Zeiss EC "Plan-Neofluar" 40x/1,30 Oil) verwendet. Die gemessene Fläche betrug 150 x 150 μ m² bei einer Auflösung von 512 x 512 Pixel und einer z-Schrittgröße von 1 – 2 μ m. Die Anregungswellenlänge für die Messung betrug 770 nm und Fluoreszenzphotonen wurden durch einen dichroitischen Spiegel (475 nm) geleitet, wobei die Photonen >475 nm einen 528/38 nm Bandpass-Filter passierten, bevor sie auf den FLIM-Detektor trafen. Für jede Hautprobe und Behandlung wurden drei unterschiedliche Lokalisationen gemessen. Zu jeder Calcium-Messung wurde das SHG-Signal der dermalen Kollagenfasern detektiert und somit die epidermale/dermale Grenze bestimmt. Hierzu wurde als 820 nm Detektor ein Photomultiplier Tube benutzt, der die Emissionsphotonen von 410 nm durch den dichroitischen Spiegel <475 nm und einem Bandpass-Filter von 417-60 nm detektierte. Bis auf den Strahlengang der Emissionsphotonen blieben alle Einstellungen zur Calcium-Messung identisch. Über die so erhobenen FLIM-Daten wurde für die Bestimmung der Calcium-Tiefenverteilung eine 35 μ m² ROI im Intensitätsbild gelegt, auf die korrespondierenden FLIM-Daten übertragen und die daraus resultierende mittlere Lebensdauer über die Tiefe geplottet. Weiter wurde, ähnlich der Calcium-FLIM-Messung der HaCat-Zellen, eine extra und intrazelluläre ROI im *Stratum granulosum* erzeugt und ebenfalls auf die FLIM-Daten übertragen und die mittlere Fluoreszenzlebensdauer innerhalb der ROI in der Analysesoftware OriginPro (OriginLab, Northampton, MA) ermittelt.

3.4.7 FLIM-Calcium-Messung an HaCat-Zellen

Für die FLIM-Calcium-Messungen wurden kultivierte HaCat-Zellen (Kapitel 3.3.2) bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert, um die Bildung einen nahezu geschlossenen Monolayers zu generieren. Am Vorabend des Experiments wurde das Medium mit der Salzform des Farbstoffs CG5N versetzt (50 μM), ü.N. bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und am nächsten Morgen im Medium mikroskopiert. Der optische Messaufbau war dem aus Kapitel 3.4.6 identisch. Über die so gewonnenen Bild-Daten wurden extra- und intrazelluläre ROI in den Intensitätsbildern erzeugt, die anschließend auf die korrespondierenden FLIM-Daten übertragen wurden. Die in den ROI enthaltenen FLIM-Daten wurden in ein Histogramm übertragen und die mittlere Fluoreszenzlebensdauer wurde in der Analysesoftware OriginPro (OriginLab, Northampton, MA) ermittelt.

3.4.8 Bestimmung der Infiltrathöhe

Die erstellten HE-Paraffinschnitte (s. Kapitel 3.1.9) wurden mit einem Mikroskop der Firma

Leica (DM-ILS, Leica, Wetzlar), das mit einer Digitalkamera (Leica EC 3) ausgestattet war, aufgenommen. Die erstellten Bilder eines Schnittes wurden in Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) importiert, zusammengefügt, kalibriert und vermessen. Für die Vermessung der Infiltrathöhe wurden pro Maus und Behandlung zwei Schnitte (n= 24) mit jeweils 5 Messungen gemittelt. Startmesspunkt war stets die Begrenzung des, der Dermis zugewandten, Hautmuskels. Der gemittelte Wert wurde in anschließenden Statistikauswertungen verwendet.

3.4.9 Evaluation von Filaggrin, Keratin 6, Keratin 14, Keratin 10, Claudin-1, ZO-1 und Ki67-Färbungen

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) evaluiert, mittels einer Hamamatsu-CCD-Kamera und der Openlab-Software (5.0) dokumentiert und anschließend in Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) importiert. Dort wurden die Bilder zusammengefügt, kalibriert und vermessen. Für das Protein Keratin 14 (K14) wurde die Strecke von der Basallamina der Epidermis bis zum Ende der Keratin 14 Färbung an 10 Lokalisationen gemessen und anschließend gemittelt (n= 16 Schnitte). Für die Proteine Keratin 10 (K10) und Claudin-1 (Cld-1) wurde, ebenfalls von der Basallamina ausgehend, die Strecke an 10 Lokalisationen vermessen, in denen das Protein nicht detektiert werden konnte und anschließend gemittelt (n= 16 Schnitte). Die Auswertung für den Proliferationsmarker Ki67 erfolgte über jeweils drei Bilder einer Probe (n= 24 Schnitte). Diese wurden mit dem Fiji-Plugin ITCN (Image-based Tool for Counting Nuclei, Center for Bio-image Informatics, UC Santa Barbara) ausgewertet und das Verhältnis (Ki67-Index) von Ki67 positiven Zellen zu Dapi-gefärbten ermittelt (je näher das Ergebnis am Wert 1 liegt, desto mehr Ki67 positive Zellen liegen vor).

Die Proteine Filaggrin, Keratin 6, und ZO-1 wurden wie folgt kategorisiert

Filaggrin	Keratin 6	ZO-1
normal lokalisiert	• vorhanden	normal lokalisiert
 stark vermindert 	 nicht vorhanden 	 leicht verbreitert

oder nicht	 stark verbreitert
vorhanden	

4 Ergebnisse

4.1 Detektorvergleich

Um die Verwendbarkeit der zwei verschiedenen Detektoren für die Intensitäts- und Lebensdauer-Messungen an Haut zu evaluieren, wurden die Grenzen der Auflösung und der Tiefenmessung dieser Detektoren an heterogenen und homogenen Geweben (Haut und Gehirn) bestimmt.

4.1.1 Bestimmung der Punktspreizfunktion (PSF) durch Bead-Messungen in lateraler und axialer Richtung

Die räumliche Auflösung wird durch die PSF des verwendeten Systems bestimmt. Um die PSF für die beiden Detektoren zu bestimmen, wurden an beiden Detektoren Messungen ($\lambda_{An} = 800 \text{ nm}$) an fluoreszierenden Beads durchgeführt. Die TCSPC-Profilmessungen der 100 nm-Beads ergaben für die axiale Auflösung (XZ) einen Wert von 1310 ± 160 nm und in lateraler Auflösung (XY) einen Wert von 350 ± 20 nm. Die PicoStar erreichte in axialer Auflösung eine vergleichbare PSF von 1350 ± 150 nm, mit 780 ± 80 nm in der lateralen Auflösung jedoch eine mehr als 2,2 fache PSF im Vergleich zum TCSPC-Detektor (Abbildung 4-1).



Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads. (A) in lateraler und (B) in axialer Richtung von PicoStar (grau) und TCSPC (schwarz) (n= 10; SD). Verändert nach Rinnenthal, Börnchen *et al.*(2013).

Diese Werte werden umso deutlicher, wenn man die Intensitätsbilder der beiden Detektoren einer beispielhaften Bead-Messung betrachtet. Deutlich zu erkennen ist die vergleichbare Abbildung des Beads in der Z-Achse beider Detektoren. Dem gegenüber steht die nahezu doppelt so hohe Auflösung der PicoStar im Vergleich zum TCSPC in der X-Achse (Abbildung 4-2).



Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung. PicoStar (oben) und TCSPC (unten). Aus Verändert nach Rinnenthal, Börnchen *et al.* (2013).

4.1.2 Tiefenabhängiges Signal-zu-Rausch-Verhältnis und maximale FLIM-Messtiefe

Ein wichtiger Bestandteil der 2P-Mikroskopie sind Tiefenmessungen in Geweben, da genau hier die Vorteile der 2-Photonenanregung liegen. Hierfür ist es notwendig, die Maximalmesstiefe für die Intensität und für das FLIM-Signal zu bestimmen. In Intensitätsmessungen ist die maximale Messtiefe durch das Erreichen eines Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (signal to noise ratio, SNR) von 1 gekennzeichnet. In zeitabhängigen Messungen, wie der Lebensdauermessung, ist die maximale Messtiefe von der Streuung der Photonen in dem zu messenden Gewebe abhängig. Je nach Streuungseigenschaften der Messprobe, wird die Genauigkeit der FLIM-Messung beeinflusst. Erreicht eine FLIM-Messung eine Verteilungsbreite von 1000 ps (heuristisch festgelegt) der bekannten Fluoreszenzlebensdauer, so wird die maximale Fluoreszenzlebensdauer-Messtiefe erreicht. Um die maximale Messtiefe für die Intensität und das FLIM-Signal zu ermitteln, wurden zwei unterschiedliche Gewebe mit unterschiedlichen optischen Streuungseigenschaften verwendet. Zum einen ein mit FITC-gefärbtes ex vivo Hautmodell (Lebensdauer von FITC: 3600 ps (Hanson et al., 2002), das als Modell für eine heterogenes und streuendes Gewebe dient. Für ein homogenes Gewebe wurde die maximale FLIM-Messtiefe an Hirnschnitten von eGFP-exprimierenden Thy1-Mäusen gemessen (Lebensdauer von eGPF: 2600 ps (Murakoshi et al., 2008). Um die Vergleichbarkeit der Detektoren zu gewährleisten, wurde die gleiche Belichtungszeit der Detektoren und Laserleistung pro Strahl gewählt. Die in Abbildung 4-3A dargestellten Intensitätsmessungen zeigen die Verteilung der FITC-Intensität des gleichen Messareals über die Tiefe des ex vivo Hautmodells in einer 3D-Ansicht. Eindeutig erkennbar ist die erhöhte Tiefe des Intensitätssignals der TCSPC-Messung gegenüber der PicoStar-Messung. Das Ergebnis der Intensitätsmessung kann in der SNR-Auswertung bestätigt werden (Abbildung 4-3B). Der kritische SNR-Wert von 1 wird von der PicoStar bei 150 µm und vom TCSPC bei 365 µm erreicht. Das entspricht einem Faktor von 2,43 gegenüber der PicoStar. Somit ist der TCSPC der Picostar bezüglich der Messtiefe der Intensität überlegen.



Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC-gefärbten, porcinen *ex vivo* Hautmodelle bis 400 μm Tiefe (gleiches Areal) **(A)**; Korrespondierendes SNR über die Tiefe der PicoStar (grau) und des TCSPCs (schwarz) **(B)**, die gestrichelten Linien markieren die Tiefe, an der ein SNR von 1 erreicht wird. Verändert nach Rinnenthal, Börnchen *et al.*(2013).

Im Vergleich beider Detektoren bezüglich der gemessenen FITC-Lebensdauern in verschiedenen Tiefen (Abbildung 4-4A) konnte gezeigt werden, dass die PicoStar nach bereits 100 μm Tiefe einen starken Anstieg der gemessen Lebensdauer aufwies, dessen

Verlauf in höheren Tiefen einen Anstieg auf bis zu 4800 ps verzeichnete. Der TCSPC hingegen zeigte erst ab einer Messtiefe von 275 µm eine Veränderung der Lebensdauer. Beide Ergebnisse sind gut mit der maximalen FLIM-Tiefenmessungen in Einklang zu bringen, die in Abbildung 4-4B dargestellt ist: Die gesetzte Grenze der Verteilungsbreite der Lebensdauer von 1000 ps wird in 90 µm Tiefe von der PicoStar und in 290 µm Tiefe vom TCSPC erreicht. Somit ist auch bezüglich der Messtiefe für die Lebensdauer der TCSPC der Picostar überlegen. In Betrachtung der Lebensdauer in Abhängigkeit der SNR liegt der PicoStar-Wert über 10 und der des TCSPCs bei 4 (Abbildung 4-4C). Dies bedeutet, dass der TCSPC in der Lage ist, mit weniger als der Hälfte des von der PicoStar benötigten Signals, valide Lebensdauern zu messen.



Abbildung 4-4: Diagramme der Messung des *ex vivo* Hautmodells (gleiches Areal). (A): Diagramm der gemessenen FITC-Lebensdauern (τ) in Abhängigkeit der Tiefe. (B): Diagramm der Breite der FITC-Lebensdauer-Verteilung (τ) in Abhängigkeit der Tiefe; die gestrichelte Linie markiert die heuristisch gesetzte Grenze von 1000 ps in der Breite der τ -Verteilung. (C): Diagramm der gemessenen Lebensdauern (τ) in Abhängigkeit des SNR. PicoStar: grau; TCSPC: schwarz. Verändert nach Rinnenthal, Börnchen *et al.* (2013)

Der Vergleich der Intensitätsmessungen in der Tiefe an Hippocampus-Schnitten (Abbildung 4-5A) zeigte, dass der kritische SNR-Wert von 1 bei der PicoStar in einer Tiefe von 133 μ m und beim TCSPC in einer Tiefe von 258 μ m erreicht worden ist (Faktor 1,93) (Abbildung 4-5B).



Abbildung 4-5: Intensitätsmessung der eGFP markierten Hippocampus-Schnitte bis 260 μm Tiefe. (A) Messung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts); gleiches Areal; Obere Reihe: Seitenansicht; Untere Reihe: Aufsicht. (B) Korrespondierendes SNR über die Tiefe der PicoStar (grau) und des TCSPCs (schwarz). Die gestrichelten Linien markieren die Tiefe, an der ein SNR von 1 erreicht wird. Verändert nach Rinnenthal, Börnchen *et al.* (2013).

Ähnlich, wie bereits in der Hautprobe beobachtet, zeigt auch der gemessene Lebensdauer-Verlauf der Hippocampus-Schnitte bei der PicoStar einen starken Anstieg ab einer Tiefe von 75 µm. Der gemessene Verlauf der Lebensdauer des TCSPCs blieb bis zu einer Messtiefe von 200 µm stabil (Abbildung 4-6A). Der Grenzwert von 1000 ps in der Breite der Lebensdauerverteilung wurde von der PicoStar in einer Tiefe von 115 µm und dem TCSPC von 240 µm erreicht (Abbildung 4-6B). Für die erwartete Lebensdauer von eGFP benötigte die PicoStar ein SNR-Wert von 17, während der SNR-Wert für eine korrekte Messung beim TCSPC zwischen 3 und 4 betrug (Abbildung 4-6C). Wie bereits für das Hautmodell gezeigt, ist auch in den Hirnschnitten der TCSPC der PicoStar in der benötigten Signalstärke überlegen, wobei hier der TCPSC um den Faktor 4 weniger kleinere SNR-Werte für valide FLIM-Messungen benötigt.



Abbildung 4-6: Diagramme der Messung der Hippocampus-Schnitte (gleiches Areal). (A): Diagramm der gemessenen eGFP-Lebensdauern (τ) in Abhängigkeit der Tiefe. (B): Diagramm der Breite der eGFP-Lebensdauer-Verteilung (τ) in Abhängigkeit der Tiefe; die gestrichelte Linie markiert die heuristisch gesetzte Grenze von 1000 ps in der Breite der τ -Verteilung. (C): Diagramm der gemessenen Lebensdauern (τ) in Abhängigkeit des SNR. PicoStar: grau; TCSPC: schwarz. Verändert nach Rinnenthal, Börnchen *et al.* (2013).

Alle weiteren mikroskopischen Messungen wurden, aufgrund des besseren Auflösungsvermögens und der Fähigkeit tieferen Schichten exaktere in Fluoreszenzlebensdauern zu ermitteln, mit dem TCSPC-Detektor durchgeführt.

4.2 Evaluation des Brechungsindex (n) muriner Haut

Verschiedene Gewebe- bzw. Zellbestandteile können unterschiedliche Brechungsindizes haben, die bei der Ermittlung der Lebensdauer eines Farbstoffs berücksichtig werden müssen. Deshalb wurde mit Hilfe von Fluorescein der Brechungsindex (n) in muriner Haut untersucht, da die Fluoreszenzlebensdauer von Fluorescein im Wesentlichen vom Brechungsindex beeinflusst wird (Hanson *et al.*, 2002). Zur Bestimmung des Brechungsindex der Haut wurden die Lebensdauer von Fluorescein in den verschiedenen Schichten der Epidermis und der sich darunter anschließenden Dermis sowie die Lebensdauer von Fluorescein. Die über die Hautschichten gemittelten Lebensdauern von Fluorescein in der murinen Haut sind in Tabelle 14 aufgeführt. Die Messung in wässriger Lösung ergab einen Wert von $\tau = 4,05 \pm 0,02$ (n= 5;

SD). Mit Hilfe der in Kapitel 3.5.3 genannten Formel und der Kenntnis, dass der Brechungsindex in wässriger Lösung 1,33 beträgt, wurden nun die Brechungsindizes der einzelnen Schichten berechnet (Abbildung 4-7). Die horizontale Verteilung der Brechungsindizes in den verschiedenen Schichten ist in Abbildung 4-8 gezeigt.

Tabelle 14: Übersicht über die gemittelten Lebensdauern (ns) und Standardabweichungen von 3 verschiedenen Messungen an einer Hautprobe im S. corneum, S. granulosum bis S. basale und Dermis.

S. corneum (SC)	S. granulosum – s. basale (SG-SB)	Dermis
3,240 ± 0,14 ns	3,489 ± 0,02 ns	3,330 ± 0,09 ns





Abbildung 4-7: Mittlere Brechungsindizes der Epidermis und Dermis mit Standardabweichung. SC (rot), die sich aus den Lebensdauern aus Tabellle-14 ergeben: Brechungsindex des S. corneums, SG – SB (grün): Brechungsindex des *S.granulosums* bis *S.basale*, Dermis (grau): Brechungsindex der Dermis (n = 3).

Das *S. corneum* (Abbildung 4-8A, Tiefe 2 µm) ist von hohen Brechungsindizes (> 1,5) dominiert (blaue und grüne Falschfarben). In der lebenden Epidermis zeichnet sich das typische Muster der Felderhaut ab, die sich in der Segmentierung der Haut widerspiegelt und in Abbildung 4-8B im Intensitätsbild zu erkennen ist. Innerhalb eines Feldes sind einzelne Zellen zu erkennen. Die ROI (region of interest) wurde bewusst in diesen Bereich gelegt, da die herabreichenden Ausläufer des *Stratum corneums* (grün) das Ergebnis für diese Schicht verfälschen würde. Die rote Färbung innerhalb der ROI zeigt einen Brechungsindex im Bereich von \geq 1,4. In der Dermis (Tiefe 23 µm) finden sich diffuse Strukturen, die auf dermale Bestandteile wie Elastin- und Kollagenfasern zurückzuführen sind. Die ROI wurde so gewählt, dass ausschließlich dermale, nicht aber aus der Epidermis eingestülpte epidermale Bereiche erfasst werden. Die Verteilung des Brechungsindexes ist





Abbildung 4-8: Darstellung des Brechungsindex in verschiedenen Maushautschichten. Die hier gezeigten FLIM-Messungen sind in Intensitäts-und Brechungsindexbilder (in Falschfarben) sowie in deren Kombination dargestellt und zeigen eine repräsentative Aufnahme für die jeweiligen Schichten (*S. corneum, S. granulosum – S. basale* und der Dermis) aus drei Messungen der Fluorescein-gefärbten Maushaut. Obere Reihe (**A**): Intensitätsbild (grau) des *S. corneums* - Brechungsindex in Falschfarben des *S. corneums* – Kombination aus Intensitätsbild und Brechungsindex des *S. corneums*. Mittlere Reihe (**B**): Intensitätsbild (grau) des *S. granulosums / S. basale* - Brechungsindex in Falschfarben des *S. granulosums / S. basale* – Kombination aus Intensitätsbild und Brechungsindex des *S. granulosums / S. basale* – Kombination aus Intensitätsbild und Brechungsindex des *S. granulosums / S. basale*. Untere Reihe (**C**): Intensitätsbild (grau) der Dermis - Brechungsindex in Falschfarben der Dermis - Kombination aus Intensitätsbild und Brechungsindex der Dermis. Falschfarbenskala zeigt den Brechungsindex. Messbalken 20 µm.

Um den Verlauf des Brechungsindex vertikal innerhalb der Schichten genauer zu betrachten, wurde aus jedem Messpunkt einer Tiefe die Fluorescein-Lebensdauer gemittelt und in einen Brechungsindex-Wert konvertiert (Abbildung 4-9). Der Brechungsindex im *Stratum corneum*, von der Oberfläche beginnend, verläuft in einem Bereich der mit 1,53 startet und bis zu einem Wert von 1,44 abfällt. Innerhalb der lebenden Schichten der Epidermis bleibt der Brechungsindex nahezu unverändert bei einem Wert von 1,43 - 1,44 und steigt anschließend in der Dermis erneut an.



Abbildung 4-9: Diagramm des Brechungsindex von Maushaut in Abhängigkeit der Tiefe. Rot: Brechungsindizes im *Stratum corneum*; Grün: Messdaten aus den lebendigen Strata der Epidermis; Grau unterlegte Daten entstammen der Dermis (n = 3; SD).

Durch die Evaluierung des Brechungsindizes des *Stratum corneums* und der lebenden Epidermis konnte jeweils ein Faktor (s. Kapitel 3.4.3) für beide Schichten erhoben werden (*Stratum corneum –* 0,79 / *Stratum granulsoum/basale –* 0,86). Diese beiden Faktoren sind für alle folgenden Lebensdauermessung der Haut bei der Umrechnung von Lebensdauern in Ca²⁺-Konzentration berücksichtigt worden.

4.3 FLIM-Kalibrierung von Calcium Green-5N (CG5N)

Damit die in dieser Arbeit mit Hilfe des Calcium-Farbstoffs Calcium Green-5N (CG5N) bestimmten Fluoreszenzlebensdauern auch in Ca²⁺-Konzentrationen ausgedrückt werden konnten, musste zunächst eine Kalibrierung des Farbstoffs vorgenommen werden. Dazu wurden Lebensdauer-Messungen von CG5N in Anwesenheit unterschiedlicher, normierter Ca²⁺-Konzentrationen durchgeführt. Dies ergab eine in Abbildung 4-10 dargestellte Kalibrierungskurve mit sigmoidalem Verlauf (Hill-Curve-Fit):



Abbildung 4-10: Fluoreszenzlebensdauern von Calcium Green-5N in Anwesenheit von unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen (schwarze Quadrate inkl. Standardabweichung). Die Kalibrierungkurve (rote Linie) wurde mit einem Hill-Curve-Fit gerechnet (n = 3).

Der Umschlagspunkt der Kalibrierungkurve lag bei 1,79 µmol/l und ist gleichzeitig die gemessene Dissoziationskonstante von CG5N. Alle weiteren gemessenen Fluoreszenz-Lebensdauern von CG5N dieser Arbeit wurden über diese Kalibrierung in absolute Ca²⁺-Konzentrationen konvertiert (in der Haut inkl. der Faktoren resultierend aus der Brechungsindexbestimmung).

4.3.1 Extra- und intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen von HaCat-Zellen

Um die Validität des verwendeten Meßsystems (Calcium Green-5N und TCSPC-Detektor) zur Messung von extra- und intrazellulären Calcium zu überprüfen, wurden HaCat-Zellen kultiviert und anschließend die intra- und extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration *in vitro* über die Lebensdauer-Messung von CG5N bestimmt. Bei HaCat-Zellen in Ruhezustand wurden bisher intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen von 70 – 150 nM gemessen, die nach Stimulierung der Zellen auf Werte von 500 – 1500 nM ansteigen können (Grzesiak & Pierschbacher, 1995; Lee *et al.*, 2001; Meyer-Hoffert *et al.*, 2004; Ranzato *et al.*, 2008). Bei den untersuchten HaCat-Zellen, die in Kulturmedium mit normaler Ca²⁺-Konzentration (1,8 mM) und bis zu einer 90 – 100% Konfluenz kultiviert wurden, zeigt der extrazelluläre Raum eine vermehrt gelbliche Färbung (Abbildung 4-11), d.h. eine Ca²⁺-Konzentration von ca. 2 μ M. Dem gegenüber steht eine türkis-bläuliche Färbung im Intrazellularraum, d.h. eine Ca²⁺-Konzentration, die zwischen 0,6 und 1,26 μ M liegt. Das bedeutet, dass im Zellinneren der HaCat-Zellen eine niedrigere Ca²⁺-Konzentration als außerhalb der Zelle vorherrscht (Abbildung 4-11).



Abbildung 4-11: Darstellung der Ca²⁺-Konzentrationen in HaCat-Zellen unter Kulturbedingungen. Die dargestellten Messungen stehen exemplarisch für jeweils drei unabhängige Experimente. Die im Intensitätsbild erzeugten ROI wurden für die Bestimmung des extra- und intrazellulären Calciums auf die FLIM-Daten (Falschfarben) übertragen, da hier die morphologischen Eigenschaften der Zellen am deutlichsten sind. **Obere Reihe (von links nach rechts)** zeigt das Intensitätsbild mit extrazellulären ROI (rot) – Mitte: FLIM-Bild der Ca²⁺-Konzentration und extrazell. ROI (schwarz) – Kombination des Intensitätsbild mit intrazellulären ROI (rot) – Mitte: FLIM-Bild der Ca²⁺-Konzentration und intrazell. ROI (schwarz) – Kombination des Intensitätsbild mit intrazellulären ROI (rot) – Mitte: FLIM-Bild der Ca²⁺-Konzentration und intrazell. ROI (schwarz) – Kombination des Intensitätsbild mit intrazellulären ROI (rot) – Mitte: FLIM-Bild der Ca²⁺-Konzentration und intrazell. ROI (schwarz) – Kombination des Intensitätsbild mit intrazellulären ROI (rot) – Mitte: FLIM-Bild der Ca²⁺-Konzentration und intrazell. ROI (schwarz) – Kombination des Intensitätsbild mit intrazellulären ROI (rot) – Mitte: FLIM-Bild der Ca²⁺-Konzentration und intrazell. ROI (schwarz) – Kombination des Intensitäts- und FLIM-Bildes mit intrazell. ROI (weiß). Untere Reihe (von links nach rechts) zeigt das Intensitätsbild mit intrazellulären ROI (rot) – Mitte: FLIM-Bild der Ca²⁺-Konzentration und intrazell. ROI (schwarz) – Kombination des Intensitäts- und FLIM-Bildes mit intrazell. ROI (weiß).Falschfarbenskala zeigt Ca²⁺-Konzentrationen in µmol/I, Messbalken: 20 µm.

Aus drei unabhängigen Experimenten wurden unter normalen Kulturbedingungen die Ca²⁺-Konzentrationen bestimmt und anschließend gemittelt (s. Abbildung 4-12). Die daraus resultierende mittlere intrazelluläre Lebensdauer liegt bei 1,76 ± 0,13 ns und die extrazelluläre Lebensdauer bei 2,32 ± 0,11 ns. Dies entspricht einer extrazellulären Ca²⁺-Konzentration von 1,95 ± 0,19 µM und einer intrazellulären Ca²⁺-Konzentration von 1,18 ± 0,15 µM.



Calcium-Green5N-Lebensdauern von HaCat-Zellen

Die 3D-Darstellung in Abbildung 4-13 zeigt die gesamte Messung aus Abbildung 4-11 über die Tiefe, die apikal über den Zellmonolayer beginnt und am Boden des Kulturgefäßes endet (Abbildung 4-13A). Neben der Tatsache, dass auch hier der Unterschied von hohen Ca^{2+} -Konzentrationen im extrazellulären Raum zu niedrigeren intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erkennbar ist, ist anzumerken, dass im Medium apikal über den Zellen zahlreiche Bereiche zu finden sind, in denen die Ca^{2+} -Konzentrationen oberhalb von 10 μ M (rote Areale) und somit außerhalb des sensitiven Bereichs des Farbstoffs CG5N liegen.

Abbildung 4-12: Darstellung der mittleren CG5N-Lebensdauern von HaCat-Zellen . Extrazellulär (orange) und intrazellulär (blau) (n=3; SEM, **:p< 0,01).



Abbildung 4-13: 3D-Ansicht (XZ) der Calcium-Verteilung in HaCat-Zellen (Kombination aus Intensitäts- und FLIM-Aufnahme). Der Intrazellularraum weist eine deutlich niedrigere Ca²⁺-Konzentration auf (hohle Pfeilspitzen), als der Extrazellularraum (gefüllten Pfeilspitzen). Apikal der Zellen (im Medium) befinden sich vermehrt rote Areale (Pfeile). A: Blick von apikal (70°, XZ); B: Blick von der Seite(XZ, 90°); C: Blick von basal (XZ, 110°). Falschfarbenskala zeigt Ca²⁺-Konzentrationen in µmol/l. Messbalken: 20 µm.

4.4 Ergebnisse des AID-Mausmodells

4.4.1 Parameter der Atopischen Dermatitis im AlD-Modell

Die Untersuchungen der HE-Färbungen von unbehandelten und provozierten Hautarealen des AID-Mausmodells zeigen deutliche morphologische Unterschiede in der Epidermis und Dermis. Die Epidermis der Kontrollhaut ist zwei- bis dreischichtig und die Dermis zeigt eine unauffällige Anzahl von Fibroblasten, die durch ihren lang gestreckten Habitus gut zu erkennen sind. Bereits in der 1-fach-provozierten Haut ist eine Verdickung (Hyperplasie) der Epidermis zu beobachten, die neben dem *Stratum corneum* zwei bis drei Schichten von lebenden Keratinozyten aufweist. Eine erhöhte Einwanderung von Zellen ist in der Dermis der 1-fach-provozierten Haut ist zu erkennen. In der 3-fach-provozierten Haut ist die lebende Epidermis bis zu 7 Schichten dick und weist zum Teil eine leichte Parakeratose des *Stratum corneums* auf (s. Abbildung 4-14).



Kontrolle

1x Provokation

3x Provokation

Abbildung 4-14: HE-Färbungen von unbehandelter und 1-fach & 3-fach-provozierter Haut des AlD-Mausmodells. Die hier gezeigten Schnitte stellen einen repräsentativen Überblick über die unterschiedlich behandelten Hautareale des AlD-Mausmodells dar. Die gestrichelte Linie weist auf einen Infiltrat-Bereich hin. Messbalken 30 µm.

Die Messungen der epidermalen Dicke, die durch den Abstand der Hautoberfläche zum dermalen SHG-Signal von Kollagenfasern bestimmt wurde, lassen sich gut mit den Beobachtungen in den HE-Färbungen aus Abbildung 4-14 in Einklang bringen. Die unterschiedlichen epidermalen Dicken der 1-fach- (26,27 ± 1,17 µm) und 3-fach- (32,59 ± 1,05 µm) provozierten Hautareale sind signifikant, wobei die 3-fach-provozierte Haut gegenüber der Kontrolle (20,91 ± 0,62 µm) das höchste Signifikanzniveau aufweist (Abbildung 4-15).



Abbildung 4-15: Übersicht der mittleren epidermalen Dicke von Kontrollarealen, 1-fach- und 3-fachprovozierten Hautarealen des AlD-Mausmodells (n=8, SEM; **:p< 0,01, ***:p< 0,001).

Ein weiteres Charakteristikum der Atopischen Dermatitis ist das dermale Infiltrat, welches auch in dem AlD-Maus-Modell induziert worden ist. In der HE-Färbung (Abbildung 4-14) ist deutlich zu sehen, dass in der 3-fachen Provokation ein dermales Infiltrat vorhanden ist, welches sich kompakt über ein Drittel der unteren Dermis in Richtung Epidermis erstreckt. Ähnlich der epidermalen Hyperplasie ist auch das Infiltrat sowohl in Anzahl von Zellen als auch in der Eindringtiefe in Richtung Epidermis mit steigender Anzahl der Provokationen erhöht. Auch hier sind die Unterschiede der Behandlungen signifikant. Sowohl die 1-fache (224,56 \pm 29,31) und 3-fache Provokationen (388,74 \pm 67,60 μ m) sind gegenüber der Kontrolle, als auch untereinander signifikant verschieden (s. Abbildung 4-16).



Abbildung 4-16: Übersicht der mittleren dermalen Infiltrathöhe (s. Kapitel 3.4.8) von Kontrollhaut, 1-fach- und 3-fach-provozierten Hautarealen des AID-Mausmodells (n=8, SEM; **:p< 0,01, ***:p< 0,001).

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchung der IgE-Antikörperkonzentrationen zeigten signifikante Erhöhungen der generellen und Ovalbumin-spezifischen Antiköperkonzentrationen mit steigender intradermaler Provokation der Mäuse. Die IgE-Antikörperkonzentration lag bei unbehandelten Mäusen bei 41,3 \pm 6,2 ng/ml, wobei die 1-fach- und 3-fach-provozierten Mäuse Werte von 421 ,1 \pm 88,3 ng/ml und 1213,4 \pm 96,9 ng/ml erreichten. Die spezifisch gegen OVA gerichteten IgE-Antikörper zeigten eine geringere Konzentration gegenüber der Gesamt-IgE-Antikörperkonzentration. Hier lagen die Werte bei den Kontrollen bei 0,25 \pm 0,11 ng/ml, bei den 1-fach-provozierten bei 12,73 \pm 5,03 ng/ml und bei den 3-fach-provozierten Tieren bei 53,6 \pm 11,04 ng/ml (s. Abbildung 4-17).


Abbildung 4-17: Serologische IgE- und IGE-OVA-Antikörperkonzentration von Kontroll-, 1-fach- und 3-fachprovozierten Mäusen. **A**: Die gesamte IgE-Antikörperkonzentration steigt abhängig von der Anzahl der Provokationen um ein Vielfaches an. **B**: Die gesamte IgE-OVA-Antikörperkonzentration steigt abhängig von der Anzahl der Provokationen um ein Vielfaches an (n=7, SEM; *:p< 0,05, **:p< 0,01, ***:p< 0,001).

Um die Wasserhaltekapazität und die epidermale Barriere-Funktion zu ermitteln, wurden die Hydratation des *Stratum corneums* und der Transepidermale Wasserverlust (transepidermal water loss; TEWL) der Haut gemessen. Die 1-fach-provozierte Haut (55,28 \pm 6,81 arbitrary units; a.u.) zeigte eine signifikante Erhöhung der Hydratation des *Stratum corneums* gegenüber der unbehandelten Kontrollhaut (32,88 \pm 3,29 a.u.). Der Wert für die Hydratation des *Stratum corneums* der 3-fach Provokation lag mit 30,21 \pm 7,40 a.u. unter dem der Kontrolle, ohne jedoch signifikant gegenüber der Kontrolle oder der 1-fach Provokation zu sein (s. Abbildung 4-18A). Die Messung des TEWL zeigt einen Trend in der Erhöhung seines Wertes, der mit der Anzahl der Behandlungen gegenüber der Kontrolle ansteigt, jedoch nicht signifikant ist (s. Abbildung 4-18B).



Abbildung 4-18: Übersicht der Hydratation des *Stratum corneums* und des TEWL im AlD Modell. A: Übersicht der Messung der Hydratation des *Stratum corneums* von Kontroll-, 1-fach- und 3-fach-provozierter Haut. B: Übersicht der TEWL-Messung von Kontrollen, 1-fach- und 3-fach-provozierter Haut (n=5, SEM; ***:p< 0,001).

4.5 2P-FLIM-Calcium-Messungen an Hautproben des AlD-Modells

Um die Ca²⁺-Konzentrationen in den unterschiedlichen epidermalen Hautschichten zu bestimmen, wurden *ex vivo* Messung von unbehandelter Kontrollhaut und provozierter Haut mittels 2P-FLIM durchgeführt. Um die Unterschiede beider Gruppen zu verdeutlichen, sind im Folgenden Bildinformationen von 3-fach Provokationen (Ekzem) verwendet worden, da hier die deutlichsten Unterschiede in der Hautreaktion auftraten und somit stellvertretend für die induzierten Ekzeme stehen.

4.5.1 2P-FLIM-Calcium-Messungen von Kontrollhaut und Ekzem in die Tiefe

Um die epidermale/dermale Grenze zu bestimmen, wurde das SHG-Signal von dermalen Kollagenfasern benutzt. Die Bestimmung verschiedener epidermaler Schichten sowie die Verknüpfung extra- und intrazelluläre Areale mit Ca²⁺-Konzentrationen wurde durch die Kombination aus Intensitäts- und FLIM-Bildern erreicht. Die Ergebnisse für Kontrollhaut sind in Abbildung 4-19 und eine Messung an ekzematöser Haut ist in Abbildung 4-20 dargestellt.







Abbildung 4-19: Repräsentative Calcium-FLIM Messung von CG5N-gefärbter Kontrollhaut des AlD-Modells in verschieden epidermalen Schichten. Linke Spalte: Intensität/SHG-Bilder der epidermalen Schichten, die eine morphologische Unterscheidung der verschiedenen epidermalen Strata ermöglicht. Im *Stratum granulosum* sind intrazelluläre Strukturen wie der Zellkern und die typischen Granula dieser Zellschicht zu erkennen. Weiter kann die epidermale/dermale Grenzschicht durch das SHG-Signal (blau) der dermalen Kollagenfasern bestimmt werden. Mittlere Spalte: FLIM-Bilder stellen die Ca²⁺-Konzentrationen der verschiedenen Hautschichten in Falschfarben dar. Deutlich ist zu erkennen, dass die höchste Ca²⁺-Konzentration im *Stratum granulosum* vorkommt und in tieferen Schichten sukzessiv abnimmt. In der Dermis steigt die Ca²⁺-Konzentration wieder an. Die quadratische ROI gibt die Fläche an, über die die mittlere Ca²⁺-Konzentration ermittelt wurde (beinhaltet extra- und intrazelluläre Bereiche). Rechte Spalte: Kombination aus Intensitäts- und FLIM-Bildern. Durch die Kombination lassen sich strukturelle und Ca²⁺-Konzentration Informationen der Messung kombinieren. Im *Stratum granulosum* in 4 μm Tiefe zeigt sich interessanterweise intrazellulär (hohle Pfeilspitzen) eine höhere Ca²⁺-Konzentration als extrazellulär (gefüllte Pfeilspitzen). Angabe der epidermalen Zellschicht in vertikaler Schrift (linke Seite). Falschfarbenskala zeigt Ca²⁺-Konzentrationen in μmol/l. Messbalken 20 μm.

Ekzem





Abbildung 4-20: Repräsentative Calcium-FLIM Messung von CG5N-gefärbter 3-fach-provozierter Haut des AlD-Modells in verschieden epidermalen Schichten. Linke Spalte: Intensität/SHG-Bilder der epidermalen Schichten, die eine morphologische Unterscheidung der verschiedenen epidermalen Strata ermöglicht. Im *Stratum granulosum* sind intrazelluläre Strukturen wie der Zellkern und die typischen Granula dieser Zellschicht zu erkennen. Weiter kann die epidermale/dermale Grenzschicht durch das SHG-Signal (blau) der dermalen Kollagenfasern bestimmt werden. **Mittlere Spalte**: FLIM-Bilder stellen die Ca²⁺-Konzentrationen der verschiedenen Hautschichten in Falschfarben dar. Deutlich ist zu erkennen, dass die höchste Ca²⁺-Konzentration im *Stratum granulosum* und oberen *Stratum spinosum* vorkommt und in tieferen Schichten sukzessiv abnimmt. In der Dermis steigt die Ca²⁺-Konzentration wieder an. Die quadratische ROI, der intra- und extrazelluläre Bereiche umfasst, gibt die Fläche an, über die die mittlere Ca²⁺-Konzentration ermittelt wurde. **Rechte Spalte:** Kombination aus Intensitäts- und FLIM-Bildern. Durch die Kombination lassen sich strukturelle und Ca²⁺-Konzentration Informationen der Messung kombinieren. Im *Stratum granulosum* (4 µm Tiefe) zeigt sich interessanterweise intrazelluläre (hohle Pfeilspitzen) eine höhere Konzentration als extrazellulär (gefüllte Pfeilspitzen). Angabe der epidermalen Zellschicht in vertikaler Schrift (linke Seite). Falschfarbenskala zeigt Ca²⁺-Konzentrationen in µmol/I. Messbalken 20 µm.

Im Vergleich beider Messung ist zum einen die unterschiedliche Dicke der Epidermis deutlich zu beobachten. Die epidermale/dermale Grenze ist in der Kontrollhaut-Messung bereits bei 20 µm Tiefe erreicht, wobei in der provozierten Haut diese Grenze erst in einer Tiefe von 34 µm erreicht ist. Die in den HE-Schnitten festgestellte epidermale Hyperplasie (s. Kapitel 4.4.1) kann somit auch durch die 2-PM bestätigt werden. Weiter zeigt sich im *Stratum granulosum* der provozierten Haut eine höhere Ca²⁺-Konzentration gegenüber der Kontrollhaut. Die Ca²⁺-Konzentration fällt in tieferen Schichten nicht so stark ab, wie es in der Kontrollhaut der Fall ist. Die unterschiedlichen Ca²⁺-Konzentrationen, die im *Stratum granulosum* vorherrschen, können am anschaulichsten in einem Querschnitt betrachtet werden, der in der Abbildung 4-21 dargestellt ist. In der Kontrollhaut ist die Ca²⁺-Konzentration deutlich geringer als im Vergleich zum Ekzem. Auch ist in dieser Darstellung die unterschiedliche epidermale Dicke der beiden Hautproben, die bereits durch das SHG-Signal aus den Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20 erhoben werden konnte, deutlich auszumachen.



Abbildung 4-21: Ca²⁺-Konzentration im 3D-Querschnitt (XZ) von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells. A: Querschnitt der Ca²⁺-Konzentration in Kontrollhaut. Die höchsten Ca²⁺-Konzentrationen sind in grün/gelb dargestellt und befinden sich direkt unter dem *Stratum corneum* im *Stratum granulosum*. B: Querschnitt der Ca²⁺-Konzentration im Ekzem. Die Ca²⁺-Konzentrationen überschreiten deutlich die Werte der Kontrolle und erstrecken sich in deutlich höhere epidermale Tiefen. Falschfarbenskala zeigt Ca²⁺-Konzentrationen in µmol/l. Messbalken 40 µm.

Um den Verlauf der Ca²⁺-Konzentration in Abhängigkeit der Tiefe genauer zu betrachten, wurden die Ca²⁺-Konzentration innerhalb einer ROI, wie beispielhaft in Abbildung 4-19 und Abbildung 4-20 in der mittleren Spalte zu sehen, gemittelt und gegen die Tiefe aufgetragen. Die Messungen beginnen in der ersten Schicht des Stratum corneums und enden an der Grenze von Epidermis und Dermis, die mit Hilfe des SHG-Signals definiert werden konnte. Die so genannten Z-Plots (Z = Tiefenebene) sind in Abbildung 4-22 dargestellt. Zu Beginn des Stratum corneums steigt die Ca²⁺-Konzentration steil an und erreicht ihren Höhepunkt im Stratum granulosum. Hierbei zeigt sich in der ekzematösen Haut eine höhere Konzentration im Vergleich zur Kontrollhaut. Anschließend fällt die Ca²⁺-Konzentration sowohl in Kontroll- als auch in ekzematöser Haut erneut unter die Werte, die im Stratum corneum erreicht wurden. Im Stratum basale zeigt sich ein relativ gleichbleibender horizontaler Verlauf der Ca²⁺-Konzentration. Um auszuschließen, dass die Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration auf der unterschiedlichen Dicke der Epidermis der Kontrollhaut und der ekzematösen Haut beruht, wurden beide Z-Plots darüber hinaus auf 100 % ihrer Tiefe normiert und miteinander verglichen. Die Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration im Stratum granulosum bleibt auch nach der Tiefen-Normierung bestehen (s. Abbildung 4-22).



Abbildung 4-22: Repräsentative Ca²⁺-Konzentrationsverläufe in Kontroll- und ekzematöser Haut des AlD-Modells. A: Gemittelte Ca²⁺-Konzentrationen in Kontrollhaut (schwarz) und Ekzem (rot) innerhalb einer 35 μ m² ROI gegen die Tiefe der Epidermis aufgetragen (beginnend mit dem *Stratum corneum*). B: Gemittelte Ca²⁺-Konzentrationen in Kontrollhaut (schwarz) und Ekzem (rot) innerhalb einer 35 μ m² ROI auf Tiefenprozent normiert. C & D: Identisch mit Abb. A & B, Angaben der epidermalen Schichten (SG/SC: Übergang *S.corneum/S.granulosum*, SS/SG: Übergang *S.granulosum/S.spinosum*, SB/SS: Übergang *S.spinosum/S.basale*, Epidermis-Dermis: Grenze Epidermis. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Lebensdauer innerhalb einer ROI.

Aufgrund der deutlichsten Unterschiede in beiden Arten der Auswertung (s. Abbildung 4-22A & B), wurden in der weiteren Arbeit zur Korrelation mit Parametern des Ekzems sowie der Differenzierung und der Barriere folgende, aus den Z-Plots gewonnenen, Daten genauer analysiert.



Abbildung 4-23: Beschreibung der aus den Z-Plots resultierenden Calcium-Parameter. A: Calcium-SG

steht für die Ca²⁺-Konzentration des *Stratum granulosums* und ergibt sich aus den mittleren Ca²⁺-Konzentrationen des extra- und intrazellularen Raums innerhalb des *Stratum granulosums* (als Beispiel s. Abbildung 4-25). **B**: Der *MeC-Wert* ist die mittlere Ca²⁺-Konzentration der Gesamtepidermis, d.h. es wurde der Mittelwert der Ca²⁺-Konzentrationen der verschiedenen Tiefenebenen berechnet **C**: Die *Calcium-Baseline* ist die

Längenangabe, in der sich die epidermale Ca²⁺-Konzentration im unteren Bereich der Epidermis auf einem niedrigen Calcium-Niveau befindet, was sich in der Kurve durch einen relativ horizontalen Verlauf zeigt.

Für die weiteren Analysen und Korrelationen wurden dabei die Original-Daten und nicht die auf Tiefenprozent normierten Daten verwendet. Für einen Überblick über die Calcium-Parameter Calcium-SG, MeC und Calcium-Baseline in Abhängigkeit der Provokationen ist die Abbildung 4-24 zu betrachten.



Abbildung 4-24: Übersicht über die Calcium-Parameter des AlD-Modells im Mittel in Abhängigkeit der Behandlung. A: Mittelwerte von Calcium-SG in Abhängigkeit der Provokationen, B: Mittelwerte von MeC in Abhängigkeit der Provokationen, C: Mittelwerte von Calcium-Baseline in Abhängigkeit der Provokationen (n=8; SD).

4.5.2 Extra- & intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen im *Stratum granulosum*

Im *Stratum granulosum* ist es möglich deutlich zwischen intra- und extrazellulären Bereichen zu unterscheiden. Somit kann der oben gewählte Parameter "Calcium-SG" noch weiter unterteilt werden in extra- und intrazelluläres Calcium. Die Messungen der intraund extrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen in dieser Schicht wurden durch die Definition von extra- und intrazellulären ROI sowohl für Kontrollhaut (Abbildung 4-25), als auch für ekzematöse Haut (Abbildung 4-26) durchgeführt. Interessanterweise sind im *Stratum granulosum* sowohl der Kontrollhaut als auch des Ekzems höhere Konzentration an freiem Calcium innerhalb der Zelle zu beobachten als extrazellulär.



Kontrolle

Abbildung 4-25: Extra- und intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration des *Stratum granulosums* in Kontrollhaut des AlD-Modells. Linke Spalte: Im Intensitätsbild werden durch die eingezeichneten ROI (rot) der extra (oben) und intrazelluläre (unten) Raum definiert. Mitte: Die zuvor in den Intensitätsbildern erstellten ROI werden auf die FLIM-Calcium-Daten übertragen. **Rechte Spalte:** Die Kombination aus Intensitäts- und FLIM-Daten macht die Korrelation von Calcium-Informationen und Zellstrukturen möglich. Falschfarbenskala zeigt Ca²⁺-Konzentrationen in μmol/l. Messbalken 20 μm.

Ekzem



Abbildung 4-26: Extra- und intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration des *Stratum granulosums* in ekzematöser Haut des AlD-Modells. Linke Spalte: Im Intensitätsbild werden durch die eingezeichneten ROI (rot) der extra (oben) und intrazelluläre (unten) Raum definiert. Mitte: Die zuvor in den Intensitätsbildern erstellten ROI werden auf die FLIM-Calcium-Daten übertragen. **Rechte Spalte:** Die Kombination aus Intensitäts- und FLIM-Daten macht die Korrelation von Calcium-Informationen und Zellstrukturen möglich. Falschfarbenskala zeigt Ca²⁺-Konzentrationen in µmol/l. Messbalken 20 µm.

Die Analyse der extra- und intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen ist in Abbildung 4-27 dargestellt. Um sowohl den Einfluss der Anzahl der Provokationen als auch die unterschiedlichen Lokalisationen der Ca²⁺-Konzentrationen abzubilden, sind die Daten in einem 3-Achsen Diagramm aufbereitet. Es wird deutlich, dass mit der Anzahl der Provokationen das Calcium im *Stratum granulosum* ansteigt, sich das Verhältnis des extraund intrazellulären Calciums nicht ändert, sondern parallel zu den Provokationen ansteigt.



Abbildung 4-27: Übersicht der extra- und intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen in Abhängigkeit der Provokationen. Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration liegt bei jeder Anzahl von Provokationen signifikant über dem Wert der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration, dies gilt auch für die Kontrolle. Ebenfalls ist die 3-fach Provokation signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht (intra- und extrazellulär) (n=8).

4.6 Epidermale Differenzierungs- und Proliferationsmarker im AlD-Modell

Da die Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten als calciumabhängig beschrieben wurde (Kurasawa *et al.*, 2011; Lansdown, 2002; Tu *et al.*, 2012; Tuschil *et al.*, 1992), führte ich in dieser Arbeit immunhistochemische Färbungen verschiedener Differenzierungs- und Proliferationsmarker durch, um die Ergebnisse mit den oben festgelegten Calcium-Parametern zu korrelieren. Zur Überprüfung von Veränderungen der Differenzierungsmarkern und deren Lokalisation in epidermalen Schichten wurden frühe und späte epidermale Marker (s. Kapitel 1.1) an Paraffinschnitten von ekzematöser und Kontrollhaut des AlD-Modells gefärbt. Als basaler Differenzierungsmarker wurde Keratin 14 verwendet. Als Indikator für die frühe Differenzierung wurde Keratin 10 und für eine fortgeschrittene Differenzierung Filaggrin (s. Kapitel 3.2) gefärbt. Marker für proliferierende Zellen war Ki67 und um hyperproliferierende Zellen nachzuweisen, wurden Färbungen gegen Keratin 6 durchgeführt.

4.6.1 Keratin 14

Die Lokalisation von Keratin 14 ist wie zu erwarten in der Kontrolle auf die basale Schicht der zwei- bis dreischichtigen Epidermis beschränkt. In der deutlich dickeren Epidermis des Ekzems, die sich über 4 – 5 lebende Schichten erstreckt, ist die Lokalisation von Keratin 14 stark verbreitert (Abbildung 4-28).



Keratin 14

Abbildung 4-28: Repräsentative immunhistochemische Färbung des basalen Differenzierungsmarker Keratin 14 an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells. Obere Reihe: Die Dapi-Kernfärbung (blau) zeigt die ein- bis zweischichtige lebende Epidermis der Kontrollhaut. Keratin 14 (Mitte, grün) ist auf die basale Schicht der Epidermis beschränkt. Rechts: Kombination aus Dapi und Keratin 14. Untere Reihe: Im Ekzem zeigt die Dapi-Färbung (blau) eine deutliche Verdickung der lebenden Epidermis. Die Keratin 14-Färbung (Mitte, grün) ist in mehreren Schichten zu finden. Rechts: Kombination aus Dapi und Keratin 14. In beiden Präparaten findet sich die K14-Färbung auch im Haarfollikel (HF). Messbalken 25 µm.

4.6.2 Keratin 10

Keratin 10 ist als früher Differenzierungsmarker in der Kontrolle erwartungsgemäß in allen suprabasalen Schichten lokalisiert. Nur wenige Zellen in der Basalschicht zeigen ebenfalls eine leichte Keratin 10-Färbung. Im Ekzem sind die unteren suprabasalen Schichten negativ und erst die typisch abgeflachten Zellen des *Stratum granulosums* gefärbt. Sowohl in der Kontrollhaut als auch im Ekzem ist das *Stratum corneum* positiv für Keratin 10 (Abbildung 4-29).



Keratin 10

Abbildung 4-29: Repräsentative immunhistochemische Färbung des suprabasalen Differenzierungsmarker Keratin 10 an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells. Obere Reihe: Die Dapi-Kernfärbung (Links, blau) zeigt die ein- bis zweischichtige lebende Epidermis der Kontrollhaut. Keratin 10 (Mitte, grün) ist vornehmlich suprabasal lokalisiert. Links: Kombination aus Dapi und Keratin 10. **Untere Reihe:** Im Ekzem zeigt die Dapi-Färbung (Links, blau) eine deutliche Verdickung der lebenden Epidermis. Keratin 10-Färbung (Mitte, grün) tritt erst im *Stratum granulosum* auf. Rechts: Kombination aus Dapi und Keratin 10 Färbung. Sowohl in der Kontrollhaut als auch im Ekzem ist Keratin 10 im *Stratum corneum* (Zellen ohne Zellkern) vorhanden. Messbalken 25 μm.

4.6.3 Filaggrin

Die Lokalisation von Filaggrin zeigt sich in der Kontrollhaut erwartungsgemäß in einer dünnen Schicht im *Stratum granulosum*. Im Ekzem des AID-Modells ist eine äußerst geringe/keine Färbung des *Stratum granulosums* festzustellen (Abbildung 4-30).



Filaggrin

Abbildung 4-30: Repräsentative immunhistochemische Färbung des Differenzierungsmarker Filaggrin an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells. Obere Reihe: Die Dapi-Kernfärbung (Links, blau) zeigt die Epidermis der Kontrollhaut. Filaggrin (Mitte, grün) ist auf das *Stratum granulosum* beschränkt. Links: Kombination aus Dapi und Filaggrin. **Untere Reihe:** Im Ekzem zeigt die Dapi-Färbung (Links, blau) eine deutliche Verdickung der lebenden Epidermis. Die Filaggrin-Färbung (Mitte, grün) ist nur noch äußerst schwach im *Stratum granulosum* zu sehen. Rechts: Kombination aus Filaggrin- und Dapi-Färbung. Messbalken 25 µm.

4.6.4 Keratin 6

Das in hyperproliferierenden Zellen auftretende Keratin 6 zeigt in der Kontrolle eine negative Färbung. In ekzematöser Haut zeigt sich eine Lokalisation im *Stratum granulosum* und in einigen Bereichen auch im *Stratum spinosum*, vor allem bei zunehmender Ekzemstärke (Abbildung 4-31).



Keratin 6

Abbildung 4-31: Repräsentative immunhistochemische Färbung des Hyperproliferationsmarkers Keratin 6 an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells. Obere Reihe: Die Dapi-Kernfärbung (Links, blau) zeigt die Epidermis der Kontrollhaut. Keratin 6 (Mitte, grün) ist negativ. Rechts: Kombination aus Dapi und Keratin 6. Untere Reihe: Im Ekzem zeigt die Dapi-Färbung (Links, blau) eine deutliche Verdickung der lebenden Epidermis. Eine Keratin 6-Färbung (Mitte, grün) wird im *Stratum granulosum* gefunden. Rechts: Kombination aus Dapi und Keratin 6-Färbung. Messbalken 25 µm.

4.6.5 Ki67

Der Marker Ki67 markiert Zellen die sich außerhalb der Interphase (Ruhephase) befinden

und somit mitotisch aktiv sind. Die Färbung der Kontrollhaut zeigt wenige Ki67-positiven Zellen, die in der Basalschicht lokalisiert sind. Im Ekzem sind die Ki67-positiven Zellen deutlich zahlreicher vertreten und beschränken sich in ihrer Lokalisation nicht ausschließlich auf die Basalschicht, sondern sie sind auch suprabasal lokalisiert (Abbildung 4-32).



Abbildung 4-32: Repräsentative immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells. Obere Reihe: Die Dapi-Kernfärbung (Links, blau) zeigt die Epidermis der Kontrollhaut. Ki67 ist basal lokalisiert (Mitte, grün). Rechts: Kombination aus Dapi und Ki67. Untere Reihe: Im Ekzem zeigt die Dapi-Färbung (Links, blau) eine deutliche Verdickung der lebenden Epidermis. Die Ki67-Färbung (Mitte, grün) ist zusätzlich zur basalen Lokalisation auch suprabasal zu beobachten. Rechts: Kombination aus Dapi und Ki67 Färbung. Messbalken 25 µm.

4.7 Tight Junction-Proteine im AID-Modell

Tight Junctions spielen eine wichtige Rolle für die Hautbarriere und für die Hauthydratation. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ihr Aufbau von der Anwesenheit von Calcium abhängig ist, sie aber auch beeinflussend auf die parazelluläre Calcium-Permeabilität wirken können.

Ki67

Da sich vor allem die TJ-Proteine Claudin-1 und ZO-1 als wichtig für den Aufbau und die Permeabilitätsfunktion herausstellten (Kirschner *et al.*, 2013), wurden diese beiden Proteine hinsichtlich deren Lokalisation in Hautproben des AlD-Modells untersucht.

4.7.1 Claudin-1

Wie zu erwarten, zeigt das Tight Junction-Protein Claudin-1 (Cldn1) in der Kontrollhaut eine Lokalisation an der Plasmamembran über die komplette lebende Epidermis von der Basalschicht bis zum *Stratum granulosum*. In der verdickten ekzematösen Haut ist eine verminderte Lokalisation an den Zellgrenzen in der Basalschicht und in 1-2 darüber liegenden Zellschichten zu beobachten (Abbildung 4-33).



Claudin-1

Abbildung 4-33: Repräsentative immunhistochemische Färbung des TJ-Proteins Cldn1 an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells. Obere Reihe: Die Dapi-Kernfärbung (Links, blau) zeigt die Epidermis der Kontrollhaut. Cldn1 zeigt eine Zellmembran-Lokalisation über die gesamte lebende Epidermis (Mitte, grün).

Rechts: Kombination aus Dapi und Cldn1. **Untere Reihe:** Im Ekzem zeigt die Dapi-Färbung (Links, blau) eine deutliche Verdickung der lebenden Epidermis. Die Cldn1-Färbung (Mitte, grün) zeigt verminderte Lokalisation an den Zellgrenzen in basalen und suprabasalen Bereichen der Epidermis Rechts: Kombination aus Dapi und Cldn1 Färbung. Messbalken 25 µm.

4.7.2 ZO-1

Das Tight Junction-Protein ZO-1 weist in Kontrollhaut eine Lokalisation an den Zellgrenzen des *Stratum granulosums* auf. Dabei ist eine punkt- oder strichartige ("whisker-like") Färbung typisch (Brandner *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigt ZO-1 im Ekzem eine stark verbreiterte Lokalisation, die vom *Stratum granulosum* bis an die Grenze zur Basalschicht reicht. Auch hier ist die Färbung unregelmäßig und punktiert an den Zellgrenzen zu beobachten, sie tritt aber deutlich intensiver als in der Kontrolle auf (Abbildung 4-34).



ZO-1

Abbildung 4-34: Repräsentative immunhistochemische Färbung des TJ-Proteins ZO-1 an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells. Obere Reihe: Die Dapi-Kernfärbung (Links, blau) zeigt die Epidermis der Kontrollhaut. (Mitte, grün). Rechts: Kombination aus Dapi und ZO-1 (ZO-1 ist durch die weißen Pfeilspitzen markiert). Untere Reihe: Im Ekzem zeigt die Dapi-Färbung (Links, blau) eine deutliche Verdickung der lebenden

Epidermis. ZO-1-Färbung (Mitte, grün). Rechts: Kombination aus Dapi und ZO-1 Färbung (ZO-1 ist durch die weißen Pfeilspitzen markiert). Messbalken 25 µm.

4.8 Korrelationen von Calcium-Parametern mit Parametern des AlD-Modells, der Differenzierungsmarker, Tight Junction-Proteinen und Proliferationsmarker

Um die Frage zu klären, in welchem Zusammenhang die in Kapitel 4.5.1 gezeigte unterschiedliche epidermale Verteilung von Ca²⁺-Konzentrationen zu den Parametern der Atopischen Dermatitis sowie der Differenzierung und Barrierefunktion stehen, wurden die drei Calcium-Parameter: Calcium SG extra/intrazellulär, Mittlere Ca²⁺-Konzentrationen der Gesamtepidermis (MeC) und Calcium-Baseline, mit den erhobenen Daten des AlD-Modells, der Differenzierungsmarker und Tight Junction-Proteinen korreliert. Hierbei sind beide Gruppen als Einfluss- und Zielgrößen berücksichtigt worden, um Effekte in beide Richtungen der Parameter zu untersuchen.

Die in den Tabellen enthaltenen Werte wurden mit gemischten Modellen erhoben (s. Kapitel 2.6). Für alle Parameter gilt n= 8 Tiere, für TEWL & Corneometrie gilt n = 5. Die Werte in den Tabellen lesen sich folgendermaßen: Wird die Einflussgröße um eine Einheit erhöht, steigt die Zielgröße um den in der Tabelle eingetragenen Wert des Schätzers (die Signifikanz der Änderung ist im Feld daneben angegeben). Als Beispiel sei hier der Einfluss von MeC auf die Infiltrathöhe (Tabelle 15) genannt: Wird MeC um eine Einheit μ mol/l erhöht, steigt die Infiltrathöhe um 49,606 μ m wobei diese Änderung in diesem Fall nicht signifikant ist.

Im Folgenden werden nur Ergebnisse genannt, die von biologischer Bedeutung sind, um die Auswertung der Daten übersichtlich zu halten.

4.8.1 Korrelationen von Calcium-Parametern mit Parametern der Atopischen Dermatitis

Die Korrelation der Calcium-Parameter mit den charakteristischen Parametern der Atopischen Dermatitis (Infiltrathöhe, Epidermisdicke, IgE und IgE-OVA-Antikörperkonzentrationen) ergaben für den MeC-Wert einen theoretischen signifikanten Einfluss auf IgE-OVA-Antikörperkonzentration, der jedoch marginal ist. Änderungen von Calcium-SG haben eine deutliche und signifikante Auswirkung auf die Epidermisdicke, die fast 6 µm ansteigt. Veränderungen in der Calcium-Baseline bewirken einen signifikanten und relevanten Anstieg sowohl der Epidermisdicke als auch der Infiltrathöhe. Veränderungen um eine Einheit der Parameter MeC und Calcium-SG lassen die Hydratation des Stratum corneums ansteigen, ein Trend ist ebenfalls für den Einfluss von Calcium-SG auf den TEWL (p= 0,06) zu beobachten (Tabelle 15).

Tabel	le 15:Korre	lationsergebnis	se des Einflusse	s von Calcium	n-Parametern au	f AD-Parameter.
-------	-------------	-----------------	------------------	---------------	-----------------	-----------------

	Infiltrathöhe (µm)		Epidermisdicke (µm)		IgE (ng/ml)		IgE-OVA (ng/ml)	
EINFLUSSGRÖßEN	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz
MeC (Mittlere Ca ²⁺ - Konz. der gesamten Epidermis, µmol/l)	49,606	0,353	0,997	0,583	0,004	0,120	0,006	0,047
Calcium-SG (μmol/l)	242,962	0,067	5,890	0,032	0,001	0,427	0,000	0,990
Calcium-Baseline (μm)	13,806	<0,001	0,603	<0,001	0,006	0,044	0,085	0,139

	ZIELGRÖßEN					
	Corneom	etrie (a.u.)	TEWL (g/m ² h)			
EINFLUSSGRÖßEN	Schätzer Signifikanz		Schätzer	Signifikanz		
MeC (Mittlere Ca ²⁺ - Konz. der gesamten Epidermis, μmol/l)	18,693	0,006	2,632	0,280		
Calcium-SG (µmol/l)	26,255	0,008	5,907	0,060		
Calcium-Baseline (μm)	0,231	0,482	0,145	0,186		

Kehrt man die Einflussgrößen und Zielgrößen um, so zeigt sich, dass die Infiltrathöhe einen Einfluss auf das Calcium-SG und die Calcium-Baseline besitzt. Auch die Epidermisdicke hat einen signifikanten Einfluss auf diese beiden Parameter. Die IgE-Antikörperkonzentration zeigt eine Beeinflussung der Calcium-Baseline. Eine Erhöhung der Hydratation (Corneometrie) lässt den MeC und Calcium-SG ansteigen. Eine Erhöhung des TEWL zieht eine Erhöhung des Calcium-SG nach sich (Tabelle 16).

	ZIELGROISEN						
	MeC (µ	umol/l)	Calcium-S	G (µmol/l)	Calcium-Baseline (µm)		
<u>EINFLUSSGRÖßEN</u>	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz	
Infiltrathöhe (μm)	0,001	0,219	0,001	0,012	0,021	<0,001	
Epidermisdicke (μm)	0,020	0,225	0,010	0,005	0,458	<0,001	
lgE (ng/ml)	-0,001	0,120	0,000	0,385	0,006	0,044	
lgE-OVA (ng/ml)	-0,015	0,047	0,000	0,946	0,085	0,139	
Corneometrie (a.u.)	0,015	0,012	0,010	<0,001	0,025	0,682	
TEWL (g/m²h)	0,018	0,347	0,021	0,012	0,266	0,144	

TIEL COÖOEN

 Tabelle 16:
 Korrelationsergebnisse des Einflusses von AD-Parametern auf Calcium-Parameter.

Zusammenfasend lässt sich feststellen, dass die Epidermisdicke mit Calcium-SG und der Calcium-Baseline in beide Richtungen verknüpft ist. Dies gilt auch für die Korrelation der Infiltrathöhe mit Calcium-Baseline und der IgE-OVA-Antikörperkonzentration mit MeC, sowie der Hydratation (Corneometrie) sowohl mit MeC als auch mit Calcium-SG. Dahingegen beeinflussen sowohl die Infiltrathöhe als auch der TEWL einseitig das Calcium-SG (wobei es für den TEWL in die andere Richtung einen Trend gibt).Die IgE-Antikörperkonzentration beeinflusst einseitig die Calcium-Baseline.

4.8.2 Korrelationen von Calcium-Parametern mit Differenzierungsmarkern

Die Korrelation der Calcium-Parameter zeigt, dass die Calcium-Baseline als Einflussgröße eng mit den Strecken der Differenzierungsmarker Keratin 10 und 14 zusammenhängt. Die Lokalisationen beider Differenzierungsmarker verlaufen in der Epidermis reziprok. Betrachtet man den Verlauf der Lokalisationen in Bezug zur Calcium-Baseline, so zeigt sich ein Trend, dass sich die gemessene Strecke (s. Kapitel 3.4.9) der beiden Marker mit der Länge der Calcium-Baseline ändert (s. Abbildung 4-35).



Abbildung 4-35: Vergleich der Strecken von Keratin 10, 14 und der Calcium-Baseline. Die Calcium-Baseline (blau), die Strecke K14 (schwarz) und Strecke "Kein K10" verlängern sich mit steigenden Provokationen.

Dabei gilt zu betonen, dass es sich bei der Keratin 10-Strecke um die Strecke handelt, die ausgehend von der Basallamina, in der kein Keratin 10 vorhanden ist. Demgegenüber gibt es keinen signifikanten Einfluss der MeC und der Calcium-SG. Alle Calcium-Parameter haben keinen Einfluss auf den späten Differenzierungsmarker Filaggrin (Tabelle 17).

	Keratin 10-Strecke		Keratin 14-Strecke		Filaggrin	
EINFLUSSGRÖßEN	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz
MeC (Mittlere Ca²+ -Konz. der gesamten Epidermis, μmol/l)	-0,022	0,973	-0,753	0,324	Keinen Einfluss	0,535
Calcium-SG (μmol/l)	2,296	0,189	3,043	0,221	Keinen Einfluss	0,411
Calcium-Baseline (μm)	0,235	<0,001	0,325	<0,001	Keinen Einfluss	0,177

 Tabelle 17: Korrelationsergebnisse des Einflusses von Calcium-Parametern auf Differenzierungsmarker.

 ZIELGRÖßEN

In der umgekehrten Korrelation der Differenzierungsmarker mit den Calcium-Parametern (Tabelle 18) zeigte sich der Einfluss von Keratin 10 und 14 auf Calcium-SG und die Calcium-Baseline. Filaggrin hat keinen Einfluss auf die Calcium-Parameter. Dies liegt an dem kategorialen Charakter des Parameters. Liegen, wie in diesem Fall, nur zwei Zustände vor, von denen einer nicht signifikant ist, gibt es keinen signifikanten Unterschied der beiden

Zustände, der sich auf die Zielgröße auswirken könnte.

Tabelle 18: Korrelationsergebnisse des Einflusses von Differenzierungsmarker auf Calcium-Paramete	r.
---------------------------------------------------------------------------------------------------	----

	ZIELGRÖßEN							
	MeC (µ	umol/l)	Calcium-S	G (μmol/l)	Calcium-Baseline (µm)			
EINFLUSSGRÖßEN	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz		
Keratin 10-Strecke (µm)	0,0446	0,146	0,017	0,027	0,8516	<0,001		
Keratin 14-Strecke (µm)	0,0155	0,577	0,015	0,032	0,8764	<0,001		
Filaggrin - normal	-0,191	0,143	1,773	0,001	9,909	0,001		
Filaggrin – stark herabreguliert	1,167	0,001	0,035	0,703	1,6486	0,243		

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass im Falle von Keratin 10 und 14 eine beidseitige Beeinflussung mit der Calcium-Baseline besteht. Beide Proteine beeinflussen einseitig signifikant das Calcium-SG.

4.8.3 Korrelation von Calcium-Parametern mit Markern für Proliferation und Hyperproliferation

Calcium-SG und die Calcium-Baseline sind positiv mit dem Proliferationsmarker Ki67-Index (Anzahl Ki-67 positive Zellen/Dapi gefärbte Zellen) korreliert.

Tabelle 19: Korrelationsergebnisse des Einflusses von Calcium-Parametern Proliferations- und

 Hyperproliferationsmarker.

	ZIELGRÖßEN						
	Ki67	-Index	Kera	tin 6			
EINFLUSSGRÖßEN	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz			
MeC (Mittlere Ca ²⁺ - Konz. der gesamten Epidermis, μmol/l)	-0,163	0,637	Keinen Einfluss	0,527			
Calcium-SG (μmol/l)	0,552	<0,001	Keinen Einfluss	0,108			
Calcium-Baseline (μm)	0,014	0,001	Keinen Einfluss	0,057			

Änderungen des Ki67-Index erhöhen Calcium-SG und verlängern die Calcium-Baseline. Das Auftreten von Keratin 6 ist mit einer Erhöhung der Calcium-Baseline korreliert.

Tabelle 20 Korrelationsergebnisse des Einflusses von Proliferations- und Hyperproliferationsmarkern aufCalcium-Parameter.

		ZIELGRÖßEN						
	MeC (µmol/l)	Calcium-SG (µmol/l)		Calcium-Baseline (µm)			
EINFLUSSGRÖßEN	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz		
Ki67-Index	0,379	0,644	0,974	<0,001	23,393	0,002		
Keratin 6 - vorhanden	1,647	<0,001	1,805	<0,001	11,176	<0,001		
Keratin 6 - nicht vorhanden	-0,241	0,086	-0,0906	0,106	-3,421	<0,001		

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass der Proliferationsmarker Ki67 mit der Calcium-Baseline und er Calcium-SG korreliert ist und das Vorhandensein von Keratin 6 die Calcium-Baseline verlängert.

4.8.4 Korrelationen von Calcium-Parametern mit der Lokalisation der Tight Junction-Proteine Claudin-1 und ZO-1

Die Calcium-Baseline zeigt einen signifikanten Einfluss auf die beiden Tight Junction-Proteine. Für Claudin-1 zeigt sich eine signifikante Korrelation der Strecke, in der Cldn1 in der Epidermis von basal ausgehend herunterreguliert ist, zur Calcium-Baseline. Für die weiteren Calcium-Parameter gibt es keine signifikante Korrelation. Im Falle von ZO-1 ist die Korrelation negativ: Hier sinkt die Wahrscheinlichkeit, bei einer Verlängerung der Calcium-Baseline, normal lokalisiertes ZO-1 zu beobachten (Tabelle 21).

	ZIELGROBEN							
	Cldn1-Str	ecke (μm)	ZO-1					
EINFLUSSGRÖßEN	Schätzer Signifikanz		Schätzer	Signifikanz				
MeC (Mittlere Ca ²⁺ -Konz.								
der gesamten Epidermis,	0,21	0,844	Keinen Einfluss	0,718				
µmol/l)								
Calcium-SG (µmol/l)	3,175	0,274	Keinen Einfluss	0,087				
Calcium-Baseline (µm)	0,375	<0,001	Einfluss	0,021				

 Tabelle 21: Korrelationsergebnisse des Einflusses von Calcium-Parametern auf Tight Junction-Proteine.

Betrachtet man ZO-1 als Einflussgröße, kann man beobachten, dass die Lokalisation von normalem und stark verbreitertem ZO-1 mit Calcium-SG korreliert ist, dass Calcium-SG sich verringert, wenn ZO-1 normal lokalisiert und sich erhöht, wenn ZO-1 stark verbreitet ist. Weiterhin haben die Lokalisationszustände "normal" und "leicht verbreitert" von ZO-1 einen negativen Einfluss auf die Länge der Calcium-Baseline, während der Lokalisationszustand "stark verbreitert" einen positiven Einfluss hat. Die Strecke, in der Cldn1 herabreguliert gefunden wird, ist signifikant mit der Länge der Calcium-Baseline korreliert (Tabelle 22).

	ZIELGRÖßEN						
	MeC (µmol/l)		Calcium-SG (µmol/l)		Calcium-Baseline (µm)		
EINFLUSSGRÖßEN	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz	Schätzer	Signifikanz	
Cldn1-Strecke	0,024	0,283	0,007	0,239	0,598	<0,001	
ZO-1 - normal	0,955	0,674	-0,249	0,008	-8,221	<0,001	
ZO-1 - leicht verbreitert	0,524	0,066	-0,198	0,311	-6,481	<0,001	
ZO-1 - stark verbreitert	1,333	<0,001	1,927	<0,001	15,905	<0,001	

 Tabelle 22:
 Korrelationsergebnisse des Einflusses von Tight Junction-Proteinen auf Calcium-Parameter.

Die Zusammenfassung der Korrelation beider Gruppen ergibt eine beidseitige und positive Korrelation der Strecke Cldn1-Herabregulation und der Calcium-Baseline. Auch ZO-1 ist beidseitig mit der Calcium-Baseline korreliert. Eine Verlängerung der Calcium-Baseline erhöht die Wahrscheinlichkeit kein normal lokalisiertes ZO-1 zu beobachten. Gleichzeitig beeinflusst die stark verbreiterte ZO-1 Lokalisation eine Verlängerung der Calcium-Baseline.

5 Diskussion

5.1 2P-FLIM

Für mikroskopische Hautuntersuchungen, die ohne Fixierung des Gewebes auskommen sollen, um somit möglichst nah die in vivo-Situation wiederzugeben, ist die 2-PM ein sehr geeignetes Werkzeug. Durch die infrarotnahe Anregung, verbunden mit der dadurch möglichen hohen Eindringtiefe in das Gewebe, dem reduzierten Bleichen des Farbstoffes und der intrinsischen Konfokalität durch den 2-Photonen-Effekt, stellt diese Methode die ideale Technik dar, um mikroskopische Hautuntersuchungen durchzuführen. Um Ca²⁺-Konzentrationen in der Haut zu erheben, wurde nicht die Messung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes angewendet. Denn gegenüber leicht zugänglichen Geweben oder Zellkulturen, würden in der Haut Artefakte durch die heterogene Farbstoffverteilung und dadurch unterschiedlichen Intensitäten auftreten, welche die Ca²⁺-Konzentrationswerte und –Verteilungen verfälschen würden. Dieses Problem wurde durch Verwendung der Fluoreszenzlebensdauermessung des Farbstoffes umgangen, da diese nicht von der Farbstoffkonzentration oder der Höhe der Anregung abhängig ist. Die Kombination aus 2-Photonenanregung und der Fluoreszenzlebensdauermessung ist daher sehr vielversprechend für die Untersuchung freien Calciums in der Haut.

5.2 Detektorvergleich

Der FLIM-Detektorvergleich wurde durchgeführt, um für zukünftige (Calcium-)Messungen an Hautproben den geeignetsten Detektor zu bestimmen. Bis zu diesem Zeitpunkt war eine tatsächliche Gegenüberstellung der Leistungsfähigkeiten beider Systeme (Picostar und TCSPC) nicht durchgeführt worden, bzw. Messdaten aus der Haut nicht bekannt.

5.2.1 Bestimmung der lateralen und axialen Punktspreizfunktion (PSF)

Die Untersuchung der Punktspreizfunktion, in der das maximale Auflösungsvermögen der Detektoren unter Idealbedingungen untersucht wurde, ergab eine vergleichbare Auflösung in der axialen Richtung von ca. 1,3 µm für beide Detektoren. Diese Werte sind mit bereits veröffentlichten Daten, die unter gleichen Anregungsmethoden erhoben wurden, vergleichbar (Niesner et al., 2007). Für die laterale Auflösung wurde für den TCSPC ein Wert von 0,35 µm ermittelt, der ebenfalls mit der Literatur übereinstimmt (Niesner et al., 2007). Diese Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten bekräftigt die Messdaten der lateralen Auflösung der PicoStar von 0,75 µm, die jedoch noch nicht in der Literatur verglichen werden konnten. Die Diskrepanz des Auflösungsvermögens beider Detektoren ist auf die unterschiedlichen Detektierungs- und Anregungsmethoden zurückzuführen. Die PicoStar regt die zu messende Probe im Multistrahl-Modus an (32 - 64-Strahlen), wandelt die Photonen in Elektronen (MCP) um und bildet diese auf einem Phosphorschirm ab, dessen Bild von einer CCD-Kamera detektiert wird (s. Kapitel 3.4.1.2). Durch diese Methode wird ein größeres Probenareal schneller angeregt, jedoch wird mit diesem Verfahren gleichzeitig die Punkt-zu-Punkt Korrelation eingebüßt und die Anfälligkeit für Probenstreulicht erhöht, da das gesamte Probenareal zu einer Zeit gemessen wird. Der TCSPC regt im Einzelstrahlmodus an und detektiert die Fluoreszenz mit (mehreren parallel geschalteten) PMTs. Durch die Anregungs- und Detektionsmethode verfügt der TCSPC über die Punkt-zu-Punkt Korrelation und detektiert sämtliche Fluoreszenz-Photonen aus nur einem Punkt der Probe und ist damit, im Vergleich zur PicoStar, unabhängiger gegenüber Streulicht. Weiter werden die Photonen nicht erneut von Elektronen in Photonen überführt, wie es bei der PicoStar der Fall ist. Somit ist die PicoStar für schnelle Messungen besser geeignet, während der TCSPC eine bessere Auflösung liefert.

5.2.2 Tiefenabhängiges Signal-zu-Rausch-Verhältnis und maximale FLIM-Messtiefe

Ein wichtiges Kriterium für die Untersuchung von Haut und deren Schichten ist eine entsprechend hohe Eindringtiefe des Mikroskops, um neben der Epidermis auch biologische Prozesse in der Dermis dokumentieren zu können. Um die maximale Messtiefe beider Detektoren zu bestimmen, wurde neben der Haut, die ein optisch streuendes Gewebe darstellt (Bhandari et al., 2012), Gehirn als ein weniger stark streuendes Gewebe ex vivo vermessen. An beiden Proben wurde die Tiefe bestimmt, in welcher das Signal-zu-Rausch-Verhältnis 1 betrug und damit das Signal nicht mehr vom Rauschen zu differenzieren war. Sowohl in der Haut (365 µm vs. 100 µm) als auch in den Hirnschnitten (258 µm vs. 133 µm) erreichte der TCSPC eine wesentlich höhere Eindringtiefe gegenüber der PicoStar. Diese Werte passen gut zu bereits veröffentlichten Messungen, die auch mit 2-Photonen-Anregung im Einzel- und Multistrahl-Anregung ermittelt wurden (Niesner et al., 2007). Ein weiterer ermittelter Parameter war die maximale FLIM-Messtiefe, da ab dieser Grenze die Genauigkeit der gemessen Lebensdauer zu ungenau wird. Diese Grenze wurde heuristisch definiert und wurde erreicht, wenn die Verteilungsbreite der bekannten Fluoreszenzlebensdauer des untersuchten Fluorophors einen Wert von 1000 ps (FWHM) betrug. Auch hier war der TCSPC (290 μm (Haut) & 240 μm (Hirn)) der PicoStar (90 μm (Haut) & 115 μm (Hirn)) deutlich überlegen. Betrachtet man die Lebensdauern in Abhängig des SNR-Wertes so zeigt sich, dass der TCSPC (SNR = 4 (Haut) & SNR = 3-4 (Hirn)) gegenüber der PicoStar (SNR = 10 (Haut) & SNR = 17 (Hirn)) wesentlich weniger Signal für valide Fluoreszenzlebensdauern benötigt. Der Grund für das schlechtere Ergebnis der PicoStar liegt in der Detektionsmethode der PicoStar. Durch die Streulichtanfälligkeit steigt das Rauschen und der SNR Wert von 1 wird früher erreicht. Dies ist auch der Grund, weshalb die maximale FLIM-Messtiefe in geringeren Tiefen von der PicoStar schneller erreicht wird. Ein zusätzlicher Faktor ist, dass die Streuung der Photonen durch Messungen in tieferen Schichten zunimmt, was die Photonenausbeute weiter reduziert und den oben genannten Effekt verstärkt. Dies ist ein besonders interessanter Punkt, da die erreichten 90 µm der PicoStar fast ein Ausschlusskriterum für Hautmessung bedeutet. Da die Epidermis der Felderhaut, die neben den Fußsohlen und Handinnenflächen, den humanen Körper bedeckt, bis zu 100 μm dick sein kann (Lüllmann-Rauch, 2006; Moll, 2010), ist die PicoStar hier an der Grenze ihrer Verwendbarkeit. Der TCSPC ist in Hinblick auf Tiefenmessungen für humane Haut besser geeignet. Murine Haut ist wesentlich dünner als humane Haut (Epidermisdicke <30 μm), weshalb für diese Haut beide Detektoren geeignet wären. Im Anbetracht der besseren Auflösung des TCSPC (siehe Kapitel 4.1.1) ist aber auch hier dieser zu bevorzugen.

5.3 Der Brechungsindex muriner Haut hat Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer wird durch den Brechungsindex verändert (Strickler & Berg, 1962). Um den Brechungsindex von muriner Haut zu messen, wurde die Fluoreszenzlebensdauer der mit Fluorescein gefärbten Haut gemessen. Die Messungen ergaben einen mittleren Brechungsindex des Stratum corneums von 1,49, für das Stratum granulosum von 1,43. Ebenfalls 2P-FLIM-Messungen von Fluorescein an muriner Haut führten Hanson et al. (2002) durch und generierten Werte von 1,52 (SC) und 1,39 (SG), die nah an den Werten dieser Arbeit liegen. 2P-FLIM-Messungen an künstlichen Hautmodellen zeigten einen Brechungsindex des Stratum corneums von 1,48 der des Stratum granulosums von 1,37 (Niesner et al., 2005), wobei für die Vergleichbarkeit bedacht werden muss, dass es in der Arbeit um artifizielle Haut handelt und somit Unterschiede zu echter Epidermis zu erwarten sind. Weiterhin spielt die Auswahl der Bilddaten, die in die Auswertung einfließen eine große Rolle, wie in dieser Arbeit beobachtet und von anderen beschrieben wurde (persönl. Kommunikation mit R. Niesner) und erschwert die Vergleichbarkeit verschiedener Arbeiten untereinander. Da die unterschiedlichen Brechungsindizes wie oben erwähnt, die Fluoreszenzlebensdauer beeinflussen, wurden die hier in der Arbeit generierten Werte auch bezüglich der Brechungsindizes korrigiert.

5.4 FLIM-Kalibrierung von Calcium-Green 5N

Für die Ca²⁺-Messungen der Haut wurde der Calcium-Farbstoff Calcium Green 5N (CG5N) gewählt, der freies Calcium detektiert. Es handelt sich dabei um einen in der 2-PM-Mikroskopie der Haut etablierten Farbstoff (Behne *et al.*, 2011; Celli *et al.*, 2010), der eine Dissoziationskonstante von 14 μ M (laut Hersteller Invitrogen) und somit eine geringe Ca²⁺-Affinität besitzt. Die Wahl stellt einen Kompromiss dar, um sowohl geringe Konzentrationen (unter 1 μ M) als auch hohe Konzentrationen (über 10 μ M) abbilden zu können und um nicht Gefahr zu laufen, hohe Ca²⁺-Konzentrationen durch einen zu sensitiven Ca²⁺-Farbstoff zu unterschätzen (Stout & Reynolds, 1999).

Die K_d-Werte für CG5N in der Literatur schwanken von 2 μ M bis zu 85 μ M (Behne *et al.*, 2011). In diesen Literaturwerten wurde ausschließlich Methoden verwendet, die auf der Messung von Fluoreszenzintensitäten beruhen. Hierbei unterliegen die Messungen z.T. Effekten wie der Bleichung oder heterogenen Verteilung des Farbstoffes, die beide Auswirkungen auf die gemessene Intensität und somit auf die Konzentration und letztendlich auf die K_d haben können.

Die FLIM-Kalibrierung von CG5N in dieser Arbeit ergab eine Dissoziationkonstante von 1,79 μ M. In Arbeiten, in denen CG5N mittels 2P-FLIM in der Haut verwendet wurde, ergaben sich bei der Kalibrierung Werte von 4,9 μ M und 3,64 μ M (Behne *et al.*, 2011; Celli *et al.*, 2010). Allerdings stützen sich beide Arbeiten auf eine Kalibrierungskurve, die sich auf nur 7 Messwerte bezieht, die einen Ca²⁺-Konzentrationsbereich von 0,3 bis ca. 100 μ M abdecken. Die in dieser Arbeit erstellte Kalibrierungskurve ist mit 14 Messwerten in einem Bereich 0 – 50 μ M deutlich genauer. Die Kalibrierungskurve zeigt darüber hinaus, dass Konzentrationen <0,3 μ M und ≥10 μ M in Bereichen liegen, die nahe dem Minimum bzw. Maximum der Kalibrierungskurve sind. Dies muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

5.5 Untersuchungen in der murinen Haut

5.5.1 Parameter des AlD-Maus-Modells

Die typischen Parameter der Atopischen Dermatitis, wie die Verdickung der Epidermis, das Auftreten eines dermalen Infiltrates und die Erhöhung der IgE-Antikörperkonzentration sind erfolgreich im Modell induziert worden und konnten durch die Anzahl der Provokationen gesteuert werden. Dabei zeigten die Parameter gute Übereinstimmungen mit Literaturwerten für die IgE-Antikörperkonzentration, Epidermisdicke und TEWL (Fallon *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 1999; Peters *et al.*, 2011). Die Corneometrie-Messung der 1fach Provokation zeigt eine signifikant erhöhte Hydratation, die der normalen Beobachtung im humanen Ekzem (Jensen *et al.*, 2004; Proksch *et al.*, 2008) aber auch in murinen Modellen für atopische Dermatitis widerspricht (Matsumoto *et al.*, 2004). Die Hydratation der 3-fach Provokation liegt im Trend unter der Hydratation der Kontrolle, was der Literatur entspricht. Die unerwarteten Ergebnisse, vor allem bei der 1 x Provokation, können zum einen auf die geringe Gruppenstärke von 5 Tieren zurückzuführen sein, zum anderen könnte es aber auch ein kompensatorischer Mechanismus sein, der bei wenig ausgeprägten Ekzemen greift. Dies muss mit höheren Tierzahlen noch überprüft werden.

5.5.2 2P-FLIM-Calcium-Messungen in gesunder Maushaut

Die 2P-FLIM-Messungen zeigen in der Kontrollhaut einen Calcium-Verlauf, der vom Stratum corneum aus gesehen ansteigt, ein Konzentrationsmaximum im Stratum granulosum erreicht und in Richtung Stratum basale auf Konzentrationen unterhalb des Stratum corneums abfällt. Anschließend zeigt sich ein Verlauf der Ca²⁺-Konzentration, der bis zur dermalen Grenze weitgehend stabil bleibt. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits beschriebenen epidermalen Calcium-Gradienten in humanen und murinen fixiertem (Leinonen et al., 2009; Mauro et al., 1998; Menon & Elias, 1991; Menon et al., 1994) und ex vivo Gewebe (Behne et al., 2011; Celli et al., 2010), gehen jedoch mehr ins Detail. Im Gegensatz zu den fixierten Geweben konnte hier ex vivo gemessen werden, darüber hinaus konnten die einzelnen epidermalen/dermalen Bereiche (inkl. extra/intrazellulär) genauer gegeneinander abgegrenzt und im dreidimensionalen visualisiert werden. Über die bisherigen ex vivo Untersuchungen von Behne et al. (2011) und Celli et al. (2010) hinausgehend, wurden in dieser Arbeit für die einzelnen epidermalen Schichten die Ca²⁺-Konzentrationen und nicht nur Konzentrationsbereiche bestimmt und im Stratum granulosum zwischen extra- und intrazellulären Bereichen unterschieden (siehe unten). Darüber hinaus wurde der Brechungsindex mit in die Auswertung einbezogen. Die tatsächlich gemessenen maximalen Ca²⁺-Konzentrationen in dieser Arbeit von 3,4 µM lagen unter denen von Behne et al. (2011) gemessenen Werten von 10 µM und denen von Celli et al. (2010) gemessenen Werten von über 20 µM. Die Unterschiede zu beiden Arbeiten liegen mit großer Wahrscheinlichkeit in der oben grob gestaffelten genannten, Kalibrierungskurven aus wenigen Messpunkten. Weiter wurden geringe Zahl von (n=3) bei Celli *et al.* (2010), und ($n \ge 3$) Behne *et al.* (2011) in den Experimenten verwendet, wogegen in dieser Arbeit 8 Experimente durchgeführt wurden. Darüber hinaus wurden die von Celli et al. (2010) benutzten humanen Hautstanzen, vor der Messung über mehrere Stunden in einer Medium-Farbstoff-Lösung inkubiert, das 60 µM Calcium enthielt. Es wurde zwar kein negativer Effekt auf die Calcium-Verteilung beschrieben, der Effekt auf die absolute Ca²⁺-Konzentration wurde jedoch nicht erwähnt. Da die mit 2P-FLIM bestimmten, absoluten Ca²⁺--Konzentrationen, somit auch vom Messsystem und der Genauigkeit der Kalibrierung abhängen, sollte dies bei der Interpretation der absoluten Werte berücksichtigt werden. Das Verhältnis der Ca²⁺-Konzentrationen zueinander (innerhalb eines Mess-Aufbaus) sollte dies aber, wenn die zuvor bestimmten Grenzwerte berücksichtigt werden, nicht beeinflussen.

5.5.3 Vergleich der epidermalen Calcium-Verteilung in Kontrollhaut und im Ekzem.

Vergleicht man die gesunde Haut mit ekzematöser Haut, so stellt man eine Verschiebung des Calciums innerhalb der Epidermis fest. Man beobachtet eine höhere Ca²⁺-Konzentration im *Stratum granulosum*, während der Bereich, in der man nur niedrige Ca²⁺-Konzentrationen hat (Calcium-Baseline) länger wird. Der durchschnittliche Calciumgehalt der Gesamt-Epidermis verändert sich aber nur marginal. Calcium-Verteilungen in ekzematöser Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis oder Mausmodellen wurden bisher nicht untersucht. In nicht-ekzematöser (nicht-läsionaler) Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis von Patienten mit Hilfe von PIXE bestimmt wurden, ebenfalls eine höhere Konzentration von Calcium im *Stratum granulosum* beobachtet werden (Pallon *et al.*, 1996). Bunse *et al.* (1991) konnten zeigen, dass sich die durchschnittliche Ca²⁺-Konzentration in nicht-läsionaler Haut nicht von der in Kontrollhaut unterscheidet.

Von besonderem Interesse ist, dass sowohl in gesunder Haut als auch im Ekzem, im Stratum
granulosum intrazellulär eine höhere Ca²⁺-Konzentration als extrazellulär beobachtet werden kann. Dies ist ungewöhnlich, da normalerweise in Zellen ein umgekehrtes Verhältnis herrscht. Um auszuschließen, dass es sich um ein durch das Messverfahren hervorgerufenes Artefakt handelt, haben wir Messungen an HaCaT-Zellen (einer humanen Keratinozyten-Zell-Linie) durchgeführt. Die 2P-FLIM-Messungen an kultivierten HaCat-Zellen zeigten, wie erwartet, eine signifikant höhere Ca²⁺-Konzentration extrazellulär (1,95 μmol/l) im Vergleich zu intrazellulär (1,18 μmol/l). In Bereichen, in denen die Ca²⁺-Konzentrationen des Medium enthält 1,8 mM Calcium) erfasst wurden, erreicht der Farbstoff seine Sättigung bei Werten \geq 10 μ M. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben für intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen von HaCat-Zellen. Bei HaCat-Zellen in Ruhezustand wurden bisher intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen von 70 – 150 nM gemessen, die nach Stimulierung der Zellen auf Werte von 500 – 1500 nM ansteigen können (Grzesiak & Pierschbacher, 1995; Lee et al., 2001; Meyer-Hoffert et al., 2004; Ranzato et al., 2008). Die in dieser Arbeit gemessenen intrazellulären Werte von 1,18 µmol/l können so interpretiert werden, dass die ROIs in denen die Werte gemessen wurden, den gesamten intrazellulären Bereich umfassen. Das bedeutet, dass auch intrazelluläre Calciumspeicher in den Messungen inkludiert sind und somit durchschnittlich höhere Werte als im Zytoplasma gemessen werden.

5.5.4 Korrelation der Calcium-Parameter mit Parametern des Ekzems und der Barriere

Korreliert man die Calcium-Parameter mit den Parametern des Ekzems, so kann man beobachten, dass man eine positive Korrelation in beide Richtungen zwischen Ca-Baseline und Infiltrathöhe hat. Aufgrund der beidseitigen Korrelation kann man keine Aussage darüber machen, welcher Parameter welchen ursächlich beeinflusst. Allerdings ist es vom Versuchsaufbau, d.h. der Induktion eines immunologischen Geschehens mit der Folge eines Ekzems, zu vermuten, dass der Einfluss eher vom Infiltrat in Richtung Calcium-Baseline und nicht umgekehrt geht. Dies wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die Calcium-Baseline einseitig vom IgE-Level und der Calcium-Parameter "Ca-SG" einseitig von der Infiltrathöhe beeinflusst werden. Man hat ebenfalls eine positive beidseitige Korrelation zwischen der Calcium-Baseline sowie der Ca²⁺-Konzentration im *Stratum granulosum* und der Epidermisdicke. Da beide Vorgänge im selben Bereich der Haut stattfinden und eine zeitliche Diskriminierung (z.B. zwischen 1-fach und 3-fach Provokation) leider nicht beobachtet werden konnte, ist es hier nicht möglich "Henne oder Ei" zu bestimmen. Allerdings deuten Veränderungen bei der Proliferation und Differenzierung (siehe unten) auf einen ursächlichen Einfluss der Calcium-Verteilung auf die Epidermisdicke und nicht umgekehrt hin.

5.5.5 Korrelationen von Calcium-Parametern mit Differenzierungs- und Proliferationsmarkern

Es ist in der Literatur beschrieben, dass eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration in kultivierten Keratinozyten von <0,06 mM auf >1,2 mM (z.T. bereits ab 0,1 mM) zu einer Differenzierung und einer verminderten Proliferation der Zellen führt (Bikle et al., 1996; Hennings et al., 1980; Yuspa et al., 1989). Sowohl im humanen Ekzem als auch im Mausmodell beobachtet man eine Verminderung der Differenzierung und einer Erhöhung der Proliferation (Jensen et al., 2004; Proksch et al., 2006). Man könnte somit vermuten, dass dies mit der veränderten Ca²⁺-Konzentration einhergeht. Tatsächlich kann man beobachten, dass die Verlängerung der Strecke, in der man eine niedrige Ca²⁺-Konzentration beobachtet (Calcium-Baseline) signifikant mit einer Erhöhung der Proliferation (und einem Auftreten von proliferativen Zellen in höheren Schichten) und einer Veränderung der frühen Differenzierungsmarker Keratin 10 und 14 einhergehen. Bei letzteren findet sich der Marker für undifferenzierte Zellen (K14) in höheren Schichten, was gut zu einer längeren Strecke von niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen passt, der Marker für frühe Differenzierung (K10) wird erst später eingeschaltet, auch dies passt zur Anwesenheit niedrigerer Ca²⁺-Konzentrationen. Dies würde also der oben aufgestellten Hypothese entsprechen. Allerdings gibt es keine Korrelation zwischen den Calcium-Parametern und dem späteren Differenzierungsmarker Filaggrin. Der Trend zeigt sogar, dass eine höhere Ca²⁺-Konzentration, v.a. im Stratum granulosum, mit einer niedrigeren Expression dieses Moleküls einhergeht, es kommt also zu eine reziproke Korrelation. Es zeigt sich, dass für die Expression dieses späten Differenzierungsmarkers und seine Prozessierung weitere

Parameter wichtig sind. Diese Beobachtung können auch in Zellkulturen machen: Allein die Erhöhung von Calcium führt nicht automatisch zu einer Induktion von Filaggrin; eine hohe Konfluenz der Zellen ist (beispielsweise) darüber hinaus ebenso nötig (eigene Beobachtungen).

5.5.6 Korrelation von Calcium-Parametern mit Tight Junction Parametern

Es stellt sich die Frage, wie der veränderte Calcium-Gradient im Ekzem entsteht. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass eine positive Korrelationen der Calcium-Baseline mit der Strecke, in der das Tight Junction Protein Cldn1 herabreguliert ist, beobachtet wird. Es gibt aber keine Veränderung von Cldn1 im *Stratum granulosum*, der der Zellschicht, in der Cldn1 essentiell für die Barrierefunktion von Tight Junctions in gesunder Haut ist (Furuse *et al.*, 2002; Tunggal *et al.*, 2005). Das TJ-Protein ZO-1 wird im Ekzem verbreitert lokalisiert beobachtet, d.h. es ist nicht mehr auf das *Stratum granulosum* beschränkt, sondern in tieferen Schichten zu finden. Die Veränderung von ZO-1 beeinflusst signifikant die Ca²⁺-Konzentration im *Stratum granulosum*: eine stark verbreiterte Expression von ZO-1 geht mit einer Erhöhung der Calcium-SG-Konzentration von 1,9 µmol/l einher.

Die Herabregulation in den tieferen Schichten könnte bedeuten, dass Cldn1 erst ab einem bestimmten Calcium-Level exprimiert wird. Zellkulturuntersuchungen zeigen, dass Cldn1 durch eine Erhöhung des Calciums verstärkt exprimiert wird (Kirschner *et al.*, 2013), eine untere Calcium-Grenze der Cldn1-Expression wurde aber noch nicht bestimmt.

Cldn1 spielt umgekehrt aber auch eine wichtige Rolle bei der Dichtigkeit von Tight Junctions für Calcium in Keratinozyten (Kirschner et al., 2013). Die unveränderte Lokalisation von Cldn1 in den oberen Schichten der Epidermis in Verbindung mit der signifikant verbreiterten Lokalisation des Tight Junction-Proteins ZO-1 könnte somit auch einen Einfluss auf die Calcium-Verteilung haben. Die verbreiterte Lokalisation von ZO-1 im Ekzem führt zu einer breiteren Kolokalisation von Cldn1 und ZO-1. Die Kolokalisation dieser Proteine ist eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung funktioneller Tight Junctions (Kirschner *et al.*, 2010a; Kirschner & Brandner, 2012). Darüber hinaus spielt auch ZO-1 eine

wichtige Rolle bei der Dichtigkeit von TJs für Calcium (Kirschner *et al.*, 2013), was für einen regulatorischen Einfluss dieses Moleküls auf das Calcium-SG spricht. Darüber hinaus ist bekannt, dass ZO-1 über die Transkriptionsfaktoren ZONAB, c-fos and c-jun regulativ auf die Proliferation und Differenzierung wirken kann (Balda *et al.*, 2003).

6 Zusammenfassung

Calcium steuert eine Vielzahl von wichtigen Zellzuständen- und Abläufen, wie Proliferation, Differenzierung, Barriere-Funktion und -Erhaltung, sowie Aufbau und Funktion von Zell-Zell-Verbindungen in Keratinozyten. Viele dieser Informationen sind allerdings nur aus Zell-Kulturen bekannt. Daher ist es von großer Bedeutung *in vivo*-nahe Informationen über die Ca²⁺-Konzentration und deren Verteilung in der Epidermis zu erhalten. Dies hat sich bisher als schwierig erwiesen, da die Mehrzahl bisheriger Arbeiten Nachweismethoden benutzten, die eine Fixierung der Haut nötig machten und somit die Charakterisierung der Calcium-Verteilung in nativer Epidermis nicht erbracht werden konnte. Allerdings haben Fortschritte in der Laser- und Detektionstechnologie neue mikroskopische Methoden hervorgebracht, die es nun ermöglichen, Haut ex vivo in unterschiedlichen Zuständen auf deren Calcium-Verteilung zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden zu Beginn zwei FLIM-Detektoren einem Vergleich unterzogen, um den geeignetsten Detektor für Messungen an muriner und humaner Haut herauszufinden. Anschließend wurde an einem Maus-Modell für Atopische Dermatitis (AID-Mausmodell) die Calcium-Verteilung in gesunder und ekzematöser Haut mittels 2P-FLIM untersucht. Schließlich wurden die erhobenen Calcium-Parameter mit Differenzierungsmarkern, Proliferationsmarkern, Parametern ekzematöser Haut, Barriereparametern und der Lokalisationen von Tight Junction-Proteinen korreliert, um deren Zusammenhänge genauer zu untersuchen.

Die beiden zu vergleichenden FLIM-Detektoren basierten auf zwei unterschiedlichen Detektionsmethoden. Die Messungen der PicoStar wurden im Multi-Strahl-Modus betrieben und ermöglichten dadurch ein schnelleres Scannen des Probenareals. Die so erzeugte Fluoreszenz, bzw. Fluoreszenzlebensdauer wurde anschließend mit einem CCDgestützten System in Zeitabschnitten detektiert. Der TCSPC wurde im Einzelstrahlmodus betrieben und detektierte die Fluoreszenz durch einen Multianoden-PMT mit einem parallelisierten Konvertersystem. Hierbei wurden Photonenereignisse einzeln aufgelöst. Das Ergebnis des Detektorvergleichs zeigte eindrücklich, dass der TCSPC sowohl in der

106

Auflösung als auch in der Tiefenmessung in stark streuendem und weniger stark streuendem Gewebe die PicoStar übertrifft. Dies gilt besonders für die laterale Auflösung und FLIM-Messungen in Tiefen ab 90 μm.

Untersuchungen des AID-Mausmodells auf Parameter des Ekzems zeigten, weitgehend (mit Ausnahme der Hydratation des *Stratum corneums*) Übereinstimmungen mit den charakteristischen Merkmalen eines atopischen Ekzems, die durch die Anzahl der Provokationen gezielt verstärkt werden konnten.

Die Calcium-Verteilung zeigte in gesunder Haut (von der Oberfläche der Haut aus gesehen) einen Anstieg im *Stratum corneum* bis zu einem Konzentrationsmaximum im *Stratum granulosum* (Calcium-SG), einen anschließenden Abfall der Konzentration unter die des *Stratum corneums* und einen stabil auf dieser Konzentration verbleibenden Verlauf bis zur Dermis (Calcium-Baseline). Im Vergleich der Calcium-Verteilung der Kontrolle zum Ekzem, stellte sich heraus, dass im *Stratum granulosum* höhere Ca²⁺-Konzentrationen vorherrschen und der Verlauf der niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen verlängert ist, während die durchschnittliche Ca²⁺-Konzentration der Gesamtepidermis nur marginal verändert ist. Interessanterweise sind sowohl im *Stratum granulosum* gesunder, als auch ekzematöser Haut, höhere intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen als extrazellulär gemessen worden. Kontroll-Messungen *in vitro* an HaCat-Zellen zeigten hingegen eine "normale" Calcium-Verteilung von niedrigeren intrazellulären Werten gegenüber höheren extrazellulären Werten.

Die Korrelationen der Calcium-Parameter mit den Parametern des Ekzems ergaben beidseitig signifikant positive Korrelation der Infiltrathöhe und der Calcium-Baseline, wobei vermutet wird, dass der Initiator die Infiltrathöhe ist, da (1) die Infiltrathöhe darüber hinaus einseitig signifikant die Ca²⁺-Konzentration im *Stratum granulosum* beeinflusst und (2) das IgE-Level einseitig signifikant die Calcium-Baseline beeinflusst und (3) das gesamte Mausmodell auf einer immunologischen Reaktion basiert. Die Veränderungen der Parameter Calcium-SG und Calcium-Baseline sind ebenfalls beidseitig positiv signifikant mit Veränderungen der Epidermisdicke korreliert. Hier können bisher keine Aussagen über Initiator und Effektor der Veränderungen gemacht werden.

Die Korrelation von Calcium-Parametern und Differenzierungs- und Proliferationsmarkern ergab eine signifikant positive Korrelation der Calcium-Baseline und der Erhöhung der Proliferation. Weiter zeigte sich eine signifikante Korrelation von Keratin 14 und Keratin 10 (jedoch reziprok) mit der Calcium-Baseline: Je länger die Calcium-Baseline ist, desto länger wird Keratin 14, ein Marker für undifferenzierte Keratinozyten und desto später Keratin 10, ein früher Marker für differenzierte Keratinozyten exprimiert. Dieses Ergebnis stützt die Theorie, dass erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen auch im Gewebeverbund der Haut die Proliferation vermindern und die Differenzierung beeinflussen. Eine signifikante Korrelation zum späten Differenzierungsmarker Filaggrin und den Calcium-Parametern wurde allerdings nicht gefunden.

Korrelationen der Calcium-Parameter mit Tight Junction-Proteinen, von denen bekannt ist, dass sie die Calcium-Permeabilität von Zellen beeinflussen, zeigten eine positive Korrelation der Calcium-Baseline mit der Herabregulation von Claudin-1 und der verbreiterten Lokalisation von ZO-1. Gleichzeitig beeinflusste ZO-1 auch positiv die Ca²⁺-Konzentration im *Stratum granulosum*. Dieses Ergebnis spricht für eine regulative Aufgabe von ZO-1 innerhalb der Epidermis.

7 Literaturverzeichnis

Aijaz S, Balda MS, Matter K (2006) Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol* 248:261-98.

Alanne S, Nermes M, Soderlund R, *et al.* (2011) Quality of life in infants with atopic dermatitis and healthy infants: a follow-up from birth to 24 months. *Acta Paediatr* 100:e65-70.

Balda MS, Garrett MD, Matter K (2003) The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160:423-32.

Behne MJ, Sanchez S, Barry NP, et al. (2011) Major translocation of calcium upon epidermal barrier insult: imaging and quantification via FLIM/Fourier vector analysis. *Arch Dermatol Res* 303:103-15.

Behne MJ, Tu C-L, Aronchik I, et al. (2003) Human keratinocyte ATP2C1 localizes to the Golgi and controls Golgi Ca2+ stores. J Invest Dermatol 121:688-94.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-29.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21.

Bhandari A, Stamnes S, Hamre B, et al. (2012) Stokes scattering matrix for human skin. Appl Opt 51:7487-98.

Bikle DD, Ratnam A, Mauro T, *et al.* (1996) Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. Potential role of the calcium receptor. *J Clin Invest* 97:1085.

Brandner JM, Kief S, Grund C, et al. (2002) Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 81:253-63.

Brandner JM, Kief S, Wladykowski E, et al. (2006) Tight junction proteins in the skin. Skin Pharmacol Physiol 19:71-7.

Bunse T, Steigleder GK, Hofert M, et al. (1991) PIXE analysis in uninvolved skin of atopic patients and aged skin. Acta Derm Venereol 71:287-90.

Candi E, Schmidt R, Melino G (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:328-40.

Carafoli E, Santella L, Branca D, et al. (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals. Crit Rev Biochem Mol Biol 36:107-260.

Celli A, Sanchez S, Behne M, et al. (2010) The epidermal Ca(2+) gradient: Measurement using the phasor representation of fluorescent lifetime imaging. *Biophys J* 98:911-21.

D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, et al. (2013) UV Radiation and the Skin. Int J Mol Sci 14:12222-48.

De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, et al. (2011) Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 127:773-86.

Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248:73-6.

Dikstein S, Zlotogorski A (1994) Measurement of skin pH. Acta Derm Venereol Suppl 185:18-20.

Ekanayake-Mudiyanselage S, Aschauer H, Schmook FP, *et al.* (1998) Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *J Invest Dermatol* 111:517-23.

Elias P, Feingold K, Fartasch M (2006) Epidermal lamellar body as a multifunctional secretory organelle. *Skin Barrier New York, NY: Taylor & Francis Group*:261-72.

Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, et al. (2009) A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet* 41:602-8.

Feng G, Mellor RH, Bernstein M, et al. (2000) Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. *Neuron* 28:41-51.

Fritsch P (1983) Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas. Springer.

Furuse M, Hata M, Furuse K, *et al.* (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099-111.

Gadella Jr TW, Jovin TM, Clegg RM (1993) Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale. *Biophysical chemistry* 48:221-39.

Ginger RS, Blachford S, Rowland J, et al. (2005) Filaggrin repeat number polymorphism is associated with a dry skin phenotype. *Arch Dermatol Res* 297:235-41.

Göppert-Mayer M (1931) Über elementarakte mit zwei quantensprüngen. Annalen der Physik 401:273-94.

Grzesiak JJ, Pierschbacher MD (1995) Shifts in the concentrations of magnesium and calcium in early porcine and rat wound fluids activate the cell migratory response. *J Clin Invest* 95:227-33.

Hanson KM, Behne MJ, Barry NP, et al. (2002) Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient. *Biophys J* 83:1682-90.

Helfrich I, Schmitz A, Zigrino P, *et al.* (2007) Role of aPKC isoforms and their binding partners Par3 and Par6 in epidermal barrier formation. *J Invest Dermatol* 127:782-91.

Hennings H, Michael D, Cheng C, et al. (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19:245-54.

Janssens M, Mulder AA, van Smeden J, *et al.* (2013) Electron diffraction study of lipids in non-lesional stratum corneum of atopic eczema patients. *Biochim Biophys Acta* 1828:1814-21.

Janssens M, van Smeden J, Gooris GS, *et al.* (2011) Lamellar lipid organization and ceramide composition in the stratum corneum of patients with atopic eczema. *J Invest Dermatol* 131:2136-8.

Jensen J-M, Fölster-Holst R, Baranowsky A, et al. (2004) Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. J Invest Dermatol 122:1423 -31.

Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM (2001) Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *Journal of Cell Science* 114:3069-70.

Kirschner N, Bohner C, Rachow S, *et al.* (2010a) Tight junctions: is there a role in dermatology? *Arch Dermatol Res* 302:483-93.

Kirschner N, Brandner JM (2012) Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci* 1257:158-66.

Kirschner N, Haftek M, Niessen CM, et al. (2011) CD44 regulates tight-junction assembly and barrier function. J Invest Dermatol 131:932-43.

Kirschner N, Houdek P, Fromm M, et al. (2010b) Tight junctions form a barrier in human

epidermis. Eur J Cell Biol 89:839-42.

Kirschner N, Rosenthal R, Furuse M, *et al.* (2013) Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 133:1161-9.

Konig K, Riemann I (2003) High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J Biomed Opt* 8:432--9.

Kurasawa M, Maeda T, Oba A, et al. (2011) Tight junction regulates epidermal calcium ion gradient and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*.

Lansdown ABG (2002) Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair and Regeneration* 10:271-85.

Lee WK, Choi SW, Lee HR, *et al.* (2001) Purinoceptor-mediated calcium mobilization and proliferation in HaCaT keratinocytes. *J Dermatol Sci* 25:97-105.

Leinonen PT, Hägg PM, Peltonen S, *et al.* (2009) Reevaluation of the normal epidermal calcium gradient, and analysis of calcium levels and ATP receptors in Hailey-Hailey and Darier epidermis. *J Invest Dermatol* 129:1379-87.

Leung DY, Bieber T (2003) Atopic dermatitis. The Lancet 361:151-60.

Lüllmann-Rauch R (2006) Taschenlehrbuch Histologie. Thieme.

Madison KC (2003) Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121:231-41.

Markova NG, Marekov LN, Chipev CC, et al. (1993) Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. *Molecular and cellular biology* 13:613-25.

Matsumoto K, Mizukoshi K, Oyobikawa M, *et al.* (2004) Establishment of an atopic dermatitis-like skin model in a hairless mouse by repeated elicitation of contact hypersensitivity that enables to conduct functional analyses of the stratum corneum with various non-invasive biophysical instruments. *Skin Res Technol* 10:122-9.

Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, *et al.* (1999) IgE Hyperproduction Through Enhanced Tyrosine Phosphorylation of Janus Kinase 3 in NC/Nga Mice, a Model for Human Atopic Dermatitis. *J Immunol* 162:1056-63.

Mauro T, Bench G, Sidderas-Haddad E, *et al.* (1998) Acute barrier perturbation abolishes the Ca2+ and K+ gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. *J Invest Dermatol* 111:1198-201.

Menon GK, Elias PM (1991) Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and normal human epidermis. *Arch Dermatol Res* 127:57-63.

Menon GK, Elias PM, Lee SH, et al. (1992) Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of the permeability barrier. *Cell Tissue Res* 270:503-12.

Menon GK, Price LF, Bommannan B, et al. (1994) Selective obliteration of the epidermal calcium gradient leads to enhanced lamellar body secretion. J Invest Dermatol 102:789-95.

Mertens AE, Rygiel TP, Olivo C, *et al.* (2005) The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol* 170:1029-37.

Mertens AEE, Pegtel DM, Collard JG (2006) Tiam1 takes PARt in cell polarity. *Trends Cell Biol* 16:308-16.

Meyer-Hoffert U, Wingertszahn J, Wiedow O (2004) Human leukocyte elastase induces keratinocyte proliferation by epidermal growth factor receptor activation. *J Invest Dermatol* 123:338-45.

Moll I (2010) Duale Reihe Dermatologie. Thieme.

Mozaffari H, Pourpak Z, Pourseyed S, et al. (2007) Quality of life in atopic dermatitis patients. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 40:260-4.

Murakoshi H, Lee S-J, Yasuda R (2008) Highly sensitive and quantitative FRET–FLIM imaging in single dendritic spines using improved non-radiative YFP. *Brain Cell Biol* 36:31-42.

Niesner R, Andresen V, Neumann J, *et al.* (2007) The Power of Single and Multibeam Two-Photon Microscopy for High-Resolution and High-Speed Deep Tissue and Intravital Imaging. *Biophys J* 93:2519-29.

Niesner R, Peker B, Schlüsche P, et al. (2005) 3D-resolved investigation of the pH gradient in artificial skin constructs by means of fluorescence lifetime imaging. *Pharm Res* 22:1079-87.

Niessen CM (2007) Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127:2525-32.

Novak N, Bieber T (2005) The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 53:S171-6.

Numaga-Tomita T, Putney JW (2013) Role of STIM1- and Orai1-mediated Ca2+ entry in Ca2+-induced epidermal keratinocyte differentiation. *Journal of Cell Science* 126:605-12.

Pallon J, Malmqvist KG, Werner-Linde Y, *et al.* (1996) Pixe analysis of pathological skin with special reference to psoriasis and atopic dry skin. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 42:111-8.

Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, *et al.* (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38:441-6.

Pavlovic S, Daniltchenko M, Tobin DJ, *et al.* (2008) Further exploring the brain-skin connection: stress worsens dermatitis via substance P-dependent neurogenic inflammation in mice. *J Invest Dermatol* 128:434-46.

Periasamy A, Wodnicki P, Wang XF, *et al.* (1996) Time-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy using a picosecond pulsed tunable dye laser system. *Rev Sci Instrum* 67:3722-31.

Peters EM, Liezmann C, Spatz K, et al. (2011) Nerve growth factor partially recovers inflamed skin from stress-induced worsening in allergic inflammation. *The Journal of Investigative Dermatology* 131:735-43.

Pinton P, Pozzan T, Rizzuto R (1998) The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphatesensitive Ca2+ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal* 17:5298-308.

Presland RB, Bassuk JA, Kimball JR, *et al.* (1995) Characterization of two distinct calciumbinding sites in the amino-terminus of human profilaggrin. *J Invest Dermatol* 104:218-23.

Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M (2008) The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17:1063--72.

Proksch E, Fölster-Holst R, Bräutigam M, et al. (2009) Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis. J Dtsch Dermatol Ges 7:899-910.

Proksch E, Folster-Holst R, Jensen JM (2006) Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci* 43:159-69.

Ranzato E, Patrone M, Mazzucco L, et al. (2008) Platelet lysate stimulates wound repair of HaCaT keratinocytes. Br J Dermatol 159:537-45.

Rinnenthal JL, Börnchen C, Radbruch H, et al. (2013) Parallelized TCSPC for dynamic intravital fluorescence lifetime imaging: quantifying neuronal dysfunction in neuroinflammation. *PLoS One* 8:e60100.

Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, et al. (2009b) Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria:

when, how and why. *Biochim Biophys Acta* 1787:1342-51.

Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, *et al.* (2009) Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci* 122:1285-94.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Meth* 9:676-82.

Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:1213-28.

Segre JA (2006) Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest* 116:1150-8.

Steven AC, Steinert PM (1994) Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *Journal of Cell Science* 107:693-700.

Stout AK, Reynolds IJ (1999) High-affinity calcium indicators underestimate increases in intracellular calcium concentrations associated with excitotoxic glutamate stimulations. *Neuroscience* 89:91-100.

Strickler S, Berg RA (1962) Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *J Chem Phys* 37:814.

Stutzmann GE, Parker I (2005) Dynamic multiphoton imaging: a live view from cells to systems. *Physiology (Bethesda)* 20:15-21.

Svoboda K, Yasuda R (2006) Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* 50:823-39.

Tu C-L, Chang W, Bikle DD (2011) The Calcium-Sensing Receptor-Dependent Regulation of Cell-Cell Adhesion and Keratinocyte Differentiation Requires Rho and Filamin A. *J Invest Dermatol*.

Tu C-L, Crumrine DA, Man M-Q, *et al.* (2012) Ablation of the calcium-sensing receptor in keratinocytes impairs epidermal differentiation and barrier function. *J Invest Dermatol* 132:2350-9.

Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, *et al.* (2005) E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *The EMBO journal* 24:1146-56.

Tuschil A, Lam C, Haslberger A, et al. (1992) Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. J Invest Dermatol 99:294-8.

van Smeden J, Janssens M, Lavrijsen AP, et al. (2013) Skin barrier dysfunction in nonlesional atopic eczema: the role of stratum corneum lipids. Eur J Dermatol.

Wong P, Coulombe PA (2003) Loss of keratin 6 (K6) proteins reveals a function for intermediate filaments during wound repair. *J Cell Biol* 163:327-37.

Yuki T, Haratake A, Koishikawa H, *et al.* (2007) Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Exp Dermatol* 16:324-30.

Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, *et al.* (1989) Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol* 109:1207-17.

Zipfel WR, Williams RM, Christie R, *et al.* (2003) Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7075-80.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau der Haut2
Abbildung 1-2: Epidermale Differenzierung der Keratinozyten4
Abbildung 1-3: Die Dynamik der Calcium Signalgebung6
Abbildung 1-4: Prinzip des 2-Photonen-Effekts im Jablonski-Diagramm
Abbildung 1-5: Mittlere Photonendichte im Vergleich10
Abbildung 1-6: Vergleich der Anregungsvolumina von Ein-Photon- (links) und 2-Photon-Anregung (rechts)11
Abbildung 1-7: Prinzip der Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer
Abbildung 1-8: Übersicht des Aufbaus des Tight Junction-Komplex
Abbildung 1-9: Vergleich zwischen einer intakten (links) und einer gestörten Hautbarriere (rechts)16
Abbildung 3-1: Übersicht der Behandlungsprozedur des AlD-Modells
Abbildung 3-2: Balb/c Maus mit deutlicher Quaddel-Bildung (Pfeil) nach intradermaler Injektion26
Abbildung 3-3: Aufbau des 2-Photonen-Systems mit Detektoren und optischen Substraten
Abbildung 3-4: Schematische Signalverarbeitung des TCSPC
Abbildung 3-5: Schematische Signalverarbeitung der PicoStar
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF42
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF42 Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads48
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF42 Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads48 Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung50
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF42 Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads48 Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung50 Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC- gefärbten, porcinen ex vivo Hautmodelle bis 400 μm Tiefe51
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF42 Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads48 Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung50 Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC- gefärbten, porcinen ex vivo Hautmodelle bis 400 μm Tiefe51 Abbildung 4-4: Diagramme der Messung des ex vivo Hautmodells
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF.42Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads.48Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung.50Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC-51gefärbten, porcinen ex vivo Hautmodelle bis 400 μm Tiefe51Abbildung 4-4: Diagramme der Messung des ex vivo Hautmodells.52Abbildung 4-5: Intensitätsmessung der eGFP markierten Hippocampus-Schnitte bis 260 μm Tiefe.53
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF.42Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads.48Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung.50Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC-51gefärbten, porcinen ex vivo Hautmodelle bis 400 μm Tiefe51Abbildung 4-4: Diagramme der Messung des ex vivo Hautmodells.52Abbildung 4-5: Intensitätsmessung der eGFP markierten Hippocampus-Schnitte bis 260 μm Tiefe53Abbildung 4-6: Diagramme der Messung der Hippocampus-Schnitte (gleiches Areal).54
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF. 42 Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads. 48 Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung. 50 Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC- 51 Abbildung 4-4: Diagramme der Messung des ex vivo Hautmodells. 52 Abbildung 4-5: Intensitätsmessung der eGFP markierten Hippocampus-Schnitte bis 260 µm Tiefe. 53 Abbildung 4-6: Diagramme der Messung der Hippocampus-Schnitte (gleiches Areal). 54 Abbildung 4-7: Mittlere Brechungsindizes der Epidermis und Dermis mit Standardabweichung. 55
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF. 42 Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads. 48 Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung. 50 Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC- 51 gefärbten, porcinen ex vivo Hautmodelle bis 400 µm Tiefe 51 Abbildung 4-4: Diagramme der Messung des ex vivo Hautmodells. 52 Abbildung 4-5: Intensitätsmessung der eGFP markierten Hippocampus-Schnitte bis 260 µm Tiefe. 53 Abbildung 4-6: Diagramme der Messung der Hippocampus-Schnitte (gleiches Areal). 54 Abbildung 4-7: Mittlere Brechungsindizes der Epidermis und Dermis mit Standardabweichung. 55 Abbildung 4-8: Darstellung des Brechungsindex in verschiedenen Maushautschichten. 56
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF. 42 Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads. 48 Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung. 50 Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC-gefärbten, porcinen ex vivo Hautmodelle bis 400 µm Tiefe 51 Abbildung 4-4: Diagramme der Messung des ex vivo Hautmodells 52 Abbildung 4-5: Intensitätsmessung der eGFP markierten Hippocampus-Schnitte bis 260 µm Tiefe. 53 Abbildung 4-6: Diagramme der Messung der Hippocampus-Schnitte (gleiches Areal). 54 Abbildung 4-7: Mittlere Brechungsindizes der Epidermis und Dermis mit Standardabweichung. 55 Abbildung 4-8: Darstellung des Brechungsindex in verschiedenen Maushautschichten. 56 Abbildung 4-9: Diagramm des Brechungsindex von Maushaut in Abhängigkeit der Tiefe. 57
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF. 42 Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads. 48 Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung. 50 Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC-gefärbten, porcinen ex vivo Hautmodelle bis 400 µm Tiefe. 51 Abbildung 4-4: Diagramme der Messung des ex vivo Hautmodells. 52 Abbildung 4-5: Intensitätsmessung der eGFP markierten Hippocampus-Schnitte bis 260 µm Tiefe. 53 Abbildung 4-6: Diagramme der Messung der Hippocampus-Schnitte (gleiches Areal). 54 Abbildung 4-7: Mittlere Brechungsindizes der Epidermis und Dermis mit Standardabweichung. 55 Abbildung 4-8: Darstellung des Brechungsindex in verschiedenen Maushautschichten. 56 Abbildung 4-9: Diagramm des Brechungsindex von Maushaut in Abhängigkeit der Tiefe. 57 Abbildung 4-10: Fluoreszenzlebensdauern von Calcium Green-5N in Anwesenheit von unterschiedlichen Ca ²⁺ -Konzentrationen (58
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF. 42 Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads. 48 Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung. 50 Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC-gefärbten, porcinen ex vivo Hautmodelle bis 400 µm Tiefe 51 Abbildung 4-4: Diagramme der Messung des ex vivo Hautmodells. 52 Abbildung 4-5: Intensitätsmessung der eGFP markierten Hippocampus-Schnitte bis 260 µm Tiefe. 53 Abbildung 4-6: Diagramme der Messung der Hippocampus-Schnitte (gleiches Areal). 54 Abbildung 4-7: Mittlere Brechungsindizes der Epidermis und Dermis mit Standardabweichung. 55 Abbildung 4-9: Diagramm des Brechungsindex von Maushaut in Abhängigkeit der Tiefe. 57 Abbildung 4-10: Fluoreszenzlebensdauern von Calcium Green-5N in Anwesenheit von 58 Abbildung 4-11: Darstellung der Ca ²⁺ -Konzentrationen in HaCat-Zellen. 60
Abbildung 3-6: Bestimmung der PSF. 42 Abbildung 4-1: Gemittelte PSF-Messungen von 100 nm-Beads. 48 Abbildung 4-2: Kombinierter Blick auf X- & Z-Achse einer Bead-Messung. 50 Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC- 51 Abbildung 4-3: Intensitätsmessung mit dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC- 51 Abbildung 4-3: Intensitätsmessung der dem TCSPC (links) und der PicoStar (rechts) der mit FITC- 52 Abbildung 4-4: Diagramme der Messung des ex vivo Hautmodells 52 Abbildung 4-5: Intensitätsmessung der eGFP markierten Hippocampus-Schnitte bis 260 µm Tiefe. 53 Abbildung 4-6: Diagramme der Messung der Hippocampus-Schnitte (gleiches Areal) 54 Abbildung 4-7: Mittlere Brechungsindizes der Epidermis und Dermis mit Standardabweichung. 55 Abbildung 4-8: Darstellung des Brechungsindex in verschiedenen Maushautschichten. 56 Abbildung 4-9: Diagramm des Brechungsindex von Maushaut in Abhängigkeit der Tiefe. 57 Abbildung 4-10: Fluoreszenzlebensdauern von Calcium Green-5N in Anwesenheit von 58 Abbildung 4-11: Darstellung der Ca ²⁺ -Konzentrationen in HaCat-Zellen. 60 Abbildung 4-12: Darstellung der mittleren CG5N-Lebensdauern von HaCat-Zellen. 61

Abbildung 4-13: 3D-Ansicht (XZ) der Calcium-Verteilung in HaCat-Zellen (Kombination aus Intensitäts- und FLIM-Aufnahme)62
Abbildung 4-14: HE-Färbungen von unbehandelter und 1-fach & 3-fach-provozierter Haut des AlD- Mausmodells
Abbildung 4-15: Übersicht der mittleren epidermalen Dicke von Kontrollarealen, 1-fach- und 3-fach- provozierten Hautarealen des AID-Mausmodells
Abbildung 4-16: Übersicht der mittleren dermalen Infiltrathöhe (s. Kapitel 3.4.8) von Kontrollhaut, 1- fach- und 3-fach-provozierten Hautarealen des AID-Mausmodells
Abbildung 4-17: Serologische IgE- und IGE-OVA-Antikörperkonzentration von Kontroll-, 1-fach- und 3- fach-provozierten Mäusen. A:
Abbildung 4-18: Übersicht der Hydratation des Stratum corneums und des TEWL im AlD Modell67
Abbildung 4-19: Repräsentative Calcium-FLIM Messung von CG5N-gefärbter Kontrollhaut des AlD- Modells in verschieden epidermalen Schichten69
Abbildung 4-20: Repräsentative Calcium-FLIM Messung von CG5N-gefärbter 3-fach-provozierter Haut des AID-Modells in verschieden epidermalen Schichten71
Abbildung 4-21: Ca ²⁺ -Konzentration im 3D-Querschnitt (XZ) von Kontrollhaut und Ekzem des AlD- Modells
Abbildung 4-22: Repräsentative Ca ²⁺ -Konzentrationsverläufe in Kontroll- und ekzematöser Haut des AID-Modells
Abbildung 4-23: Beschreibung der aus den Z-Plots resultierenden Calcium-Parameter
Abbildung 4-24: Übersicht über die Calcium-Parameter des AlD-Modells im Mittel in Abhängigkeit der Behandlung76
Abbildung 4-25: Extra- und intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration des Stratum granulosums in Kontrollhaut des AID-Modells77
Abbildung 4-26: Extra- und intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration des Stratum granulosums in ekzematöser Haut des AID-Modells
Abbildung 4-27: Übersicht der extra- und intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentrationen in Abhängigkeit der Provokationen
Abbildung 4-28: Repräsentative immunhistochemische Färbung des basalen Differenzierungsmarker Keratin 14 an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells
Abbildung 4-29: Repräsentative immunhistochemische Färbung des suprabasalen Differenzierungsmarker Keratin 10 an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD- Modells
Abbildung 4-30: Repräsentative immunhistochemische Färbung des Differenzierungsmarker Filaggrin an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AID-Modells
Abbildung 4-31: Repräsentative immunhistochemische Färbung des Hyperproliferationsmarkers Keratin 6 an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells
Abbildung 4-32: Repräsentative immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 an Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells
Abbildung 4-33: Repräsentative immunhistochemische Färbung des TJ-Proteins Cldn1 an

Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AlD-Modells	85
Abbildung 4-34: Repräsentative immunhistochemische Färbung des TJ-Proteins ZO-1 an	
Paraffinschnitten von Kontrollhaut und Ekzem des AID-Modells	86
Abbildung 4-35: Vergleich der Strecken von Keratin 10, 14 und der Calcium-Baseline	90

9 Formelverzeichnis

Formel 1 : I = Fluoreszenzintensität, I(0) = Fluoreszenzintensität zu t_0 , t = Zeit, τ = mittlere Lebensdauer)
Formel 2: Formel zur Brechung des Brechungsindex der Haut. τ_{Haut} = gemessene Lebensdauer von Fluorescein in der Haut, $\tau_{Lösung}$ = gemessene Lebensdauer von Fluorescein in wässriger Lösung, n_{Haut} = Brechungsindex der Haut, $n_{Lösung}$ = Brechungsindex der wässrigen Lösung	L
Formel 3: Formel zur Berechnung des Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR). Signal: Anzahl der detektierten Photonen, Noise: Grundrauschen der Elektronik des Detektors	2

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antiköper inklusive deren Verdünnung, Epitop-Demaskierung, Blockschritt der unspezifischen Bindungsstellen und Bezugsquelle. Alle primären Antikörper wurden über Nacht bei 4°C inkubiert	20
Tabelle 2: Ansatz der Sensibilisierungslösung für die systemische Applikation des Antigens Ovalbumi 2	n ?5
Tabelle 3: Ansatz des Mäuse-Narkotikums2	!5
Tabelle 4: Ansatz der Provokationslösung für die intradermale Injektion	!5
	!9
Tabelle 6: ELISA-Protokoll für die IgE- und IgE-OVA-Antikörperbestimmung	0
Tabelle 7: Zeit- und Behandlungsschema für das Entparaffinieren/Rehydratisieren von Paraffinschnitten	2
Tabelle 8: Zeit- und Behandlungsschema der HE-Färbung von Gefrier- und Paraffinschnitten	3
Tabelle 9: Zusammensetzung des Kulturmediums des porcinen ex vivo Hautmodells. 3	5
Tabelle 10: Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für HaCat-Zellen	6
Tabelle 11: Zusammensetzung des Differenzierungsmediums für HaCat-Zellen (1,8 mM Calcium)3	6
Tabelle 12: Zusammensetzung des ACSF-Puffers für die Mikroskopie der Hirnschnitte von Thy1- Mäusen.	13
Tabelle 13: Ansatz und Zusammensetzung des Hepes-Puffers für die Mikroskopie der ex vivo Hautmodelle4	4
Tabelle 14: Übersicht über die gemittelten Lebensdauern (ns) und Standardabweichungen von 3 verschiedenen Messungen an einer Hautprobe im S. corneum, S. granulosum bis S. basale und Dermis5	55
Tabelle 15:Korrelationsergebnisse des Einflusses von Calcium-Parametern auf AD-Parameter8	8
Tabelle 16: Korrelationsergebnisse des Einflusses von AD-Parametern auf Calcium-Parameter8	39
Tabelle 17: Korrelationsergebnisse des Einflusses von Calcium-Parametern auf Differenzierungsmarker9	90
Tabelle 18: Korrelationsergebnisse des Einflusses von Differenzierungsmarker auf Calcium- Parameter	91
Tabelle 19: Korrelationsergebnisse des Einflusses von Calcium-Parametern Proliferations- und Hyperproliferationsmarker	92
Tabelle 20 Korrelationsergebnisse des Einflusses von Proliferations- und Hyperproliferationsmarkern auf Calcium-Parameter9))2
Tabelle 21: Korrelationsergebnisse des Einflusses von Calcium-Parametern auf Tight Junction- Proteine9)3
Tabelle 22: Korrelationsergebnisse des Einflusses von Tight Junction-Proteinen auf Calcium- Parameter9)4

Publikationen

Rinnenthal JL*, Börnchen C*, Radbruch H, *et al.* (2013) Parallelized TCSPC for dynamic intravital fluorescence lifetime imaging: quantifying neuronal dysfunction in neuroinflammation. *PLoS One* 8:e60100.

* gleichberechtigte Autorenschaft

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Johanna Brandner für die Bereitstellung des Themas und die engagierte Betreuung, sowie für die Zurverfügungstellung aller technischen und finanziellen Mittel. Ihre fachliche Anleitung und die vielen Anregungen aus unseren Diskussionen haben mir bei der Versuchsdurchführung und Fertigstellung dieser Dissertation entscheidend weitergeholfen.

Bei Dr. Martin Behne bedanke ich mich für die herausfordernde Themenstellung im Bereich der 2-Photonen-Mikroskopie und seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Christian Lohr (Zoologisches Institut, Universität Hamburg) danke ich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereichs Biologie.

Bei Frau Prof. Dr. Ingrid Moll bedanke ich mich für die Ermöglichung der Anfertigung der Dissertation im Zell- und Molekularbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie.

Für die unermüdliche, geduldige und sehr engagierte Einführung in die Statistik danke ich Frau Anne Daubmann sehr herzlich.

Frau Dr. Raluca Niesner und Dr. Jan Rinnenthal danke sehr ich für das große Engagement, wenn es galt spezielle Probleme der 2-Photonen-Mikroskopie zu lösen (auch nach Dienstende).

Bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. med. Eva Peters für die freundliche Zurverfügungstellung ihres AD Modells, sowie für die hilfreichen Tipps bei der Einführung des Modells, ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Den technischen Assistenten/innen des Labors Sabine Vidal Pia Houdek, Ewa Wladykowski danke ich, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein besonderer Dank gilt dabei Sabine Vidal, die mich besonders unterstützt hat.

Ebenso danke ich meinen Mitdoktoranden Claudia Bohner, Thomas Volksdorf, Mutiha Pandjaitan, Christopher Ueck und Katja Bäsler für die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Den Postdocs Dr. Michaela Zorn-Kruppa, Dr. Thomas Tilling, Dr. Simone Pollok und Dr. Nina Kirschner danke ich für die vielen Ratschläge und ihre Hilfe.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und die Gewissheit immer einen Rückhalt zu haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei Nina bedanken, die maßgeblich durch motivationsfördernde Maßnahmen und jeder Menge Zuversicht an dem Gelingen dieser

Arbeit mitgewirkt hat.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Clistic Fonch