

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie

Direktor Herr Prof. Dr. Stefan W. Schneider

## **Untersuchung zur Rolle der Tight Junction Proteine Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 in von atopischer Dermatitis veränderter Haut**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Barbara Caroline von Bünau

aus Buchholz

Berlin 2022

Angenommen von der<sup>[1]</sup><sub>SEP</sub> Medizinischen Fakultät der Universität  
Hamburg am: 03.04.2023

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. Stefan W. Schneider

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin:

Prof. Dr. Johanna Brandner

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1	Anatomie und Funktion der Haut	7
1.2	Atopische Dermatitis (AD)	9
1.2.1	Pathogenese der atopischen Dermatitis und vermutete Ursachen	12
1.2.1.1	Genetische Faktoren bei atopischer Dermatitis	14
1.2.1.2	Das Hautmikrobiom von PatientInnen mit atopischer Dermatitis	16
1.3	Tight Junctions	17
1.3.1	Occludin	18
1.3.2	Claudine-1 und 4	19
1.4	Veränderungen von Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 bei atopischer Dermatitis	20
<b>2</b>	<b>ZIELE DIESER ARBEIT</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>26</b>
3.1.1	StudienteilnehmerInnen	26
3.2	Verbrauchsmaterialien und Geräte	29
3.2.1	Puffer und Lösungen	32
3.2.2	Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen	33
3.2.3	Software	34
3.3	Methoden	36
3.3.1	Erhebung des SCORADs	36
3.3.2	Messung der Barrierefunktionsparameter	38
3.3.2.1	Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) mittels Tewameter	38
3.3.2.2	Corneometrie	40
3.3.3	Blutuntersuchung zur Bestimmung des IgE-Spiegels und zur genetischen Untersuchung von Filaggrinmutationen	41

3.3.4	Entnahme der Hautbiopsien	42
3.3.5	Biotinylierung	43
3.3.6	Paraffineinbettung und Fixierung	44
3.3.7	Paraffinschnitte	45
3.3.8	Immunhistologische Färbung	45
3.3.9	Mikroskopieren und Fotografieren	46
3.3.9.1	Auswertung der immunhistologischen Färbung	46
3.3.9.2	Auswertung der Biotinylierung	48
3.3.9.3	Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbungen	49
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse der SCORAD Erhebung</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse der nichtinvasiven Barrierefunktionsmessungen</b>	<b>53</b>
4.2.1	Ergebnisse der corneometrischen Messung	53
4.2.2	Ergebnisse der Messung des transepidermalen Wasserverlusts	54
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse der Blutuntersuchung</b>	<b>56</b>
4.3.1	IgE-Werte	56
4.3.2	Filaggrin	57
<b>4.4</b>	<b>Lokalisation von Tight-Junction-Proteinen</b>	<b>58</b>
4.4.1	Vorkommen und Verteilung von Occludin in läSIONaler und nichtläSIONaler Haut von AD PatientInnen und gesunder Haut	58
4.4.2	Vorkommen und Verteilung von Claudin-1 in läSIONaler und nichtläSIONaler Haut von AD PatientInnen und gesunder Haut	61
4.4.3	Vorkommen und Verteilung von Claudin-4 in läSIONaler und nichtläSIONaler Haut von AD PatientInnen und gesunder Haut	65
<b>4.5</b>	<b>Ergebnisse der Biotinylierung der Epidermis</b>	<b>68</b>
<b>4.6</b>	<b>TEWL-Level und Claudin-1-Immunfluoreszenzintensitätslevel</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung der untersuchten norddeutschen Kohorte</b>	<b>77</b>

<b>5.2 Funktionelle Hautbarriereveränderungen bei atopischer Dermatitis</b>	<b>79</b>
<b>5.3 Verändertes Auftreten von TJ-Proteinen bei atopischer Dermatitis</b>	<b>80</b>
5.3.1 Vermehrtes Auftreten von Occludin in läsionaler und nichtläsionaler Epidermis	80
5.3.2 Vermindertes Auftreten von Claudin-4 in den oberen Schichten und vermehrtes Vorkommen in den unteren Schichten läsionaler Epidermis	82
5.3.3 Vermindertes Auftreten von Claudin-1 in läsionaler Epidermis	84
<b>5.4 Claudin-1 beeinflusst den transepidermale Wasserverlust (TEWL) und die Anzahl der Biotin-SH-Stopps im Stratum granulosum</b>	<b>86</b>
<b>5.5 Ausblick</b>	<b>88</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>90</b>
<b>7 SUMMARY</b>	<b>92</b>
<b>8 ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS</b>	<b>94</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>98</b>
<b>10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>113</b>
<b>11 TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>115</b>
<b>12 LISTE BISHER VERÖFFENTLICHTER ARBEITEN</b>	<b>116</b>
<b>13 LEBENSLAUF (KURZFASSUNG)</b>	<b>117</b>
<b>14 DANKSAGUNGEN</b>	<b>118</b>
<b>15 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b>	<b>119</b>

**Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgendem Artikel veröffentlicht:**

Bergmann, S., von Buenau, B., Vidal-y-Sy, S., Haftek, M., Wladykowski, E., Houdek, P., ... Brandner, J. M. (2020). Claudin-1 decrease impacts epidermal barrier function in atopic dermatitis lesions dose-dependently. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58718-9>

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie und Funktion der Haut

Die Haut gehört zu den größten und vielfältigsten Organen des Menschen - sie bedeckt die gesamte Oberfläche des Körpers. Wesentlich sind ihre Schutzfunktionen vor mechanischer, thermischer und chemischer Schädigung. Über die Haut findet ein Großteil der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes und der Körpertemperatur statt. Sie besitzt mit der Bildung von Vitamin D endokrine Funktionen. Auch in der Infektionsabwehr übernimmt sie wichtige Aufgaben. Die Haut gehört mit ihren Tastzellen, Temperatur- und Schmerzrezeptoren zu den Sinnesorganen (Fritsch, 2009; Moll, 2016). Außerdem besitzt die Haut durch ihre Sichtbarkeit soziale Funktionen.

Die Hautoberfläche weist eine rhombische Felderung mit Haaren und Drüsen auf und wird Felderhaut genannt. An den Handflächen und Fußsohlen wird sie als Leistenhaut bezeichnet und hat eine glattere Oberfläche ohne Behaarung (Welsch, 2003).

Die Haut lässt sich anatomisch in drei Schichten einteilen: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Corium oder Lederhaut) und Subkutis (Hypodermis oder Unterhaut) (siehe Abb. 1). Die Epidermis besteht aus mehrschichtig verhorntem Plattenepithel und weist vier unterscheidbare Schichten auf (siehe Abb. 1):

Das Stratum corneum (Hornschicht), die äußerste Schicht bildet die Grenze zur Umwelt und erfüllt damit wesentliche Barrierefunktionen. Sie wird aus mehreren Lagen abgestorbener, kernloser, flüssigkeitsarmer Hautzellen (Corneozyten) gebildet, die in einer Lipidmatrix, deren Hauptkomponente Filaggrin (von engl. **Filament aggregating protein**) ist, eingebettet sind. Die Corneozyten sind schuppenförmig angeordnet und über Zell-Zell-Verbindungsstrukturen, den Corneodesmosomen verknüpft. Die oberste Zellschicht wird laufend durch Abschilferung abgestoßen (Moll, 2016; Welsch, 2003).

## Einleitung

Unter dem Stratum corneum liegt das Stratum granulosum (Körnerschicht) (siehe Abb. 1) mit abgeflachten lebenden Keratinozyten, welche die Hornsubstanz Keratin produzieren. Die Keratinozyten des Stratum granulosums (SG) sind über Tight Junctions (TJ) miteinander verbunden, die in diesem Bereich einen weiteren Teil der funktionellen Hautbarriere bilden. Namensgebend sind die intrazellulären Keratohyalin granulae (siehe Abb. 1), die Vorstufen des Proteins Filaggrin enthalten. Im Laufe ihres Lebens entwickeln sich die Keratinozyten zu Corneozyten des Stratum corneums weiter (Moll, 2016).

Das tieferliegende Stratum spinosum (Stachelzellschicht) liegt dem Stratum basale (Basalzellschicht) auf und besteht aus mehreren Schichten abgerundeter polygonaler Zellen, die zum Stratum granulosum (SG) hin eine flachere Form annehmen (siehe Abb. 1). Im Stratum spinosum und Stratum granulosum werden *lamellar bodies* von den Keratinozyten mit Vorstufen der epidermalen Lipide abgegeben.

Die tiefste Schicht der Epidermis, das Stratum basale liegt der Dermis auf. Es besteht aus kubischen Zellen aus deren Teilung die darüber liegenden Zellen der Epidermis hervorgehen.

Der häufigste Zelltyp der Epidermis sind die Keratinozyten, die im Laufe ihres Lebens eine Differenzierung durchlaufen, die Keratinozytenproliferation oder Keratinisierung genannt wird. Von der Zellbildung in der Basalschicht bis zur Abschuppung eines Corneozyten als tote Hornschicht vergehen etwa vier Wochen, ein Prozess der als „terminale epidermale Differenzierung“ bezeichnet wird (Moll, 2016).

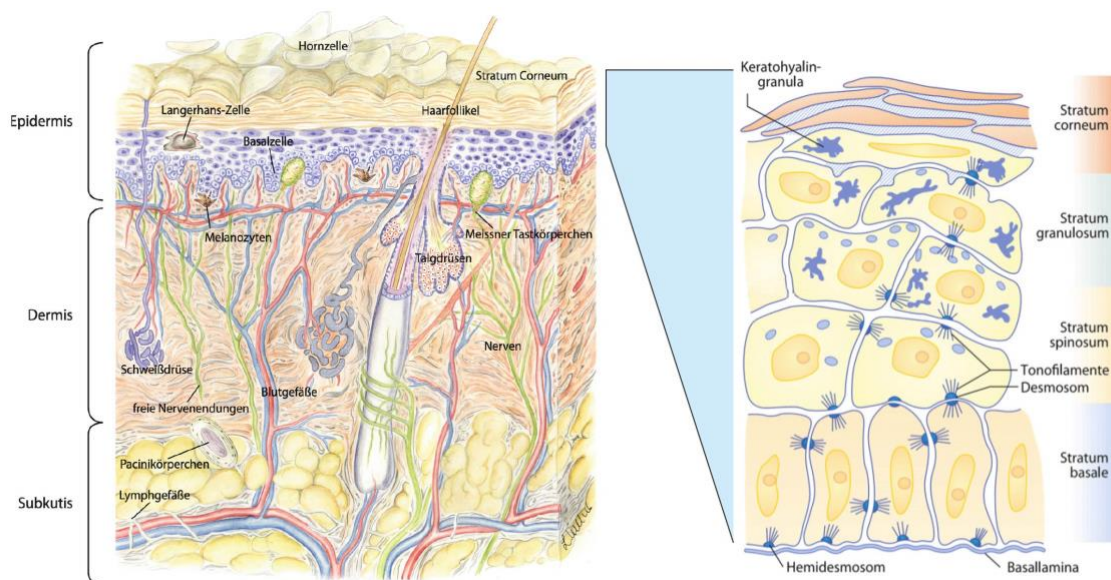
Desweiteren finden sich im Stratum basale pigmentbildende Melanozyten und Merkelzellen mit neuroendokriner Funktion und Mechanorezeptoren. Als Bestandteil des Immunsystems wandern Langerhanszellen und Lymphozyten bis in die Epidermis ein. Durch die Dermis erfolgt über Blutkapillare die Nährstoffversorgung der Epidermis. Fetteinlagerungen in der Subcutis dienen der Wärmeisolation und schützen den Körper durch Polsterung (Moll, 2016).



## Einleitung

Die menschliche Haut bildet die wichtigste Barriere zwischen Umwelt und Körper. Diese besteht im Wesentlichen, neben anatomischen Komponenten der Epidermis, Dermis und Subcutis, aus Bestandteilen des Immunsystems, einer chemischen Barriere (pH-Wert) und der bakteriellen Besiedelung (Mikrobiom).

Bei vielen Hauterkrankungen kommt es zu einer Störung der Barrierefunktion der Epidermis. Eine der weitest verbreiteten chronischen Erkrankungen der Haut ist die atopische Dermatitis (AD), die in dieser Arbeit in Hinsicht auf die Barrierefunktion der Tight junctions (TJ) in der Epidermis untersucht werden soll.



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau der menschlichen Haut und Epidermis**

Die menschliche Haut wird in drei Schichten gegliedert, der Epidermis, Dermis und Subcutis (modifiziert nach: Hertl, 2018). Die Epidermis wird wiederum in vier Schichten unterteilt: Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale (modifiziert nach: Fritsch, Schwarz, Fritsch, & Schwarz, 2018).

### 1.2 Atopische Dermatitis (AD)

AD ist eine chronisch entzündliche, schubweise auftretende, ekzematöse Hauterkrankung. 15-25% der europäischen Vorschulkinder und 1,5-3% der Erwachsenen sind von einer AD betroffen. In den letzten 50 Jahren hat sich die

## Einleitung

Prävalenz der Erkrankung vervier- bis versechsfacht (Avena-Woods, 2017; Grobe et al., 2019; Werfel, 2011).

Die Symptome der AD sind vielfältig und treten altersabhängig in unterschiedlicher Form und Lokalisation auf. Erwachsene leiden vorwiegend unter trockener geröteter Haut, Ekzem, Erosion, Lichenifikation und starkem Juckreiz an den Beugeseiten der Extremitäten, im Gesicht und am Hals. Sehr belastend ist die damit häufig verbundene Schlaflosigkeit (Mounsey & Agius, 2017).

Im Kindesalter äußert sich die AD in den ersten Lebensmonaten in einer vermehrten Milchschorfbildung. Bei Kleinkindern tritt das atopische Ekzem vorwiegend im Gesicht und an den Streckseiten der Extremitäten auf (Leung & Bieber, 2003).

Typisch für die Erkrankung ist der Wandel von einer atopischen Dermatitis im Kindesalter zu anderen Allergie-Typ-1-Erkrankungen, wie Asthma bronchiale oder allergische Rhinitis. Dies wird als „atopischer Marsch“ bezeichnet (Dharmage et al., 2014).

Die Diagnose einer AD erfolgt klinisch anhand der typischen Hautveränderungen, des Verteilungsmusters und der Anamnese. In 70% der Fälle ist die AD mit einem erhöhten Immunglobulin E (IgE) Spiegel assoziiert (Tokura, 2010). Daher kann die Messung des IgE-Serumspiegels als weiteres diagnostisches Mittel herangezogen werden. Auch Allergietests können der weiteren Abklärung dienen (Sterry, 2005).

Der Schweregrad einer AD kann mit verschiedenen klinischen nicht invasiven Assessmentinstrumenten subjektiv und objektiv erfasst und eingeteilt werden. Häufig wird der SCORAD (von engl. **scoring atopic dermatitis**) verwendet, der sich aus einem subjektiven Selbsteinschätzungsteil der PatientInnen in Bezug auf Juckreiz und Schlaflosigkeit und einem objektiven Teil zusammensetzt. Dazu bewertet ein geschulter Untersucher den Zustand der Haut und schätzt das Ausmaß der betroffenen Fläche. Aus dem subjektiven und objektiven Teil wird ein Punktwert ermittelt, der den Schweregrad der AD wiedergibt

## Einleitung

(Angelova-Fischer et al., 2005). Eine genauere Beschreibung erfolgt im Abschnitt Material und Methoden in Abschnitt 3.3.1 „Erhebung des SCORADs“.

Nicht invasive diagnostische Mittel zur Einschätzung der Barrierefunktion bei AD sind der transepidermale Wasserverlust (TEWL; von engl. *transepidermal water loss*) und die Corneometrie. Der TEWL wird mit einem Tewameter über der Haut gemessen und misst die abgegebene Wasserdampftrate pro Fläche (siehe Material und Methoden 3.3.2.1 „Messung des transepidermalen Wasserverlusts“). Die corneometrische Messung erfolgt mit einer Sonde, die ein elektrisches Feld innerhalb der obersten Hautschichten aufbaut und so Rückschlüsse auf die Hydratation der Haut zulässt (siehe Material und Methoden 3.3.2.2 „Corneometrie“). Es wird die elektrische Kapazität der Haut gemessen, die proportional zum Wassergehalt der Haut ist und in Corneometereinheiten® angegeben wird (Rudolph & Kownatzki, 2004).

Nach verschiedenen Studien besteht ein positiver Zusammenhang zwischen TEWL, Corneometrie, IgE Level und der Krankheitsaktivität (Addor et al., 2012; Berardesca & Maibach, 1990; Hon et al., 2018; Werner & Lindberg, 1985).

Histopathologisch präsentiert sich die AD mit einer Hyperplasie der Epidermis, perivaskulären lymphozytären Infiltraten und einer Orthohyperkeratose (Sterry, 2005). Eine histologische Untersuchung mit einer Probenentnahme von betroffenen Hautarealen findet jedoch im klinischen Alltag sehr selten statt, da eine klinische Diagnose in den allermeisten Fällen ausreichend ist (Werfel, Heratizadeh, et al., 2016).

Therapeutische Maßnahmen zur Linderung der Symptome gliedern sich in eine Stufentherapie, beginnend mit Allergenkarenz und Vermeidung von auslösenden Faktoren, topischen Glukokortikoiden oder topischen Calcineurininhibitoren bis zur systemischen Gabe von immunmodulierenden Substanzen wie z.B. Ciclosporin A (Heratizadeh & Werfel, 2016; Moll, 2016; Werfel, Heratizadeh, et al., 2016). Zusätzlich werden physikalische Maßnahmen wie Phototherapie und Solebäder empfohlen.

In sehr schweren Fällen ist seit 2017 eine monoklonale Antikörpertherapie (Dupilumab) zur Blockierung von Rezeptoren für Interleukin 4 und 13 auf Th2-

## Einleitung

Helferzellen, Makrophagen und Mastzellen zugelassen (Strowd & Feldman, 2017). Crisaborole-Salbe (Eurcrisa®) die in den USA, Kanada, Israel und Australien seit 2017 für leichte und mittelschwere AD zugelassen ist, wurde in der europäischen Union im April 2020 zur Therapie von atopischer Dermatitis ebenfalls zugelassen. Crisaborole wirkt über die selektive Hemmung der Phosphodiesterase-4 (PDE-4) und verhindert den Abbau von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), was eine Akkumulation von zellulärem cAMP bedingt. Dies führt zu einer Unterdrückung der Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen (Hoy, 2017; Woo & Kuzel, 2019). Ein weiteres Medikament, Bortezomib, welches bisher für die Therapie des multiplen Myeloms zugelassen ist, wird als neues lokal wirkendes Mittel zur Therapie der atopischen Dermatitis diskutiert und wird im Tiermodell getestet. Bortezomib wirkt vermutlich unter anderem über die Erhöhung der Claudin-1 Protein Expression durch eine Hemmung von Proteasomen (Hoy, 2017; Y. E. Kim et al., 2017).

Eine kausale Therapie der atopischen Dermatitis ist zurzeit nicht bekannt.

### **1.2.1 Pathogenese der atopischen Dermatitis und vermutete Ursachen**

Die Ursachen und auslösenden Faktoren für die Entstehung von AD werden als „multifaktoriell“ beschrieben. Genetische Prädisposition, psychischer Stress, Umweltverschmutzung, Ernährung und Veränderungen der Hautflora (Mikrobiom) können das Auftreten einer AD begünstigen (David Boothe et al., 2017; Grobe et al., 2019; Peng & Novak, 2015). Meist treten krankheitsauslösende Faktoren in Kombination auf und es kann nur selten eine einzige Ursache ausgemacht werden (Bieber & Prölss, 2008; David Boothe et al., 2017).

Funktionell lässt sich in läsionalen Hautbereichen bei AD eine Störung der Hautbarriere nachweisen, die sich über eine erhöhte Wasserabgabe und erniedrigte Hydratation der obersten Hautschichten bemerkbar macht. Diese Phänomene lassen sich mittels tewametrischen Messungen und Corneometrie nachweisen (siehe Kapitel 3.3.2.1 und 3.3.2.2) und sind Folge von atopischen Veränderungen, die symptomatisch bei AD auftreten. Gleichzeitig kommt es häufig zu vermehrtem Pruritus, was zu Kratzen führen kann. Die dadurch

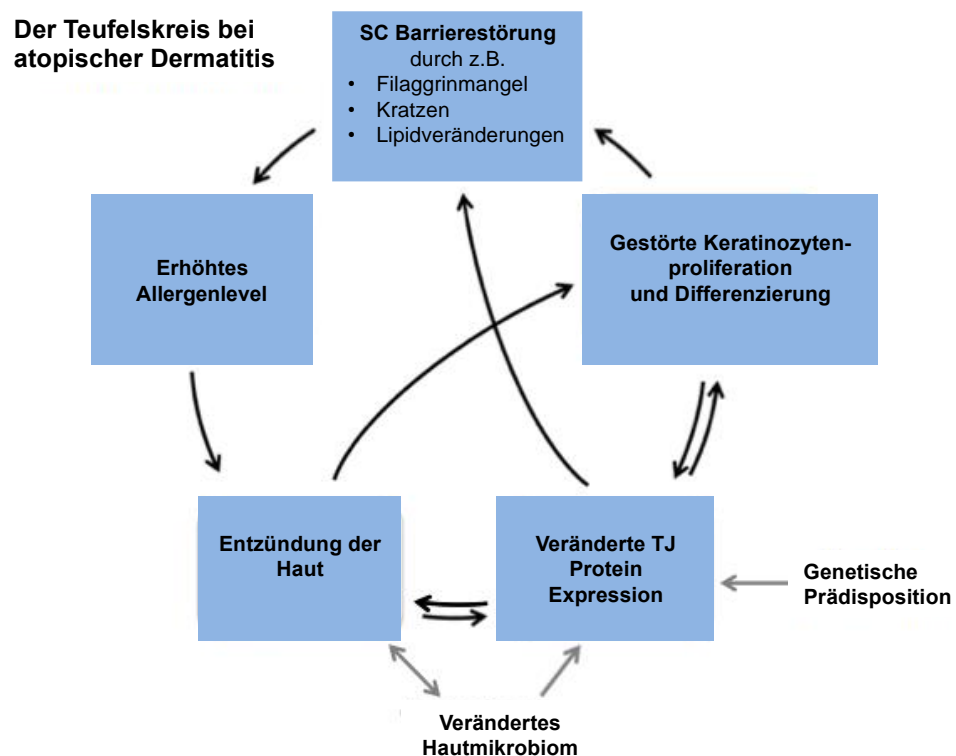
## Einleitung

bedingte Störung der mechanischen Barriere der Epidermis ermöglicht das Eindringen von Mikroorganismen und Allergenen und führt zu einer Verstärkung einer lokalen Entzündung in der Haut, was wiederum den Juckreiz erhöht. Es folgt eine lokale Th2-Helferzellen-Immunantwort, die in frühen AD Hautläsionen nachweisbar ist. In chronisch entzündlich veränderten Hautstellen werden Th0- und Th1- Helferzellen gefunden (Bieber, 2010). Es finden sich ein systemisch erhöhter IgE-Antikörperspiegel im Serum von AD PatientInnen (siehe Kapitel 1.2) und vermehrt inflammatorische Infiltrate (vorwiegend aus Th2 Helferzellen und Mastzellen bestehend) in der Epidermis, welche proallergische Zytokine produzieren. Im akuten Stadium werden vorwiegend Interleukine (IL) 4, 13 und 31 ausgeschüttet, im chronischen Stadium liegen vermehrt IL 4, IFN-gamma, IL17 und IL 22 vor (Eyerich & Novak, 2013). Diese entzündlichen Prozesse führen zu einer weiteren Verschlechterung der Barrierefunktion durch strukturelle und funktionelle Veränderung der Hautschichten und zu einer weiteren Zunahme des Pruritus, was durch Kratzen zu einer weiteren mechanischen Störung der Hautbarriere führen kann.

Auch auf zellulärer Ebene der Genese der AD findet sich kein einzelner Pathomechanismus. Verschiedene krankheitsfördernde Faktoren fügen sich zu einem Teufelskreis zusammen (siehe Abb. 2). Die Hinweise mehren sich, dass Defekte in der Barrierefunktion sowohl Tight junctions (TJ) im Stratum granulosum (siehe Kapitel 1.4), als auch das Stratum corneum betreffend zu den ersten Schritten in der Entwicklung einer AD gehören (Bäsler et al., 2016; Cork et al., 2009). Ungeachtet dessen, ob Ursache oder Folge, kommt es bei der AD zu Barrierefunktionsstörungen der Haut, die im Stratum corneum und im Stratum granulosum lokalisiert sind (Rerknimitr et al., 2017). Die Dysfunktion der Hautbarriere bei AD kann durch mechanische Hautirritation ausgelöst werden (Murota & Katayama, 2017). Auch Lipidmangel im Stratum corneum (Imokawa, 2001; Van Smeden & Bouwstra, 2016), durch Genmutation beispielsweise des Filaggrin-Gens (Weidinger & Irvine, 2011), oder andere Genveränderungen (Cork et al., 2006; Liang et al., 2016) (siehe Kapitel 1.2.1.1) können die Hautbarrierefunktion stören (A. Y. Lee, 2020) (siehe Abb. 2). Weitere Faktoren, wie eine gestörte Keratinozytenproliferation und Differenzierung durch veränderte TJ Expression können sich gegenseitig

## Einleitung

bedingen und beeinflussen ebenfalls die Barrierefunktion (Bäsler et al., 2016; Sugita & Kabashima, 2020) (siehe Abb. 2). Eine gestörte Hautbarriere kann zu einem systemisch erhöhten Allergenlevel führen, dies wiederum kann eine Entzündung in der Haut hervorrufen und sich so auf die TJ Expression auswirken (siehe Abb. 2, siehe Kapitel 1.2.1.2). Auch ein verändertes Hautmikrobiom beeinflusst diesen Teufelskreis, wie in Kapitel 1.2.1.3 näher beschrieben wird. Nach heutigem Wissensstand wird vermutet, dass AD durch eine überschießende systemische Th2-Helferzellen-Immunantwort des Körpers der PatientInnen und nicht nur durch eine lokale Entzündung, die auf die Haut begrenzt ist, begünstigt wird (Werfel, Allam, et al., 2016).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Teufelskreises bei atopischer Dermatitis**

Der Teufelskreises bei atopischer Dermatitis führt zu einer Stratum corneum (SC) Barrierestörung, insbesondere durch Wechselwirkungen auf die Tight junction (TJ) Protein Expression durch Entzündungen, Veränderungen im Hautmikrobiom und durch genetische Prädisposition (Modifiziert nach Bäsler et al., 2016).

### 1.2.1.1 Genetische Faktoren bei atopischer Dermatitis

Genetische Prädisposition erhöht das Risiko an einer AD zu erkranken, besonders wenn fördernde Umweltfaktoren vorhanden sind. In einer deutschen

## Einleitung

Studie konnte gezeigt werden, dass Kinder mit von atopischen Erkrankungen betroffenen Elternteilen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko haben (Schmitz et al., 2012).

Es konnten bereits 34 verschiedene Genorte, die mit einem erhöhten AD-Risiko einhergehen, identifiziert werden (2020): zum Beispiel Gene, die den Signalweg von Th 2- und Th 17-Helferzellen und den epidermalen Differenzierungskomplex betreffen (Bin & Leung, 2016; Paternoster et al., 2015). Stärkeren Einfluss haben genetische Veränderungen, welche die Barrierefunktion der Haut beeinflussen. Der größte genetische Risikofaktor ist eine Null-Mutation des Filaggrin-Gens, wobei aber eine große Anzahl von AD PatientInnen keine Mutation aufweist (Paternoster et al., 2015). Filaggrin besteht aus Keratin, welches bei Verhornungsprozessen im Stratum granulosum eine wichtige Rolle spielt. Es ist fast immer erniedrigt bei PatientInnen mit AD, was sowohl genetisch, als auch durch entzündliche Ursachen bedingt sein kann (Peng & Novak, 2015). Die vier häufigsten Mutationen des Filaggrin-Gens in Europa sind R501X, 2282del4, R2447X und S3247X (Visser et al., 2013).

Es konnte in zwei nordamerikanischen Bevölkerungsgruppen ein Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus in der Genregion von Claudin-1 und AD hergestellt werden (De Benedetto et al., 2011). De Benedetto et al. konnten zeigen, dass auf mRNA- und Proteinebene eine reduzierte Expression von Claudin-1 und Claudin-23 in AD PatientInnen stattfindet und die Claudin-1 Expression invers mit Th2 Biomarkern korreliert. In vitro konnte bestätigt werden, dass das Ausschalten der Claudin-1 Expression in humanen Keratinozyten zu einer verminderten TJ Funktion führte, während es die Keratinozytenproliferation verstärkte (De Benedetto et al., 2011).

In einer äthiopischen Studie von Asad et al, 2016 hingegen wurde kein genereller Zusammenhang mit Genveränderungen im Claudin 1 Gen gefunden, jedoch zeigte sich eine signifikante Assoziation mit einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, von engl. *single nucleotide polymorphism*) bei von AD betroffenen Kindern, die vor dem fünften Lebensjahr erkrankten (Asad et al., 2016).

## Einleitung

Eine koreanische Studie von Yu et al. 2015 konnte zeigen, dass bei einem SNP im Claudin-1 Gen und Schimmelpilzbelastung die Wahrscheinlichkeit an AD zu erkranken erhöht ist (Yu et al., 2015). In einer dänischen Studie wiederum konnte kein Zusammenhang zwischen AD und SNPs im Claudin-1 Gen hergestellt werden (Ross-Hansen et al., 2013).

### **1.2.1.2 Das Hautmikrobiom von PatientInnen mit atopischer Dermatitis**

Das Mikrobiom der Haut ist ein eigenes Ökosystem, das aus unterschiedlichen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen und Viren besteht. Einige leben ständig auf der Haut, andere nur vorübergehend. Die auf der Haut dominierenden Bakterienstämme sind: Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes und Proteobacteria. Am häufigsten kommt das Bakterium *Staphylococcus epidermidis* vor (Fyhrquist et al., 2016).

Das Mikrobiom unterscheidet sich stark nach Hautschicht, Körperregion, Alter, Geschlecht, Körperpflege und wird durch Umweltfaktoren beeinflusst. Ein verändertes Mikrobiom scheint einen Einfluss auf die Pathogenese von AD zu haben und ein eigenständiger Risikofaktor für die Entstehung einer AD an Prädilektionsstellen zu sein. So wurde bei PatientInnen mit AD ein verändertes Mikrobiom gefunden, das eine verminderte Diversität an Bakterien aufwies und zu Sekundärinfektionen führte (Fyhrquist et al., 2016). In mehr als 90% der an AD erkrankten PatientInnen ist die Haut mit dem Bakterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) kolonisiert, das in 50% ein entzündungsförderndes Toxin produziert (Park et al., 2017). Besonders läsionale Haut scheint betroffen zu sein, wo es zu einer Infiltration von Entzündungszellen des Th1/Th2-Typs und einer Ausschüttung von Interleukinen kommt (Nakatsuji et al., 2016). Dies wiederum kann zu einer Verminderung der Expression von Filaggrin führen, welches die Barrierefunktion des Stratum corneums schwächt. *S. aureus* kann eine kurzzeitig TJ Barrierefunktion verbessernde Wirkung haben, führt aber in einem längeren Zeitraum zu einer Beeinträchtigung der Barriere (Bäsler et al., 2017).

Außerdem wird vermutet, dass das Darmmikrobiom eine Rolle bei der Prädisposition von AD spielt (Wollina, 2017).



### 1.3 Tight Junctions

Tight Junctions (TJs) sind komplexe Strukturen, die Zellen untereinander verbinden (Lüllmann-Rauch, 2019). Sie kommen in fast allen Organen und Geweben des menschlichen Körpers vor. Sie tragen zum kontrollierten parazellulären Fluss von Ionen, Molekülen und Wasser in Zellschichten bei und sind außerdem an diversen anderen Prozessen, wie Gentranskription, Tumorsuppression, Zellproliferation und Zellpolarität beteiligt (Schneeberger, 2004).

TJs konnten in der humanen Epidermis nachgewiesen werden und sind vorwiegend im Stratum granulosum lokalisiert (Kirschner, Bohner, et al., 2010). TJ Proteine kommen auch in anderen Schichten der Epidermis vor. So findet sich z.B. das TJ Protein Occludin in gesunder Haut überwiegend im Stratum granulosum, während Claudin-1 ebenfalls vermehrt im Stratum granulosum auftritt, aber auch im Stratum spinosum bis zum tiefliegenden Stratum basale nachweisbar ist (Kirschner & Brandner, 2012). TJs bilden zusammen mit dem Stratum corneum einen Teil der physikalischen Hautbarriere (Madison, 2003).

TJs bestehen aus verschiedenen Proteinen: Intrazellulär finden sich Plaqueproteine (z.B. ZO 1-3, MUPP1) die mit den Transmembranproteinen in funktionellem Zusammenhang stehen und Kontakt mit dem Aktinskelett der Keratinozyten herstellen.

Claudine sind die größte Familie von Transmembranproteinen. Es können 27 Familienmitglieder unterschieden werden, die sich spezifisch in Organen und Geweben befinden (Liu et al., 2016). Sie regulieren die Öffnung und den Verschluss des Interzellularraums und sind damit für die Barrierefunktion der Epidermis von Bedeutung (Kirschner et al., 2013).

Zu den transmembranständigen TJ assoziierten Marvel Proteinen (TAMPs von engl.: *tight junction associated marvel proteins*) zählen Occludin, Tricellulin und Marvel 3D. Occludin hat eine stabilisierende und festigende Funktion. Seine Funktion wird durch Phosphorylierung moduliert. Tricellulin findet sich in TJs, die drei Zellen miteinander verbinden (Niessen, 2007).

## Einleitung

Eine weitere Gruppe der transmembranständigen TJ Proteine sind die TJ Adhäsionsmoleküle (JAMs von engl.: *junctional adhesion molecules*), die mit den intrazellulären Plaqueproteinen in Verbindung stehen.

Plaqueproteine (ZO1,2,3, Symplekin, Cingulin, MUPP1 und Small GTPases) stellen eine Verbindung zwischen Transmembranproteinen und dem Aktinskelett her und leiten so Signale weiter ins Zellinnere (Niessen, 2007; Schneeberger, 2004).

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten TJ Proteine Occludin und Claudin-1 und -4 näher beschrieben.

### 1.3.1 Occludin

Occludin wurde 1993 von Furuse et al. entdeckt und war somit das erste bekannte Transmembranprotein der TJ (Furuse et al., 1993). Es wird von einem einzigen Gen exprimiert und kann durch alternatives *Splicing* in mindestens vier verschiedenen Isoformen auftreten (Mankertz et al., 2002). Das TJ Protein Occludin spannt sich vierfach durch die Zellmembran und bildet zwei extrazelluläre und eine kleine intrazelluläre Schleife. Beide Enden des Proteins, das carboxyterminale und das aminoternale Ende liegen im Zellinneren (Schneeberger, 2004). Die extrazellulären Schleifen interagieren mit den extrazellulären Schleifen der benachbarten Zelle. Occludin kommt vorwiegend im oberen Stratum granulosum vor (Brandner et al., 2002; Langbein et al., 2002; Pummi et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das transmembranständige Occludin wichtige Funktionen in der Barrierefunktion der Haut und der Differenzierung der Keratinozyten erfüllt und in der Wundheilung und Regeneration eine Rolle spielt (Volksdorf et al., 2017). Die Funktion von Occludin ist abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus. Occludin interagiert mit dem Zellskelett über ZO-1, ZO-2 und ZO-3 und anderen Proteinen (Dörfel & Huber, 2012; Y. Li et al., 2005; Rao, 2009; Wong, 1997).

Bei Psoriasis zeigte sich eine verbreiterte Verteilung von Occludin über die Epidermisschichten und in der Polymerasekettenreaktion konnte ein erhöhter mRNA-Spiegel nachgewiesen werden (Kirschner et al., 2009). Beim Plattenepithelzellkarzinom hingegen wurde eine Herabregulation von Occludin

## Einleitung

beobachtet (Rachow et al., 2013). Auch bei atopischer Dermatitis konnten Veränderungen beim Auftreten von Occludin nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.4).

### 1.3.2 Claudine-1 und 4

Claudine wurden erstmalig 1998 von Furuse et al. beschrieben (Furuse et al., 1998), der gleichen Arbeitsgruppe, die bereits Occludin als Bestandteil von TJ identifiziert hatte. Claudin-1 und 4 gehören, wie Occludin zu den transmembranständigen Anteilen von TJs. Sie durchspannen die Zellmembran vier Mal und auch bei ihnen liegen Amino-Terminus und Carboxyl-Terminus intrazellulär (Schneeberger, 2004). Extrazellulär bilden sie eine größere und eine kleinere Schleife, diese interagieren vorwiegend über nicht-kovalente Bindungen und Disulfidbrücken mit den extrazellulären Schleifen der TJs der Nachbarzellen (Krause et al., 2015; J. Li et al., 2013). Claudin-1 ist im Stratum granulosum, Stratum spinosum bis zum Stratum basale zu finden. Claudin-4 ist vorwiegend im Stratum granulosum lokalisiert (Bäsler et al., 2016). Claudin-1 und Claudin-4 gehören zu den Claudinen, die den parazellulären Fluss einschränken, im Gegensatz zu den porenbildenden Claudinen (Günzel & Yu, 2013).

Claudin-1 kommt in den meisten Epithelien des menschlichen Körpers vor und spielt eine große Rolle in der Barrierefunktion der Epidermis und anderen Epithelien. So sterben Knockout-Mäuse aufgrund eines starken Wasserverlustes über die Haut nach der Geburt (Furuse et al., 2002). Und auch in Zellkulturen mit Claudin-1 knockout Versuchen zeigte sich ein Einfluss auf die Barrierefunktion (Kirschner et al., 2013).

Beim humanen NISCH-Syndrom (von engl.: *neonatal ichthyosis-sclerosing cholangitis syndrome*) findet sich eine Mutation des Claudin-1-Gens. Es zeigt sich eine Ichthyose (gestörte Verhornung der Haut), Hypotrichose (verminderter Haarwuchs) und eine Entzündung der Gallenwege (Roehlen et al., 2020). Auch bei atopischer Dermatitis (siehe Kapitel 1.4) und Psoriasis zeigt sich eine veränderte Claudin-1-Expression (De Benedetto et al., 2011; Kirschner et al., 2009).

## Einleitung

Claudin-4 ist wie Claudin-1 eine Komponente der TJ und hat Einfluss auf den parazellulären Fluss von Ionen und gelösten Stoffen in Epithelien und der Epidermis und vermutlich auf die Entwicklung innerer Organe. Es war das erste Claudin, dessen Einfluss auf die Permeabilität im Zellversuch nachgewiesen werden konnte. So hatte eine Überexpression eine Erhöhung des TER (von engl.: *transepidermal electrical resistance*) in der Zellkultur zur Folge (Van Itallie et al., 2003). Die genaue Funktion von Claudin-4 ist bisher noch unklar (Tokuda et al., 2017).

In der Haut konnte bei Sonnenlichtexposition Claudin-4 in mehr Epidermisschichten beobachtet werden als in nicht sonnenexponierter Haut, wo sich Claudin-4 vorwiegend im Stratum granulosum und oberem Stratum spinosum befindet (Rachow et al., 2013). Ähnliche Veränderungen des Claudin-4s und eine vermehrte Expression finden sich auch beim Plattenepithelzellkarzinom (Morita et al., 2004; Rachow et al., 2013). Bei Psoriasis zeigte sich in läsionalen Hautbereichen ebenfalls ein Auftreten von Claudin-4 in mehr Epidermisschichten als in gesunder Haut (Kirschner et al., 2009). Und in der Zellkultur konnte in Claudin-4 knock-out Versuchen gezeigt werden, dass Claudin-4 Verluste die Barrierefunktion beeinflussen (Kirschner et al., 2013). Bei der atopischen Dermatitis finden sich bisher wenige Forschungsergebnisse (siehe Kapitel 1.4)

### **1.4 Veränderungen von Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 bei atopischer Dermatitis**

Bei PatientInnen mit AD finden sich Strukturveränderungen in der Epidermis mit Filaggrinverminderung im Stratum corneum und Stratum granulosum und eine veränderte TJ Struktur im Stratum granulosum. Es wird vermutet, dass eine Veränderung der TJ Proteine im Stratum granulosum zu einer gestörten Barrierefunktion im Stratum granulosum und im Stratum corneum führen (Furuse et al., 2002; Sugawara et al., 2013).

Zu den TJ Proteinen Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 in AD liegen folgende Forschungsergebnisse vor:

## Einleitung

Für Occludin wurde bis heute keine signifikante Veränderung in menschlicher Haut bei AD PatientInnen im Vergleich zu gesunder Haut gefunden, allerdings wird eine Tendenz zu erhöhtem Auftreten von Occludin in nichtläsionaler Haut bei PatientInnen mit AD in der Immunfluoreszenzintensitätsmessung (IF) vermutet (Gruber et al., 2015). Auch in einer weiteren vorangegangenen Studie wurde für Occludin in Haut von AD PatientInnen keine signifikante Veränderung in der IF festgestellt (De Benedetto et al., 2011;) (siehe Tabelle 1.1). Im AD Tiermodell (Beagle Hunde) gibt es Hinweise dafür, dass Occludin möglicherweise Veränderungen unterworfen ist (H.-J. Kim et al., 2016). Hier wird eine Verminderung von Occludin bei auf Hausstaub sensibilisierten Beaglen beschrieben. Hönzke et al., 2016 fand eine kompensatorische Erhöhung von Occludin in Knockdown-Filaggrin-Hautmodellen und eine Verminderung von Occludin in mit Interleukinen-4 und 13 behandelten Knockdown-Filaggrin -Hautmodellen. In einer neueren Studie von 2017 konnte gezeigt werden, dass in rekonstruierter humaner Epidermis (RHE) mit filaggrin-defizienten Keratinozyten keine Veränderung der Barrierefunktion nachweisbar war, aber Occludin und Claudin-4 nur lückenhaft vorhanden waren (Niehues et al., 2017). Tohgasaki et al., 2018 machen eine vermehrte Enolase-1 Expression bei verminderter Keratinisierung bei AD für die Reduktion von Occludin und Claudin-4 verantwortlich.

Für Claudin-1 wurde in drei vergleichbaren Studien (siehe Tabelle 1.1) eine signifikante Verminderung in läsionaler Haut von AD PatientInnen im Vergleich zu gesunden ProbandInnen gefunden (Batista et al., 2015; Gruber et al., 2015; Yuki et al., 2016). In diesen Studien wurden Immunfluoreszenzintensitätsmessungen (IF) als Nachweismethode verwendet. Im Vergleich zwischen nichtläsionaler und gesunder Haut fanden Gruber et al., 2015 und Yuki et al., 2016 keine signifikanten Unterschiede im Auftreten von Claudin-1. De Benedetto et al., 2011 hingegen fand eine Reduktion. Läsionale im Vergleich zu nichtläsionaler Haut von AD PatientInnen wurde hinsichtlich des Claudin-1-Vorkommens in der IF bisher nur von Gruber et al. untersucht. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion von Claudin-1 (siehe Tabelle 1). Auch in Haarfollikeln und Schweißdrüsen von PatientInnen mit AD ließ sich eine

## Einleitung

Verminderung von Claudin-1 beobachten (Murota et al., 2018; Zorn-Kruppa et al., 2018).

Es konnten bisher keine signifikanten Unterschiede in der Immunfluoreszenzmessung (IF) von Claudin-4 in läsionaler Haut im Vergleich zu gesunder Haut gezeigt werden (Batista et al., 2015; Gruber et al., 2015; Yuki et al., 2016). Gruber et al. konnte eine signifikante Zunahme von Claudin-4 in nichtläsionaler Haut im Vergleich zu gesunder nachweisen, sowie eine Reduktion in läsionaler Haut im Vergleich zu nichtläsionaler (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1.1: Tabellarische Übersicht der bisher veröffentlichten Studien zu Tight junctions bei atopischer Dermatitis.**

Autoren	Gruber et al., 2015			De Benedetto et al., 2011	Yuki et al., 2016		Batista et al., 2015
Ethnie/ Angaben zur Studie	europäisch/kaukasisch  25 PatientInnen: 8 PatientInnen wurde läsionale Haut (L), 17 PatientInnen nichtläsionale Haut (NL) und 10 gesunden (G) ProbandInnen wurde Haut am unteren Rücken entnommen			afro-amerikanisch  11 PatientInnen, 12 ProbandInnen, nicht atopisch  Hautentnahme am nicht-sonnenexponierten Unterarm	japanisch  3 PatientInnen, 3 ProbandInnen, Hautentnahme NL erfolgte am Unterarm und L am Bein		brasilianisch  33 PatientInnen, 25 gesunde ProbandInnen  Keine Angabe zur Probenentnahme
	NL:G	L:NL	L:G	NL:G	L:G	NL:G	L:G
Occludin in der Epidermis	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	nicht untersucht
Claudin-1 in der Epidermis	n.s.	↓↓↓↓	↓↓	↓	↓	n.s.	↓↓↓↓
	n.s.	↓	n.s.				
Claudin-4 in der Epidermis	↑↑	↓↓↓↓	n.s.	nicht untersucht	n.s.	n.s.	n.s.

Tabellarische Übersicht der bisher veröffentlichten Studien zu Tight junctions bei atopischer Dermatitis. Als Nachweismethode wurde bei allen vier genannten Studien Immunfluoreszenzintensitätsmessungen (IF) verwendet. Die Ergebnisse der IF sind in Schichten der Epidermis im Vergleich von gesunder (G), nichtläsionaler (NL) und läsionaler Haut (L) dargestellt. In der Studie von Gruber et al., 2015 wurde bei der IF von Claudin-1 die Epidermis in das Stratum granulosum und untere Stratum spinosum/Stratum basale unterteilt. Bei der IF von Occludin und Claudin-4 wurde nur in oberen Bereichen der Epidermis gemessen.

## Einleitung

In den dargestellten Arbeiten werden die Schichten der Haut nicht so detailliert eingeteilt, wie in der hier vorgelegten Arbeit. ↑=Hochregulation; ↓=Herabregulation; ↑= p-Wert < 0.05; ↑↑/↓↓= p-Wert < 0.01; ↑↑↑/↓↓↓= p-Wert < 0.001; **n.s.**= nicht signifikant



## 2 Ziele dieser Arbeit

Bei der AD wird eine gestörte Barrierefunktion der Epidermis beobachtet. Es wird vermutet, dass dieser Barrierefunktionsstörung eine veränderte Expression von TJ Proteinen, vor allem Claudin-1 zugrunde liegt (Batista et al., 2015; De Benedetto et al., 2011; Gruber et al., 2015; Yuki et al., 2016).

Es gibt Hinweise dafür, dass die TJ-Barriere im humanen Stratum granulosum lokalisiert ist (Kirschner et al., 2013) und somit eine Verminderung von Claudin-1 besonders in dieser Schicht zu einer Störung der Barriere führen könnte. Bisher konnte aber kein Zusammenhang vom Auftreten des TJ Proteins Claudin-1 und der funktionellen Barriere im Stratum granulosum in AD erbracht werden, da in bisherigen Arbeiten keine funktionellen Untersuchungen der Tight Junction Barrierefunktion durchgeführt wurden. Auch eine Korrelation der Claudin-1 Expression zur Gesamthautbarrierefunktion, gemessen mittels TEWL, fehlte.

In dieser Arbeit soll deshalb die Rolle von Claudin-1 durch Immunfluoreszenzmikroskopie und durch funktionelle Haut- und TJ-Barrieremessungen in der Epidermis von PatientInnen mit AD in läsionaler Haut im Vergleich zu nichtläsionaler Haut und gesunder Epidermis untersucht werden.

Da über die TJ-Proteine Occludin und Claudin-4 in atopisch veränderter Haut bisher sehr wenig bekannt ist, werden auch diese Proteine untersucht.

## **3 Materialien und Methoden**

### **3.1.1 StudienteilnehmerInnen**

In dieser Arbeit wurden in vivo zwei Hautbiopsien von PatientInnen mit AD und jeweils eine Hautbiopsie von ProbandInnen (Kontrollen) entnommen. Die PatientInnen wurden in einem läsionalen und in einem nichtläsionalen Bereich biopsiert (siehe Tabelle 3.1 für die Lokalisation der Entnahme). Den ProbandInnen wurde eine Stanze an ähnlicher Lokalisation entnommen. Es nahmen 13 freiwillige, gesunde ProbandInnen und 13 freiwillige PatientInnen mit atopischem Ekzem teil. Die gesunden ProbandInnen wurden so ausgewählt, dass sie dem Alter und Geschlecht der AD PatientInnen weitestgehend entsprachen. Es nahmen insgesamt 16 Frauen und 10 Männer teil (siehe Tabelle 3.1).

Die Diagnosestellung, Untersuchungen und Probenentnahme wurden in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und in der Universitäts-Hautklinik Kiel des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein im Zeitraum von November 2015 bis April 2016 von DermatologInnen durchgeführt.

Die StudienteilnehmerInnen wurden mit Hilfe eines PatientInnenregisters des Universitäts-Hautklinikums Kiel und aus der Sprechstunde für atopische Dermatitis des Universitätsklinikums Eppendorf rekrutiert.

Eingeschlossen wurden PatientInnen und ProbandInnen mit atopischer Dermatitis im Alter von 20 bis 61 Jahren.

Ausschlusskriterien für die PatientInnen waren systemische Therapien zur Behandlung von atopischer Dermatitis mit z. B. Cortison, Calcineurininhibitoren, Ciclosporin A oder Tacrolimus, sowie Anwendung von lokalen Therapeutika wie z. B. harnsäure- oder cortisonhaltigen Cremes oder UV-Lichttherapie in den letzten drei Wochen vor Biopsieentnahme. Eincremen der Haut war am Tag der Messungen und Probenentnahme nicht erlaubt.

## Materialien und Methoden

Ausschlusskriterien für gesunde ProbandInnen waren jegliche Hauterkrankungen und andere schwerwiegende systemische Erkrankungen.

Zur Einstufung des Schweregrades der atopischen Dermatitis wurde zunächst ein SCORAD bei den PatientInnen erhoben (siehe Kapitel 3.3.1.). TEWL-Messungen und eine Corneometriemessung (siehe Kapitel 3.3.2.1 und 3.3.2.2) wurden an läsionalen und nichtläsionalen Hautstellen durchgeführt, an denen später die Biopsien entnommen wurden (siehe Kapitel 3.3.4).

Bei den gesunden ProbandInnen wurden an ähnlichen Lokalisationen Messungen von TEWL und Corneometrie vorgenommen, sowie Gewebeproben entnommen. Hier wurde kein SCORAD erhoben.

Im zweiten Schritt wurde PatientInnen mit atopischem Ekzem je eine Biopsie mit einem Durchmesser von 6 mm aus einem läsionalen Hautareal und aus einem optisch nicht atopisch veränderten Hautgebieten mit ähnlicher Lokalisation entnommen. Den gesunden ProbandInnen wurde jeweils eine Stanze an ähnlichen Lokalisationen wie den VergleichspatientInnen entnommen.

Allen StudienteilnehmerInnen wurde Blut abgenommen (jeweils ein Röhrchen EDTA und Serum) zur genetischen Analyse auf Mutationen im Filaggrin-Gen und zur Bestimmung des IgE Gehaltes im Blut (siehe Kapitel 3.3.3).

Der Patient p1 wurde aufgrund einer fehlerhaften Biotinylierung und nicht erfolgter TEWL-Messung und Corneometrie ausgeschlossen.

Die Entnahme und Verwendung der Hautbiopsien und des Blutes wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg (PV4724, PV4400) und des Ethikvotum A100/12 der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt.

**Tabelle 3.1: Darstellung der Studienteilnehmer/innen**

PatientInnen				ProbandInnen			
PatientIn	Alter	Geschlecht	SCORAD	Lokalisation der Entnahme	Geschlecht	Alter	Proband-In
p2	61	weiblich	38,7	Oberarm, Ellbogen dorsal	weiblich	61	g1
p3	22	weiblich	37,6	Oberarm, Ellbogen medial	weiblich	25	g2
p4	19	weiblich	43,6	Oberarm, Ellbogen medial	weiblich	19	g3
p5	25	weiblich	39,8	Oberarm, Ellbogen medial	weiblich	27	g4
p6	43	männlich	37,9	Oberschenkel Kniehöhe, medial	männlich	39	g5
p7	29	weiblich	15	Oberarm, Ellbogen medial	weiblich	30	g6
p8	48	männlich	66,3	Oberarm, Ellbogen medial	männlich	61	g7
p9	27	weiblich	53,1	Oberschenkel lateral	weiblich	27	g8
p10	21	männlich	53,1	Oberarm, Ellbogen medial	männlich	21	g9
p11	25	weiblich	15,6	Oberarm, Ellbogen medial	weiblich	25	g10

## Materialien und Methoden

p12	21	männlich	30,8	Oberarm, Ellbogen medial	männlich	21	g11
p13	27	weiblich	27,1	Oberarm, Ellbogen medial	weiblich	27	g12
p14	48	männlich	36,5	Oberarm, Ellbogen medial	männlich	48	g13

Darstellung aller teilnehmenden PatientInnen (p) und gesunden ProbandInnen (g) mit Geschlecht, Alter, Lokalisation der Probenentnahme und bei der PatientInnengruppe dem SCORAD, der wie in Kapitel 3.3.1. beschrieben, erhoben wurde. Der Patient p1 wurde aufgrund einer fehlerhaften Biotinylierung, nicht erfolgter TEWL-Messung und Corneometrie ausgeschlossen.

### 3.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

**Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien**

Deckgläser	24*60mm, Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofe
Eppendorfgefäße	Safe-Lock Tubes, 0,5-2,0 ml Eppendorf AG
Einmalspritzen	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, DE)
Konische Zentrifugenröhrchen	BD Falcon™ conical tubes, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes/ USA
Markierungsstift	Liquid Blocker Super PAP PEN, Daido Sangyo Co. Ltd., Tokyo/ Japan
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, 72 SuperFrost/Plus Objektträger Assistent®
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg

**Tabelle 3.3: Geräte**

Corneometer	Corneometer CM 825 der Firma Courage + Khazaka electronic GmbH
Einbettautomat	„Shandon Citadel 2000“ Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Feinwaage	Sartorius BP 211 D, Sartorius AG, Göttingen
Feuchtkammer	KreaTech Diagnostics, Amsterdam/ Niederlande
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot II Zeiss, Göttingen; Kamera: CCD-Kamera C4742-95 Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Software: Openlab 5.0.2 (Improvision, Coventry, UK)
Kühlplatte	medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Kühlschrank	5°C, Liebherr, Ochsenhausen,
Magnetrührer	Heidolph MR 3001, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Mikrowelle	Bosch, Stuttgart
Paraffin-Streckbad	GFL® Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Nr. 1052
pH-Meter	766 Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Rotationsmikrotom	Leica, Benzheim, RM 2165
Tewameter	Tewameter® TM 300 der Firma Courage + Khazaka electronic GmbH
Tischzentrifuge	Peglaa Deutschland, PerfectSpin 24 Plus
Vortexer	Bender und Hobein AG, Zürich/ Schweiz
Wärmeplatte	MTG Medical Technology Vertriebs GmbH, Bruckberg, HT 50

## Materialien und Methoden

Wärmeschrank	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach
--------------	------------------------------------

**Tabelle 3.4: Chemikalien**

CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid, Merck KGaA, Darmstadt
Dako Diluent	Dako REAL Antibody Diluent
DakoCytomation- Proteinblock	(serum free), DakoCytomation, Glostrup/ Dänemark
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA	Titriplex III; Ethylendiamintetraacetat Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99%, 96%, 80% und 70% vergällt mit MEK und Bitrex	CHEMSolute
EZ-Link Sulfon-NHS-LC Biotin Sulfonsuccinimidyl-6-(biotinamido) Hexanote	Thermo Scientific, Rockford, USA
Fluoromount-GTM	Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham / USA
Formafix 4%	Grimm med. Logistik
Trypsin	powder substance activity 1416 USP U/mg, Biochrom AG, Berlin
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen

### 3.2.1 Puffer und Lösungen

#### **Biotinylierungssubstanz:**

5 mg/ml EZ-Link Sulfon-NHS-LC Biotin Sulfonsuccinimidyl-6-(biotinamido) Hexanote in PBS mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> im weiteren Text als „Biotin-SH“ bezeichnet

#### **Nährmedium:**

DMEM 2% FBS Penicillin Streptomycin

#### **DAPI-Färbebad:**

DAPI-Stammlösung: DAPI-Pulver in Aqua dest. gelöst

Endkonzentration: 5 mg/ml<sup>[1][SEP]</sup>

Gebrauchslösung (1:5000): 40 µl DAPI-Stammlösung in 200 ml PBS gelöst

#### **10x PBS (phosphate buffered saline) pH 7,4:**

Stammlösung: 160,00 g NaCl, 4,00 g KCl<sup>[1][SEP]</sup> 23,20 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O<sup>[1][SEP]</sup> 2,00 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>[1][SEP]</sup> ad 2000 ml Aqua dest., pH 6,9

Gebrauchslösung: 1:10

#### **10x TBST (tris buffered saline) pH 7,6:**

Stammlösung: 121,10 g Tris-HCL, 175,32 g NaCl<sup>[1][SEP]</sup> wurden zu 1500 ml Aqua dest. hinzugefügt, dann Zugabe von 10,00 ml Tween 20<sup>[1][SEP]</sup> 113,30 ml HCl 25 %.

Die Lösung wurde auf pH 7,4 eingestellt mit 1 M und 10 M HCl bzw. 1 M NaOH und auf 2000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.<sup>[1][SEP]</sup>

Gebrauchslösung: 1:10



**20x TEC-Puffer (Tris-EDTA-Citrat) pH 7,8:**

Stammlösung: 5,00 g Trizma® base

10,00 g EDTA, 6,40 g Tri-Natriumcitrat wurden zu 950 ml Aqua dest. zugegeben, auf pH 7,8 mit 1 M und 10 M HCl bzw. 1 M NaOH eingestellt und auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Gebrauchslösung: 1:20

**Trypsin-Lösung:**

Stammlösung: 1 ml Tris-HCl 0,5 mol, 9 ml Aqua dest. 0,010 g Trypsin  
0,011 g CaCl<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O

Gebrauchslösung (0,001 %): 1 ml Tris-HCl 9 ml Aqua dest., daraus 100 µl  
verwerfen und durch 100 µl Stammlösung  
ersetzen

**3.2.2 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen**

**Tabelle 3.5: Primärantikörper**

Occludin	Endverdünnung: 1:250 mit PBS	polyclonal, goat anti-Occludin (N-19): sc-8145.; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas/USA
Claudin-1	Endverdünnung: 1:500 mit Dako Diluent	polyclonal, rabbit anti-Claudin 1, JAY.8rb Catalog No:51-9000 Invitrogen, Kalifornien/USA
Claudin-4	Endverdünnung: 1:1000 mit PBS	monoclonal, mouse anti-Claudin 4, Clone 3E2C1, Catalog No: 18734; Invitrogen, Kalifornien/USA

**Tabelle 3.6: Immunglobuline für die Negativkontrollen**

Isotypkontrolle rabbit Immunglobulin Fraction Dako Cytomation	20 mg/ml	Endverdünnung: 1:40000
Isotypkontrolle goat normal goat IgG-Kontrolle RD System	1 mg/ml	Endverdünnung: 1:1250
Isotypkontrolle mouse Dako Cytomation	100 µg/l	Endverdünnung: 1:500

**Tabelle 3.7: Sekundärantikörper**

AlexaFluor® 488 nm, F(ab') <sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG, Molecular Probes Inc., Eugene/Oregon/USA	Endverdünnung: 1:600
AlexaFluor® 488 nm, F(ab') <sub>2</sub> fragment of goat anti-rabbit IgG, Molecular Probes Inc., Eugene/Oregon/USA	Endverdünnung: 1:600
Bethyl 488 nm, F(ab') <sub>2</sub> fragment of donkey anti-goat, Bethyl Laboratories, Montgomery/Texas/USA	Endverdünnung: 1:400
TexasRed Conjugated Streptavidin gegen Biotin 596 nm, Rockland/Maine/USA	Endverdünnung: 1:700

### 3.2.3 Software

Für die Errechnung des SCORADs wurde eine Anleitung in Form einer CD ROM der Firma Astellas Pharma GmbH verwendet.

## Materialien und Methoden

Openlab 5.0.2 (Improvision, Coventry, UK) wurde für das Fotografieren der immunhistologischen Färbung und Image-J (Version 2.0.0-rc-49/1.51d) für die Bildbearbeitung benutzt.

Für die statistische Auswertung der immunhistologischen Färbungen wurde die Software SPSS (Version 23) benutzt. Für das Schreiben, die Erstellung von Graphiken und weitere statistische Auswertungen des SCORADs, der TEWL- und der Corneometrie-Messungen wurden die Microsoft Office Programme MS Word und Excel ® 2011; Version 14.5.2 verwendet.

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Erhebung des SCORADs

Der SCORAD wurde vor Entnahme der Hautbiopsien von einem geschulten Untersucher erhoben. SCORAD ist ein Akronym für engl. **scoring atopic dermatitis**, eine Methode zur Quantifizierung und Qualifizierung von atopischer Dermatitis zu einem bestimmten Zeitpunkt. Per Fragebogen wurden sowohl objektive Symptome (welche durch eine geschulte UntersucherIn eingeschätzt wurden) als auch das subjektive Erleben der Erkrankten erfasst (Oranje, 2011; Schmitt et al., 2013). Die von atopischem Ekzem betroffene Körperoberfläche wurde in Prozent angegeben. Die Stärke oder Intensität der objektiven Symptome umfassten:

- trockene Haut
- Rötung
- Ödeme, Papeln
- Nässen/Krustenbildung
- Exkorationen
- Lichenifikationen

und wurden in vier Stufen mit Punkten von null (nicht vorhanden), eins (leicht), zwei (mittelstark) bis drei (sehr ausgeprägt) von der UntersucherIn eingeschätzt.

Außerdem beurteilten die PatientInnen ihre subjektiv wahrgenommenen Symptome:

- Pruritus
- Insomnolenz

der letzten drei Tage mit Hilfe von numerischen Skalen von null (keine Symptome vorhanden) bis zehn (stärkster Juckreiz/absolute Schlaflosigkeit).

## Materialien und Methoden

In dieser Arbeit wurde eine CD ROM der Firma Astellas Pharma GmbH für die Berechnung des SCORADs nach der Formel  $\frac{\text{betroffenen Körperfläche in Prozent}}{5} + \frac{7 \cdot \text{Intensität der Symptome}}{2} + \text{subjektive Symptome} = \text{SCORAD}$  verwendet.

### Beispielberechnung des SCORADs an Patient Nummer 8:

Datum: 09.12.15  
PatientInnenkürzel: 08  
Geburtsdatum: 08.10.1967

Ergebnisse:

**A. Prozent der befallenen Körperfläche:** 24 % (wurde durch die UntersucherIn anhand von Beispielbildern geschätzt)

**B. Intensität:** 13 Punkte ergaben sich additiv aus den Intensitätsangaben der folgenden Parameter:

-Rötung	2
-Ödem, Papeln	2
-Nässen, Krusten	2
-Exkoration	2
-Lichenifikation	2
-Trockenheit	3

**C. Subjektive Symptome:** 16 Punkte ergaben sich additiv aus den subjektiven Symptomen:

-Juckreiz	8
-Schlaflosigkeit	8

**Beurteilung:**  $\frac{24\%(A)}{5} + \frac{7 \cdot 13 (B)}{2} + 16 (C) = 66,3$  Punkte, dies entspricht einer **schweren AD**

### 3.3.2 Messung der Barrierefunktionsparameter

#### 3.3.2.1 Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) mittels Tewameter

Durch passive Diffusion oder Schwitzen kann Feuchtigkeit über die Haut abgegeben werden (Moll, 2016). Die passive Diffusion wird als transepidermaler Wasserverlust (TEWL) bezeichnet und wurde mittels Tewameter bestimmt. In den 1970iger Jahren wurde diese nicht invasive Methode von Nilsson entwickelt und findet seitdem klinische Anwendung (Fahrenhold, 2019; Nilsson, 1977).

Das Tewameter besitzt eine belüftete zylinderförmige Messsonde, in der sich zwei übereinander angeordnete Feuchte- und Temperatursonden mit unterschiedlichem Abstand zur Hautoberfläche befinden (siehe Abb.3). So können Wasserdampfpartialdrücke ( $p$ ) an zwei unterschiedlichen Hautoberflächenabständen ( $x$ ) bestimmt werden. Bei bekannter Hautoberfläche ( $A$ ) und experimentell ermittelter Diffusionskonstante ( $D$ ) kann auf Grundlage des ersten Fick'schen Diffusionsgesetzes der TEWL berechnet werden:

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dp}{dx}$$

$A$  = Fläche (m<sup>2</sup>)

$m$  = transportiertes Wasser (g)

$t$  = Zeit (h)

$D$  = Diffusionskonstante [= 0.0877 g/m(h(mm Hg))]

$p$  = Wasserdampfdruck der Atmosphäre (mm Hg)

$x$  = Entfernung zwischen Hautoberfläche und Messpunkt (m)

$d$  = Delta

## Materialien und Methoden

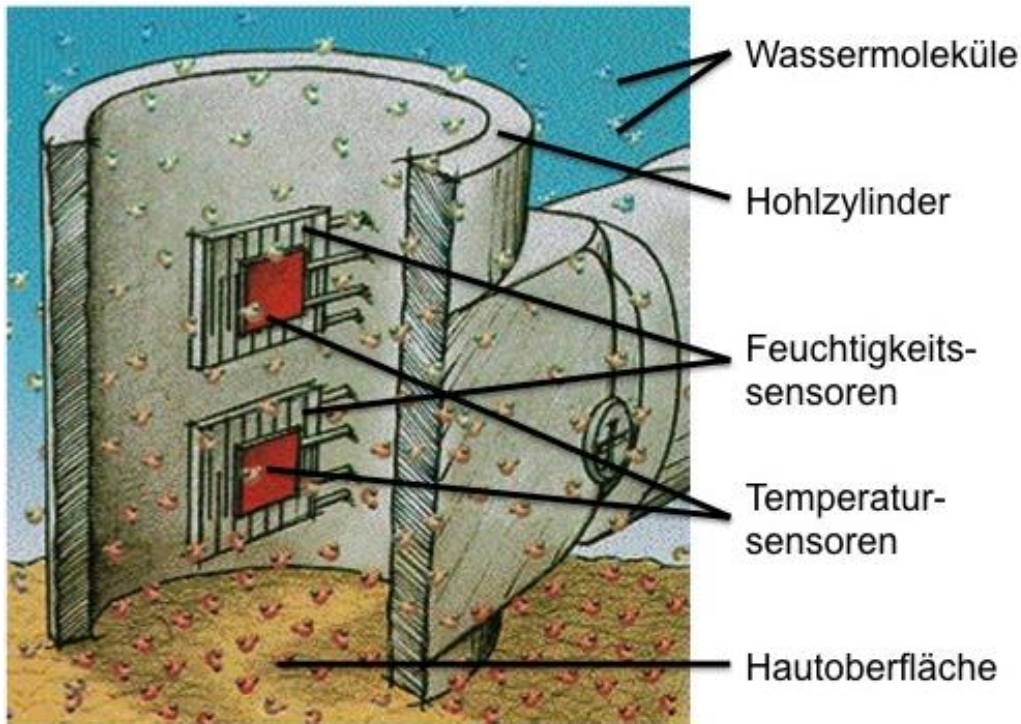
Nach Umstellung dieser Gleichung kann die Wasserdampfflussdichte ermittelt werden, die dem transepidermalen Wasserverlust (TEWL) entspricht:  $\frac{dm}{dt \cdot A} =$

$$- D \cdot \frac{dp}{dx}$$

Er wird als Wasserverlust pro Zeit und Fläche in g/ (h m<sup>2</sup>) angegeben. Diese Berechnung ist in vereinfachter Form angegeben, denn zusätzlich werden die Umgebungstemperatur und -Drücke mit in die Berechnung einbezogen.

Vor der Entnahme der Hautbiopsien wurde bei allen PatientInnen an läsionaler und nichtläsionaler Haut und bei ProbandInnen an gesunder Haut mittels Tewameter (siehe Abb. 3), nach Kalibrierung des Gerätes, nicht invasiv der TEWL bestimmt. Am Tag der Messung sollten die PatientInnen und ProbandInnen auf Eincremen der gesamten Haut verzichten und vor der Messung erfolgte keine sportliche Betätigung. Es wurde das Tewameter ® TM 300 der Firma Courage + Khazaka electronic GmbH verwendet.

Die Messung bestand aus 90 Einzelmessungen und wurden bei einer Umgebungstemperatur zwischen ca. 18 und 22 °C in einem ca. 20 m<sup>2</sup> großem Raum und nicht kontrollierter Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Aus den einzelnen Messungen wurde durch die Gerätesoftware ein Mittelwert errechnet und die Umgebungstemperatur mit einbezogen. Ein erhöhter TEWL deutet auf eine erhöhte Flüssigkeitsabgabe über die Haut hin und kann ein Hinweis für eine Barrierefunktionsstörung der Haut sein. TEWL-Messungen werden häufig in Studien verwendet (Berardesca & Maibach, 1990; Hon et al., 2018; C. H. Lee et al., 2006; Werner & Lindberg, 1985).



**Abbildung 3: Darstellung einer TEWA-Metersonde mit Feuchtigkeits- und Temperatursonde im Hohlzylinder**

(verändert nach Courage+Khazaka electronic GmbH; URL: <https://www.courage-khazaka.de/de/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/89-tewameter-d> (Stand: 24.04.2020))

### 3.3.2.2 Corneometrie

Vor der Entnahme der Hautbiopsien wurde durch eine nicht invasive Corneometrie die elektrische Kapazität der obersten verhornten Hautschichten bis zu einer Tiefe von ca. 40  $\mu\text{m}$  ermittelt, was den Feuchtigkeitsgehalt des Stratum corneum widerspiegelt (Rudolph & Kownatzki, 2004). Es wurde das Corneometer CM 825 der Firma Courage + Khazaka electronic GmbH verwendet.

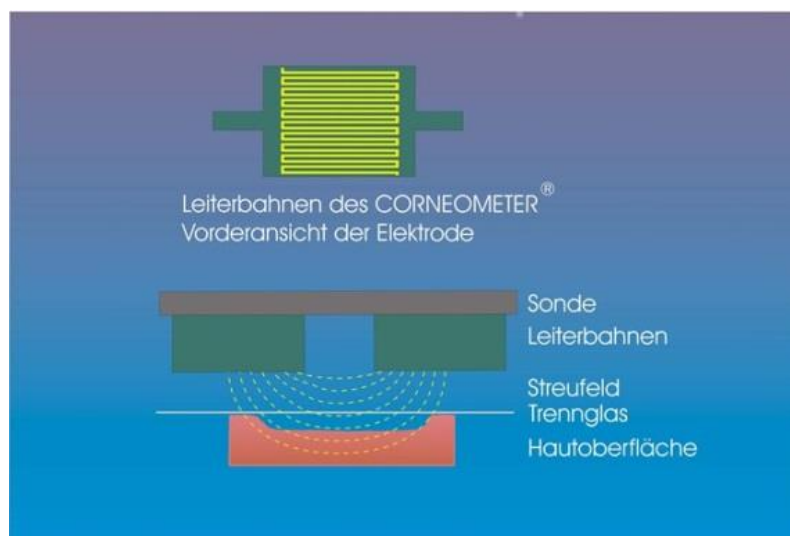
Bei der Corneometriemessung wird ein bogenförmiges elektrisches Streufeld zwischen zwei Elektroden in der Haut erzeugt (siehe Abbildung 4). Aufgrund der hohen Dielektrizitätskonstante von Wasser ( $\epsilon=80,1$  bei  $20^\circ\text{C}$  bzw.  $\epsilon=78$  bei  $32^\circ\text{C}$ ) im Vergleich zu anderen Stoffen der Haut z. B. Lipiden ( $\epsilon=\text{ca. } 5$ ) können Rückschlüsse auf die Hydratation gezogen werden. Je höher die Dielektrizitätskonstante der Haut, desto größer ist ihr Wassergehalt und damit verbunden eine veränderte elektrische Kapazität. Die Werte werden in



## Materialien und Methoden

Corneometer® Einheiten angegeben, die laut Herstellerinformation proportional zur Hautfeuchtigkeit sind. Laut Hersteller werden die Messwerte des Corneometers in willkürlichen Einheiten von 0 (kein Wasser) bis 120 (auf Wasser) angegeben (Firma Courage + Khazaka electronic GmbH).

Es erfolgten jeweils drei Einzelmessung an nichtläsionaler und läsionaler Haut und Haut von gesunden ProbandInnen im Abstand von jeweils 5 Sekunden. Aus den drei Messwerten wurde ein Mittelwert errechnet.



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Corneometers**

Die Sonde ist aus zwei Leiterbahnen (dunkelgrün) aufgebaut, zwischen denen ein elektrisches Streufeld erzeugt wird (Abbildung von Courage+Khazaka electronic GmbH; URL: <https://www.courage-khazaka.de/de/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/89-tewameter-d> (Stand: 24.04.2020)).

### **3.3.3 Blutuntersuchung zur Bestimmung des IgE-Spiegels und zur genetischen Untersuchung von Filaggrinmutationen**

Die Blutentnahme erfolgte bei den ProbandInnen und PatientInnen in der Ellenbeuge mit möglichst kurzer Stauungszeit. Allen ProbandInnen und PatientInnen wurden ein EDTA- und ein Serumröhrchen mit Blut zur genetischen Untersuchung von Filaggrin und zur Bestimmung des IgE-Spiegels abgenommen. Das Blutserum wurde ab zentrifugiert, das Serum ab pipettiert und in das Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Bestimmung des IgE-Spiegels geschickt. Aus dem EDTA-Blut wurde die DNA mit dem „automated chemagic Star“ aus peripherem EDTA-Blut

## Materialien und Methoden

(workstation protocol, Hamilton Company, Reno, NV) zur Bestimmung des Filaggrin-Status von AD PatientInnen und gesunden ProbandInnen isoliert. Die vier häufigsten europäischen Mutationen R501X, 2282del4, R2447X und S3247X wurden mit der „TaqMan allelic discrimination method“ zur allelischen Diskriminierung (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) nach den Standardverfahren auf der Grundlage der Reagenzien des Herstellers analysiert. Der Sondennachweis wurde mit dem Fast-Real-Time-PCR-System 7900HT von Applied Biosystems durchgeführt. Vorbereitung der Blutproben und ihre Analyse bezüglich des Filaggrin-Gen-Status wurden von Frau Dr. Elke Rodriguez an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.

### 3.3.4 Entnahme der Hautbiopsien

Alle Hautbiopsien wurden unter Lokalanästhesie mit 5 % Lidocain 5 ml halbsteril entnommen. Die entstandenen kreisförmigen Hautverletzungen mit einem Durchmesser von 6 mm wurden mit Nähten (Prolene 3.0) vernäht. Die Biopsien wurden in einer mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) befeuchteten Gaze in einer Petrischale bei 4°C für höchstens drei Stunden gelagert und bei Raumtemperatur ins Labor transportiert. Dort erfolgte in einem weiteren Schritt bei Raumtemperatur die Biotinylierung (siehe Kapitel 3.3.5).



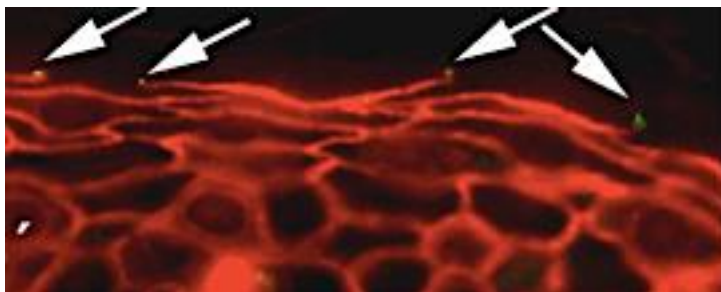
**Abbildung 5: Entnahme einer Stanzbiopsie**

Es wird die Entnahme einer Stanzbiopsie mit einem Durchmesser von 6 mm aus humaner Haut nach vorheriger Lokalanästhesie gezeigt.

### 3.3.5 Biotinylierung

Zur Bestimmung der innen- nach außen-Barriere der Epidermis wurde das Verfahren der Biotinylierung eingesetzt. Das Verfahren nutzt die parazelluläre Diffusion von innen nach außen innerhalb der Epidermis.

Die Biotinylierungsreagenz (EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin = Biotin-SH) diffundiert durch den Extrazellularraum. Das Biotin-SH bindet an extrazelluläre Proteine, dringt aber nicht in lebende Zellen ein. Wenn der Zell-Zellkontakt für Stoffe größer als 556 Dalton undurchlässig ist, kann Biotin-SH diese Barriere nicht überwinden. Es entstehen sogenannte „Biotin-SH-Stopp“, die im weiteren Text so bezeichnet werden. Der Nachweis von biotinylierten Proteinen erfolgte über eine TexasRed-Steptavidin-Färbung, die unter dem Fluoreszenzmikroskop rot erscheint. Es können Biotin-SH-Stopp erkannt werden an Stellen, wo keine Weiterdiffusion durch den Interzellularraum für Biotin-SH möglich ist (siehe Abb. 6, weiße Pfeile).



**Abbildung 6: Biotinylierung des interzellulären Raumes**

Die Biotinylierung des interzellulären Raumes ist durch Rotfärbung mit Streptavidin gekennzeichnet. Grün gefärbt ist Occludin, welches an den Biotin-SH-Stopp (weiße Pfeile) kolokalisiert ist.

Die Biotinylierung der entnommenen Hautstanzen erfolgte spätestens drei Stunden nach ihrer Entnahme. Seitlich unterhalb der Epidermis wurde mittels einer Insulinspritze 0,04 ml Biotinylierungsreagenz (5 mg in 1 ml PBS mit  $\text{CaCl}_2$ ) injiziert. Anschließend wurden die Stanzen für zwei Stunden auf mit Medium: DMEM/ FBS/ Penicillin/Streptomycin (1 ml) vollgesogener Gaze bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Über Nacht erfolgte die Fixation in Formafix 4 % bei Raumtemperatur. Nach Einbettung in Paraffin (siehe Kapitel 3.3.6) und

Schneiden der Hautstanzen (siehe Kapitel 3.3.7) in 5 µm dicke Schnitte wurden die Schnitte getrocknet und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, hydratisiert und anschließend in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur für 30 min mit Streptavidin TexasRed 1:700 in PBS (parallel zum Sekundärantikörper) inkubiert (siehe Kapitel 3.3.8). In DAPI-Lösung für eine Minute erfolgte die Kerngegenfärbung. Nach kurzem Spülen in PBS und Aqua dest. konnten die Schnitte feucht mit Fluoromount-G (Southern Biotech, USA) eingedeckelt werden.

### 3.3.6 Paraffineinbettung und Fixierung

Nach der Biotinylierung und Inkubation von 2 h wurden die Hautbiopsien mit Formafix 4 % bei Raumtemperatur über Nacht fixiert. Anschließend wurden sie im Kühlraum bei 4 °C gelagert. Vor der Einbettung in Paraffin wurden die zylinderförmigen Stanzen mit einem Skalpell halbiert.

Beide Hälften wurden in einer Einbettkassette im Einbettautomaten dehydratisiert und paraffiniert. Dabei wurden folgende Schritte innerhalb des Automaten durchgeführt:

- |                     |            |
|---------------------|------------|
| 1. H <sub>2</sub> O | für 30 min |
| 2. Ethanol 70 %     | für 30 min |
| 3. Ethanol 80 %     | für 20 min |
| 4. Ethanol 96 %     | für 20 min |
| 5. Ethanol 96 %     | für 20 min |
| 6. Ethanol 99 %     | für 20 min |
| 7. Ethanol 99 %     | für 30 min |
| 8. Xylol            | für 30 min |
| 9. Xylol            | für 30 min |
| 10. Xylol           | für 30 min |
| 11. Paraffin        | für 30 min |
| 12. Paraffin        | für 30 min |

Nach 24 h wurden die halbierten entwässerten und paraffinierten Stanzen in mit warmem Paraffin gefüllten Ausgießförmchen so ausgerichtet, dass alle

## Materialien und Methoden

Hautschichten in der Mitte der Stanze parallel angeschnitten werden konnten (Halbierungsschnittfläche nach oben). Die beschriftete Einbettkassette wurde ins Paraffin gedrückt und das Paraffinblöckchen mit dem Präparat auf eine Kühlplatte zum Aushärten gelegt. Nach Festwerden des Paraffins wurden die Blöcke aus den Förmchen entnommen und die Ränder von überschüssigem Paraffin befreit.

### 3.3.7 Paraffinschnitte

Anschließend wurden die in Paraffin gebetteten Gewebeproben mit dem Rotationsmikrotom in 5 µm dicke Schnitte geschnitten, im warmen Wasserbad „gestreckt“ und auf Objektträger überführt.

Im ersten Schritt wurden die in Paraffinblöcke eingebetteten Proben auf der Kühlplatte auf – 7 °C bis - 8 °C gekühlt. Nach Einspannen und Justierung des Blockes im Mikrotom wurde bei Erreichen der Schnittebene der Block erneut auf der Kühlplatte gekühlt. Beim nächsten Schnitt wurden dann 5 µm dicke Gewebeschnitte mittels Pinsel ins Kaltwasserbad überführt und dort voneinander getrennt und geglättet oder mussten mit einem Pinsel ausgerollt werden. Mit einem unbeschichteten Objektträger konnten nun die einzelnen Schnitte ins 40-45°C warme Streckbad überführt werden und hier für 10 bis 20 Sekunden geglättet werden, bis das Präparat faltenfrei war. Nun konnten die Schnitte mit einem Objektträger aufgenommen und zum Trocknen fast senkrecht aufgestellt werden. Falls notwendig, konnten Wasserblasen mit Filterpapier entfernt werden. Nach einigen Minuten wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für 30 min auf eine Wärmeplatte gelegt, um komplett auszutrocknen. Nach dieser Zeit konnten die Schnitte weiter bei Raumtemperatur nachtrocknen.

### 3.3.8 Immunhistologische Färbung

Vor Beginn der eigentlichen Färbung wurden die Schnitte auf den Objektträgern in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und hydratisiert:

1. Xylol für 10 min
2. Xylol für 10 min

## Materialien und Methoden

3. Xylol	für 10 min
4. Ethanol 99 %	für 1 min
5. Ethanol 99 %	für 5 min
6. Ethanol 96 %	kurz geschwenkt
7. Ethanol 80 %	kurz geschwenkt
8. Ethanol 70 %	kurz geschwenkt
9. <i>A. dest.</i>	für 5 min

Zum Freilegen der Epitope wurden die Schnitte in TEC-Puffer, der mit Aqua dest. 1:20 verdünnt war, bei 360 W in der Mikrowelle zweimal für 10 min gekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte mit TBST gespült und für 10 min bei 37 °C mit 0,001 % Trypsin behandelt, um durch Enzymeinwirkung die Epitope freizulegen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde der Proteinblocker DAKO mit einer Inkubationszeit von 30 min nach zweimaligem Abwaschen mit TBST (jeweils drei Minuten) auf die Schnitte appliziert. Der erste Antikörper (Verdünnungen siehe Kapitel 3.2.2; Tabelle 3.5) wurde zunächst mit 2000 g für 15 min ab zentrifugiert, der Überstand auf die Schnitte gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit TBST für drei Minuten wurde anschließend der Überstand des ab zentrifugierten Sekundärantikörpers (Verdünnungen siehe Kapitel 3.2.2; Tabelle 3.7) ebenfalls bei Raumtemperatur für 30 min appliziert. In diesem Schritt wurde auch die Biotinylierung sichtbar gemacht, indem zusätzlich Streptavidin TexasRed mit inkubiert wurde (siehe Kapitel 3.2.2; Tabelle 3.7). Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI (0,001 mg/ml in PBS) für eine Minute gefärbt, zuvor einmaliges Waschen in PBS für 5 Minuten und danach Spülen mit PBS (zweimal 5 Minuten) und Aqua dest. für drei Minuten. Dann konnten die Schnitte feucht mit Fluoromont G und Deckgläschen ein gedeckelt werden.

### **3.3.9 Mikroskopieren und Fotografieren**

#### **3.3.9.1 Auswertung der immunhistologischen Färbung**

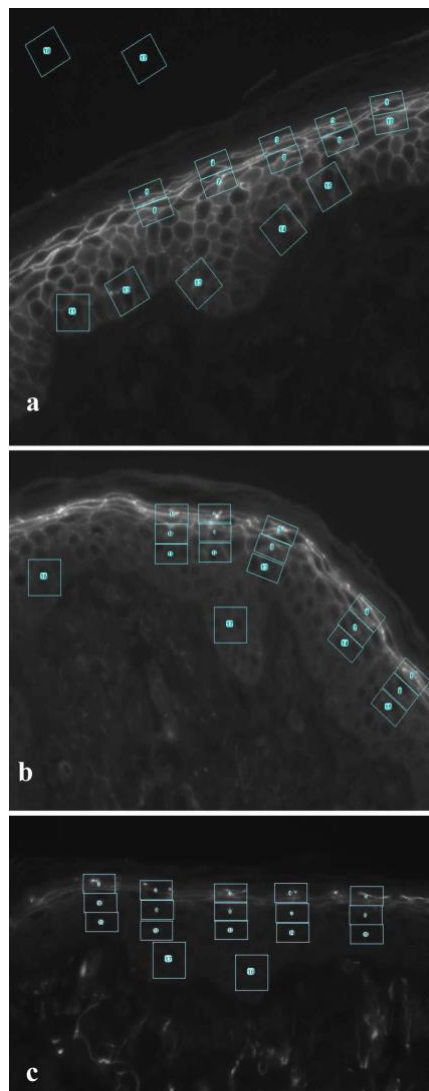
Für die quantitative Bewertung und Dokumentation der immunhistologischen Färbungen wurden ein Axiophot II Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland)

## Materialien und Methoden

und die Software Openlab 5.0.2 (Improvision, Coventry, UK) verwendet. Alle Färbungen aus einer Reihe von Proben wurden mit den gleichen Einstellungen aufgenommen. Es wurden stets repräsentative Bereiche fotografiert. Die quantitative Analyse der TJ-Proteinexpression wurde unter Verwendung von Image-J (Version 2.0.0-rc-49 / 1.51d) durchgeführt. Es wurde die relative Immunfluoreszenzintensität (IF) der spezifischen immunhistochemischen Färbungen von Claudin-1, 4 und Occludin aus drei verschiedenen Bereichen der Epidermis ermittelt (siehe Abb. 7).

Für die Bestimmung der relativen Immunfluoreszenzintensität (IF) von Claudin-1 wurde die Epidermis in das Stratum granulosum, das obere Stratum spinosum (oSSP) und das unteren Stratum spinosum/Stratum basale (uSSP/SB) eingeteilt. Es wurden 17 „regions of interest“ (ROI, von engl. *region of interest*) pro Bild bestimmt: fünf ROIs mit  $137 \mu\text{m}^2$  im SG (bestehend aus den Stratum granulosum - Zellschichten zwei und drei), fünf ROIs mit  $137 \mu\text{m}^2$  im oSSP, fünf ROIs mit  $320 \mu\text{m}^2$  im angrenzenden Bereich im Stratum basale (SB) und unterem Stratum spinosum (uSSP) und zwei ROIs  $320 \mu\text{m}^2$  für die Hintergrundsubtraktion (siehe Abbildung 7 a).

Bei Claudin-4 und Occludin wurden die relativen Immunfluoreszenzintensitäten (IF) ebenfalls in 17 ROIs pro Bild bestimmt: fünf ROIs mit  $137 \mu\text{m}^2$  im SG, fünf ROIs mit  $137 \mu\text{m}^2$  im oberen Stratum spinosum (oSSP) fünf ROIs mit  $137 \mu\text{m}^2$  im mittleren Stratum spinosum (mSSP) und zwei ROIs mit  $320 \mu\text{m}^2$  für die Hintergrundsubtraktion (siehe Abb. 7 b und c). Von jeder Hautprobe wurden mindestens drei Bilder von unterschiedlichen Orten in unterschiedlichen Schnitten ausgewertet und ein Mittelwert gebildet.



**Abbildung 7: Beispiele für die Lokalisation der ROIs (regions of interest)**

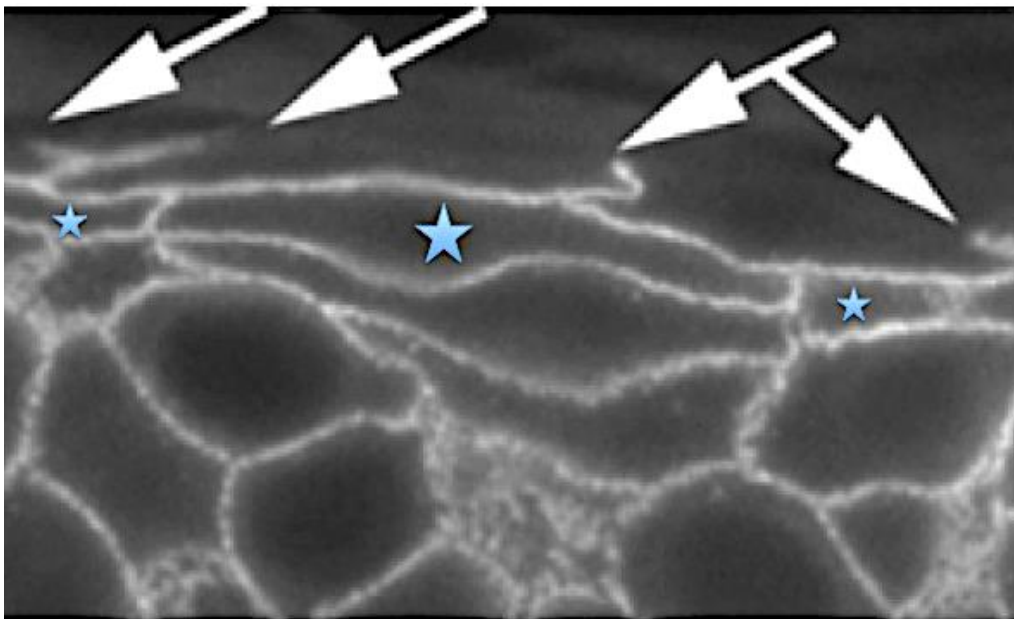
Beispiele für die Lokalisation der ROIs („regions of interest“) in der Immunfluoreszenzintensitätsmessung innerhalb der verschiedenen Epidermisschichten humaner Haut für die TJ Proteine Claudin-1 (a), Claudin-4 (b) und Occludin (c).

### **3.3.9.2 Auswertung der Biotinylierung**

Die Auswertung der Biotinylierung erfolgte durch Prof. Dr. Johanna Brandner. Es wurde das Axiophot II Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) verwendet und an repräsentativen Bereichen der Hautschnitte gesunder, läsionaler und nichtläsionaler Haut die Biotinylierung bewertet. Es wurde das Auftreten von Biotin-SH-Stopps (siehe Abb. 8, weiße Pfeile) im räumlichen Zusammenhang mit TJ Proteinen beobachtet. Biotin-SH-Stopps sind Abbrüche der mit Streptavidin TexasRed rotgefärbten Interzellularräume. Stoppte die Diffusion



von Biotin, konnte von einer Barriere in Form einer TJ ausgegangen werden. Durch das Anfärben von TJ Proteinen, in diesem Fall Occludin, Claudin-1 und 4 konnte eine Kolokalisation zwischen TJs und Biotin-SH-Stopps gezeigt werden. Die Biotin-SH-Stopps wurden auf die Anzahl der Zellen der darunterliegenden Schicht, die noch komplett mit Biotin „umfungen waren“ bezogen. Es wurden mindestens 3 Gesichtsfelder in zwei technischen Replikaten pro ProbandIn/PatientIn ausgewertet.



**Abbildung 8: Lokalisation von Biotin-SH-Stopps in gesunder Haut**

Die hellgraue Färbung des Biotins zeigt eine Biotinylierung des Extrazellulärraums. Die weißen Pfeile zeigen auf Biotin-SH-Stopps. Die blauen Sterne markieren Keratinozyten in der darunterliegenden Schicht, die komplett von Biotin-SH umgeben waren.

### 3.3.9.3 Statistische Auswertung der immunhistologischen Färbungen

Die Messergebnisse der relativen Immunfluoreszenzintensitäten (IF) der immunhistologischen Färbung wurden mittels der Software SPSS (Version 23) statistisch ausgewertet. Für die deskriptive Auswertung wurden Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Mit Varianzanalysen wurde geprüft, in welchen Fällen signifikante Unterschiede zwischen läsionalen, nichtläsionalen und Kontrollproben in verschiedenen Hautschichten vorlagen. Mit Hilfe des Mauchly-Tests auf Sphärizität wurde überprüft, ob die Voraussetzungen für die Varianzanalyse erfüllt waren. Es wurde mithilfe von paarweisen Post-Hoc-T-

## Materialien und Methoden

Tests ermittelt, zwischen welchen Gruppen (läsional, nichtläsional, Kontrollen) genau Unterschiede bestehen. Die p-Werte dieser Post-Hoc-Tests wurden für multiples Testen korrigiert (nach Sidak).

Bei Verletzung der Voraussetzungen für die Varianzanalyse (Test auf Sphärizität abgelehnt) wurde ein nichtparametrisches Verfahren (Friedman-Test) genutzt. Falls sich signifikante Unterschiede ergaben, wurde mit Wilcoxon-Tests geprüft, für welche paarweisen Vergleiche die Immunfluoreszenzintensitäten sich unterschieden. Auch hier wurde mithilfe des Sidak-Tests für multiples Testen korrigiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der SCORAD Erhebung

Von allen PatientInnen (n=13) (p) wurde ein SCORAD nach der Formel  $\frac{\text{betroffenen Körperfläche in Prozent}}{5} + \frac{7 \cdot \text{Intensität der Symptome}}{2} + \text{subjektive Symptome} =$  SCORAD erhoben. Der durchschnittliche SCORAD-Wert betrug 39,4 Punkte bei einer Spanne von 15,6 bis 66,3 Punkten und einem Median von 37,9 Punkten. Die subjektiven Symptome wurden im Durchschnitt mit 6,7 Punkten angegeben bei einem Median von 5,9 Punkten. Objektiv betrug die betroffene Körperoberfläche 6,4 % und im Median 3 %. Die Intensität der Symptome wurde mit 9 Punkten durchschnittlich erhoben, auch der Median lag bei 9 Punkten (siehe Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1: Ergebnisse der SCORAD Erhebung**

PatientIn	Alter	Geschlecht	SCORD in Punkten	Betroffene Körperoberfläche in Prozent	Subjektive Symptome in Punkten	Intensität der Symptome in Punkten
p2	61	weiblich	38,7	1	0	11
p3	22	weiblich	37,6	3	9	8
p4	19	weiblich	43,6	3	8	10
p5	25	weiblich	39,8	1	8,1	9
p6	43	männlich	37,9	4	9,1	8
p7	29	weiblich	15	1	3,9	8
p8	48	männlich	66,3	24	16	13

## Ergebnisse

p9	27	weiblich	53,1	7	4	14
p10	21	männlich	53,1	3	14	11
p11	25	weiblich	15,6	1	1,4	4
p12	21	männlich	30,8	29	4	6
p13	27	weiblich	27,1	1	5,9	6
p14	48	männlich	36,5	5	4	9

p: PatientIn 2-14 ; \* Der Patient p1 wurde aus der Studie aufgrund unzureichend erhobener Daten ausgeschlossen (siehe Material und Methoden Tabelle 3.1)

Die Schweregrade der atopischen Dermatitis wurden anhand des SCORADs in die drei Grade leicht (bis 25 Punkte), mittelschwer (25-60 Punkte) und schwer (über 60 Punkte) eingeteilt. Zwei PatientInnen wiesen in dieser Kohorte somit eine leichte AD auf, zehn PatientInnen waren mittelschwer betroffen und eine PatientIn hatte Symptome einer schweren AD (siehe Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2: Ergebnisse der SCORAD Erhebung nach Schweregrad**

<b>Anzahl der PatientInnen mit leichter AD</b> <b>Weniger als 25 Punkte</b>	<b>Anzahl der PatientInnen mit mittelschwere AD</b> <b>25-60 Punkte</b>	<b>Anzahl der PatientInnen mit schwere AD</b> <b>Über 60 Punkte</b>
2	10	1

## 4.2 Ergebnisse der nichtinvasiven Barrierefunktionsmessungen

### 4.2.1 Ergebnisse der corneometrischen Messung

In der corneometrischen Messung fand sich in der gesunden ProbandInnengruppe (n=13) (g) ein Mittelwert von 44,93 Corneometereinheiten® +/- 7,6 Standardabweichung bei einem Median von 38,6 Corneometereinheiten®. Bei PatientInnen (p) war an läsionalen, atopisch veränderten Bereichen (n=13) der Wert im Mittel auf 22,6 Corneometereinheiten® +/- 9,1 Standardabweichung und einem Median von 23,9 Corneometereinheiten® vermindert. An nichtläsionalen Hautstellen (n=13) betrug der relative Corneometerwert im Mittel 41,05 Corneometereinheiten® +/- 10,8 Standardabweichung bei einem Median von 45,77 Corneometereinheiten® (siehe Tabelle 4.3).

Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen gesunder Haut und läsionaler Haut (p-Wert:<0,001), sowie zwischen läsionaler und nichtläsionaler Haut (p-Wert:<0,001). Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich zwischen gesunder Haut und nichtläsionaler Haut.

**Tabelle 4.3: Ergebnisse der corneometrischen Messung**

ProbandIn	Corneometrie ProbandInnen	PatientIn	Corneometrie nichtläsional	Corneometrie läsional
g1	51,43 ± 2,3	p2	45,47 ± 1,7	6,77 ± 1,8
g2	36,30 ± 4,2	p3	46,77 ± 1,7	31,03 ± 1,5
g3	47,93 ± 2,1	p4	24,33 ± 0,7	19,00 ± 2,8
g4	54,40 ± 0,3	p5	66,10 ± 1,2	35,80 ± 6,3
g5	59,70 ± 2,2	p6	43,87 ± 2,8	37,10 ± 0,4

## Ergebnisse

g6	42,13 ± 0,3	p7	50,50 ± 3,6	27,50 ± 1,65	
g7	47,37 ± 2,4	p8	40,57 ± 0,4	11,93 ± 1,27	
g8	32,80 ± 1,5	p9	46,47 ± 0,4	23,90 ± 3,3	
g9	42,13 ± 0,4	p10	28,50 ± 2,1	13,33 ± 0,6	
g10	45,77 ± 2,2	p11	45,87 ± 0,8	16,39 ± 1,1	
g11	37,00 ± 1,3	p12	29,43 ± 0,2	28,07 ± 1,3	
g12	35,43 ± 0,9	p13	30,30 ± 2,1	27,70 ± 2,8	
g13	51,67 ± 0,7	p14	35,47 ± 2,0	15,77 ± 2,46	
	<b>44,93 ± 7,6</b>		<b>41,05 ± 10,8</b>	<b>22,64 ± 9,1</b>	<b>Mittel-wert</b>
	<b>38,60</b>		<b>45,77</b>	<b>23,9</b>	<b>Median</b>

g: gesunde/r ProbandIn; p: PatientIn 2-14 1-13; ± entspricht +/- Standardabweichung

### 4.2.2 Ergebnisse der Messung des transepidermalen Wasserverlusts

Der transepidermale Wasserverlust (TEWL) lag in der ProbandInnengruppe (g) im Mittel bei 22,32 g/ (h m<sup>2</sup>) +/- 21,34 Standardabweichung mit einem Median von 11,05 g/h m<sup>2</sup>. Und in der Gruppe der PatientInnen (p) zeigte sich ein Mittelwert von 12,84 g/ (h m<sup>2</sup>) +/- 3,78 Standardabweichung bei einem Median von 12,3 g/ (h m<sup>2</sup>) in nichtläsionaler Haut. In läsionaler Haut war der TEWL im Mittel deutlich erhöht bei 38,39 g/ (h m<sup>2</sup>) +/- 14,97 Standardabweichung und einem Median von 38,6 g/ (h m<sup>2</sup>) (siehe Tabelle 4.4).

Die TEWL-Messung ist sehr anfällig für Änderungen der Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit. Bei höheren Temperaturen steigt der TEWL aufgrund von Schwitzen an. Dies war bei drei Messungen in der ProbandInnengruppe (g8, g9, g10) bei sommerlich erhöhten Temperaturen der Fall. Die Messwerte konnten mit Hilfe des Dean-Dixon-Test (Signifikanzniveau 5 %) als Ausreißer

## Ergebnisse

identifiziert werden und wurden in den weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Deshalb wurden die weiteren Berechnungen und Analysen mit einer geringeren ProbandInnenzahl (n=10) durchgeführt.

Nach Ausschluss der Ausreißer zeigte sich ein Mittelwert bei den ProbandInnen von 11,7 g/ (h m<sup>2</sup>) +/- 3,49 Standardabweichung und ein Median von 10,25 g/ (h m<sup>2</sup>) Mit diesen Werten der ProbandInnengruppe wurden die weiteren Berechnungen durchgeführt.

Es fanden sich signifikante Unterschiede im TEWL zwischen gesunder Haut und läsionaler Haut (p-Wert:<0,001) und zwischen läsionaler und nichtläsionaler Haut (p-Wert:<0,001). Keine signifikanten Unterschiede fanden sich zwischen gesunder Haut und nichtläsionaler Epidermis.

**Tabelle 4.4: Ergebnisse der TEWL Messung**

ProbandInnen	TEWL in g/ (h m <sup>2</sup> ) gesund	PatientInnen	TEWL in g/ (h m <sup>2</sup> ) nichtläsional	TEWL in g/ (h m <sup>2</sup> ) läsional
g1	9,8 ± 0,53	p2	8,20 ± 2,1	25,30 ± 3,25
g2	10,7 ± 1,18	p3	12,30 ± 1,30	38,60 ± 5,7
g3	18,5 ± 2,05	p4	20,50 ± 0,72	34,80 ± 4,6
g4	9,6 ± 1,28	p5	13,60 ± 0,93	57,00 ± 2,75
g5	7,8 ± 0,46	p6	8,90 ± 0,67	15,20 ± 2,92
g6	9,6 ± 0,76	p7	15,10 ± 1,13	47,30 ± 7,26
g7	11,5 ± 1,28	p8	13,20 ± 1,52	38,20 ± 2,5
g8*	38,2* ± 5,13	p9	6,60 ± 1,81	54,10 ± 4,75
g9*	54,3* ± 9,52	p10	11,40 ± 3,88	52,90 ± 7,27

## Ergebnisse

g10*	80,6* ± 33,11	p11	11,80 ± 1,23	18,60 ± 3,04	
g11	8,5 ± 4,48	p12	19,20 ± 2,75	40,80 ± 1,91	
g12	13,5 ± 1,03	p13	13,90 ± 2,77	59,50 ± 5,28	
g13	17,5 ± 0,89	p14	12,20 ± 075	16,80 ± 0,79	
	<b>22,32</b> ±21,34		<b>12,84 ± 3,78</b>	<b>38,39 ± 14,97</b>	<b>MW</b>
	<b>11,7 ± 3,49</b>				<b>MW ohne Ausreißer</b>
	<b>11,5</b>		<b>12,3</b>	<b>38,6</b>	<b>Median</b>
	<b>10,25</b>				<b>Median ohne Ausreißer</b>

p: PatientIn 2-14; g: gesunde/r ProbandIn 1-13; ± entspricht +/- Standardabweichung; MW: Mittelwert

\* Erhöhte Werte aufgrund von warmem Wetter. Nach dem statistischen Dean-Dixon-Test waren die drei Werte von g8, g9 und g10 Ausreißer und werden in den nachfolgenden Rechnungen ausgeschlossen.

### 4.3 Ergebnisse der Blutuntersuchung

#### 4.3.1 IgE-Werte

Der IgE-Spiegel im Blut von PatientInnen mit atopischem Ekzem war signifikant erhöht (p-Wert:< 0,05) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und lag im Mittel bei 823,45 kU/l +/- 982,7 Standardabweichung in der PatientInnengruppe und bei den ProbandInnen bei 123,92 kU/l +/- 146,3 Standardabweichung (siehe Tabelle 4.5). Die Streuung war besonders in der PatientInnengruppe stark ausgeprägt und lag zwischen 6,00 und 2960 kU/l. Der Median lag in der



## Ergebnisse

PatientInnengruppe bei 270 und in der ProbandInnengruppe bei 139 kU/l (siehe Tabelle 4.5).

### 4.3.2 Filaggrin

Das Filaggrin-Gen war in der PatientInnengruppe bei zwei PatientInnen heterozygot für die Mutation 2282del4 (PatientInnen Nummer 03 und 13) nachweisbar und in der Kontrollgruppe war Proband g11 ebenfalls heterozygot für 2282del4. Die Mutationen R501X, R2447X und S3247X fanden sich nicht. Bei den restlichen PatientInnen und ProbandInnen war der Wildtyp (WT) vorhanden. Statistisch war dieses Ergebnis aufgrund der niedrigen Zahl der Testpersonen nicht signifikant (siehe Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5: Ergebnisse der Bestimmung des IgE-Spiegels und Filaggrin-Gen-Mutationen (2282del4)**

ProbandInnen	ProbandInnen IgE in kU/l	Filaggrin-Gen	PatientInnen	PatientInnen IgE in kU/l	Filaggrin-Gen
g1	13	WT	p2	1440	WT
g2	154	WT	p3	513	heterozygot
g3	575	WT	p4	2960	WT
g4	163	WT	p5	48	WT
g5	8	WT	p6	6	WT
g6	40	WT	p7	245	WT
g7	162	WT	p8	2580	WT
g8	22	WT	p9	270	WT
g9	139	WT	p10	753	WT

## Ergebnisse

g10	11	WT	p11	12	WT
g11	152	heterozygot	p12	155	WT
g12	12	WT	p13	24	heterozygot
g13	160	WT	p14	1700	WT
	<b>123,92 ± 146,3</b>			<b>823,54 ± 982,7</b>	<b>MW</b>
	<b>139,00</b>			<b>270,00</b>	<b>Median</b>

p: PatientIn 2-14; g: gesunde/r ProbandIn 1-13; ± entspricht +/- Standardabweichung; WT: Wildtyp; MW: Mittelwert

### 4.4 Lokalisation von Tight-Junction-Proteinen

In der Immunfluoreszenzfärbung (IF) wurden das Auftreten der drei TJ Proteine Occludin, Claudin-1 und Claudin-4 in jeweils drei verschiedenen Schichten der Epidermis von gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut untersucht. Bei allen Färbungen wurden das Stratum granulosum (SG) und das obere Stratum spinosum (oSSP) beurteilt. Bei der IF von Claudin-1 wurde zusätzlich das Stratum basale/untere Stratum spinosum (SB/uSSP) und bei Claudin-4 und Occludin das mittlere Stratum spinosum (mSSP) untersucht.

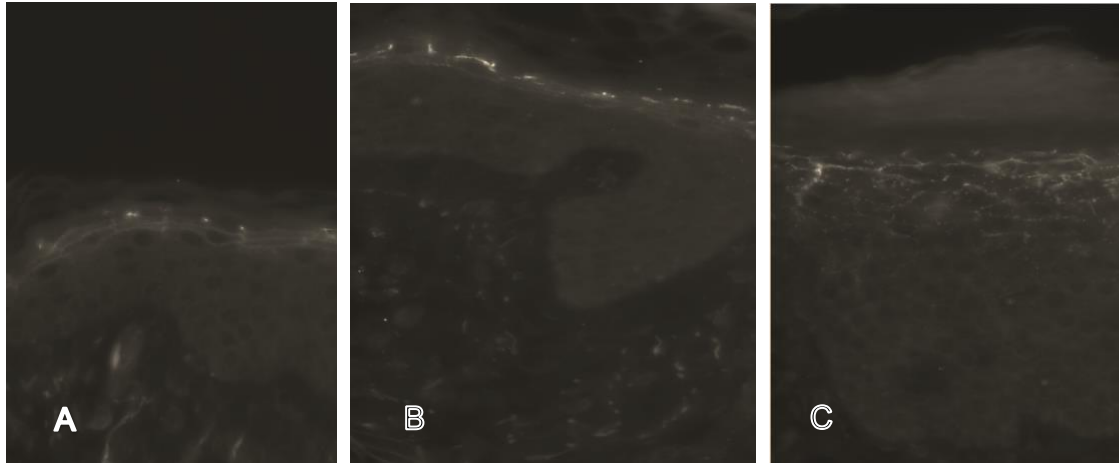
#### 4.4.1 Vorkommen und Verteilung von Occludin in läsionaler und nichtläsionaler Haut von AD PatientInnen und gesunder Haut

Das TJ Protein Occludin findet sich in gesunder Haut überwiegend im Stratum granulosum, wie bereits in den Studien von Brandner et al., 2002, Langbein et al., 2002 und Pummi et. al., 2001 gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 1.3.1). Dies konnte auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden.

In dieser Arbeit konnte Occludin außerdem in von atopischer Dermatitis veränderter Haut in signifikantem Ausmaß in läsionaler und nichtläsionaler Epidermis in tieferen Schichten (oSSP und mSSP) gefunden werden (siehe

## Ergebnisse

Abb. 9 und Abb. 10). In der Abb. 9 auf den Bildern B und C ist mit bloßem Auge ein verbreiteter Bereich des in den Fotos hell erscheinenden Occludinvorkommens zu erkennen. Durch die Immunfluoreszenzmessung konnte dies objektiviert werden (siehe Abb. 10).



**Abbildung 9: Occludinvorkommen in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut**

Linkes Bild: Occludinvorkommen in der Immunfluoreszenzintensitätsmessung (IF) in gesunder Haut (A) von Probandin 3, Mittleres Bild: Occludinvorkommen in nichtläsionaler Haut (B) und im rechten Bild in läsionaler Haut (C) von Patientin 4 in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Es zeigte sich in der Patientinnenhaut eine signifikante Erhöhung von Occludin in der IF und vermehrtes Auftreten in den tieferen Hautschichten in läsionaler Haut.

In der Fluoreszenzintensitätsmessung von Occludin in der Epidermis wurde insgesamt eine signifikante Erhöhung in PatientInnenhaut (n=13) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit gesunden Hautproben (n=13) festgestellt. Besonders deutlich war das vermehrte Auftreten von Occludin in den tieferen Hautschichten (oSSP und mSSP) von läsionaler Haut im Vergleich zu nichtläsionaler und gesunder Haut zu erkennen (siehe Abb. 10).

Occludin war im Stratum granulosum (SG) in nichtläsionaler Haut im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (p-Wert:< 0,05) (siehe Abb.10).

Im oberen Stratum granulosum (oSSP) war sowohl zwischen läsionalen Bereichen und gesunder Haut (p-Wert: <0,01), sowie zwischen läsionaler und nichtläsionaler Haut (p-Wert: <0,05) eine signifikante Erhöhung von Occludin in

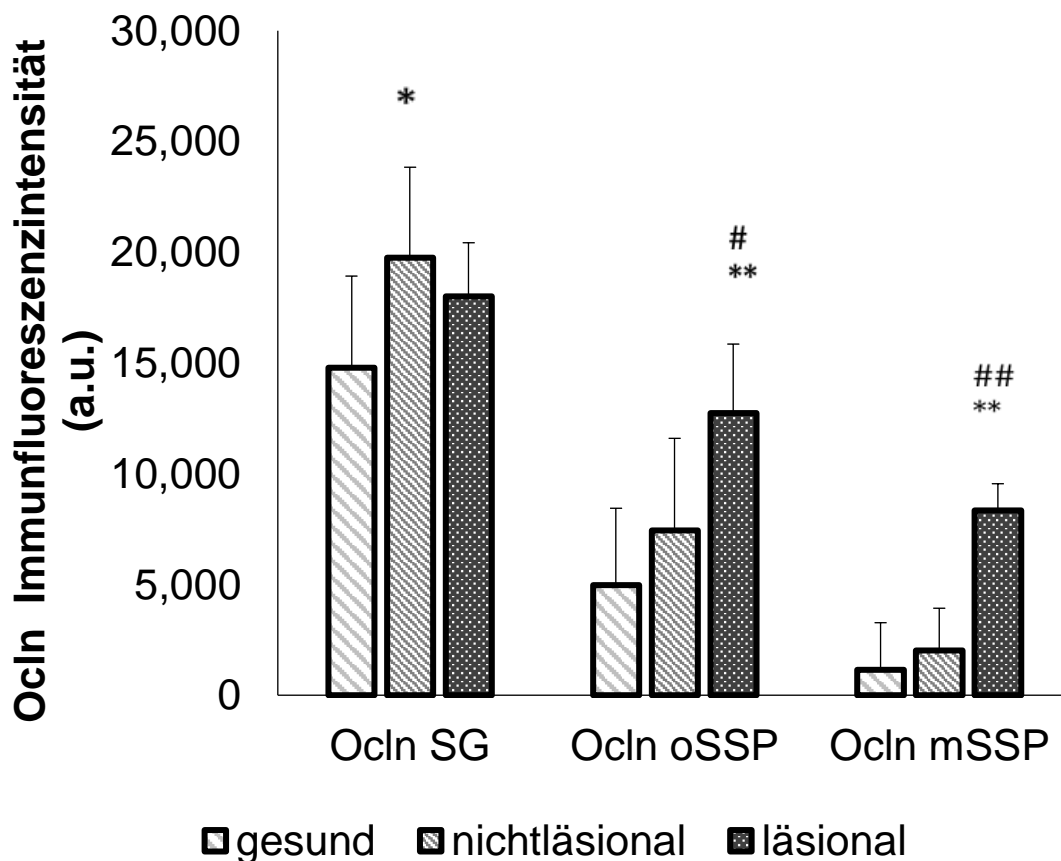
## Ergebnisse

läsionalen Bereichen festzustellen. Nicht signifikant war der Unterschied zwischen gesunder und nichtläsionaler Haut in der IF (siehe Abb.10).

Im mittleren Stratum spinosum (mSSP) war Occludin in der IF in läsionaler Haut signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (p-Wert: <0,01), sowie zur nichtläsionalen Haut (p-Wert: <0,01). Nicht signifikant war der Unterschied zwischen gesunder und nichtläsionaler Haut (siehe Abb. 10)

Die Immunfluoreszenzintensität (IF) von Occludin war insgesamt im Stratum granulosum am höchsten und nahm in den tieferen Epidermisschichten ab (siehe Abb. 10).

Insgesamt ließ sich ein signifikant vermehrtes Auftreten von Occludin in den tieferen Schichten der Epidermis in läsionaler Haut von AD PatientInnen im Vergleich zu gesunder ProbandInnen Haut beobachten (siehe Abb. 10).



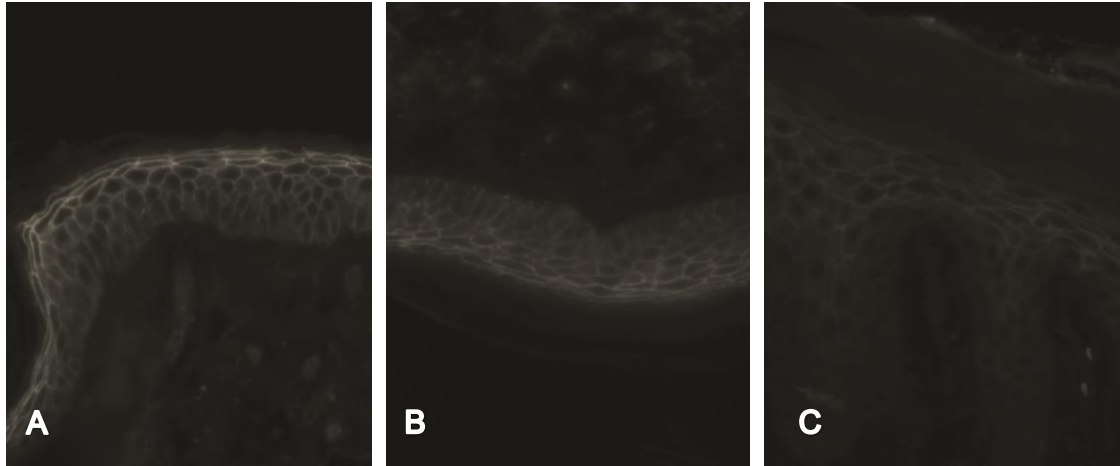
### **Abbildung 10: Occludin in verschiedenen Epidermisschichten in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut**

Messung der Immunfluoreszenzintensität (IF) von Occludin (Ocln) in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Epidermis. SG: *Stratum granulosum*; oSSP: *oberes Stratum spinosum*; mSSP: *mittleres Stratum spinosum*. n=13. a.u.: arbitrary units= relative Einheiten; \*: verglichen mit gesunder Haut; #: verglichen mit nichtläsionaler Haut. \*/#= p-Wert <0.05; \*\*/##= p-Wert <0.01; \*\*\*/###= p-Wert <0.001

#### **4.4.2 Vorkommen und Verteilung von Claudin-1 in läsionaler und nichtläsionaler Haut von AD PatientInnen und gesunder Haut**

Claudin-1 ist in gesunder Epidermis vorwiegend im Stratum granulosum lokalisiert und zunehmend vermindert im Stratum spinosum bis zum Stratum basale zu finden, wie auch diese Studie bestätigt. Eine signifikante Abnahme des Claudin-1 Vorkommens wurde bereits in läsionaler atopisch veränderter Epidermis im Vergleich zu gesunder Epidermis gezeigt (Batista et al., 2015; Gruber et al., 2015; Yuki et al., 2016), sowie eine Verminderung in nichtläsionaler Epidermis gegenüber gesunder Haut (De Benedetto et al., 2011) (siehe Kapitel 1.3.2).

In Abbildung 11 lässt sich ebenfalls eine Verminderung von Claudin-1 in nichtläsionaler Epidermis und verstärkt in läsionaler Epidermis erkennen und konnte durch die Immunfluoreszenzmessung bestätigt werden (siehe Abb. 12)



**Abbildung 11: Claudin-1-Vorkommen in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut**

Linkes Bild: Claudin-1 Vorkommen in gesunder Haut (A) von Probandin 1, Claudin-1 in nichtläsionaler Haut (B) im mittleren Bild und im rechten Bild läsionaler Haut (C) von Patientin 2 in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Es zeigte sich insgesamt in der läsionalen Patientinnenhaut eine signifikante Verminderung in der Immunfluoreszenzmessung (IF).

In der Immunfluoreszenzintensitätsmessung (IF) von Claudin-1 ließ sich eine deutliche Verminderung von Claudin-1 in läsionaler Epidermis ( $n=13$ ) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ( $n=13$ ) nachweisen (siehe Abb. 12).

Claudin-1 war im Stratum granulosum (SG) in läsionalen Hautbereichen deutlich vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p$ -Wert: $<0,001$ ). Auch zwischen nichtläsionaler und läsionaler Haut war eine signifikante Verminderung von Claudin-1 in läsionaler Epidermis nachweisbar ( $p$ -Wert: $<0,001$ ) und zwischen gesunder und nichtläsionaler Haut ( $p$ -Wert:  $<0,05$ ) (siehe Abb.12).

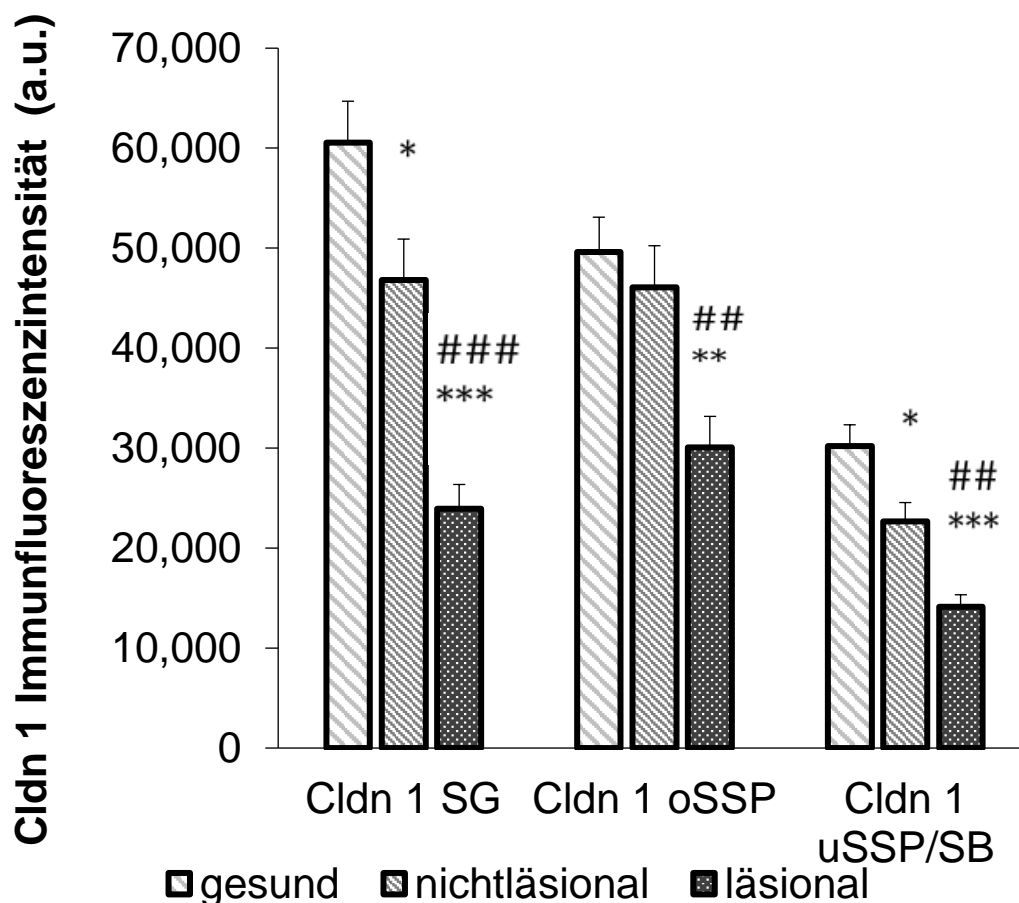
Im oberen Stratum spinosum (oSSP) war in läsionaler Epidermis Claudin-1 im Vergleich zu gesunder Haut ( $p$ -Wert:  $<0,05$ ) und zu nichtläsionaler Haut ( $p$ -Wert:  $<0,01$ ) vermindert. Nicht signifikant war der Verlust von Claudin-1 in nichtläsionaler im Vergleich zu gesunder Haut (siehe Abb.12).

Im unteren Stratum spinosum und Stratum basale (uSSP/SB) fanden sich zwischen allen drei Gruppen signifikante Unterschiede im Auftreten von

## Ergebnisse

Claudin-1 in der IF. Claudin-1 war in läSIONaler (p-Wert: <0,001) und nichtläSIONaler Haut (p-Wert: <0,05) im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert zu finden. Auch eine Herabregulation in nichtläSIONaler im Vergleich zu gesunder Haut (p-Wert: <0,05) war signifikant nachweisbar (siehe Abb.12).

Die IF von Claudin-1 nahm von den oberflächlichen Epidermisschichten zu tieferen Schichten hin in allen drei Versuchsgruppen ab. Insgesamt kam es bei PatientInnen mit AD zu einer stärkeren Verminderung von Claudin-1, sowohl sehr deutlich in läSIONaler aber auch in nichtläSIONaler Haut. Dies galt für alle drei untersuchten Epidermisschichten (siehe Abb.12).



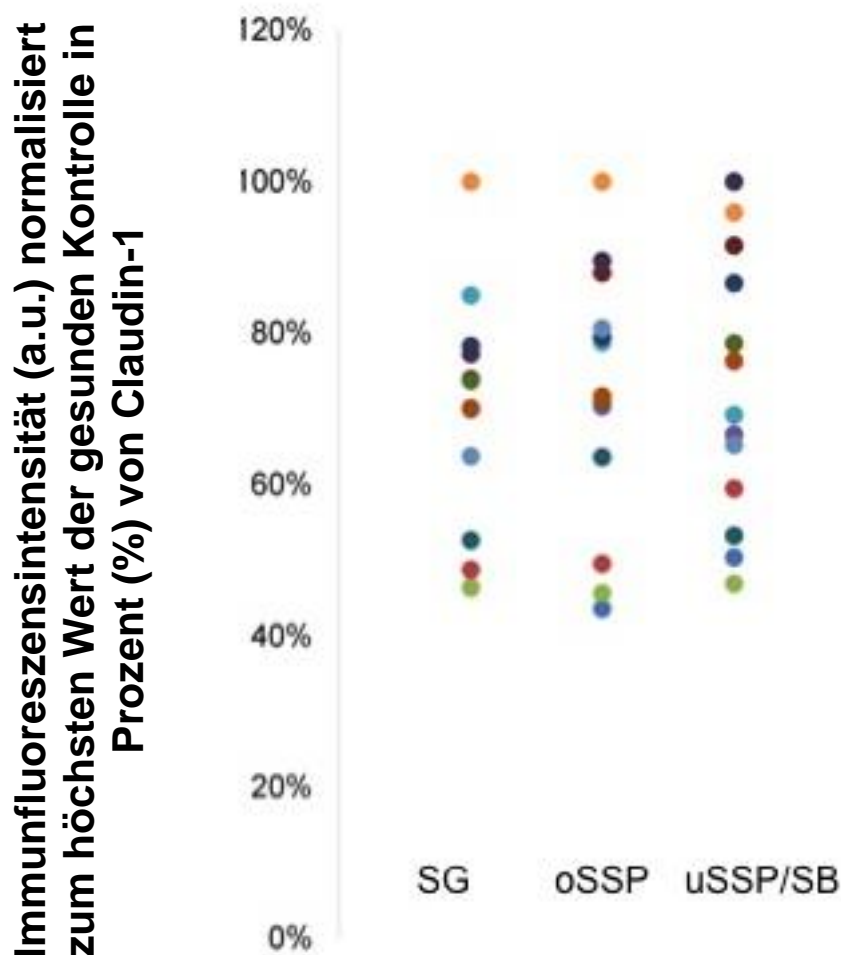
**Abbildung 12: Claudin-1 in verschiedenen Epidermisschichten in gesunder, nichtläSIONaler und läSIONaler Haut**

Messung der Immunfluoreszenzintensität (IF) von Claudin-1 (Cldn 1) in gesunder, nichtläSIONaler und läSIONaler Epidermis. SG: *Stratum granulosum*; oSSP: *oberes*

## Ergebnisse

*Stratum spinosum*; uSSP/SB: *unteres Stratum spinosum/Stratum basale*. n=13, a.u.: arbitrary units= relative Einheiten; \*: verglichen mit gesunder Haut; #: verglichen mit nichtläsionaler Haut. \*/#= p-Wert <0.05; \*\*/##= p-Wert <0.01; \*\*\*/###= p-Wert <0.001

In der relativen Auswertung, bei der die höchstgemessenen IF gesunder Kontrollen von Claudin-1 in der jeweiligen Schicht auf 100% gesetzt wurde, zeigte sich, dass bereits in gesunder Epidermis eine breite Streuung der IF von Claudin-1 zu beobachten war (siehe Abb.13). Im Stratum granulosum (SG) rangierten die Werte der IF von 46 % bis 100 % der maximalen IF, im oberen Stratum spinosum (oSSP) von 44 % bis 100 % und im unteren Stratum spinosum und Stratum basale (uSSP/SB) zwischen 47 % und 100 % (siehe Abb. 13).



**Abbildung 13: Verteilung der Immunfluoreszenzintensität von Claudin-1 in Prozent (%) in gesunder Epidermis**

Verteilung der Immunfluoreszenzintensität (IF) von Claudin-1 in Prozent (%) zum höchstgemessenen Wert gesunder Epidermis im Stratum granulosum (SG),



## Ergebnisse

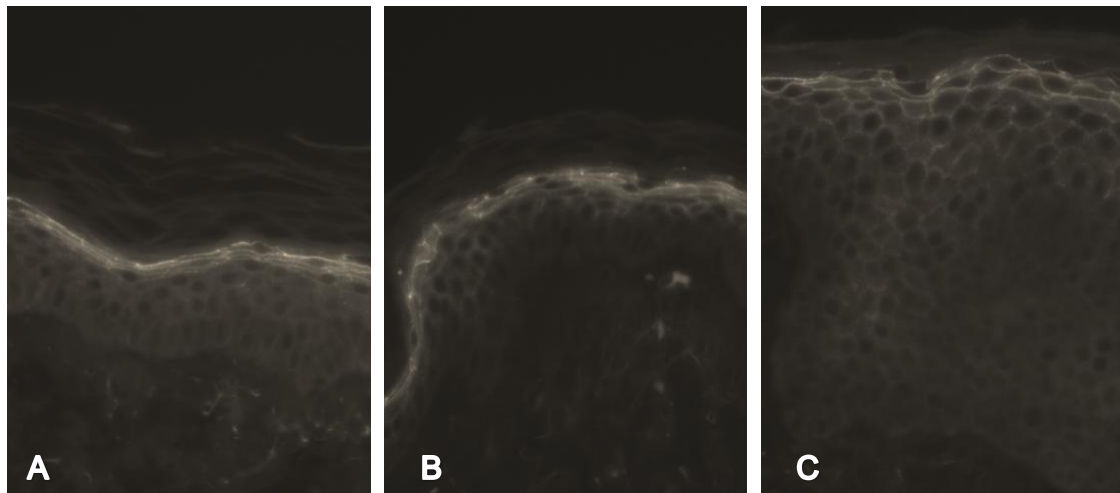
oberen Stratum spinosum (oSSP) und unteren Stratum spinosum/Stratum basale (uSSP/SB) n=13. Die farbliche Kennzeichnung der Punkte zeigt die Messergebnisse jeweils einer ProbandIn in den verschiedenen Epidermisschichten (SG, oSSP und uSSP/SB).

### **4.4.3 Vorkommen und Verteilung von Claudin-4 in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von AD PatientInnen und gesunder Haut**

Claudin-4 kommt in gesunder Epidermis vorwiegend im Stratum granulosum und oberen Stratum spinosum vor (Rachow et al., 2013) (Kapitel 1.3.2).

Bisher konnten keine signifikanten Unterschiede in der Immunfluoreszenzmessung (IF) von Claudin-4 in läsionaler Haut im Vergleich zu gesunder Haut gezeigt werden (Batista et al., 2015; Gruber et al., 2015; Yuki et al., 2016). Gruber et al. jedoch konnten eine signifikante Zunahme von Claudin-4 in nichtläsionaler Haut im Vergleich zu gesunder nachweisen, sowie eine Reduktion in läsionaler Haut im Vergleich zu nichtläsionaler (siehe Kapitel 1.4).

In dieser Studie konnte eine signifikante Umverteilung von Claudin-4 in läsionaler Haut im Vergleich zu nichtläsionaler und gesunder Haut innerhalb der Epidermis gezeigt werden. In Abbildung 14 erscheint das Stratum granulosum einer gesunden Probandin im Bild A deutlich heller und schmaler als im Bild C, welches läsionale Epidermis eines Menschen mit atopischer Dermatitis zeigt.



**Abbildung 14: Claudin-4-Vorkommen in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut**

Linkes Bild: Claudin-4 in gesunder Haut (A) von Probandin 10, im mittleren Bild: Claudin-4 in nichtläsionaler Haut (B) und läsionaler Haut (C) von Patientin 3 in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Es zeigte sich in der läsionalen Patientinnenhaut (C) eine signifikante Verminderung von Claudin-4 im Stratum granulosum und eine Erhöhung im mittleren Stratum spinosum in der (IF) von Claudin-4.

Auch in der Immunfluoreszenzintensität (IF) von Claudin-4 ließ sich in Abhängigkeit zur Hautschicht, sowohl eine Erhöhung als auch eine Verminderung in PatientInnenhaut im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten. Im Stratum granulosum (SG) kam es zu einer signifikanten Verminderung von Claudin-4 in läsionaler Haut im Vergleich zu nichtläsionaler Haut und einer nicht signifikanten Verminderung im Vergleich zu gesunder Haut, während im mittleren Stratum spinosum (mSSP) Claudin-4 in läsionaler Haut vermehrt im Vergleich zu gesunder und nichtläsionaler Haut auftrat (siehe Abb. 15).

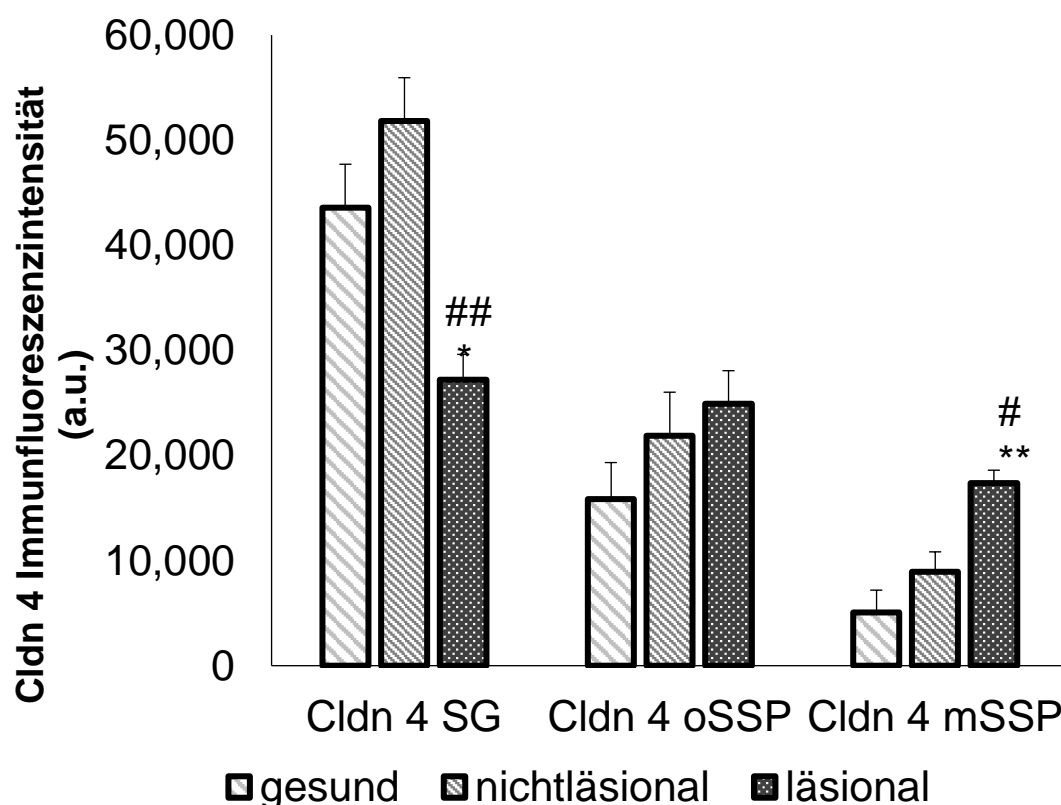
In der IF von Claudin-4 im Stratum granulosum (SG) zeigte sich eine signifikante Verminderung von Claudin-4 zwischen läsionaler und nichtläsionaler Haut (p-Wert: <0,001). Im Vergleich von nichtläsionaler und gesunder Haut (p-Wert: 0,379) fand sich kein signifikanter Unterschied im Stratum granulosum (siehe Abb. 15).

## Ergebnisse

Im oberen Stratum spinosum (oSSP) fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die p-Werte lagen weit vom Signifikanzniveau entfernt (siehe Abb. 15).

Claudin-4 war im mittleren Stratum spinosum in läSIONALER Haut signifikant erhöht im Vergleich zur gesunden (p-Wert: <0,01) und nichtläSIONALER Haut (p-Wert: <0,05) in der IF. Der Unterschied zwischen gesunder und nichtläSIONALER Haut war nicht signifikant (p-Wert: 0,412) (siehe Abb. 15).

In oberflächlichen Schichten (SG) trat Claudin-4 insgesamt in allen Versuchsgruppen vermehrt auf. In läSIONALER Haut war es hier aber deutlich erniedrigt und vermehrt in nichtläSIONALER Haut. Während im tiefer gelegenen mittlerem Stratum spinosum (mSSP) eine Heraufregulation in läSIONALER Haut im Vergleich zu gesunder Epidermis beobachtet wurde (siehe Abb. 15).



**Abbildung 15: Claudin-4 in verschiedenen Epidermisschichten in gesunder, nichtläSIONALER und läSIONALER Haut**

Messung der Immunfluoreszenzintensität (IF) von Claudin-4 (Cldn 4) in gesunder, nichtläSIONALER und läSIONALER Epidermis. SG: *Stratum granulosum*; oSSP: *oberes Stratum spinosum*; uSSP/SB: *unteres Stratum spinosum/ Stratum*

## Ergebnisse

*basale*. n=13. a.u.: arbitrary units= relative Einheiten; \*: verglichen mit gesunder Haut; #: verglichen mit nichtläsionaler Haut. \*/#= p-Wert < 0.05; \*\*/##= p-Wert < 0.01; \*\*\*/###= p-Wert < 0.001

**Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzintensitätsmessung**

	NL:G	L:NL	L:G
Occludin im Stratum granulosum (SG)	↑	n.s.	n.s.
Occludin im oberen Stratum spinosum (oSSP)	n.s.	↑	↑↑
Occludin im mittleren Stratum spinosum (mSSP)	n.s.	↑↑	↑↑
Claudin-1 im Stratum granulosum (SG)	↓	↓↓	↓↓↓
Claudin-1 im oberen Stratum spinosum (oSSP)	n.s.	↓↓	↓
Claudin-1 im Stratum basale/unteren Stratum spinosum (SB/uSSP)	↓	↓↓↓	↓↓↓
Claudin-4 im Stratum granulosum (SG)	n.s.	↓↓	↓
Claudin-4 im oberen Stratum spinosum (oSSP)	n.s.	n.s.	n.s.
Claudin-4 im mittleren Stratum spinosum (mSSP)	n.s.	↑	↑↑

Übersicht der Ergebnisse der Immunfluoreszenzintensitätsmessungen (IF) in der Epidermis im Vergleich von gesunder (**G**), nichtläsionaler (**NL**) und läsionaler Haut (**L**) in verschiedenen Schichten der Epidermis von Occludin, Claudin-1 und 4. ↑=Hochregulation; ↓=Herabregulation; ↑= p-Wert < 0.05; ↑↑= p-Wert < 0.01; ↑↑↑= p-Wert < 0.001; n.s.= nicht signifikant

### 4.5 Ergebnisse der Biotinylierung der Epidermis

Es wurden von 13 ProbandInnen und 13 PatientInnen Hautproben entnommen und wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, biotinyliert und gefärbt. Die quantitative immunfluoreszenzmikroskopische und statistische Auswertung wurde von Professorin Dr. Johanna Brandner und Dr. Sophia Bergmann durchgeführt.

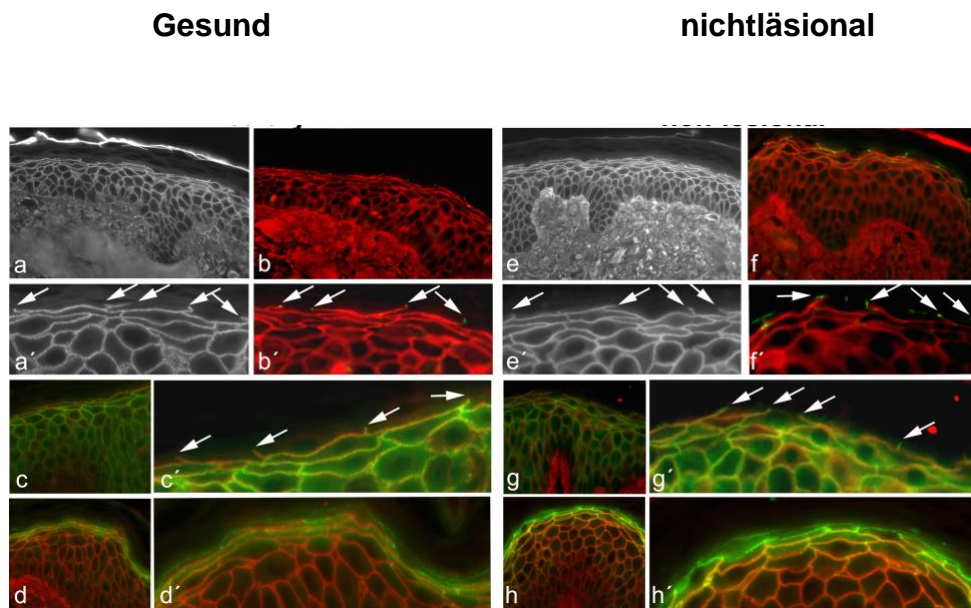
## Ergebnisse

In den qualitativen mikroskopischen Untersuchungen von gesunder und nichtläsionaler biotinylierter Epidermis zeigten sich eine deutliche Biotinylierung der Zellzwischenräume (siehe Abb. 16). Die Vergrößerungen des jeweiligen Epidermisabschnittes wurden in Abbildung 16 jeweils mit ´ gekennzeichnet. In der einfachen Färbung war der extrazelluläre Raum als hellgrauer Bereich zu erkennen (siehe a, a´ und e, e´). In der Vergrößerung sind sowohl in der gesunden (a´), als auch in der nichtläsionalen Epidermis (e´) deutliche Biotin-SH-Stopps zu erkennen (mit weißen Pfeilen markiert). In den Doppelimmunfärbungen (b, b´, c, c´, g, g´, d, d´, h, h´) wurde das Biotin-SH rot dargestellt und die TJ-Proteine Occludin, Claudin-1 und -4 mit grün eingefärbt (siehe Abb. 16).

In b, b´, f und f´ wurde Occludin grün gefärbt und ist im Stratum granulosum punktförmig zu erkennen. In den Vergrößerungen von gesunder (b´) und von nichtläsionaler Epidermis (f´) ist eine deutliche Kolo-kalisation von Occludin (grüne Punkte) an den Biotin-SH-Stopps (weiße Pfeile) vorhanden.

Claudin-1 konnte ebenfalls in der Doppelfärbung in gesunder und läsionaler Epidermis in grün dargestellt werden (siehe Abb. 16 c, c´ und g, g´). Die Verteilung des Claudin-1 erstreckte sich über das Stratum granulosum und das Stratum spinosum. Es besitzt im Vergleich zu Occludin eine deutlich breitere Verteilung innerhalb der Epidermis. Es zeigte sich ebenfalls eine Kolo-kalisation von Claudin-1 und den Biotin-SH-Stopps in gesunder und nichtläsionaler Epidermis (siehe weiße Pfeile in c´ und g´).

Das grün gefärbte Claudin-4 ist in der Abbildung 16 in d, d´, h und h´ vorwiegend im Stratum granulosum lokalisiert und liegt ebenfalls in enger Nachbarschaft zu den Biotin-SH-Stopps in gesunder und nichtläsionaler Epidermis.



**Abbildung 16: TJ-Barriere in gesunder Epidermis und nichtläsionaler Epidermis von AD PatientInnen**

(a, a', e, e') Beispiele für die Biotin-SH-TJ-Barriere-Untersuchung in gesunder Epidermis (a, a') und in nichtläsionaler Epidermis von AD PatientInnen (e, e'). (b, b', f, f') Doppelimmunfärbung von Biotin-SH (rot) und Occludin (grün), (c, c', g, g') Biotin-SH (rot) und Claudin-1 (grün) und (d, d', h, h') Biotin-SH und Claudin-4 (grün) in gesunder Epidermis und nichtläsionaler Epidermis von AD PatientInnen. (a', b', c', d', e', f', g', h') sind Vergrößerungen von (a-h). Die weißen Pfeile deuten auf Biotin-SH-Stopps.

In läsionaler Epidermis von PatientInnen mit AD zeigte sich ebenfalls eine Biotinylierung der Zellzwischenräume (siehe Abb. 17), jedoch waren weniger Biotin-SH-Stopps zu erkennen (siehe Abb. 17 a, a'), selbst in den Vergrößerungen (a' und a'') waren kaum deutliche Abbrüche der Biotinylierung auszumachen.

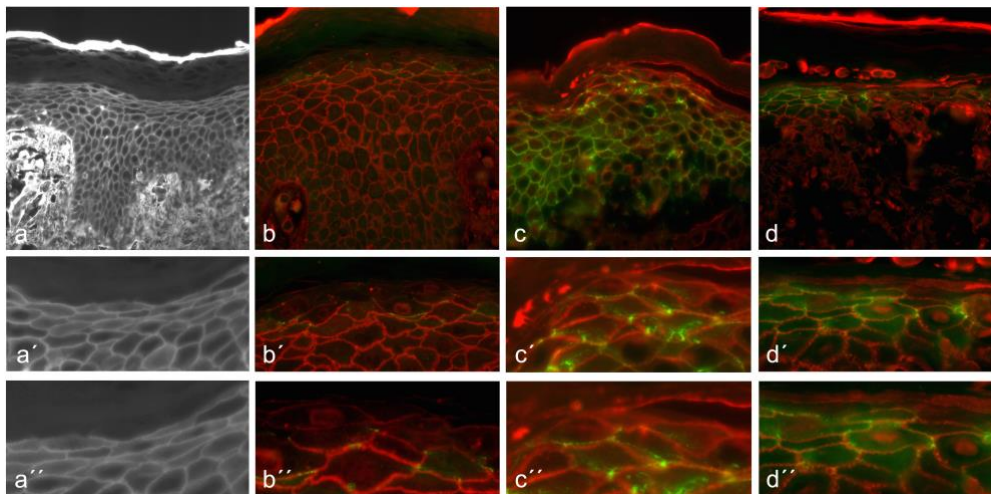
In der Doppelfärbung von Biotin-SH (rot) und Occludin (grün) zeigte sich im Stratum granulosum ein Vorkommen von Occludin in läsionaler Epidermis. Außerdem ein geringes Auftreten von Kolo-kalisationen von Biotin-SH-Stopps und Occludin. Die rote Biotinylierung trat proximal der grün gefärbten Occludine auf und schien teilweise durch die mit Occludin gebildeten TJ zu diffundieren (siehe Abb. 17 b, b', b'').

## Ergebnisse

Die grüne Färbung von Claudin-1 in läsionaler Epidermis zeigte insgesamt eine geringere Intensität als in gesunder und nichtläsionaler Epidermis und es bestand nur wenig Zusammenhang mit Biotin-SH-Stopps und Claudin-1 Vorkommen. Auch hier schien die Diffusion von Biotin-SH durch TJ mit Claudin-1 deutlich stärker aufzutreten als in gesunder und nichtläsionaler Epidermis (siehe Abb. 17 c, c', c'').

In der Doppelfärbung von Biotin-SH und Claudin-4 zeigte sich eine deutlich geringere Farbintensität des grünen Claudins in läsionaler Epidermis. Auch zeigte sich kein deutlicher grüner Saum im Stratum granulosum wie in gesunder und nichtläsionaler Epidermis (siehe Abb. 16 d, d' und h, h' und Abb. 17 d, d', d''). Das rötliche Biotin-SH trat auch hier proximal des Claudin-4s auf (siehe Abb. 17 d, d', d'').

### läsional

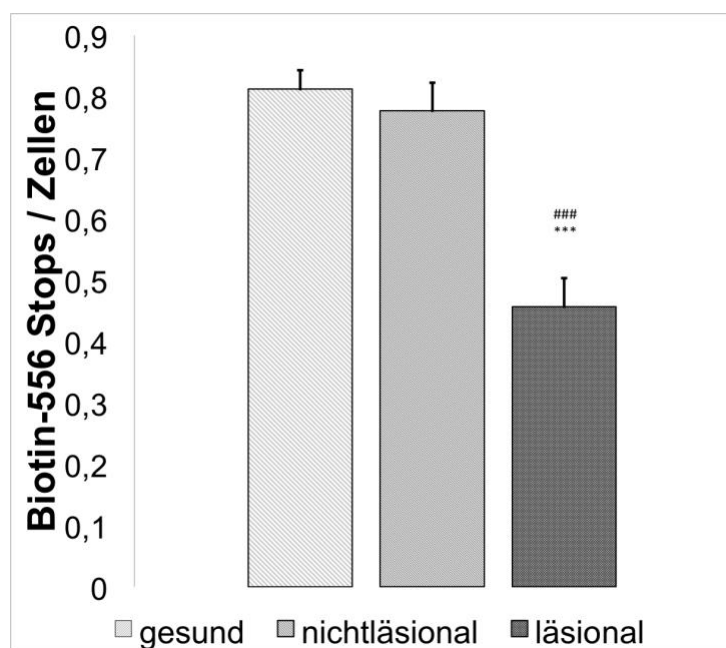


**Abbildung 17: TJ-Barriere in läsionaler Epidermis von AD PatientInnen**

(a, a', a'') Beispiele für die Biotin-SH-TJ-Barriere-Untersuchung in läsionaler Haut von AD PatientInnen. (b, b', b'') Doppelimunfärbung von Biotin-SH (rot) und Occludin (grün), (c, c', c'') von Biotin-SH (rot) und Claudin-1 (grün) und (d, d', d'') von Biotin-SH (rot) und Claudin-4 (grün) in läsionaler Haut von AD PatientInnen. (a', b', c', d) sind Vergrößerungen von (a-d) und (a'', b'', c'', d'') sind Vergrößerungen von (a'-d').

## Ergebnisse

In der quantitativen Auswertung zeigte sich zwischen gesunder und nichtläsionaler Haut kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl von Biotin-SH-Stopps pro Zellen (siehe Abb. 18). Die Zahl der Biotin-SH-Stopps pro Zellen lag bei gesunder Epidermis zwischen 0,62/Zellen und 0,95/Zellen und in nichtläsionaler Haut zwischen 0,67/Zellen und 0,89/Zellen. In läsionaler Epidermis zeigte sich eine deutlich signifikante Reduktion der Biotin-SH-Stopps (p-Wert: <0,001) im Vergleich zu gesunder und nichtläsionaler Epidermis (siehe Abb.18).



**Abbildung 18: Quantitative Evaluation von Biotin-SH-Stopps pro Zellen**

im Stratum granulosum von gesunder Epidermis (n=13) und nichtläsionaler und läsionaler Epidermis von AD PatientInnen (n=13). Es zeigte sich eine signifikante Verminderung von Biotin-SH-Stopps in läsionaler Haut verglichen mit nichtläsionaler und gesunder Haut. \*: verglichen mit gesunder Haut; #: verglichen mit nichtläsionaler Haut. \*/# = p-Wert < 0.05; \*\*/## = p-Wert < 0.01; \*\*\*/### = p-Wert < 0.001

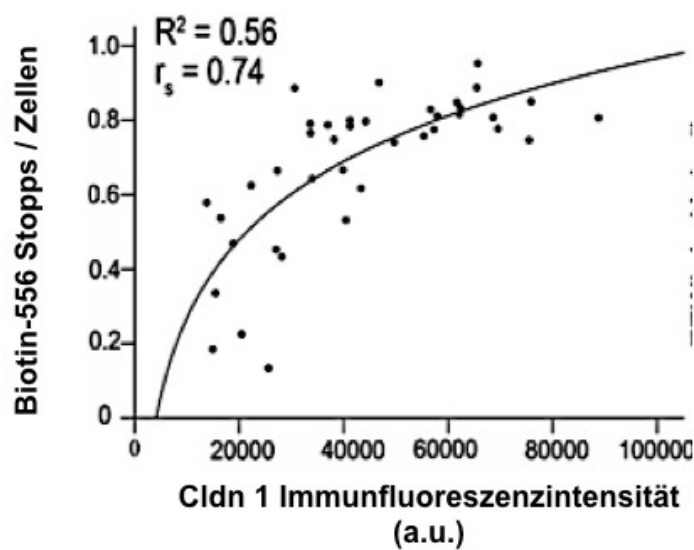
Bei einer Korrelation der Immunfluoreszenzintensitätsmessungen von Claudin-1 im Stratum granulosum in gesunder Haut, nichtläsionaler und läsionaler Haut von AD PatientInnen und den Biotin-SH-Stopps pro Zellen zeigte sich eine logarithmische Kurve ( $R^2 = 0.56$ , Spearman's Korrelationskoeffizient  $r_s = 0.74$ ,



## Ergebnisse

p-Wert: < 0.01) (siehe Abb. 19).

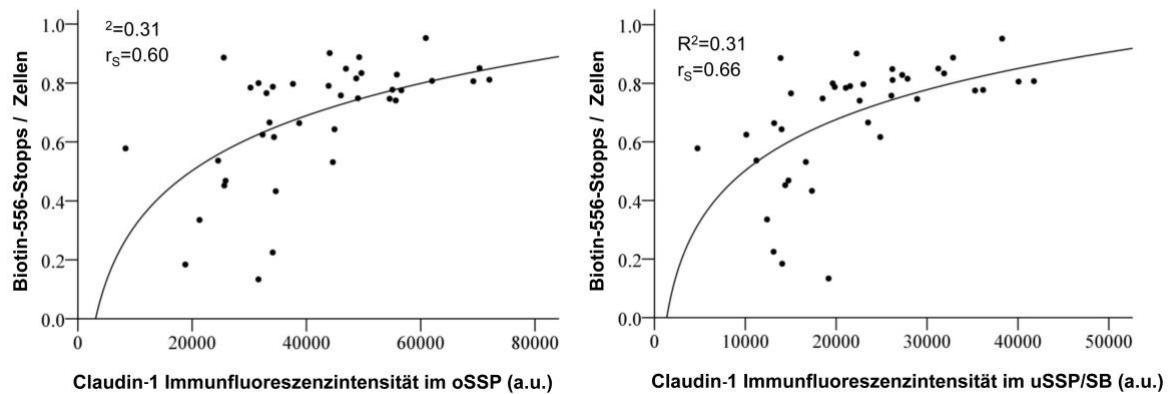
In den tieferliegenden Schichten, dem oberen Stratum spinosum (oSSP) und dem unteren Stratum spinosum/Stratum basale (uSSP/SB) fanden sich ebenfalls logarithmische Zusammenhänge, aber eine weniger starke Korrelation ( $R^2 = 0.31$ ,  $r_s = 0.60$  und  $0.66$ ; p-Wert: < 0.01) (siehe Abb. 20). Die Zahl der Biotin-SH-Stopps war zwischen ca. 90 000 und 40 000 a.u. der Claudin-1 Immunintensität (ca. 50% der Maximalintensität) relativ stabil hoch und sank unterhalb von 40 000 a.u. deutlich ab.



**Abbildung 19: Korrelation der Claudin-1-Immunfluoreszenzintensität in (a.u.) und Biotin-SH-Stopps/Zellen im Stratum granulosum (SG)**

Die einzelnen Punkte stellen alle Proben von gesunder ( $n=13$ ), läSIONALER ( $n=13$ ) und nichtläSIONALER ( $n=13$ ) Haut mit ihrer jeweiligen Immunfluoreszenzintensität und Biotin-SH-Stopps/Zellen dar ( $n=39$ ). Es zeigt sich ein Graph, der sich einer logarithmischen Funktion annähert (Bestimmungskoeffizient  $R^2 = 0,56$ ; Spearman-Korrelationskoeffizient  $r_s = 0,74$ ; p-Wert: <0,01).

## Ergebnisse



**Abbildung 20: Korrelation der Claudin-1-Immunfluoreszenzintensität in (a.u.) und Biotin-SH-Stoppss/Zellen im oberen Stratum granulosum (oSSP) und im unteren Stratum spinosum/Stratum basale (uSSP/SB)**

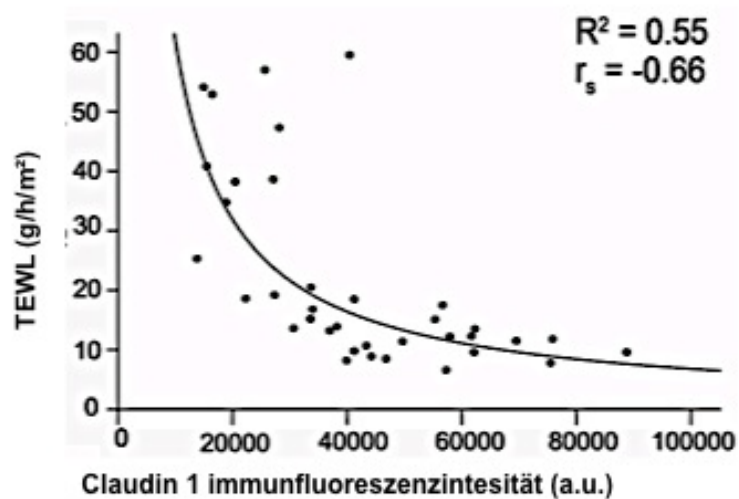
Die einzelnen Punkte stellen alle Proben von gesunder ( $n=13$ ), läsionaler ( $n=13$ ) und nichtläsionaler ( $n=13$ ) Haut mit ihrer jeweiligen Immunfluoreszenzintensität und Biotin-SH-Stoppss/Zellen dar ( $n=39$ ). Es zeigten sich Annäherungen an logarithmische Graphen. Für das oSSP und das uSSP/SB wurden Korrelationen mit niedrigeren  $R^2$ -Werten ( $R^2 = 0,31$ ,  $r_s = 0,60$  bzw.  $0,66$ ;  $p < 0,01$ ) als im Stratum granulosum (SG) (siehe Abb. 19) gefunden.

### 4.6 TEWL-Level und Claudin-1-Immunfluoreszenzintensitätslevel

In der TEWL-Messung gesunder und nichtläsionaler Haut fand sich kein signifikanter Unterschied. In läsionaler Haut war der TEWL signifikant erhöht im Vergleich zu nichtläsionaler und gesunder Haut (siehe Kapitel 3.3.2.1.).

Bei der Korrelation der Immunfluoreszenzintensität (IF) von Claudin-1 im Stratum granulosum (SG) und dem TEWL zeigte sich eine Potenzfunktion ( $R^2 = 0,55$ ,  $r_s = -0,66$ ). Der TEWL war bei einer Claudin-1 IF von ca. 90 000 bis ca. 40 000 a.u. (ca. 50% des Maximalwertes gesunder Haut) stabil niedrig, unterhalb dieses Wertes (40 000 a.u.) kam es zu einem exponentiellen Anstieg des Flüssigkeitsverlustes über die Haut (siehe Abb. 21).

## Ergebnisse



**Abbildung 21: Korrelation der Claudin-1-Immunfluoreszenzintensität in (a.u.) und dem TEWL im Stratum granulosum (SG) (n=36)**

Die einzelnen Punkte stellen alle Proben von gesunder (n=10), lässionaler (n=13) und nichtlässionaler (n=13) Haut mit ihrer jeweiligen Immunfluoreszenzintensität (IF) und TEWL-Werten dar (n=36). Es zeigte sich eine gute Anpassung an eine Potenzfunktion ( $R^2 = 0,55$ ,  $r_s = -0,66$ ). Der TEWL war über 40.000 a.u. der IF von Claudin-1 stabil.

## 5 Diskussion

Ein wesentliches Kennzeichen der atopischen Dermatitis (AD) sind pathologische, läsionale Veränderungen der Haut und ein Verlust der funktionellen Hautbarriere (Addor et al., 2012; Avena-Woods, 2017).

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der TJ als einen wichtigen Teil der Hautbarriere näher zu charakterisieren. Daher wurden in dieser Arbeit die drei TJ Proteine Occludin, Claudin-4 und Claudin-1, als auch die Hautbarrierefunktionen und andere relevante Parameter von AD PatientInnen und gesunden ProbandInnen untersucht.

Bisherige Erkenntnisse hinsichtlich des Auftretens von TJ-Proteinen in von AD veränderter Haut, insbesondere von Claudin-1 und der funktionellen Hautbarriere konnten durch diese vergleichende Untersuchung bestätigt und erweitert werden.

Eine Verminderung von Claudin-1 in der Epidermis korreliert mit den funktionellen Auswirkungen, die durch einen erhöhten transepidermalen Flüssigkeitsverlust (TEWL) und eine verminderte Zahl von Biotin-SH-Stopps, gekennzeichnet sind.

Claudin-1 besitzt vermutlich unterschiedliche Funktionen in den verschiedenen Schichten der Epidermis. Im Stratum granulosum (SG) ist Claudin-1 mit der Permeabilität und der Barrierefunktion assoziiert (Kirschner, Houdek, et al., 2010; Yoshida et al., 2013). Im oberen Stratum spinosum (oSSP) und im tiefer liegenden Bereich der Epidermis wird Claudin-1 vorwiegend eine Funktion in der epidermalen Differenzierung und Proliferation zugeschrieben (De Benedetto et al., 2011; Gruber et al., 2015). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die angenommene Hautbarrierefunktion von Claudin-1 im Stratum granulosum in humaner Haut.

Auch für die anderen untersuchten TJ-Proteine Occludin und Claudin-4 konnte verändertes Auftreten in von AD betroffener Epidermis gezeigt werden.

## 5.1 Charakterisierung der untersuchten norddeutschen Kohorte

In dieser Arbeit wurden die StudienteilnehmerInnen umfassend untersucht. Es wurde mittels SCORAD der Schweregrad der AD bestimmt, die nichtinvasiven Hautbarrierefunktionsparameter gemessen, sowie eine genetische Bestimmung von Filaggrin-Gen Mutationen und IgE-Konzentration des Blutes erhoben. Diese Charakterisierung sollte einer verbesserten statistischen Auswertung und Objektivierung der Ergebnisse, sowie ihrer Einordnung im Vergleich zu anderen Kohorten insbesondere von Gruber et al., 2015, De Benedetto et al., 2011, Yuki et al., 2016 und Batista et al. 2015 dienen.

Das Alter der untersuchten Personengruppen wurde bei Gruber et al. mit durchschnittlich 29 Jahren angegeben, bei Batista et al. von 23-69 Jahren, Yuki et al. 29-61 Jahren. In der Veröffentlichung von De Benedetto et al. findet sich keine Altersangabe. In der vorliegenden Arbeit weisen die StudienteilnehmerInnen eine ähnlich breite Altersverteilung von 19-61 Jahren auf.

Um ein umfassendes Gesamtbild der PatientInnen und ProbandInnen zu gewinnen, wurde zu Beginn der Untersuchungen der SCORAD (siehe Kapitel 3.3.1 und 4.1) erhoben. Es herrscht zurzeit keine Einigkeit über die Verwendung von Assessmentinstrumenten in Bezug auf den Schweregrad und das Ausmaß von AD. Es werden 28 verschiedene klinische Assessmentinstrumente für den Schweregrad der AD gezählt. Am häufigsten werden der SCORAD und der EASI (von engl.: *Eczema Area and Severity Index*) verwendet. Der EASI beschreibt objektiv die betroffene Region, während im SCORAD sowohl auf die Lokalisation und Aussehen des Ekzems, als auch auf das Allgemeinbefinden von PatientInnen eingegangen wird (Laird M1, 2017).

Für die Ziele dieser Arbeit war es wichtig, ein allgemeines Bild des Schweregrades der AD bei PatientInnen zu bestimmen. Eine genaue Dokumentation der Lokalisation der betroffenen Haut war hingegen nicht notwendig, da hier nicht der klinische Verlauf untersucht werden sollte. Deshalb wurde der SCORAD gewählt, der sowohl objektive als auch subjektive

## Diskussion

Symptome berücksichtigt und somit ein aktuelles Gesamtbild des Gesundheitszustandes der PatientInnen liefert.

In der Arbeit von Gruber et al., 2015 zeigte sich bei den 25 PatientInnen mit AD ein EASI von 11,76 Punkten als Mittelwert, was einer moderat oder mittelschwer ausgeprägten AD entspricht (Chopra et al., 2017). De Benedetto et al. gab für ihre PatientInnengruppe (n=11) und auch Yuki et al., 2016 (n=3) keinen EASI oder SCORAD an. Batista et al. beschrieb nach dem EASI-Score 10 PatientInnen mit leichter, 15 mit mittelschwerer und 8 PatientInnen mit schwerer AD.

In der vorliegenden Arbeit nahmen PatientInnen mit einem vergleichbaren Ausprägungsgrad einer AD teil, wie in den vier oben genannten Studien: Zwei PatientInnen mit leichter AD, 10 mit mittelschwerer und einer mit schwerer AD (siehe Kapitel 4.1).

Die PatientInnengruppe dieser Studie wies erwartungsgemäß eine signifikante Erhöhung des Serum-IgE-Spiegels auf, wie auch in Studien von Yoon et al., 2015 und Addor et al., 2012 gezeigt wurde. Auch in den Veröffentlichungen von Gruber et al. und De Benedetto et al. konnte ein signifikant erhöhter IgE-Spiegel bei PatientInnen mit AD nachgewiesen werden. Die geschädigte Hautbarriere führt vermutlich zu einer IgE-Sensibilisierung und erleichtert die Entzündungsreaktion in der atopischen Epidermis. Es wird ein Ungleichgewicht von Th2- zu Th1-Zytokinen vermutet, was zu Veränderungen der zellvermittelten Immunantworten führen und eine IgE-vermittelte Überempfindlichkeit fördern könnte (David Boothe et al., 2017).

In der untersuchten Gruppe waren zwei ProbandInnen und ein Patient heterozygote Träger der Filaggrin-Gen-Mutation 2282del4, einer der vier häufigsten Filaggrin-Gen-Mutationen in Europa. Hier konnten keine signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen werden, vermutlich aufgrund einer zu geringen getesteten Personenzahl. So kann in dieser Arbeit der genetische Einfluss dieser Mutationen auf AD weder widerlegt noch bestätigt werden.

## **5.2 Funktionelle Hautbarriereveränderungen bei atopischer Dermatitis**

Die Barrierefunktion wurde in vivo mittels TEWL und Corneometrie erhoben und spiegelt bekannte Ergebnisse aus der Literatur wider. Diese Methoden sind weit verbreitet in der Dermatologie und werden häufig zur Analyse der Hautbarriere verwendet (Addor et al., 2012; Rudolph & Kownatzki, 2004). In den Vergleichsstudien von Gruber et al. zeigten sich signifikant erhöhte TEWL-Werte in läsionaler Haut im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und zu nichtläsionaler Haut von AD PatientInnen (siehe Kapitel 4.2.2). In den anderen drei vergleichbaren Studien bezüglich der Untersuchungen von TJ von De Benedetto et al., Yuki et al. und Batista et al. wurden keine TEWL- und Corneometriemessungen durchgeführt.

Erstmalig wurde in dieser Arbeit die Barrierefunktion der Epidermis in nichtläsionaler und läsionaler Epidermis von PatientInnen mit AD und gesunder Epidermis von ProbandInnen mittels einer Biotinylierung untersucht. In der Untersuchung der innen-außen-Barriere der Epidermis mit Biotin-SH konnte keine signifikante Verminderung der Biotin-SH-Stopps in nichtläsionaler im Vergleich zu gesunder Epidermis festgestellt werden (siehe Abb. 18). Daraus lässt sich schließen, dass die TJ-Barriere in diesem frühen Stadium der AD noch intakt ist und die Beeinträchtigung der TJ- Barriere erst in einem späteren Krankheitsstadium in läsionalen Hautarealen auftritt (siehe Kapitel 4.5 und 5.4). In läsionaler Epidermis konnte eine signifikante Reduktion von Biotin-SH-Stopps nachgewiesen werden (siehe Abb. 18) (siehe Kapitel 4.5).

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Untersuchung der Hautbarriere bei AD PatientInnen zeigt sich eine funktionelle Störung in den läsionalen Hautbereichen durch einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust, erniedrigte Hydratation in der Corneometrie, sowie durch eine verminderte Anzahl von Biotin-SH-Stopps.

## **5.3 Verändertes Auftreten von TJ-Proteinen bei atopischer Dermatitis**

### **5.3.1 Vermehrtes Auftreten von Occludin in läsionaler und nichtläsionaler Epidermis**

In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass Occludin in der Immunfluoreszenzintensitätsmessung (IF) in tieferliegenden Schichten der Epidermis (oSSP und mSSP) in läsionaler Haut signifikant erhöht ist im Vergleich zu gesunder und nichtläsionaler Haut. Im Stratum granulosum (SG) konnte eine signifikante Hochregulation von Occludin in nichtläsionaler Epidermis im Vergleich zu gesunder Epidermis festgestellt werden (siehe Abb. 10). In Untersuchungen von Gruber et al. zeigte sich eine nicht signifikante Erhöhung von Occludin in der IF in nichtläsionaler humaner Epidermis und in muriner ekzematöser Haut. Außerdem wurde in einigen Proben in läsionaler humaner Epidermis eine etwas breitere Verteilung von Occludin beobachtet. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. De Benedetto et al. und Yuki et al. beschrieben in ihren Studien ein Auftreten von Occludin im oberen Stratum granulosum, konnten aber keine signifikanten Veränderungen in der IF nachweisen. In der Studie von Batista et al. wurde das TJ Protein Occludin nicht untersucht.

In gesunder Haut beschränkt sich das Vorkommen von Occludin vorwiegend auf die oberflächlichen Epidermisschichten, insbesondere auf das Stratum granulosum. Hier konnte gezeigt werden, dass in läsionaler Haut von AD PatientInnen besonders in den tieferen Schichten im oberen Stratum spinosum (oSSP) und im mittleren Stratum spinosum (mSSP) eine Erhöhung von Occludin vorhanden ist (siehe Abb. 10). Insgesamt lag aber von den oberflächlichen Epidermisschichten zu den tieferliegenden eine generelle Abnahme des Occludins vor (siehe Abb. 10). Dieses Ergebnis konnte durch eine feinere Einteilung der Epidermis in drei Schichten und durch die Untersuchungsmethode mittels IF erzielt werden. Denn wie von Gruber et al. postuliert, könnte bei verwendeten mRNA- oder Immunoblot-Analysen durch eine erhöhte Anzahl von untersuchten Zellschichten in läsionaler Epidermis ein



## Diskussion

Verdünnungseffekt aufgetreten sein und somit ein vermehrtes Occludin (und Claudin-4) nicht nachweisbar sein.

Womöglich kommt es bei läsionaler Epidermis zu einer Verschiebung der TJ-Bariere in tiefere Regionen und zu einer Kompensation von Claudin-1 und 4 durch Occludin (siehe Tabelle 5.1, 5.2, 5.3). Occludin besitzt Funktionen in der Zelldifferenzierung und Regeneration, sowie in der Wundheilung (Volksdorf et al., 2017). Die durch atopische Veränderungen geschädigte Haut unterliegt einer erhöhten Zellteilung und befindet sich in einer regenerativen Phase (Proksch et al., 2006). Daher könnte ein erhöhtes Vorkommen von Occludin in den besonders aktiven Bereichen der läsionalen Epidermis nahe der Basalzellschicht erklärbar sein. In nichtläsionaler Haut könnte das vermehrte Auftreten von Occludin als Folge von vermehrter Proliferation bei systemisch erhöhter Entzündungsaktivität angesehen werden.

**Tabelle 5.1: Vergleich der Occludinverteilung mit anderen Studien**

	In dieser Arbeit			Gruber et al., 2015			De Benedetto et al., 2011	Yuki et al., 2016	
	NL:G	L:NL	L:G	NL:G	L:NL	L:G	NL:G	L:G	NL:G
Occludin im SG	↑	n.s.	n.s.	n.s. (↑)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Occludin im oSSP	n.s.	↑	↑↑						
Occludin im mSSP	n.s.	↑↑	↑↑						

Ergebnisse der Immunfluoreszenzintensitätsmessungen von Occludin in Schichten der Epidermis im Vergleich von gesunder (G), nichtläsionaler (NL) und läsionaler Haut (L) in verschiedenen Schichten der Epidermis in verschiedenen Studien. SG: *Stratum granulosum*; oSSP: *oberes Stratum spinosum*; mSSP: *mittleres Stratum spinosum*. ↑=Hochregulation; ↓=Herabregulation; ↑= p-Wert < 0.05; ↑↑= p-Wert < 0.01; ↑↑↑= p-Wert < 0.001; n.s.= nicht signifikant (↑)= nicht signifikant erhöht

### **5.3.2 Vermindertes Auftreten von Claudin-4 in den oberen Schichten und vermehrtes Vorkommen in den unteren Schichten läsionaler Epidermis**

Claudin-4 war im Stratum granulosum signifikant vermindert in läsionaler Epidermis im Vergleich zu gesunder und nichtläsionaler Haut. Im tiefergelegenen mittleren Stratum spinosum wiederum war Claudin-4 in der läsionalen Epidermis signifikant vermehrt im Vergleich zu nichtläsionaler und gesunder Haut (siehe Tabelle 5.2).

Gruber et al., 2015 beschrieben eine signifikante Erhöhung in nichtläsionaler Haut im Vergleich zu gesunder Haut im Stratum granulosum von Claudin-4. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine nicht signifikante Erhöhung im Stratum granulosum zwischen nichtläsionaler und gesunder Epidermis nachgewiesen werden, sowie eine deutliche Zunahme von Claudin-4 in nichtläsionaler Haut im Vergleich zu läsionaler Epidermis in den tieferen Schichten (siehe Tabelle 5.2). Yuki et al., 2016 fanden eine nicht signifikante Verminderung zwischen nichtläsionaler und gesunder Haut im Westernblot und der IF. Batista et al. fanden in ihren Untersuchungen eine nicht signifikante Verminderung des Claudin-4s in läsionaler Epidermis im Vergleich zu gesunder Epidermis und eine positive Korrelation zwischen Claudin-1 und 4 (Daten sind im Paper nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sind mit der vorliegenden Arbeit nicht vollständig vergleichbar, da der hier gewählte methodische Ansatz verschieden war: Das Ergebnis dieser Arbeit konnte nur durch eine dreischichtige Einteilung der Epidermis erzielt werden.

Vermutlich kommt es insgesamt zu einer leichten Verminderung oder gleichbleibendem Auftreten von Claudin-4 in läsionaler Epidermis, bei einer Veränderung der Verteilung des TJ-Proteins Claudin-4 in der Epidermis.

Ein verminderter Claudin-4-Spiegel im Stratum granulosum in läsionaler Haut, könnte durch die Störung des Stratum corneums (durch z.B. Kratzen, Filaggrinmangel oder Lipidveränderungen) und durch ein verändertes Hautmikrobiom erklärt werden, da das Stratum granulosum näher am

## Diskussion

beeinträchtigt Stratum corneum liegt und weniger geschützt vor Umwelteinflüssen ist als das obere und mittlere Stratum spinosum (oSSP und mSSP). Das vermehrte Auftreten von Claudin-4 in den tiefen Epidermisschichten (mSSP) kann, wie schon bei Occludin vermutet, als Kompensationsmechanismus mit einem Verschieben der TJ-Barriere bei erniedrigtem Claudin-1-Spiegel in tiefere Schichten in Betracht gezogen werden. Eine weitere Vermutung ist, dass eine vermehrte Expression von Enolase-1, die bei AD vermehrt im Stratum corneum auftritt, für einen Abbau von TJ-Proteinen wie Claudin-4 und Occludin verantwortlich sein könnte (Tohgasaki et al., 2018).

**Tabelle 5.2: Vergleich der Claudin-4-Verteilung mit anderen Studien**

	In dieser Arbeit			Gruber et al., 2015			De Benedetto et al., 2011	Yuki et al., 2016		Batista et al., 2015
	NL:G	L:NL	L:G	NL:G	L:NL	L:G	NL:G	L:G	NL:G	L:G
Claudin-4 im SG	n.s.	↓↓↓	↓	↑↑	↓↓↓↓	n.s.	Wurde nicht untersucht	n.s.	n.s.	n.s.
Claudin-4 im oSSP	n.s.	n.s.	n.s.							
Claudin-4 im mSSP	n.s.	↑	↑↑							

Ergebnisse der Immunfluoreszenzintensitätsmessungen von Claudin-4 in Schichten der Epidermis im Vergleich von gesunder (G), nichtläsionaler (NL) und läsionaler Haut (L) in verschiedenen Schichten der Epidermis in verschiedenen Studien. SG: *Stratum granulosum*; oSSP: *oberes Stratum spinosum*; mSSP: *mittleres Stratum spinosum*. ↑=Hochregulation; ↓=Herabregulation; ↑= p-Wert < 0.05; ↑↑= p-Wert < 0.01; ↑↑↑= p-Wert < 0.001 n.s.= nicht signifikant

### **5.3.3 Vermindertes Auftreten von Claudin-1 in läsionaler Epidermis**

In der Immunfluoreszenzintensitätsmessung (IF) von Claudin-1 fiel eine deutliche Verminderung in läsionaler Haut im Vergleich zu gesunder und nichtläsionaler Haut in allen Hautschichten auf. Diese Verminderung von Claudin-1 zeigte sich auch in anderen Studien (siehe Tabelle 1.1 und Tabelle 5.3).

In vorangegangenen Studien fanden sich ähnliche Ergebnisse für Claudin-1 in der IF, wobei diese Arbeit in Bezug auf die Verteilung innerhalb der Epidermisschichten zu anderen Untersuchungen nicht direkt vergleichbar ist. So wurden bei Yuki et al., 2016 und Batista et al., 2015 keine Angaben zur Epidermisschicht in der IF gemacht, sondern von einer generellen Verminderung von Claudin-1 in läsionaler atopischer Haut berichtet.

De Benedetto et al., 2011 verglichen nichtläsionale Haut (n=11) mit gesunder Haut von ProbandInnen (n=12) in der IF und fanden eine Verminderung von Claudin-1 in nichtläsionaler im Vergleich zu gesunder Haut. Dies konnte auch in dieser Arbeit, sowohl im Stratum granulosum als auch für die tieferen Epidermisschichten im unteren Stratum spinosum und basale gezeigt werden. Läsionale Haut wurde in der Studie von de Benedetto et al. nicht untersucht.

Gruber et al. teilten die Epidermis in zwei Schichten, eine obere und eine untere Schicht und es wurden größere ROIs (320  $\mu\text{m}^2$ ) im Vergleich zur vorliegenden Arbeit verwendet. In oberen Epidermisschichten wurden signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und läsionaler Haut gefunden. Beim Vergleich läsionaler zu nichtläsionaler Haut wurden bei Gruber et al., anders als in dieser Arbeit, keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Yuki et al., 2016 zeigte eine Verminderung von Claudin-1 zwischen läsionaler (n=3) und gesunder Haut (n=3), aber nicht zwischen nichtläsionaler und gesunder Epidermis.

Während somit im Vergleich gesunde zu läsionaler Epidermis alle Studien eine deutliche Herabregulation von Claudin-1 zeigten, waren die Ergebnisse für die nichtläsionale Haut unterschiedlich. Ein Grund dafür könnte die Verteilung der

## Diskussion

Reduktion von Claudin-1 innerhalb der Epidermisschichten sein. In dieser Arbeit konnte durch die Dreiteilung gezeigt werden, dass ein Verlust von Claudin-1 im Stratum granulosum und im unterem Stratum spinosum/basale vorhanden war, nicht aber im oberen Stratum spinosum. Daher könnte es bei der Verwendung von größeren ROIs, die mehrere Schichten gleichzeitig vermessen, wie in den Untersuchungen von Gruber et al., möglich sein, dass eine geringe Abnahme nicht gezeigt werden konnte.

Das genaue Vorgehen bei Yuki et al., 2016 hinsichtlich der Methode der mikroskopischen Immunfluoreszenzmessung wurde nicht beschrieben. Es zeigte sich in der Studie von Yuki et al. kein signifikanter Unterschied zwischen nichtläsionaler und gesunder Epidermis. Jedoch konnte eine Verminderung der mRNA von Claudin-1 in nichtläsionaler Epidermis im Vergleich zu gesunder Epidermis nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deckte sich in der Studie von Yuki et al., 2016 nicht mit der IF Messung.

Das generelle verminderte Vorkommen des TJ Proteins Claudin-1 in läsionaler Haut in dieser (siehe Tabelle 5.3) und in vorangegangenen Studien (Batista et al., 2015; De Benedetto et al., 2011; Gruber et al., 2015; Yuki et al., 2016) lässt sich möglicherweise durch das stärkere lokale Entzündungsgeschehen erklären, das zu einer veränderten TJ-Expression führt, sowie durch ein verändertes Hautmikrobiom und genetische Prädisposition bedingt sein könnte (Bäsler et al., 2016). Claudin-1 erfüllt in verschiedenen Schichten der Epidermis unterschiedliche Funktionen. So ist Claudin-1 in nichtläsionaler Haut im Vergleich zu gesunder Epidermis vermindert, was De Benedetto et al., 2011 für einen Hinweis auf eine genetisch bedingte Verminderung interpretiert. Gruber et al., 2015 sehen eine systemische Entzündungsreaktion als mögliche Ursache. Tokumasu et al., 2016 konnte in läsionaler Epidermis von AD PatientInnen eine Korrelation zwischen einer Verminderung von Claudin-1 und einer erhöhten Anzahl von Makrophagen zeigen.

Welcher Mechanismus für diese Reduktionen von Claudin-1 verantwortlich ist, ist bisher nicht bekannt.

**Tabelle 5.3: Vergleich der Claudin-1-Verteilung mit anderen Studien**

	In dieser Arbeit			Gruber et al., 2015			De Benedetto et al., 2011	Yuki et al., 2016		Batista et al., 2015
	NL:G	L:NL	L:G	NL:G	L:NL	L:G	NL:G	NL:G	L:G	L:G
Claudin-1 im SG	↓	↓↓	↓↓↓							
Claudin-1 im oSSP	n.s.	↓↓	↓	n.s.	↓↓↓	↓↓	↓	n.s.	↓	↓↓↓
Claudin-1 im uSSP/SB	↓	↓↓↓	↓↓↓		↓	n.s.				

Ergebnisse der Immunfluoreszenzintensitätsmessungen von Claudin-1 in Schichten der Epidermis im Vergleich von gesunder (G), nichtläsionaler (NL) und läsionaler Haut (L) in verschiedenen Schichten der Epidermis in verschiedenen Studien. SG: *Stratum granulosum*; oSSP: *oberes Stratum spinosum*; uSSP/SB: *unteres Stratum spinosum/Stratum basale*. ↑=Hochregulation; ↓=Herabregulation; ↑= p-Wert < 0.05; ↑↑= p-Wert < 0.01; ↑↑↑= p-Wert < 0.001 n.s.= nicht signifikant

#### 5.4 Claudin-1 beeinflusst den transepidermale Wasserverlust (TEWL) und die Anzahl der Biotin-SH-Stops im Stratum granulosum

Bisher konnte keine Korrelation zwischen einzelnen TJ-Proteinen und einem Anstieg des TEWL in humaner Haut, der als Maß für die Gesamthautbarrierefunktion dient, nachgewiesen werden. Der TEWL ist über den transepidermalen Wasserverlust pro Zeit und Fläche in g/ (h m<sup>2</sup>) definiert und kann somit nicht einer einzelnen epidermalen Struktur zugeordnet werden.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Claudin-1-Vorkommen im Stratum granulosum und dem TEWL bestehen könnte (siehe Abb. 18). Die Verminderung von Claudin-1 in der IF im Stratum granulosum korreliert mit der Zunahme des TEWL.

## Diskussion

Der TEWL war von ca. 90 000 bis ca. 40 000 a.u. bei der Claudin-1 IF (ca. 50% des Maximalwertes gesunder Haut) stabil niedrig, unterhalb dieser Werte kam es zu einem exponentiellen Anstieg des Flüssigkeitsverlustes über die Haut (siehe Abb. 21). Dies könnte so interpretiert werden, dass das Claudin-1 Vorkommen erst ab einer Schwelle unterhalb von ca. 50% des Maximalwertes gesunder Haut reduziert sein muss, bevor es zu einer deutlich erhöhten Permeabilität für Wasser kommt. Da eine funktionelle Barrierebeeinträchtigung (erhöhter TEWL) verstärkt bei Abnahme der Claudin-1 IF im Stratum granulosum bestand, kann möglicherweise davon ausgegangen werden, dass sich in diesem Stratum die gestörte TJ-Barriere befinden könnte.

Yoshida et al., 2014, die eine Biotinylierung von läSIONALER AD Haut durchführten, die speziell aufgrund des zu gesunder Haut ähnlichen Claudin-1-Vorkommens ausgewählt wurde, fanden keine beeinträchtigte TJ-Barrierefunktion. In der vorliegenden Arbeit, wo eine größere Varianz des Claudin-1 Vorkommens untersucht wurde, konnte ein Verlust der Biotin-SH-Stopps im Zusammenhang mit einem verminderten Auftreten von Claudin-1 beobachtet werden, der sich deutlich von gesunder und nichtläSIONALER Epidermis unterscheidet (siehe Abb. 16 und 17 und Kapitel 4.5 und 5.4). Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen einer starken Claudin-1 Verminderung und einem TJ-Barrierefunktionsverlust hin.

Die Biotinylierung legt ebenfalls nahe, dass eine wichtige Barriere im Stratum granulosum der Epidermis von innen nach außen vorhanden ist. Es konnten vermindert Biotin-SH-Stopps im Stratum granulosum bei einer deutlich erniedrigten IF von Claudin-1 gezählt werden. Diese Korrelation verläuft nicht linear. Ab einem Wert von 40 000 a.u. in der IF von Claudin-1 und im oSSP ab einem Wert von 20 000 a.u. abwärts kommt es zu einem massiven Verlust von Biotin-SH-Stopps (siehe Abb. 19 und 20), was die These für das Vorhandensein der claudin-1-abhängigen TJ-Barriere im Stratum granulosum (SG) unterstützt. Außerdem wurde in nichtläSIONALER Epidermis keine Verminderung von Biotin-SH-Stopps gezeigt, die Hautbarriere ist hier also noch nicht geschädigt. Das bedeutet, dass eine geringe Abnahme des Claudin-1s in nichtläSIONALER Haut noch keine Permeabilitätsänderung hervorrufen muss. Es

## Diskussion

ließen sich auch keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunder Haut und nichtläsionaler Epidermis im TEWL nachweisen.

In rekonstruierter humaner Epidermis konnte bei Verlust von Claudin-1 eine Veränderung der Expression von Strukturproteinen im Stratum corneum nachgewiesen werden (Bergmann et al., 2020).

Im AD Maus-Model konnte eine Abnahme von Claudin-1, die von einer Erhöhung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) begleitet wurde, nachgewiesen werden (Gruber et al., 2015). Im Zellversuch mit humanen Keratinozyten ist ein Nachweis einer erhöhten Permeabilität von Ionen und Molekülen bei Claudin-1-Herabregulation bereits erfolgt (Kirschner et al., 2013).

Tokumasu et al. postulieren, dass die Claudin-1 Expression die Ausprägung der AD Symptome von AD PatientInnen reguliert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass derzeit verschiedene Untersuchungen mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen darauf hinweisen, dass Claudin-1 eine zentrale Rolle für die Permeabilitätsbarriere in läsionaler Epidermis bei AD spielt.

Die auslösenden Mechanismen für den Verlust von Claudin-1 sind nicht bekannt und sind schwer zu erfassen, da es sich um ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen handelt.

### **5.5 Ausblick**

Es ist bekannt, dass ein Teufelskreis bei der Genese und Aufrechterhaltung der Krankheitsaktivität von AD besteht und multiple Faktoren eine Rolle spielen. Weitere Untersuchungen sind notwendig für eine genauere Analyse, ob die Verminderung von Claudin-1 Ursache oder Folge der Symptome von AD sind. Auch ist es unklar, wodurch die Claudin-1 Reduktion hervorgerufen wird. Mehrere Mechanismen scheinen ineinander zu greifen.

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen der Hautbarrierefunktion hinsichtlich des transepidermalen Wasserverlustes und der TJ-Barriere für Biotin und dem Claudin-1-Vorkommen in der Epidermis erbracht werden. Es



## Diskussion

konnte in dieser und anderen Arbeiten gezeigt werden, dass es bei AD zu einer deutlichen Reduktion von Claudin-1 in der läsionalen Epidermis kommt. Auch andere krankheitsfördernde Faktoren scheinen mit dem Claudin-1-Vorkommen zusammenzuhängen.

So konnte gezeigt werden, dass das Claudin-1-Vorkommen negativ mit dem Auftreten von Makrophagen in humaner Epidermis korreliert und eine Verminderung von Claudin-1 in Mäusekeratinozyten eine Ausschüttung von IL-1 $\beta$  auslöst (Tokumasu et al., 2016). In rekonstruierter humaner Epidermis mit Claudin-1 Knockdown konnte dieser Effekt ebenfalls gezeigt werden (Bergmann et al., 2020). Was zeigen könnte, dass eine Verminderung von Claudin-1 Ausgangspunkt für eine Entzündungsreaktion sein könnte. Daher könnte ein Therapieansatz, der zu einer direkten lokalen Erhöhung des Claudin-1-Vorkommens in der Epidermis führt, sinnvoll sein. Zurzeit wird ein Medikament (Bortezomib), welches das Claudin-1-Vorkommen in der Epidermis durch eine Hemmung von Proteasomen erhöhen soll, getestet. Es zeigte sich im Tiermodelle an Mäusen eine Reduktion der Symptome (Hoy, 2017; Y. E. Kim et al., 2017).

Der Mechanismus der Verminderung von Claudin-1 in AD ist vermutlich durch unterschiedliche Einflüsse im Entzündungsgeschehen der Epidermis und systemisch erklärbar und bisher noch nicht vollständig verstanden, wie auch die Rolle der Claudine-1 und 4 und Occludin im gesamten Krankheitsgeschehen von AD.

## 6 Zusammenfassung

Tight junctions (TJ) sind an der Barrierefunktion der Epidermis beteiligt. Diese Barriere ist in Haut von PatientInnen, die von atopischer Dermatitis (AD) betroffen sind, gestört. Es kommt zu Veränderungen im Auftreten der TJ-Proteine Claudin-1, Claudin-4 und Occludin. In dieser Arbeit wurde das Auftreten dieser Proteine und die funktionelle Hautbarriere in einer norddeutschen Kohorte bei PatientInnen mit AD in nichtläsionaler, läsionaler und in Epidermis von gesunden ProbandInnen untersucht.

Die Ergebnisse basieren auf der Untersuchung von 13 gesunden ProbandInnen und 13 PatientInnen mit AD. Zunächst wurde in der Gruppe der PatientInnen der SCORAD (engl.: **scoring atopic dermatitis**) erhoben und sowohl bei ProbandInnen an gesunder und bei PatientInnen an läsionaler und nichtläsionaler Haut der transepidermale Wasserverlust (TEWL) gemessen und die Hydratation der Epidermis mittels einer Corneometrie bestimmt. Biopsien wurden an läsionalen und nichtläsionalen Epidermisbereichen von AD PatientInnen und an gesunder Haut von den ProbandInnen entnommen. Zusätzlich erfolgte bei allen TeilnehmerInnen eine Blutentnahme zur Bestimmung des IgE-Spiegels und zur genetischen Untersuchung der vier häufigsten europäischen Filaggrin-Gen-Mutationen.

Anschließend wurde eine Biotinylierung der Epidermis aller entnommenen Stenzen mit dem Tracer Biotin-SH durchgeführt, der nur durch Zwischenräume bis zu einer Größe von 556 Dalton diffundieren kann. Die Proteine Claudin-1, Claudin-4 und Occludin wurden durch immunhistologische Färbung und Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) untersucht. Die Epidermis wurde zur Bestimmung der genaueren Lokalisation der Proteine in drei Schichten eingeteilt.

Die IF von Occludin zeigte ein vermehrtes Auftreten in läsionaler Epidermis im Vergleich zu gesunder Haut im oberen und mittleren Stratum spinosum. In nichtläsionaler Haut im Vergleich zu gesunder Haut fand sich im Stratum

## Zusammenfassung

granulosum ein erhöhtes Vorkommen. Auch für Claudin-4 konnte im mittleren Stratum spinosum eine Vermehrung in läsionaler Epidermis im Vergleich zu nichtläsionaler und gesunder Haut beobachtet werden. Im Stratum granulosum hingegen wurde eine Verminderung von Claudin-4 festgestellt. Diese Ergebnisse wurden bisher noch nicht beschrieben.

Claudin-1 zeigte in der IF erwartungsgemäß eine generelle Reduktion in der läsionalen Epidermis in allen Schichten. Durch Korrelation des TEWLs mit diesen schichtbezogenen Ergebnissen kann postuliert werden, dass eine Abnahme des Proteins mit der Erhöhung des transepidermalen Wasserverlustes negativ korreliert ist. Außerdem kann vermutet werden, dass bei negativer Korrelation von Claudin-1 und Biotin-SH-Stopps im Stratum granulosum hier eine Beeinträchtigung der Hautbarriere vorliegt. Die Erhöhung des transepidermalen Wasserverlustes und eine Verminderung der Biotin-SH-Stopps tritt erst verstärkt bei einer Schwelle von weniger als 50% Verringerung des Claudin-1s des maximal gemessenen Wertes gesunder Haut auf. Kompensation der Hautbarrierefunktion bei Claudin-1-Verlust ist vermutlich in einem großen Maß möglich.

Mit diesen Ergebnissen konnte diese Arbeit zu einem weiteren Verständnis der Rolle der Tight junction Proteine Claudin-1, Claudin-4 und Occludin in atopisch veränderter Epidermis beitragen.

## 7 Summary

Tight Junctions (TJ) are involved in the barrier function of the epidermis. This barrier is disrupted in the skin of patients affected by atopic dermatitis (AD). Changes in the occurrence of the TJ proteins Claudin-1, Claudin-4 and Occludin occur. In this study, the occurrence of these proteins and the functional skin barrier in a north German cohort in patients with AD in non-lesional, lesional and in the epidermis of healthy subjects was investigated.

The results are based on the examination of 13 healthy volunteers and 13 patients with AD. In the beginning the SCORAD (scoring atopic dermatitis) was recorded in the group of patients and the transepidermal water loss (TEWL) was measured on healthy skin as well as on lesional and non-lesional skin and the hydration of the epidermis was measured by using corneometry. Biopsies were taken from lesional and non-lesion epidermal areas of AD patients and from healthy skin of test subjects. In addition, a blood sample was taken from all participants to determine the IgE level and for the genetic examination of the four most common European Filaggrin gen mutations.

The epidermis of the samples was then biotinylated with the tracer Biotin-SH, which can only diffuse through spaces up to a size of 556 Daltons. The proteins Claudin-1, Claudin-4 and Occludin were evaluated by immunohistological staining and immunofluorescence microscopy (IF). The epidermis was examined to determine the precise localization of the proteins in three layers.

Occludin IF showed an increased incidence in lesional epidermis compared to healthy skin in the upper and middle Stratum spinosum. In non-lesional skin compared to healthy skin, an increased occurrence was found in the Stratum granulosum. An increase in lesional epidermis in the middle Stratum spinosum was also observed for Claudin-4 compared to non-lesional and healthy skin. In the Stratum granulosum, however, a decrease in Claudin-4 was found. These results have not yet been described.

## Summary

As expected, Claudin-1 showed a general reduction in the lesional epidermis in all layers in the IF. By correlating the TEWL with these layer-related results, it can be postulated that a decrease in protein affects the increase in transepidermal water loss and the barrier of the Biotin-SH. The increase in trans-epidermal water loss and a decrease in the TJ barrier function only occur more intensely at a threshold of less than 50% decrease in Claudin-1 of the maximum measured value for healthy skin. Compensation of barrier function is therefore likely to a large extent.

With these results, this study can contribute to a further understanding of the role of TJ proteins Claudin-1, Claudin-4 and Occludin in atopic epidermis.

## 8 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
<	kleiner als
>	größer als
&	und
<i>A. dest.</i>	destilliertes Wasser ( <i>aqua destillata</i> )
a.u.	relative Einheiten (von engl. <i>arbitrary units</i> )
Abb.	Abbildung
AD	atopische Dermatitis
AG	Arbeitsgemeinschaft
C-terminal	carboxyterminal
CD ROM	Compact Disc Read-Only Memory
CLDN	Claudin
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	standardisiertes Nährmedium für Zellkulturen (von engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure (von engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
EASI	Akronym für engl. <i>Eczema Area and Severity Index</i>
EDTA	Titriplex III; Ethylendiamintetraacetat

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

engl.	englisch
G	gesunde Haut
g	Gramm
g1-13	gesunder Proband 1-13
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
IF	relative Immunfluoreszenzintensität
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
JAMs	junctional adhesion molecules
L	läsionale Haut
l	Liter
M	Molar
<i>m</i>	transportiertes Wasser [g]
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar (mMol pro Liter)
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger</i> RNA
ms	Millisekunde
mSSP	mittleres Stratum spinosum
MUPP	multi-PDZ Domäne Protein

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

n	Anzahl
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NL	nichtläsionale Haut
Ocln	Occludin
oSSP	oberes Stratum spinosum
p1-14	Patient 1-14
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (von engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion (von engl. <i>Polymerase chain reaction</i> )
pH	„Stärke des Wasserstoffs“ (von lat.: <i>Potentia hydrogenii</i> )
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RHE	rekonstruierte humane Epidermis
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	„untersuchte Region“ (von engl.: <i>region of interest</i> )
r <sub>s</sub>	Spearman's Korrelationskoeffizient
s	Sekunde
S. aureus	Staphylococcus aureus
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SCORAD	Akronym für engl.: <i>scoring atopic dermatitis</i>
SG	Stratum granulosum
TAMPs	TJ-assoziiertes Marvel Protein (von engl.: <i>tight junction associated marvel proteins</i> )



## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween
TEC	TRIS-EDTA-Citrat
TER	transepidermaler Widerstand (von engl.: <i>transepidermal electrical resistance</i> )
TEWL	transepidermaler Wasserverlust (von engl.: <i>transepidermal water loss</i> )
Th	T Helferzelle
TJ	Tight junction
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
uSSP	unteres Stratum spinosum
UV	ultra violett
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
ZO	Zonula occudens
µm	Mikrometer

## 9 Literaturverzeichnis

- Addor, F. A. S., Takaoka, R., Rivitti, E. A., & Aoki, V. (2012). Atopic dermatitis: Correlation between non-damaged skin barrier function and disease activity. *International Journal of Dermatology*, 51(6), 672–676.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05176.x>
- Angelova-Fischer, I., Bauer, A., Hipler, U. C., Petrov, I., Kazandjieva, J., Bruckner, T., Diepgen, T., Tsankov, N., Williams, M., Fischer, T. W., Elsner, P., & Fluhr, J. W. (2005). The Objective Severity Assessment of Atopic Dermatitis (OSAAD) score: Validity, reliability and sensitivity in adult patients with atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 153(4), 767–773. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06697.x>
- Asad, S., Winge, M. C. G., Wahlgren, C. F., Bilcha, K. D., Nordenskjöld, M., Taylan, F., & Bradley, M. (2016). The tight junction gene Claudin-1 is associated with atopic dermatitis among Ethiopians. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(11), 1939–1941.  
<https://doi.org/10.1111/jdv.13806>
- Avena-Woods, C. (2017). Overview of atopic dermatitis. In *The American journal of managed care* (Vol. 23, Issue 8, pp. S115–S123).  
<https://doi.org/10.5415/apallergy.2013.3.2.79>
- Bäsler, K., Bergmann, S., Heisig, M., Naegel, A., Zorn-Kruppa, M., & Brandner, J. M. (2016). The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *Journal of Controlled Release*, 242, 105–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.08.007>
- Bäsler, K., Galliano, M. F., Bergmann, S., Rohde, H., Wladykowski, E., Vidal-Y-Sy, S., Guiraud, B., Houdek, P., Schüring, G., Volksdorf, T., Caruana, A., Bessou-Touya, S., Schneider, S. W., Duplan, H., & Brandner, J. M. (2017). Biphasic influence of *Staphylococcus aureus* on human epidermal tight junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1405(1), 53–70.

<https://doi.org/10.1111/nyas.13418>

Batista, D. I. S., Perez, L., Orfali, R. L., Zaniboni, M. C., Samorano, L. P., Pereira, N. V., Sotto, M. N., Ishizaki, A. S., Oliveira, L. M. S., Sato, M. N., & Aoki, V. (2015). Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 29(6), 1091–1095. <https://doi.org/10.1111/jdv.12753>

Berardesca, E., & Maibach, H. I. (1990). Transepidermal water loss and skin surface hydration in the non invasive assessment of stratum corneum function. [Review] [28 refs]. *Dermatosen in Beruf Und Umwelt, Occupation*(2), 50–53.

Bergmann, S., von Buenau, B., Vidal-y-Sy, S., Haftek, M., Wladykowski, E., Houdek, P., Lezius, S., Duplan, H., Bäsler, K., Dähnhardt-Pfeiffer, S., Gorzelanny, C., Schneider, S. W., Rodriguez, E., Stölzl, D., Weidinger, S., & Brandner, J. M. (2020). Claudin-1 decrease impacts epidermal barrier function in atopic dermatitis lesions dose-dependently. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58718-9>

Bieber, T. (2010). Atopic dermatitis. In *Annals of Dermatology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 125–137). <https://doi.org/10.5021/ad.2010.22.2.125>

Bieber, T., & Prölss, J. (2008). Atopic dermatitis. In *Clinical and Basic Immunodermatology* (pp. 193–206). [https://doi.org/10.1007/978-1-84800-165-7\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-84800-165-7_13)

Bin, L., & Leung, D. Y. M. (2016). Genetic and epigenetic studies of atopic dermatitis. In *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13223-016-0158-5>

Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W. W., & Moll, I. (2002). Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *European Journal of Cell Biology*, 81(5), 253–263. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00244>

## Literaturverzeichnis

- Chopra, R., Vakharia, P. P., Sacotte, R., Patel, N., Immaneni, S., White, T., Kantor, R., Hsu, D. Y., & Silverberg, J. I. (2017). Severity strata for Eczema Area and Severity Index (EASI), modified EASI, Scoring Atopic Dermatitis (SCORAD), objective SCORAD, Atopic Dermatitis Severity Index and body surface area in adolescents and adults with atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 177(5), 1316–1321.  
<https://doi.org/10.1111/bjd.15641>
- Cork, M. J., Danby, S. G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M. E., Moustafa, M., Guy, R. H., MacGowan, A. L., Tazi-Ahnini, R., Ward, S. J., Lane, E., Moustafa, M., Guy, R. H., MacGowan, A. L., Tazi-Ahnini, R., & Ward, S. J. (2009). Epidermal Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*, 129(8), 1892–1908. <https://doi.org/jid2009133> [pii] 10.1038/jid.2009.133
- Cork, M. J., Robinson, D. A., Vasilopoulos, Y., Ferguson, A., Moustafa, M., MacGowan, A., Duff, G. W., Ward, S. J., & Tazi-Ahnini, R. (2006). New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: Gene-environment interactions. In *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 118, Issue 1, pp. 3–21). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.04.042>
- David Boothe, W., Tarbox, J. A., & Tarbox, M. B. (2017). Atopic Dermatitis: Pathophysiology. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 1027, pp. 21–37). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-64804-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64804-0_3)
- De Benedetto, A., Rafaels, N. M., McGirt, L. Y., Ivanov, A. I., Georas, S. N., Cheadle, C., Berger, A. E., Zhang, K., Vidyasagar, S., Yoshida, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L. C., Hanifin, J. M., Gallo, R. L., Novak, N., Weidinger, S., Beaty, T. H., Leung, D. Y. M., ... Beck, L. A. (2011). Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 773-86.e1-7.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.018>
- Dharmage, S. C., Lowe, A. J., Matheson, M. C., Burgess, J. A., Allen, K. J., & Abramson, M. J. (2014). Atopic dermatitis and the atopic march revisited. In *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 69,

## Literaturverzeichnis

- Issue 1, pp. 17–27). <https://doi.org/10.1111/all.12268>
- Dörfel, M. J., & Huber, O. (2012). A phosphorylation hotspot within the occludin C-terminal domain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1257(1), 38–44. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06536.x>
- Eyerich, K., & Novak, N. (2013). Immunology of atopic eczema: Overcoming the Th1/Th2 paradigm. In *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 68, Issue 8, pp. 974–982). <https://doi.org/10.1111/all.12184>
- Fahrenhold, M. (2019). Transepidermaler Wasserverlust bei gesunden Erwachsenen. *Hautnah Dermatologie*. <https://doi.org/10.1007/s15012-019-2969-9>
- Fritsch, P. (2009). Dermatologie & Venerologie für das Studium. In *Springer Medizin Verlag*.
- Fritsch, P., Schwarz, T., Fritsch, P., & Schwarz, T. (2018). Aufbau und Funktionen der Haut. In *Dermatologie Venerologie* (pp. 5–68). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-53647-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53647-6_2)
- Furuse, Hata, Furuse, Yoshida, Haratake, Sugitani, Noda, Kubo, A., & Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, 156(6), 1099–1111. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110122>
- Furuse, Hirase, Itoh, Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *Journal of Cell Biology*, 123(6 II), 1777–1788. <https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1777>
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *Journal of Cell Biology*, 141(7), 1539–1550. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.7.1539>
- Fyhrquist, N., Salava, A., Auvinen, P., & Lauerma, A. (2016). Skin Biomes. In

- Current Allergy and Asthma Reports* (Vol. 16, Issue 5).  
<https://doi.org/10.1007/s11882-016-0618-5>
- Grobe, W., Bieber, T., & Novak, N. (2019). Pathophysiology of atopic dermatitis. *JDDG - Journal of the German Society of Dermatology*, 17(4), 433–440.  
<https://doi.org/10.1111/ddg.13819>
- Gruber, R., Börnchen, C., Rose, K., Daubmann, A., Volksdorf, T., Wladykowski, E., Vidal-Y-Sy, S., Peters, E. M., Danso, M., Bouwstra, J. A., Hennies, H. C., Moll, I., Schmuth, M., & Brandner, J. M. (2015). Diverse Regulation of Claudin-1 and Claudin-4 in Atopic Dermatitis. *American Journal of Pathology*, 185(10), 2777–2789.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.021>
- Günzel, D., & Yu, A. S. L. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological Reviews*, 93(2), 525–569.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>
- Heratizadeh, A., & Werfel, T. (2016). Anti-inflammatory therapies in atopic dermatitis. In *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 71, Issue 12, pp. 1666–1675). <https://doi.org/10.1111/all.13065>
- Hertl, M. (2018). Dermatologische Grundlagen. In *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie* (pp. 1–20). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-49546-9\\_1-1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49546-9_1-1)
- Hon, K. L., Kung, J., Ng, W. G., Tsang, K., Cheng, N. S., & Leung, T. F. (2018). Are skin equipment for assessing childhood eczema any good? . *J Dermatolog.Treat.* , %20:1-15., 1–15.
- Hoy, S. M. (2017). Crisaborole Ointment 2%: A Review in Mild to Moderate Atopic Dermatitis. *American Journal of Clinical Dermatology*, 18(6), 837–843. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0327-4>
- Imokawa, G. (2001). Lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(1 SUPPL. 1).  
<https://doi.org/10.1067/mjd.2001.117020>

## Literaturverzeichnis

- Kim, H.-J., Cronin, M., Ahrens, K., Papastavros, V., Santoro, D., & Marsella, R. (2016). A comparative study of epidermal tight junction proteins in a dog model of atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 27(1).  
<https://doi.org/10.1111/vde.12276>
- Kim, Y. E., Cho, N., Cheon, S., & Kim, K. K. (2017). Bortezomib, a proteasome inhibitor, alleviates atopic dermatitis by increasing claudin 1 protein expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(1), 744–750. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.120>
- Kirschner, N., Bohner, C., Rachow, S., & Brandner, J. M. (2010). Tight junctions: Is there a role in dermatology? In *Archives of Dermatological Research* (Vol. 302, Issue 7, pp. 483–493). <https://doi.org/10.1007/s00403-010-1058-z>
- Kirschner, N., & Brandner, J. M. (2012). Barriers and more: Functions of tight junction proteins in the skin. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1257, Issue 1, pp. 158–166). <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06554.x>
- Kirschner, N., Houdek, P., Fromm, M., Moll, I., & Brandner, J. M. (2010). Tight junctions form a barrier in human epidermis. *European Journal of Cell Biology*, 89(11), 839–842. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.07.010>
- Kirschner, N., Poetzl, C., Von Den Driesch, P., Wladykowski, E., Moll, I., Behne, M. J., & Brandner, J. M. (2009). Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: Putative involvement of proinflammatory cytokines. *American Journal of Pathology*, 175(3), 1095–1106.  
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080973>
- Kirschner, N., Rosenthal, R., Furuse, M., Moll, I., Fromm, M., & Brandner, J. M. (2013). Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(5), 1161–1169. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.507>
- Krause, G., Protze, J., & Piontek, J. (2015). Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal

## Literaturverzeichnis

- structures. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 42, pp. 3–12). <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.04.010>
- Laird M1, L. S. K. (2017). Defining and Measuring the Scope of Atopic Dermatitis. *Part of the Advances in Experimental Medicine and Biology Book Series (AEMB, Volume 1027)*.
- Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., Brandner, J. M., Moll, I., & Franke, W. W. (2002). Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *European Journal of Cell Biology*, 81(8), 419–435. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00270>
- Lee, A. Y. (2020). Molecular mechanism of epidermal barrier dysfunction as primary abnormalities. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/ijms21041194>
- Lee, C. H., Chuang, H. Y., Shih, C. C., Jong, S. B., Chang, C. H., & Yu, H. S. (2006). Transepidermal water loss, serum IgE and  $\beta$ -endorphin as important and independent biological markers for development of itch intensity in atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 154(6), 1100–1107. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07191.x>
- Leung, D. Y. M., & Bieber, T. (2003). Atopic dermatitis. *Lancet*, 361(9352), 151–160. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12193-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12193-9)
- Li, J., Angelow, S., Linge, A., Zhuo, M., & Yu, A. S. L. (2013). Claudin-2 pore function requires an intramolecular disulfide bond between two conserved extracellular cysteines. *AJP: Cell Physiology*, 305(2), C190–C196. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00074.2013>
- Li, Y., Fanning, A. S., Anderson, J. M., & Lavie, A. (2005). Structure of the conserved cytoplasmic C-terminal domain of occludin: Identification of the ZO-1 binding surface. *Journal of Molecular Biology*, 352(1), 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.017>
- Liang, Y., Chang, C., & Lu, Q. (2016). The Genetics and Epigenetics of Atopic



- Dermatitis—Filaggrin and Other Polymorphisms. In *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* (Vol. 51, Issue 3, pp. 315–328).  
<https://doi.org/10.1007/s12016-015-8508-5>
- Liu, F., Koval, M., Ranganathan, S., Fanayan, S., Hancock, W. S., Lundberg, E. K., Beavis, R. C., Lane, L., Duek, P., McQuade, L., Kelleher, N. L., & Baker, M. S. (2016). Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. In *Journal of Proteome Research* (Vol. 15, Issue 2, pp. 339–359). <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00769>
- Lüllmann-Rauch. (2019). *Taschenlehrbuch der Histologie*. Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-006-163361>
- Madison, K. C. (2003). Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Etre” of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 121(2), 231–241.  
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12359.x>
- Mankertz, J., Stefan Waller, J., Hillenbrand, B., Tavalali, S., Florian, P., Schöneberg, T., Fromm, M., & Dieter Schulzke, J. (2002). Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(5), 657–666. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02487-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02487-7)
- Moll, I. (2016). *Duale Reihe: Dermatologie*.
- Morita, K., Tsukita, S., & Miyachi, Y. (2004). Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen’s disease. *British Journal of Dermatology*, 151(2), 328–334.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06029.x>
- Mounsey, S. J., & Agius, E. (2017). Atopic dermatitis. *British Journal of Hospital Medicine*, 78(12), C183–C187.  
<https://doi.org/10.12968/hmed.2017.78.12.C183>
- Murota, H., & Katayama, I. (2017). Exacerbating factors of itch in atopic dermatitis. In *Allergology International* (Vol. 66, Issue 1, pp. 8–13).

<https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.10.005>

Murota, H., Yamaga, K., Ono, E., & Katayama, I. (2018). Sweat in the pathogenesis of atopic dermatitis. In *Allergology International*.

<https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.06.003>

Nakatsuji, T., Chen, T. H., Two, A. M., Chun, K. A., Narala, S., Geha, R. S., Hata, T. R., & Gallo, R. L. (2016). Staphylococcus aureus Exploits Epidermal Barrier Defects in Atopic Dermatitis to Trigger Cytokine Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(11), 2192–2200.

<https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.05.127>

Niehues, H., Schalkwijk, J., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Rodijk-Olthuis, D., van Rossum, M. M., Wladykowski, E., Brandner, J. M., van den Bogaard, E. H. J., & Zeeuwen, P. L. J. M. (2017). Epidermal equivalents of filaggrin null keratinocytes do not show impaired skin barrier function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(6), 1979-1981.e13.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.09.016>

Niessen, C. M. (2007). Tight junctions/adherens junctions: Basic structure and function. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 127, Issue 11, pp. 2525–2532). <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700865>

Nilsson, G. E. (1977). Measurement of water exchange through skin. *Medical & Biological Engineering & Computing*. <https://doi.org/10.1007/BF02441040>

Oranje, A. P. (2011). Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: SCORAD index, objective SCORAD, patient-oriented SCORAD and three-item severity score. *Current Problems in Dermatology*, 41, 149–155. <https://doi.org/10.1159/000323308>

Park, K. D., Pak, S. C., & Park, K. K. (2017). The pathogenetic effect of natural and bacterial toxins on atopic dermatitis. In *Toxins* (Vol. 9, Issue 1).

<https://doi.org/10.3390/toxins9010003>

Paternoster, L., Standl, M., Waage, J., Baurecht, H., Hotze, M., Strachan, D. P., Curtin, J. A., Bønnelykke, K., Tian, C., Takahashi, A., Esparza-Gordillo, J.,

## Literaturverzeichnis

- Alves, A. C., Thyssen, J. P., Den Dekker, H. T., Ferreira, M. A., Altmaier, E., Sleiman, P. M. A., Xiao, F. L., Gonzalez, J. R., ... Weidinger, S. (2015). Multi-ancestry genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. *Nature Genetics*, *47*(12), 1449–1456. <https://doi.org/10.1038/ng.3424>
- Peng, W., & Novak, N. (2015). Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Allergy*, *45*(3), 566–574. <https://doi.org/10.1111/cea.12495>
- Proksch, E., Fölster-Holst, R., & Jensen, J. M. (2006). Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. In *Journal of Dermatological Science* (Vol. 43, Issue 3, pp. 159–169). <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.06.003>
- Pummi, K., Malminen, M., Aho, H., Karvonen, S. L., Peltonen, J., & Peltonen, S. (2001). Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, *117*(5), 1050–1058. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202X.2001.01493.x>
- Rachow, S., Zorn-Kruppa, M., Ohnemus, U., Kirschner, N., Vidal-y-Sy, S., von den Driesch, P., Börnchen, C., Eberle, J., Mildner, M., Vettorazzi, E., Rosenthal, R., Moll, I., & Brandner, J. M. (2013). Occludin Is Involved in Adhesion, Apoptosis, Differentiation and Ca<sup>2+</sup>-Homeostasis of Human Keratinocytes: Implications for Tumorigenesis. *PLoS ONE*, *8*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055116>
- Rao, R. (2009). Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1165*, 62–68. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04054.x>
- Rerknimitr, P., Otsuka, A., Nakashima, C., & Kabashima, K. (2017). The etiopathogenesis of atopic dermatitis: barrier disruption, immunological derangement, and pruritus. *Inflammation and Regeneration*, *37*(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s41232-017-0044-7>
- Roehlen, N., Suarez, A. A. R., El Saghire, H., Saviano, A., Schuster, C.,

## Literaturverzeichnis

- Lupberger, J., & Baumert, T. F. (2020). Tight junction proteins and the biology of hepatobiliary disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030825>
- Ross-Hansen, K., Linneberg, A., Johansen, J. D., Hersoug, L. G., Brasch-Andersen, C., Menné, T., & Thyssen, J. P. (2013). The role of glutathione S-transferase and claudin-1 gene polymorphisms in contact sensitization: A cross-sectional study. *British Journal of Dermatology*, *168*(4), 762–770. <https://doi.org/10.1111/bjd.12126>
- Rudolph, R., & Kownatzki, E. (2004). Corneometric, sebumetric and TEWL measurements following the cleaning of atopic skin with a urea emulsion versus a detergent cleanser. *Contact Dermatitis*, *50*(6), 354–358. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2004.00368.x>
- Schmitt, J., Langan, S., Deckert, S., Svensson, A., Von Kobyletzki, L., Thomas, K., & Spuls, P. (2013). Assessment of clinical signs of atopic dermatitis: A systematic review and recommendation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *132*(6), 1337–1347. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.008>
- Schmitz, R., Atzpodien, K., & Schlaud, M. (2012). Prevalence and risk factors of atopic diseases in German children and adolescents. *Pediatric Allergy and Immunology*, *23*(8), 716–723. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2012.01342.x>
- Schneeberger, E. E. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *AJP: Cell Physiology*, *286*(6), C1213–C1228. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00558.2003>
- Sterry, W. et al. (2005). *Checklisten der aktuellen Medizin: Checkliste Dermatologie*. <https://doi.org/10.1055/b-0034-46610>
- Strowd, L. C., & Feldman, S. R. (2017). Dupilumab for atopic dermatitis. In *The Lancet* (Vol. 389, Issue 10086, pp. 2265–2266). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31192-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31192-3)
- Sugawara, T., Iwamoto, N., Akashi, M., Kojima, T., Hisatsune, J., Sugai, M., &

## Literaturverzeichnis

- Furuse, M. (2013). Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *Journal of Dermatological Science*, *70*(1), 12–18.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.01.002>
- Sugita, K., & Kabashima, K. (2020). Tight junctions in the development of asthma, chronic rhinosinusitis, atopic dermatitis, eosinophilic esophagitis, and inflammatory bowel diseases. In *Journal of Leukocyte Biology*.  
<https://doi.org/10.1002/JLB.5MR0120-230R>
- Tohgasaki, T., Ozawa, N., Yoshino, T., Ishiwatari, S., Matsukuma, S., Yanagi, S., & Fukuda, H. (2018). Enolase-1 expression in the stratum corneum is elevated with parakeratosis of atopic dermatitis and disrupts the cellular tight junction barrier in keratinocytes. *International Journal of Cosmetic Science*. <https://doi.org/10.1111/ics.12449>
- Tokuda, Hirai, & Furuse. (2017). Claudin-4 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: Claudin-4 is dispensable for the permeability properties of tight junctions in wild-type MDCK cells. *PLoS ONE*, *12*(8).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182521>
- Tokumasu, R., Yamaga, K., Yamazaki, Y., Murota, H., Suzuki, K., Tamura, A., Bando, K., Furuta, Y., Katayama, I., & Tsukita, S. (2016). Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(28), E4061–E4068. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525474113>
- Tokura, Y. (2010). Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. In *Journal of Dermatological Science* (Vol. 58, Issue 1, pp. 1–7).  
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.02.008>
- Van Itallie, C. M., Fanning, A. S., & Anderson, J. M. (2003). Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *285*(6 54-6). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00116.2003>
- Van Smeden, J., & Bouwstra, J. A. (2016). Stratum Corneum Lipids: Their Role

## Literaturverzeichnis

- for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. *Current Problems in Dermatology (Switzerland)*, 49, 8–26.  
<https://doi.org/10.1159/000441540>
- Visser, M. J., Landeck, L., Campbell, L. E., McLean, W. H. I., Weidinger, S., Calkoen, F., John, S. M., & Kezic, S. (2013). Impact of atopic dermatitis and loss-of-function mutations in the filaggrin gene on the development of occupational irritant contact dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 168(2), 326–332. <https://doi.org/10.1111/bjd.12083>
- Volksdorf, T., Heilmann, J., Eming, S. A., Schawjinski, K., Zorn-Kruppa, M., Ueck, C., Vidal-y-Sy, S., Windhorst, S., Jücker, M., Moll, I., & Brandner, J. M. (2017). Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Are Important for Cutaneous Wound Healing. *American Journal of Pathology*, 187(6), 1301–1312. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.02.006>
- Weidinger, S., & Irvine, A. D. (2011). Genetics of Atopic Dermatitis. In *Harper's Textbook of Pediatric Dermatology: Third Edition* (Vol. 1, pp. 1–17).  
<https://doi.org/10.1002/9781444345384.ch23>
- Welsch. (2003). *Lehrbuch Histologie*. Elsevier GmbH.
- Werfel, T. (2011). Classification, clinical features and differential diagnostics of atopic dermatitis. *Atopic Dermatitis in Childhood and Adolescence*, 15, 1–10. <https://doi.org/10.1159/000328130>
- Werfel, T., Allam, J. P., Biedermann, T., Eyerich, K., Gilles, S., Guttman-Yassky, E., Hoetzenecker, W., Knol, E., Simon, H. U., Wollenberg, A., Bieber, T., Lauener, R., Schmid-Grendelmeier, P., Traidl-Hoffmann, C., & Akdis, C. A. (2016). Cellular and molecular immunologic mechanisms in patients with atopic dermatitis. In *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (Vol. 138, Issue 2, pp. 336–349).  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.010>
- Werfel, T., Heratizadeh, A., Aberer, W., Ahrens, F., Augustin, M., Biedermann, T., Diepgen, T., Fölster-Holst, R., Gieler, U., Kahle, J., Kapp, A., Nast, A., Nemat, K., Ott, H., Przybilla, B., Roeckel, M., Schlaeger, M., Schmid-

## Literaturverzeichnis

- Grendelmeier, P., Schmitt, J., ... Worm, M. (2016). S2k guideline on diagnosis and treatment of atopic dermatitis — short version. *Allergo Journal International*, 25(3), 82–95. <https://doi.org/10.1007/s40629-016-0110-8>
- Werner, Y., & Lindberg, M. (1985). Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*, 65(2), 102–105.  
<http://europepmc.org/abstract/med/2408409>
- Wollina, U. (2017). Microbiome in atopic dermatitis. In *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* (Vol. 10, pp. 51–56).  
<https://doi.org/10.2147/CCID.S130013>
- Wong, V. (1997). Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. *The American Journal of Physiology*, 273(6 Pt 1), C1859-67. <https://doi.org/0363-6143/97>
- Woo, T. E., & Kuzel, P. (2019). Crisaborole 2% Ointment (Eucrisa) for Atopic Dermatitis. In *Skin therapy letter* (Vol. 24, Issue 2, pp. 4–6).
- Yoon, J. H., Nam, Y., Song, E. Y., Roh, E. Y., Yoon, H. S., & Shin, S. (2015). CCL28 cannot replace IgE for severity by objective SCORAD index in atopic dermatitis in children. *Clinical Laboratory*, 61(10), 1577–1580.  
<https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2015.150311>
- Yoshida, K., Kubo, A., Fujita, H., Yokouchi, M., Ishii, K., Kawasaki, H., Nomura, T., Shimizu, H., Kouyama, K., Ebihara, T., Nagao, K., & Amagai, M. (2014). Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(4), 856–864.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.001>
- Yoshida, K., Yokouchi, M., Nagao, K., Ishii, K., Amagai, M., & Kubo, A. (2013). Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *Journal of Dermatological Science*, 71(2), 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.04.021>

## Literaturverzeichnis

- Yu, H. S., Kang, M. J., Kwon, J. W., Lee, S. Y., Lee, E., Yang, S. I., Jung, Y. H., Hong, K., Kim, Y. J., Lee, S. H., Kim, H. J., Kim, H. Y., Seo, J. H., Kim, B. J., Kim, H. Bin, & Hong, S. J. (2015). Claudin-1 polymorphism modifies the effect of mold exposure on the development of atopic dermatitis and production of IgE. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*(3), 827-830.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.040>
- Yuki, T., Tobiishi, M., Kusaka-Kikushima, A., Ota, Y., & Tokura, Y. (2016). Impaired tight junctions in atopic dermatitis skin and in a skin-equivalent model treated with interleukin-17. *PLoS ONE*, *11*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161759>
- Zorn-Kruppa, M., Vidal-y-Sy, S., Houdek, P., Wladykowski, E., Grzybowski, S., Gruber, R., Gorzelanny, C., Harcup, J., Schneider, S. W., Majumdar, A., & Brandner, J. M. (2018). Tight Junction barriers in human hair follicles – role of claudin-1. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30341-9>



## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der menschlichen Haut und Epidermis.....	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Teufelskreises bei atopischer Dermatitis .....	14
Abbildung 3: Darstellung einer TEWA-Metersonde mit Feuchtigkeits- und Temperatursonde im Hohlzylinder.....	40
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines Corneometers .....	41
Abbildung 5: Entnahme einer Stanzbiopsie .....	42
Abbildung 6: Biotinylierung des interzellulären Raumes .....	43
Abbildung 7: Beispiele für die Lokalisation der ROIs (regions of interest) .....	48
Abbildung 8: Lokalisation von Biotin-SH-Stopps in gesunder Haut.....	49
Abbildung 9: Occludinvorkommen in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut.....	59
Abbildung 10: Occludin in verschiedenen Epidermisschichten in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut .....	61
Abbildung 11: Claudin-1-Vorkommen in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut.....	62
Abbildung 12: Claudin-1 in verschiedenen Epidermisschichten in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut .....	63
Abbildung 13: Verteilung der Immunfluoreszenzintensität von Claudin-1 in Prozent (%) in gesunder Epidermis .....	64
Abbildung 14: Claudin-4-Vorkommen in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut.....	66

<b>Abbildung 15: Claudin-4 in verschiedenen Epidermisschichten in gesunder, nichtläsionaler und läsionaler Haut .....</b>	<b>67</b>
<b>Abbildung 16: TJ-Barriere in gesunder Epidermis und nichtläsionaler Epidermis von AD PatientInnen .....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 17: TJ-Barriere in läsionaler Epidermis von AD PatientInnen .</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 18: Quantitative Evaluation von Biotin-SH-Stopps pro Zellen .</b>	<b>72</b>
<b>Abbildung 19: Korrelation der Claudin-1-Immunfluoreszenzintensität in (a.u.) und Biotin-SH-Stopps/Zellen im Stratum granulosum (SG) .....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 20: Korrelation der Claudin-1-Immunfluoreszenzintensität in (a.u.) und Biotin-SH-Stopps/Zellen im oberen Stratum granulosum (oSSP) und im unteren Stratum spinosum/Stratum basale (uSSP/SB) .....</b>	<b>74</b>
<b>Abbildung 21: Korrelation der Claudin-1-Immunfluoreszenzintensität in (a.u.) und dem TEWL im Stratum granulosum (SG) (n=39) .....</b>	<b>75</b>

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Tabellarische Übersicht der bisher veröffentlichten Studien zu Tight junctions bei atopischer Dermatitis .....	23
Tabelle 3.1: Darstellung der StudienteilnehmerInnen .....	28
Tabelle 3.2: Verbrauchsmaterialien .....	29
Tabelle 3.3: Geräte.....	30
Tabelle 3.4: Chemikalien .....	31
Tabelle 3.5: Primärantikörper .....	33
Tabelle 3.6: Immunglobuline für die Negativkontrollen .....	34
Tabelle 3.7: Sekundärantikörper .....	34
Tabelle 4.1: Ergebnisse der SCORAD Erhebung .....	51
Tabelle 4.2: Ergebnisse der SCORAD Erhebung nach Schweregrad .....	52
Tabelle 4.3: Ergebnisse der corneometrischen Messung .....	53
Tabelle 4.4: Ergebnisse der TEWL Messung .....	55
Tabelle 4.5: Ergebnisse der Bestimmung des IgE-Spiegels und Filaggrinmutation (2282del4) .....	56
Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzintensitätsmessung .....	68
Tabelle 5.1: Vergleich der Occludinverteilung mit anderen Studien .....	81
Tabelle 5.2: Vergleich der Claudin-4-Verteilung mit anderen Studien .....	83
Tabelle 5.3: Vergleich der Claudin-1-Verteilung mit anderen Studien .....	86

## 12 Liste bisher veröffentlichter Arbeiten

Bergmann, S., von Buenau, B., Vidal-y-Sy, S., Haftek, M., Wladykowski, E., Houdek, P., ... Brandner, J. M. (2020). Claudin-1 decrease impacts epidermal barrier function in atopic dermatitis lesions dose-dependently. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58718-9>

### **13 Lebenslauf (Kurzfassung)**

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 14 Danksagungen

Ganz besonders möchte ich mich bei **Frau Prof. Dr. Johanna Brandner**, Leiterin des Labors für Zell- und Molekularbiologie der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKE, für Ihre sehr freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken.

Bei **Frau Prof. Dr. Ingrid Moll** und **Herrn Prof. Dr. Stefan W. Schneider** bedanke ich mich dafür, dass ich meine Dissertation im Zellbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie am UKE anfertigen durfte.

Herzlichen Dank an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Labors für Zell- und Molekularbiologie des UKEs für Ihre freundliche Hilfe bei der Durchführung der Experimente, insbesondere an **Pia Houdek, Ewa Wladikowski, Sabine Vidal-y-Sy, Dr. Michaela Zorn-Kruppa** und meinen Mitdotorandinnen **Dr. Sophia Bergmann** und **Dr. Katja Bäsler**. Ich möchte mich besonders bei der Dermatologie des UKEs, bei **Frau Dr. med. Carmen Klingelhöller, Frau Dr. med. Ute Siemann-Harms** und **Frau Dr. med. D. Varwig-Janßen** bedanken, die mir bei der Organisation, ProbandInnensuche und Probenentnahme geholfen haben.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Universitäts-Hautklinik Kiel bedanken: Bei **Frau Dr. Elke Rodriguez**, die mir bei einem Großteil der ProbandInnensuche geholfen und die genetischen Bestimmungen durchgeführt hat. Ganz herzlichen Dank an **Frau Dr. med. Frederieke Thielking**, die mir sehr bei der Probenentnahme geholfen hat und an die Leiterin des dortigen Labors **Frau Dr. Agatha Schwarz**. Bei **Herrn Prof. Dr. med. Stephan Weidinger** möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit mit der Universitäts-Hautklinik Kiel und Organisation bedanken.

Für die Hilfe und Beratung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit möchte ich mich sehr bei meiner Freundin **Dr. Johanna Callhoff** bedanken.

## **15 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Auflage und Jahr des Erscheinens, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden darf.

Unterschrift: .....