

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Innere Medizin  
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Prof. Dr. Stefan W. Schneider

**Veränderungen von Calciumkanälen, TJ-Proteinen und Connexinen  
in einem Atopische-Dermatitis Mausmodell  
und im menschlichen atopischen Ekzem**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Katharina Rose  
aus Hamburg

Hamburg 2018

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.07.2018**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Johanna Brandner**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Viacheslav Nikolaev**

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Aufbau und Funktion der Haut .....	1
1.2 Tight junctions .....	3
1.2.1 Claudin-1 (Cldn-1) .....	4
1.2.2 Zonula Occludens protein 1 (ZO-1).....	5
1.3 Atopische Dermatitis .....	6
1.4 Atopic Dermatitis-like Allergic Dermatitis (AID) Mausmodell .....	10
1.5 Der Ca <sup>2+</sup> -Gradient in der Haut.....	10
1.6 Der Ca <sup>2+</sup> -Gradient im AID-Mausmodell.....	12
1.7 Ca <sup>2+</sup> -Signaling und die Bedeutung von Ca <sup>2+</sup> für Proliferation und Differenzierung.....	14
1.8 Calcium-Kanäle.....	16
1.8.1 Orai1 / CRAC-Kanal .....	17
1.8.2 TRP-Kanäle ( <i>Transient receptor potential channels</i> ).....	20
1.8.2.1 Transient Receptor Potential Canonical/Classic Channel 1 (TRPC1) .....	21
1.8.2.2 Transient Receptor Potential Vanilloid Channel 4 (TRPV4) .....	22
1.9 Connexine und Gap junctions .....	24
1.9.1 Cx43 und Cx26.....	26
1.10 Zielsetzung der Arbeit .....	28
2. Material .....	29
2.1 Gewebe .....	29
2.1.1 Maus .....	29
2.1.2 Mensch.....	30
2.2 Chemikalien.....	31
2.3 Geräte und Verbrauchsmaterial.....	32
2.4 Antikörper.....	33
2.5 Isotypkontrollen .....	35
2.6 Puffer und Lösungen .....	35
2.7 Software.....	36
3. Methoden.....	37
3.1 AID-Mausmodell.....	37
3.2 Erstellen und Fixieren von Paraffinschnitten.....	37
3.3 Immunhistochemische Färbung .....	38
3.4 Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen .....	39
3.4.1 Auswertung der Intensität .....	40
3.4.2 Auswertung der Expressionsbreite innerhalb der Epidermis .....	42

3.5 Bestimmung der Dichte des dermalen Infiltrats.....	42
3.6 Statistische Auswertung.....	43
4. Ergebnisse.....	44
4.1 Dichte des dermalen Infiltrats .....	44
4.2 Lokalisation der TJ-Proteine im AID-Mausmodell.....	44
4.2.1 Lokalisation von Cldn-1 im AID-Mausmodell.....	45
4.2.2 Lokalisation von ZO-1 im AID-Mausmodell.....	48
4.3 Expression von Ca <sup>2+</sup> -Kanälen im AID-Mausmodell.....	52
4.3.1 Expression von Orai1 im AID-Mausmodell.....	52
4.3.2 Expression von TRPC1 im AID-Mausmodell.....	53
4.3.3 Färbung von TRPV4 im AID-Mausmodell.....	55
4.4 Lokalisation der Connexine Cx43 und Cx26 im AID-Mausmodell .....	57
4.4.1 Lokalisation von Cx43 im AID-Mausmodell.....	57
4.4.2 Lokalisation von Cx26 im AID-Mausmodell.....	60
4.5 Korrelationen der im AID-Mausmodell erhobenen Parameter .....	61
4.6 Einfluss der dermalen Infiltratdichte .....	61
4.6.1 Korrelation der Infiltratdichte mit Proliferation, Differenzierung und Epidermisdicke .....	62
4.6.2 Korrelation der Infiltratdichte mit dem Calcium-Gradienten.....	62
4.6.3 Korrelation der Infiltratdichte mit der Färbung von TJ-Proteinen, Calcium-Kanälen und Connexinen.....	63
4.7 Korrelationen weiterer immunologischer Komponenten mit den untersuchten Parametern .....	64
4.8 Korrelationen mit Parametern des Ekzems.....	64
4.8.1 Korrelation von TJ-Proteinen mit der Epidermisdicke und der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten.....	64
4.8.2 Korrelationen von Ca <sup>2+</sup> -Kanälen mit Proliferation, Differenzierung und Epidermisdicke..	67
4.8.3 Korrelation von Connexinen mit Proliferation, Differenzierung und Epidermisdicke .....	68
4.9 Korrelationen mit dem Calcium-Gradienten.....	69
4.9.1 Korrelation von TJ-Proteinen mit dem Calcium-Gradienten .....	69
4.9.2 Korrelationen von Ca <sup>2+</sup> -Kanälen mit dem Calcium-Gradienten .....	71
4.9.3 Korrelationen von Connexinen mit dem Calcium-Gradienten.....	71
4.10 Korrelationen von Proteinen der Calciumhomöostase .....	72
4.10.1 Korrelationen von TJ-Proteinen mit Connexinen.....	72
4.10.2 Korrelationen von TJ-Proteinen mit Ca <sup>2+</sup> -Kanälen .....	73
4.10.3 Korrelationen von Connexinen mit Ca <sup>2+</sup> -Kanälen .....	75
4.10.4 Korrelationen von Ca <sup>2+</sup> -Kanälen mit anderen Ca <sup>2+</sup> -Kanälen .....	76
4.10.5 Korrelation von Cx26 und Cx43.....	76
4.11 Färbung der Ca <sup>2+</sup> -Kanäle in normaler humaner Haut und im humanen Ekzem .....	76

4.11.1 Färbung von Orai1 in humaner Haut .....	76
4.11.2 Färbung von TRPC1 in humaner Haut.....	78
4.11.3 Färbung von TRPV4 in humaner Haut .....	80
5. Diskussion .....	81
5.1 TJ-Proteine im AID-Mausmodell.....	82
5.2 Connexine im AID-Mausmodell.....	87
5.3 Calcium-Kanäle im AID-Mausmodell und im humanen atopischen Ekzem .....	90
5.3.1 Orai1 im AID-Mausmodell und im humanen atopischen Ekzem.....	90
5.3.2 TRPC1 im AID-Mausmodell und im humanen atopischen Ekzem .....	93
5.3.3 TRPV4 im AID-Mausmodell und im humanen atopischen Ekzem.....	95
5.4 Diskussion des AID-Mausmodells und des Modellsystems „Maus“ im Allgemeinen.....	96
6. Zusammenfassung/Summary .....	98
7. Abkürzungsverzeichnis .....	101
8. Literaturverzeichnis.....	104
9. Anhang .....	121
9.1 Gesamttabelle der statistischen Auswertung.....	121
9.2 Syntax.....	140
10. Danksagung .....	149
11. Eidesstattliche Versicherung.....	150

# 1. Einleitung

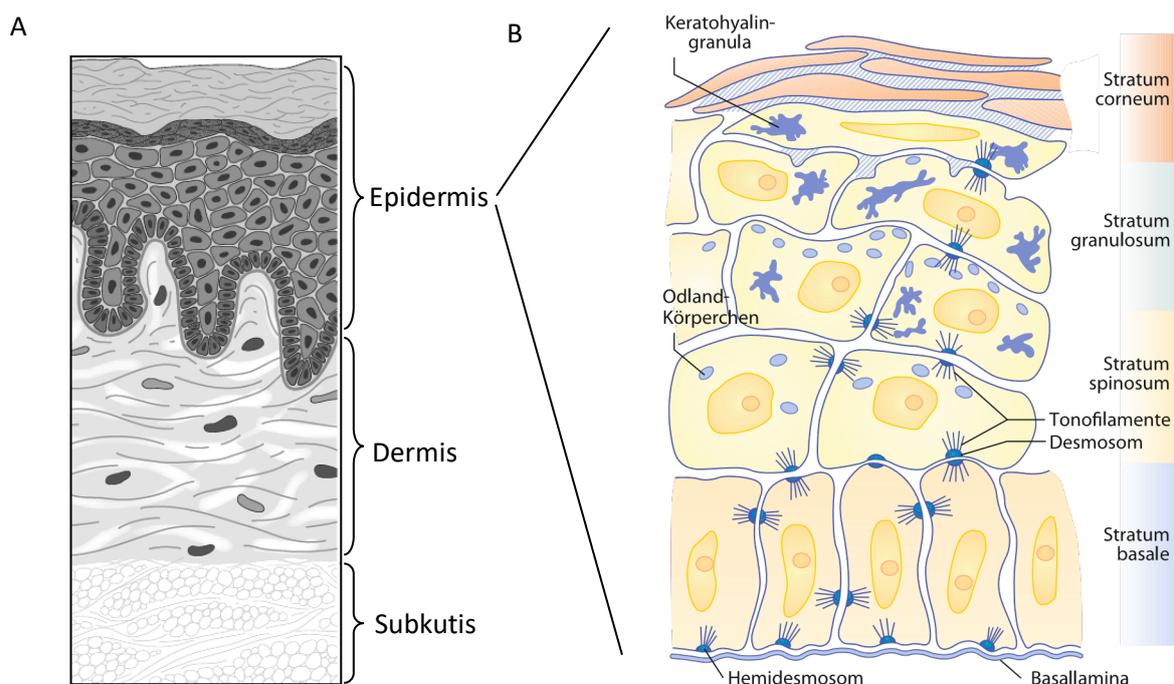
## 1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Als dynamische Grenzfläche zwischen Körper und Umwelt übernimmt sie als Barriere eine essenzielle Schutzfunktion, und ist gleichzeitig ein Medium der Wahrnehmung, Kommunikation und des Austausches. Neben diesen Funktionen ist die Haut Ausdruck des physischen und psychischen Allgemeinzustandes eines Menschen.

Die Haut setzt sich aus insgesamt drei Schichten zusammen: Epidermis, Dermis und Subkutis (Abb. 1.1 A). An der Oberfläche liegt die Epidermis, ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel, welche für die Barrierefunktion der Haut verantwortlich ist. Die Epidermis ist ein dynamisches Gefüge, welches kontinuierlich durch Zellteilung im Stratum basale (SB) und Wanderung der Keratinozyten in Richtung Hautoberfläche erneuert wird. Sie besteht hauptsächlich aus Keratinozyten, welche anhand ihrer Funktion und Morphologie wiederum in vier Schichten unterteilt werden (Abb. 1.1 B). Im Stratum basale (SB), dessen Zellen über Hemidesmosomen an der Basallamina befestigt sind, befinden sich die Stammzellen der Haut. Unter physiologischen Bedingungen ist dies die einzige Schicht, in der Proliferation stattfindet. Auf der Wanderung in Richtung Hautoberfläche durchleben die Keratinozyten morphologische und physiologische Veränderungen, sie differenzieren, und bilden unterschiedliche Zell-Zell-Kontakte. Diese Zell-Zell-Kontakte sind nicht permanent, sondern unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau. Die Differenzierung von Keratinozyten ist ein sehr komplexer, unidirektionaler, unter physiologischen Bedingungen, irreversibler Prozess (Candi et al. 2005). Der Differenzierungsgrad der Zellen geht mit der Synthese jeweils charakteristischer Proteine, den Cytokeratinen, einher, die als Differenzierungsmarker definiert wurden (Fuchs 1990). *In vitro* unterliegt die Expression der verschiedenen Cytokeratine einer strikten Regulation durch die extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Yuspa et al. 1989). Die undifferenzierten Keratinozyten des SB exprimieren die Cytokeratine 5 (CK5) und 14 (CK14). Die Keratinozyten des angrenzenden Stratum spinosum (SS) sind durch zahlreiche Desmosomen, vernetzt. Diese verleihen den Zellen ihre typische polygonale Form. Charakteristisch für die Keratinozyten des SS sind die sogenannten frühen Differenzierungsmarker CK1 und CK10. Die Keratinozyten des Stratum granulosum (SG) sind abgeflacht und enthalten Keratohyalin granula, die Profilaggrin enthalten, sowie

*lamellar bodies*, auch Odland-Körperchen genannt. Diese sind reich an Lipiden und Enzymen und werden an der Grenze vom SG zum Stratum corneum (SC) in den Interzellularraum sezerniert (Holleran et al. 2006). Das SC bildet die äußerste Schicht der Epidermis, es besteht aus sehr flachen Zellen, die weder Zellkern noch Organellen besitzen – den Korneozyten. Zudem werden in den differenzierten Schichten der Epidermis Involucrin, Loricrin und Filaggrin exprimiert (Watt 1983; Mehrel et al. 1990; Candi et al. 2005). Filaggrin spielt eine wichtige aber bisher noch nicht klar identifizierte Rolle in der Integrität und Barrierefunktion des SC (Irvine et al. 2011). Durch Quervernetzung entsteht der sog. *cornified envelope* (Polakowska und Goldsmith 1991; Reichert et al. 1993), welcher übermäßigen Wasserverlust verhindert, und vor dem Eindringen von Pathogenen schützt (Candi et al. 2005). Der Schutz vor äußeren Einflüssen, wie Strahlung, Chemikalien oder Pathogenen wird auch als *outside-in barrier* bezeichnet, der Schutz vor übermäßigem Wasserverlust als *inside-out barrier*. Zur Erfüllung dieser Barrierefunktion tragen neben dem SC auch die Tight junctions im SG bei (s. Kap. 1.2).

Neben den Keratinozyten finden sich in der Epidermis noch weitere Zelltypen, darunter Melanozyten, Merkel-Zellen, Lymphozyten und Langerhans-Zellen.



**Abbildung 1.1: Aufbau der Haut. (A)** Die Haut besteht aus Epidermis, Dermis und Subkutis. (modifiziert im Rahmen der CCC Annual License – Academic (Moll 2016)) **(B)** Die Epidermis setzt sich aus vier Schichten zusammen: An das Stratum basale, in dem die Proliferation stattfindet, schließen sich nach außen hin das Stratum spinosum, Stratum granulosum und das Stratum corneum an, in denen die Keratinozyten differenzieren und

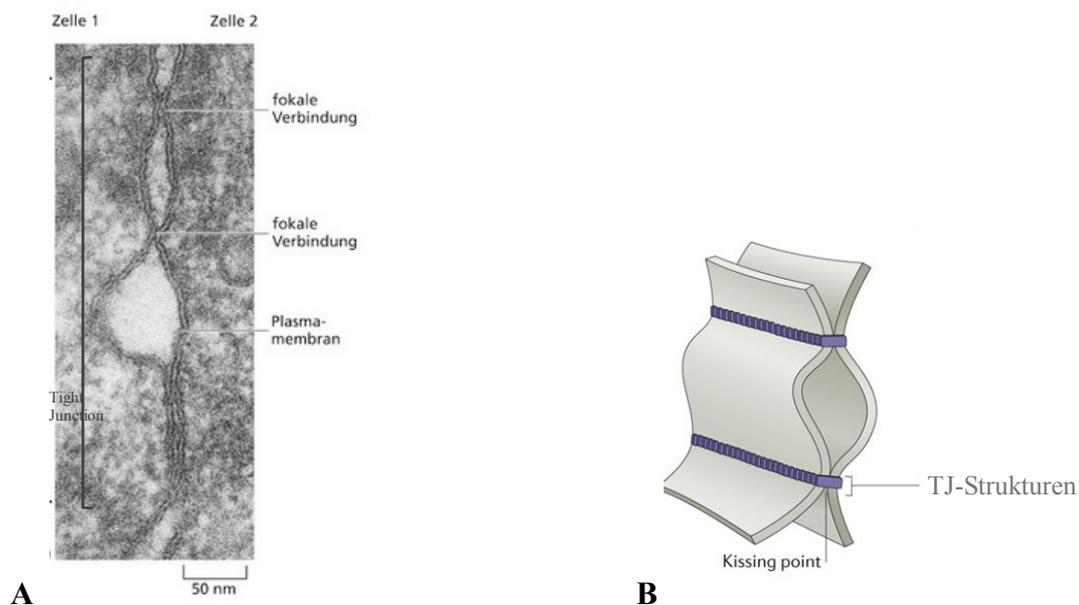
schließlich als Korneozyten abgeschilfert werden (Details s. 1.1). (modifiziert im Rahmen der CCC Annual License – Academic (Fritsch 2009))

## 1.2 Tight junctions

Tight junctions (TJs) sind Zell-Zell-Kontakte, die an der Barrierefunktion von Zellschichten beteiligt sind.

TJs setzen sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Transmembran- und Plaque-Proteine zusammen, welche intrazellulär eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellen. Die Zusammensetzung der TJs ist abhängig vom Differenzierungsstatus der Zelle, dem Zelltyp, sowie von weiteren physiologischen und pathologischen Einflüssen. Generell konnten bisher sowohl in humaner, als auch in muriner Epidermis diverse TJ-Proteine, darunter Cldn-1, Cldn-4, Occludin und ZO-1 lokalisiert werden (Brandner et al. 2015).

Die charakteristischen Tight-junction-Strukturen („*kissing points*“; Abb. 1.2) finden sich in der Haut an der apikalen Seite der lateralen Plasmamembran im SG (Brandner et al. 2002).



**Abbildung 1.2:** A Elektronenmikroskopische Aufnahme charakteristischer TJ-Strukturen im SG, sog. *kissing points*, örtliche Verbindungen mit einem direkten Membrankontakt zwischen zwei Zellen (modifiziert mit Erlaubnis von John Wiley and Sons Inc. aus Molekularbiologie der Zelle (Alberts 2011); Erlaubnis erteilt durch Copyright Clearance Center, inc.)

**B** Schematische Darstellung von TJ-Strukturen (modifiziert mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Molecular Cell Biology (Zihni et al. 2016)).

In der Haut konnte eine Barrierefunktion von TJs als *inside-out* Barriere für kleine (557 Da) und große (32 kDa) Moleküle (Furuse et al. 2002; Kirschner et al. 2010; Yoshida et al. 2013) und als *outside-in* Barriere für 45kDa FITC-Ovalbumin nach Störung der Barrierefunktion des SC nachgewiesen werden (Kubo et al. 2009). Die Permeabilität der TJ Barriere wird vorwiegend durch Claudine bestimmt (als Übersichtsartikel siehe Brandner und Schulzke 2015). Zudem erfüllen TJs vermutlich eine sogenannte Zaunfunktion (*fence function*), eine Diffusionsbarriere für Lipide innerhalb der Plasmamembran zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment (Ajaz et al. 2006; Schneeberger und Lynch 2004).

Die TJ-Proteine sind innerhalb der Epidermis unterschiedlich verteilt und liegen in der Haut auch außerhalb der TJ-Strukturen im SG vor, was auf eine zusätzliche, von diesen Strukturen unabhängige Rolle hindeutet (als Übersichtsartikel siehe Brandner und Schulzke 2015). Beispielsweise sind TJ-Proteine in die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten involviert (Kirschner und Brandner 2012).

Im Folgenden werden die beiden TJ Proteine Claudin-1 und ZO-1, die in dieser Arbeit untersucht wurden, genauer beschrieben.

### **1.2.1 Claudin-1 (Cldn-1)**

Claudin-1 (Cldn-1) ist ein Transmembranprotein, welches unter physiologischen Bedingungen in allen Schichten der Epidermis in humaner Haut und allen lebenden Schichten der Epidermis in Maushaut zu finden ist. (als Übersichtsartikel siehe Brandner und Schulzke 2015)

Cldn-1 ist von essenzieller Bedeutung für die Barrierefunktion der Haut. Ein Cldn-1 *Knock-out* führt in Mäusen zu einem deutlich erhöhten transepidermalen Wasserverlust (*transepidermal water loss*, TEWL), einem Parameter der *inside-out* Barriere, welcher bereits am ersten Tag post partum zum Tod der Mäuse führt (Furuse et al. 2002). Der Anstieg des TEWL ist Folge einer gesteigerten Permeabilität des SC (Sugawara et al. 2013), woran deutlich wird, dass Cldn-1 nicht nur Teil der TJ-Barriere ist (Kirschner et al. 2013), sondern zusätzlich die Barrierefunktion des SC beeinflusst. Dies konnte auch in humanen Keratinozyten gezeigt werden (Kirschner et al. 2013). *In vitro* ist Cldn-1 an der

Barrierefunktion der TJs in Keratinozyten für Calcium, Natrium, Chlorid, sowie für kleine und große Moleküle (bis zu 40 kDa) beteiligt (Kirschner et al. 2013).

In einer Studie aus dem Jahr 2011 wurde in nicht-läsionaler Haut nord-amerikanischer Patienten mit Atopischer Dermatitis auf mRNA- und Proteinebene eine verminderte Cldn-1-Expression gefunden und mit einer Störung der Barrierefunktion der Haut assoziiert (De Benedetto et al. 2011). Eine Verminderung der Cldn-1 Expression ist *in vitro* verbunden mit einem Anstieg der parazellulären Permeabilität und der Proliferation der Keratinozyten (De Benedetto et al. 2011).

In einer aktuellen Studie mit einer europäischen Kohorte von AD-Patienten, konnte eine verminderte Cldn-1-Expression in läsionaler Haut gezeigt werden. Allgemeine Veränderungen in nicht-läsionaler Haut konnten hier allerdings nicht bestätigt werden (Gruber et al. 2015).

### **1.2.2 Zonula Occludens protein 1 (ZO-1)**

ZO-1 ist ein Plaqueprotein, welches sich in der Epidermis unter physiologischen Bedingungen lediglich im SG/oberen SS befindet (Pummi et al. 2001, Brandner et al. 2002; Brandner et al. 2006). Auch ZO-1 ist wichtig für die Barrierefunktion von TJs in Keratinozyten für Calcium, Natrium, Chlorid, kleinere und größere Moleküle, was in *knock-down* Untersuchungen gezeigt werden konnte (Kirschner et al. 2013).

Diese *knock-down*-Ergebnisse deuten darauf hin, dass TJs einen Beitrag zur Bildung und Aufrechterhaltung des  $Ca^{2+}$ -Gradienten leisten. Auch die Arbeit von Kurasawa et al. 2011 unterstützt diese Hypothese. Er konnte an Hautmodellen zeigen, dass eine Störung der TJ-Barriere mit Natrium-Caprat zu einem Verlust des  $Ca^{2+}$ -Gradienten vom SB zum SG führt. Zudem fand sich eine erhöhte Anzahl proliferierender Zellen und eine Störung des Differenzierungsprozesses. Allerdings wurde in dieser Studie nicht die Expression von TJ-Proteinen untersucht. Darüber hinaus wirkt Natrium-Caprat nicht spezifisch auf die TJ-Barriere, sondern bewirkt über einen Phospholipase C vermittelten Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$  -Konzentration eine Kontraktion des Zytoskeletts, welches mit AJs und TJs verbunden ist. Durch das Zusammenziehen der Zelle und der daraus resultierenden Erweiterung des interzellulären Spalts verringert sich indirekt die parazelluläre Abdichtung durch TJs.

### 1.3 Atopische Dermatitis

Die Atopische Dermatitis (AD; Synonyme: Atopisches Ekzem, Neurodermitis) ist eine chronisch-rezidivierende inflammatorische Hauterkrankung, welche häufig mit Asthma bronchiale und anderen Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis einhergeht (als Übersichtsartikel siehe Bieber 2008).

AD betrifft vor allem Kinder. Die Prävalenz unter Kindern in Europa liegt in etwa zwischen 10-20%, wobei diese sowohl in Abhängigkeit vom Alter als auch in den unterschiedlichen Ländern variiert (Ring et al. 2010; Asher et al. 2006; Schlaud et al. 2007).

Charakteristisch für die AD (läsionale Haut) ist eine ekzematöse, trockene Haut mit starkem Juckreiz (Abb. 1.3).



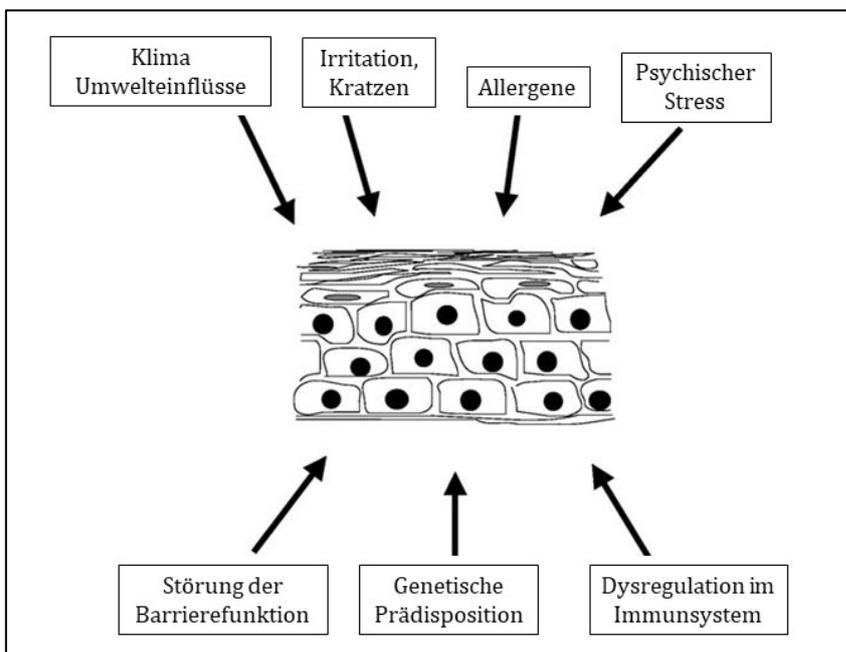
**Abbildung 1.3:** Charakteristisches atopisches Ekzem an der Beuge-Seite beider Arme (modifiziert mit Erlaubnis von Elsevier: Journal of Dermatological Science (Proksch et al. 2006))

Das histologische Bild eines atopischen Ekzems ist in seiner Ausprägung abhängig von der Akuität der Läsion. Veränderungen in der Epidermis umfassen ein interzelluläres Ödem (Spongiose), eine Verbreiterung des Stratum spinosum (Akanthose) sowie eine verstärkte Verhornung (Hyperkeratose). In der Dermis ist ein in erster Linie perivaskuläres, vorwiegend lymphozytäres Infiltrat zu beobachten, in dem sich vereinzelt auch eosinophile Granulozyten befinden (Ring 2012). Auch in klinisch unauffälliger Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis (nicht-läsionale Haut) besteht ein spärliches perivaskuläres T-lymphozytäres Infiltrat (Mihm et al. 1976). Zudem findet sich bei etwa 60% der Patienten eine erhöhte IgE-Konzentration im Serum (extrinsische atopische Dermatitis).

Wichtige Differenzialdiagnosen der atopischen Dermatitis sind andere Ekzem-Erkrankungen wie das allergische oder irritativ-toxische Kontaktekzem, das nummuläre

Ekzem und bei Säuglingen vor allem das seborrhoische Ekzem (Übersicht in Williams 2005). Weiterhin sind Hautmanifestationen im Rahmen von Immundefektsyndromen, Psoriasis sowie infektiöse Ursachen wie Scabies und Tinea zu berücksichtigen, bei Erwachsenen sollte zusätzlich an das Ekzemstadium des kutanen T-zell-Lymphoms gedacht werden. (Werfel et al. (2016) Leitlinie JDDG)

Die Pathogenese der Atopischen Dermatitis ist bisher lediglich in Ansätzen verstanden. Es handelt sich um eine multifaktorielle Erkrankung, welche eine genetische Prädisposition, eine Störung der Barrierefunktion der Haut, sowie eine Dysregulation des Immunsystems mit einschließt. Die Exposition gegenüber Umweltfaktoren spielt ebenfalls eine Rolle (Abb. 1.4); bestimmte genetische Veränderungen werden erst in Verbindung mit bestimmten Umwelteinflüssen klinisch relevant.



**Abbildung 1.4:** Darstellung relevanter Faktoren in der Pathogenese der Atopischen Dermatitis (modifiziert mit Erlaubnis von Elsevier: Journal of Dermatological Science (Proksch et al. 2006))

Die Beeinträchtigung der Barrierefunktion der Haut in AD findet sich auf zwei Ebenen:

- (i) Die äußere Barriere, das Stratum corneum, weist eine Verminderung von Ceramiden, Wasserverlust-vorbeugenden Lipiden auf (Sator et al. 2003). Zudem zeigten IHC und ELISA assays eine verminderte Expression von Filaggrin (FLG), einem wichtigen Struktur-Protein des SC, in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von AD-Patienten (Seguchi et al. 1996; Jensen et al.

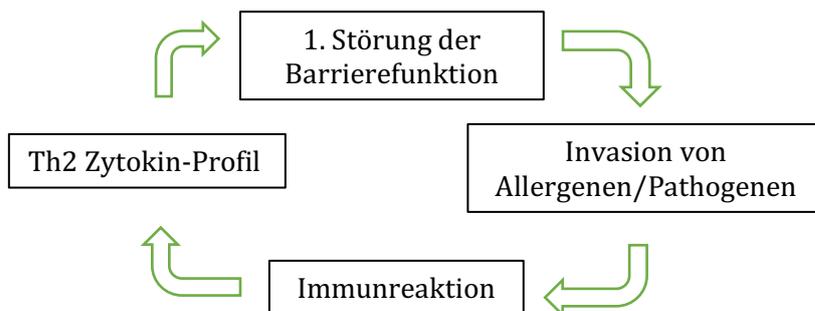
2004), wofür es verschiedene Gründe gibt. So stellen *Loss-of-function*-Mutationen im Profilaggrin/FLG-Gen (EDC, 1q21) einen wichtigen prädisponierenden Faktor für die Entwicklung einer Atopischen Dermatitis dar (Palmer et al. 2006). Sie finden sich jedoch nur bei etwa einem Drittel europäischer AD-Patienten (Rodriguez et al. 2009). Auch das Zytokinprofil (IL-4 und IL-13 (Howell et al. 2009); IL-25 (Deleuran et al. 2012)) sowie exogene Faktoren können, unabhängig vom Mutationsstatus, eine Verminderung der Filaggrin-Expression bewirken (Übersicht siehe Thyssen und Kezic 2014).

- (ii) Eine Beeinträchtigung der sekundären Barriere, der Tight junctions im SG, wird ebenfalls diskutiert. Eine Herabregulation von Cldn-1 und Cldn-23 fand sich in nicht-läsionaler Haut von AD-Patienten einer Nordamerikanischen Kohorte (De Benedetto et al. 2011). De Benedetto et al. konnten auch eine präliminäre Assoziation verschiedener SNPs mit dem Risiko, dem Zeitpunkt des Auftretens und dem Schweregrad der AD in einer afroamerikanischen Kohorte beobachten (De Benedetto et al. 2011). Eine Untersuchung in einer dänischen Kohorte fand diesen Zusammenhang nicht (Ross-Hansen et al. 2013), aber in einer äthiopischen Kohorte konnte der Zusammenhang ebenfalls festgestellt werden (Asad et al. 2016).

Ein weiterer Faktor, der die Barrierefunktion der Haut beeinträchtigt, ist eine gestörte Differenzierung der Keratinozyten. In der Haut von AD-Patienten finden sich Veränderungen in der Expression von Keratinen: das Markerprotein für undifferenzierte Keratinozyten, K5, ist bereits in nicht-läsionaler Haut in suprabasalen Schichten zu finden, was sich in läsionaler Haut bis einschließlich ins SG ausdehnt (Proksch et al. 2006); der Differenzierungsmarker K10 ist in läsionaler Haut in den unteren Schichten des SS reduziert (Proksch et al. 2006).

Aufgrund der gestörten Barrierefunktion können Allergene und Pathogene leichter in die Haut eindringen, wodurch eine lokale Immunreaktion ausgelöst und aufrechterhalten wird. Zudem produzieren Keratinozyten inflammatorische Botenstoffe, wie Chemokine, welche eine Entzündung der Haut initiieren, verstärken und unterhalten können (Elias 2005). Keratinozyten in läsionaler Haut produzieren vermehrt das Zytokin TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) (Fritsch 2009), welches die Aktivierung und Auswanderung von Langerhans-Zellen in regionäre Lymphknoten fördert. Dort induzieren sie vorzugsweise

eine TH2-dominierte Immunantwort. Damit verbunden ist ein charakteristisches Zytokin-Profil in der Haut, welches eine erhöhte Produktion von IL-4, IL-13 und IL-31 mit einschließt (Williams 2005; Hänel et al. 2013). TSLP und IL-31 scheinen Nervenendigungen zu stimulieren, die in das Empfinden von Juckreiz involviert sind. (Misery 2014) Die Konsequenzen der *Downstream*-Effekte dieser Zytokine und ihre Wechselwirkungen sind bisher jedoch nur ansatzweise verstanden. Bekannt ist, dass sie die Barrierefunktion zusätzlich beeinträchtigen und somit das inflammatorische Milieu weiter stärken – ein Teufelskreis (Hänel et al. 2013). (Abb. 1.5)



**Abbildung 1.5: Wechselwirkung von Barrierefunktion und Immunsystem in der AD.**

Die gestörte Barrierefunktion der Haut erleichtert das Eindringen von Allergenen und Pathogenen, welche eine Immunreaktion auslösen. Diese Immunantwort ist TH-2-dominiert, und schließt ein charakteristisches Zytokin-Profil in der Haut mit ein. Diese Zytokine bedingen eine zusätzliche Beeinträchtigung der Barrierefunktion und stärken somit das inflammatorische Milieu – ein Teufelskreis.

Die Therapie der AD ist symptomorientiert und wird anhand der klinischen Ausprägung, des Alters, der Lokalisation und des Leidensdruckes individuell zusammengestellt. Neben einer dem Hautzustand angepassten Basistherapie, kann in Abhängigkeit der oben genannten Parameter eine lokale Applikation von Glukokortikoiden und Calcineurininhibitoren (Tacrolimus und Pimecrolimus) zur Eindämmung der Immunreaktion erfolgen. Bei Nichtansprechen auf diese Therapie und/oder einer bakteriellen Superinfektion können zusätzlich antimikrobielle Substanzen eingesetzt werden. In besonders schweren Fällen kann eine systemische Immunsuppression nötig sein, beispielsweise mit dem Calcineurininhibitor Ciclosporin. Eine adjuvante Phototherapie (UVA-1, UVB-Schmal- oder Breitband, Balneo-PUVA) ist ebenfalls möglich. Aktuell wird auch der Einsatz von Biologika diskutiert, für den die Studienlage

jedoch noch unzureichend ist. Daneben existieren zahlreiche weitere Therapieansätze. (Details zu aktuellen Therapieempfehlungen siehe Leitlinie JDDG Werfel et al. 2016)

#### **1.4 Atopic Dermatitis-like Allergic Dermatitis (AID) Mausmodell**

Im AID-Mausmodell wird über eine Sensibilisierung durch Ovalbumin und anschließende kutane Exposition eine Immunreaktion induziert.<sup>1</sup> Diese Immunreaktion wird deutlich an einem Anstieg der IgE-Konzentration im Serum, sowie einem dermalen Infiltrat. Die typische Th2-dominierte Immunreaktion spiegelt sich im Zytokinprofil, darunter IL-4, sowie im IgE-Level, wider (Pavlovic et al. 2008; Peters et al. 2011). Im Verlauf treten zudem weitere histologische Charakteristika eines Ekzems in den entsprechenden Arealen der Haut auf, darunter Hyperkeratose, Spongiose und Akanthose, eine Verdickung der Epidermis.

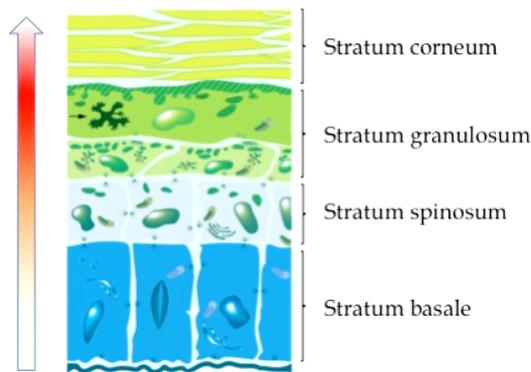
Dieses Modell repräsentiert vorwiegend immunologische Komponenten der humanen Atopischen Dermatitis. Anders als in der Pathogenese der AD, von der inzwischen vermutet wird, dass die Störung der Barrierefunktion den immunologischen Veränderungen vorausgeht, steht in diesem Modell die induzierte Immunreaktion an erster Stelle. Diese führt dann allerdings zur Beeinträchtigung der Barrierefunktion und damit zum oben genannten Teufelskreis. Die in Atopischer Dermatitis vorhandene Störung der epidermalen Balance von Proliferation und Differenzierung konnte auch in diesem Mausmodell gezeigt werden. Diese zeigt sich in einer Verbreiterung der Expression von K14, dem Marker für undifferenzierte Zellen, sowie einem in höhere Schichten verschobenen Beginn der Expression des frühen Differenzierungsmarkers K10 (Gruber et al. 2015).

#### **1.5 Der Ca<sup>2+</sup>-Gradient in der Haut**

Die Epidermis weist einen charakteristischen Ca<sup>2+</sup>-Gradienten auf. Kennzeichen dieses Gradienten sind eine niedrige Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Stratum basale und unteren Stratum spinosum, die zur Haut-Oberfläche hin bis zu ihrem Maximum im Stratum granulosum ansteigt und im daran anschließenden Stratum corneum wieder abfällt (als Übersichtsartikel siehe Bikle et al. 2012; Abb. 1.6).

---

<sup>1</sup> Eine ausführliche Beschreibung der Methodik findet sich in Kapitel 3.1



**Abbildung 1.6: Ca<sup>2+</sup>-Gradient.** Der epidermale Ca<sup>2+</sup>-Gradient ist charakterisiert durch eine niedrige Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Stratum basale und im unteren Stratum spinosum, welche bis in die oberen Schichten des Stratum granulosum ansteigt und im Stratum corneum wieder sinkt. Die Farbintensität des Pfeils veranschaulicht die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, wobei eine Zunahme der Intensität einer Zunahme der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration entspricht. (modifiziert mit Erlaubnis von Taylor & Francis: Bikle et al. 2012)

Seit Ende der 80er Jahre wurde dieser Gradient anhand verschiedener Methoden in muriner und humaner Haut dargestellt. Hierzu gehören die *Ion capture cytochemistry* (Menon et al. 1985 (murine Haut); Menon und Elias 1991 (humane Haut)), PIXE (*Proton-induced X-ray emission*)-Analysen (Pallon et al. 1996; Elias et al. 1998; Mauro et al. 1998), sowie Studien unter Verwendung von Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen (Denda et al. 2000). Die Studien zeigen einen gesamten Ca<sup>2+</sup>-Gradient, der sowohl freies als auch gebundenes Ca<sup>2+</sup> mit einschließt. Im Jahr 2010 wurde der Ca<sup>2+</sup>-Gradient in unfixierter humaner Epidermis *ex vivo* durch 2-Photonen-FLIM-Messungen bestätigt (Celli et al. 2010). In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass der Ca<sup>2+</sup>-Gehalt unter den Keratinozyten des SB variabel ist, und dass einige von ihnen einen ähnlich hohen Ca<sup>2+</sup>-Gehalt aufweisen wie Keratinozyten im SS. Zudem wurde deutlich, dass sich ein Großteil des Calciums intrazellulär befindet. Mit Hilfe von FLIM-Messungen konnte der Calcium-Gradient auch in muriner Epidermis gezeigt werden (Börnchen 2013; siehe auch Kapitel 1.6).

Es wurde postuliert, dass der epidermale Ca<sup>2+</sup>-Gradient mit der Barrierefunktion der Haut assoziiert ist. Die Entstehung dieses Gradienten tritt im Kaninchen in Verbindung mit entscheidenden Prozessen in der Ontogenese der Hautbarriere auf (Elias et al. 1998). Zudem ist die Integrität der Hautbarriere wichtig für die Aufrechterhaltung des Ca<sup>2+</sup>-Gradienten (Menon et al. 1994). Es wird angenommen, dass das Ca<sup>2+</sup>-Reservoir der

Epidermis durch calciumhaltige Flüssigkeitsströmungen aus der Dermis aufgefüllt wird und sich u.a. auf diesem Weg in Richtung Hautoberfläche bewegt (Menon et al. 1994).

Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten wurden bereits mit einigen Erkrankungen der Haut assoziiert, welche mit einem gestörten Differenzierungsprozess einhergehen. In läsionaler psoriatischer Haut fand sich weniger extrazelluläres Calcium im SB und eine höhere Calciumkonzentration in den suprabasalen Schichten (Menon und Elias 1991), in nicht-läsionaler psoriatischer Haut sowie in atopischer Haut zeigte sich ebenfalls eine etwa zweifach höhere Calciumkonzentration im SG (Pallon et al. 1996). Bezüglich der Analysen an atopischer Haut wurde bei Pallon et al. nicht spezifiziert, ob es sich um läsionale oder nicht-läsionale Haut handelt.

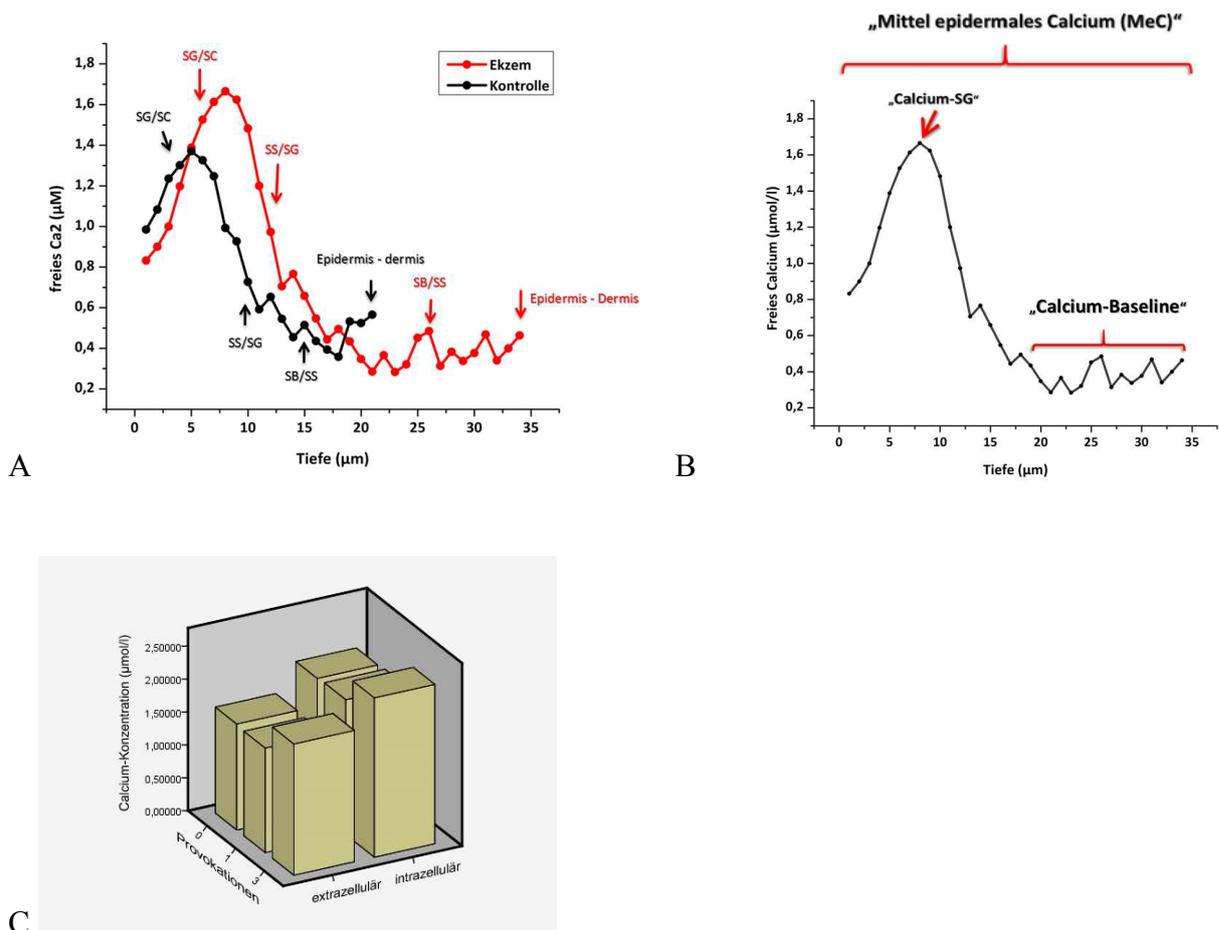
Zudem sind bestimmte Mutationen in Genen, die für intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen codieren, Ursache hereditärer Erkrankungen der Haut, wie *Hailey-Hailey Disease* (HHD) und *Darier Disease* (DD) (Foggia und Hovnanian 2004). Diese Erkrankungen werden durch inaktivierende Mutationen im ATP2C1 (*ATPase type 2c member 1*) Gen in HHD, welches für die *secretory pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase 1* (SPCA1) codiert (Hu et al. 2000; Sudbrak et al. 2000) und im ATP2A2 Gen in DD, welches für die *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2* (SERCA2) codiert (Sakuntabhai et al. 1999), verursacht.

## 1.6 Der $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient im AID-Mausmodell

Wie bereits oben erwähnt, konnte auch in muriner Haut mit Hilfe von 2-Photonen-Mikroskopie der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient bestätigt werden. Dabei zeigt sich im SB/unteres SS eine niedrige Calcium-Konzentration („Calcium-Baseline“), danach steigt die Calcium-Konzentration kontinuierlich bis zum SG an und fällt dann zum SC hin wieder ab (Börnchen 2013, Abb. 1.7). Der Gradient im Ekzem des AID-Mausmodells sieht prinzipiell ähnlich aus, allerdings ist der Bereich, in dem niedrige Calcium-Konzentrationen gemessen wurden („Calcium-Baseline“) länger, und der *peak* im SG ist höher. Die Verlängerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Baseline im Ekzem korreliert mit einer breiteren Expression von CK14, dem Marker für undifferenzierte Keratinozyten, und einer verspäteten CK10-Expression (Börnchen 2013).

Gemessen wurde das Gesamt-Calcium, d.h. gemittelte Werte zwischen extrazellulären und intrazellulären Bereichen. Im SG war es auch möglich, intra- und extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$

zu unterscheiden und es konnte gezeigt werden, dass im Ekzem beide Werte ansteigen (Abb. 1.7 B).



**Abbildung 1.7: Ca<sup>2+</sup>-Parameter im AID-Mausmodell (A)** Darstellung des Ca<sup>2+</sup>-Gradienten im AID-Mausmodell in Kontrollhaut (schwarz) und im Ekzem (rot). Auffallend ist eine erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Stratum granulosum, sowie eine Verlängerung der Ca<sup>2+</sup>-Baseline im Ekzem. **(B)** Veranschaulichung der im AID-Mausmodell charakterisierten Komponenten des ermittelten Ca<sup>2+</sup>-Gradienten. „Calcium-SG“ beschreibt die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Stratum granulosum. Die „Calcium-Baseline“ ist die Strecke ohne Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beginnend an der Grenze von Dermis und Epidermis. Das mittlere epidermale Calcium (MeC) ist die mittlere Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der gesamten Epidermis **(C)** Darstellung der extra- und intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG in Abhängigkeit von der Anzahl der Provokationen. (modifiziert nach Börnchen 2013)

## 1.7 Ca<sup>2+</sup>-Signaling und die Bedeutung von Ca<sup>2+</sup> für Proliferation und Differenzierung

Ca<sup>2+</sup> spielt in einer Vielzahl essenzieller Prozesse im Körper eine zentrale Rolle, beispielsweise in der Zellzykluskontrolle, Proliferation und Differenzierung von Zellen sowie beim Zelltod (Clapham 1995; Berridge et al. 2000). Zusammenfassend könnte man sagen, Ca<sup>2+</sup> reguliert Leben und Tod einer Zelle. Dieser Abschnitt soll einen kleinen Einblick in die für diese Arbeit wichtigen Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Signalwege geben.

Anfang der 80er Jahre haben *in vitro* Studien gezeigt, dass die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im Medium ausschlaggebend für Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten ist. Während Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen von 0,05-0,1 mM die Proliferation fördern, induziert ein sog. Ca<sup>2+</sup>-*switch* zu über 1,2 mM die Differenzierung der Keratinozyten (Hennings et al. 1980). Ein Anstieg der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wird über den *Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor* (CaR), ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der in der Plasmamembran lokalisiert ist, registriert (Tu et al. 2004). Der CaR spielt eine essenzielle Rolle in der Initiierung intrazellulärer Signalwege zur Förderung der Differenzierung als Reaktion auf den Anstieg der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Oda et al. 1998).

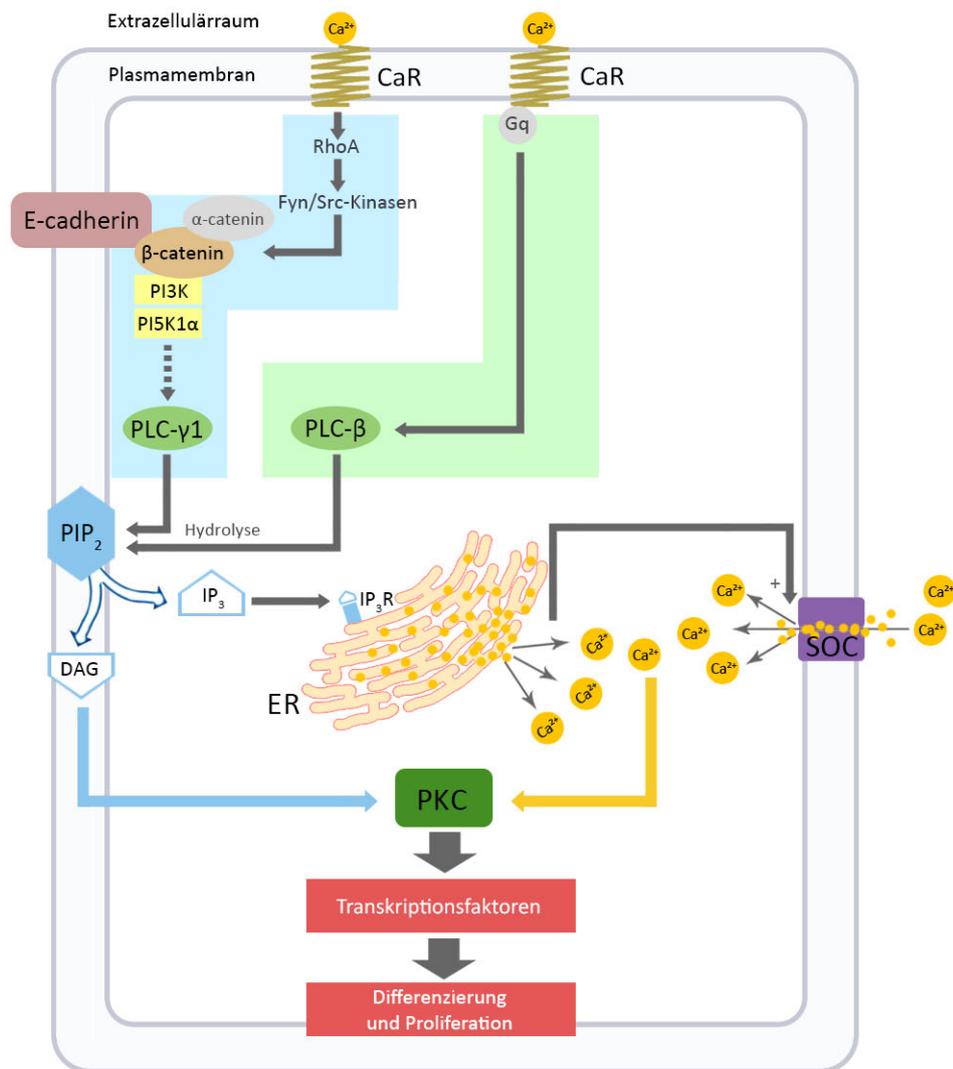
Der CaR aktiviert über ein Gq-Protein die Phospholipase C (PLC) und ermöglicht parallel über RhoA und Src/Fyn-Kinasen (Calautti et al. 1998; 2002) die Bildung des E-cadherin-catenin-Komplexes. Der Anstieg der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration induziert auf diese Weise die E-cadherin-abhängige Zell-Zell-Adhäsion (Hennings und Holbrook 1983). Der Zusammenhalt der Zellen innerhalb eines Gewebes ist wichtig für das Agieren als funktionelle Einheit. *In vitro* führt eine Inhibition des CaR zu einer Störung der E-cadherin-vermittelten Etablierung von Zell-Zell-Kontakten, sowie der Ca<sup>2+</sup>-induzierten Differenzierung (Tu et al. 2008).

Die Anbindung von E-cadherin an das Aktin-Netzwerk wird über  $\alpha$ -catenin vermittelt, wobei E-cadherin und  $\alpha$ -catenin über  $\beta$ -catenin miteinander interagieren. Dieser Proteinkomplex rekrutiert zwei wichtige Enzyme, PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und PIP5K1a (Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-kinase, Typ I), an die Plasmamembran, welche dort die Synthese von PIP<sub>3</sub> und PIP<sub>2</sub>, Substrate der PLC- $\gamma$ 1, sicherstellen (Xie und Bikle 2007). PLCs spalten PIP<sub>2</sub> in die *second messenger* IP<sub>3</sub> und DAG. IP<sub>3</sub> fördert die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER, wodurch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steigt. Dieser Anstieg besteht aus zwei Komponenten: der Ca<sup>2+</sup> Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie dem darauf folgenden Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über

Calciumkanäle in der Plasmamembran (Berridge und Irvine 1984), dem sogenannten *Store-operated calcium entry* (SOCE).

Das Konzept des SOCE wurde erstmals in den 1980er Jahren von Jim Putney vorgestellt – zu damaliger Zeit als „*capacitative calcium entry*“-Hypothese bezeichnet (Putney 1986). Der SOCE ermöglicht eine Verlängerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in der Zelle, sowie ein Wiederauffüllen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher. Putney konnte an exokrinen Zellen zeigen, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum nicht direkt durch  $\text{IP}_3$ , sondern vielmehr durch das  $\text{IP}_3$ -vermittelte Leeren der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher vermittelt wird (Putney 1990). Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum wurde daraufhin als  $I_{\text{CRAC}}$  (*Ca<sup>2+</sup>-release-activated Ca<sup>2+</sup> current*) bezeichnet (Hoth und Penner 1992) und der zugehörige Calciumkanal in der Plasmamembran, wurde entsprechend *CRAC channel* genannt. Der  $I_{\text{CRAC}}$  wurde zunächst in Zellen des Immunsystems, den T-Zellen und Mastzellen (Hoth und Penner 1992; 1993), in Endothelzellen (Fasolato und Nilius 1998), Fibroblasten (Gwack et al. 2007) und schließlich auch in Keratinozyten (Vandenberghe et al. 2013) entdeckt. Es wird angenommen, dass der SOCE der wichtigste  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in Zellen ist (als Übersichtsartikel siehe Parekh und Putney 2005), so auch in Keratinozyten.

Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und von DAG (s.o.) bewirkt eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), wodurch Transkriptionsfaktoren der Fos/Jun Familie aktiviert werden, welche an AP-1 Sequenzen bestimmter Gene binden, die in den Differenzierungsprozess der Keratinozyten involviert sind (Ng et al. 2000). (Abb. 1.8).



**Abbildung 1.8:** Vermittlung extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale in intrazelluläre Signalwege

## 1.8 Calcium-Kanäle

Calciumkanäle sind Transmembranproteine mit Poren, welche eine unterschiedliche Selektivität für Calciumionen aufweisen. Sie können in spannungsabhängige Calciumkanäle (*Voltage-gated calcium channels, VGCCs*), Liganden-regulierte (*Ligand-gated oder receptor-operated*) Calciumkanäle (ROCCs), *Store-operated calcium channels* (SOCCs) und *Stretch-activated calcium channels* eingeteilt werden. Spannungsabhängige Kanäle öffnen sich durch Änderung des Membranpotenzials. Die Öffnung Liganden-regulierter Kanäle erfolgt über eine Konformationsänderung resultierend aus der Bindung eines passenden Liganden. Hierzu gehören beispielsweise  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren. Hiervon werden *Store-operated calcium channels* (SOCCs) unterschieden, welche nicht direkt

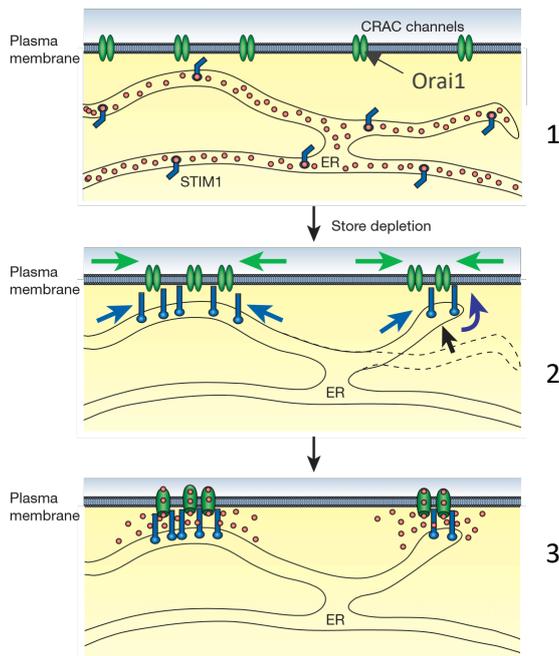
durch Bindung eines Liganden, sondern durch das daraus resultierende Leeren intrazellulärer Calciumspeicher aktiviert werden. Zu den SOCs gehört u.a. der CRAC-Kanal und vermutlich auch TRPC1, welche in Kapitel 1.8 näher vorgestellt werden (als Übersichtsartikel siehe Parekh und Putney 2005; Lewis 2007). TRP-Kanäle stellen eine heterogene Gruppe dar, sie können durch unterschiedliche Stimuli aktiviert werden, und können daher nicht allein einer der oben genannten Gruppen zugeordnet werden.

### 1.8.1 Orai1 / CRAC-Kanal

Orai1-Proteine sind in der Plasmamembran lokalisierte Untereinheiten der CRAC (*Ca<sup>2+</sup>-release-activated Ca<sup>2+</sup>*)–Kanäle (Prakriya et al. 2006). CRAC-Kanäle gehören zu den SOCs besitzen jedoch gegenüber anderen SOCs besondere Eigenschaften. Charakteristisch für CRAC-Kanäle ist ihre extrem hohe  $Ca^{2+}$ -Selektivität, die unter physiologischen Bedingungen bei mehr als 1000:1 gegenüber  $Na^{+}$  liegt. Hiermit zählen CRAC-Kanäle zu den  $Ca^{2+}$ -selektivsten Kanälen überhaupt (Hoth und Penner 1993; Parekh und Penner 1997). Sie sind am SOCE in verschiedenen Zelltypen beteiligt.

CRAC-Kanäle spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem, unter anderem bei der Aktivierung von T-Lymphozyten. Das Fehlen des  $I_{CRAC}$  durch eine *Missense*-Mutation in dem Gen, welches für das Protein Orai1 codiert, ist verantwortlich für schwerwiegende Immundefekte (SCID, *severe combined immunodeficiency syndrome*) (Feske et al. 2006).

Die Regulierung von Orai1 wird über STIM1, den  $Ca^{2+}$ -Sensor des ER, vermittelt (Liou et al. 2005; Roos et al. 2005). Ein Absinken der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im ER, einem wichtigen  $Ca^{2+}$ -Speicher in Zellen, führt über eine STIM1-initiierte Interaktion mit Orai1 zu einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum durch die CRAC-Kanäle in der Plasmamembran (Luik et al. 2006; Xu et al. 2006) (Abb. 1.9).  $Ca^{2+}$ -Pumpen in der Membran des ER, die SERCAs, füllen den ER- $Ca^{2+}$ -Speicher wieder auf, woraufhin der Komplex aus Orai1 und STIM1 wieder dissoziiert.



**Abbildung 1.9:** Interaktion von STIM1 und CRAC-Kanälen. (1) Ist der ER- $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher gefüllt, sind die STIM1-Moleküle in der Membran des ER verteilt. (2) Durch Leeren des Speichers sinkt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER, woraufhin die STIM1-Moleküle oligomerisieren und zu *ER-PM-junctions*, Regionen, in denen die Membran des ER und die Plasmamembran der Zelle sehr nah beieinander liegen, translozieren. (3) Dort interagieren sie mit in der Plasmamembran lokalisierten Orai1-Proteinen und ermöglichen somit einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die CRAC-Kanäle aus dem Extrazellulärraum (modifiziert mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: Nature (Lewis 2007)).

Orai1 findet sich in Maushaut vor allem in Keratinozyten des SB und des SS, sowie in Haarfollikeln (Gwack et al. 2008). Auf zellulärer Ebene befindet sich Orai1 an den Zellgrenzen, was eine Lokalisation in der Plasmamembran unterstützt (Gwack et al. 2008). Studien an humaner Haut bzw. an humanen Zellen zeigen unterschiedliche Ergebnisse zur Orai1-Expression im Verlauf zunehmender Differenzierung. In humaner Haut zeigen Immunhistochemie (IHC) und q-PCR eine Orai1-Expression in allen Schichten, die stärkste Expression findet sich in den undifferenzierten Keratinozyten des SB (Darbellay et al. 2014; Vandenberghe et al. 2013).

Die physiologischen Funktionen von Orai1 in humaner Haut sind Gegenstand aktueller Forschung. Orai1 ist entscheidend für die Migration von primären normalen humanen Keratinozyten (NHEKs) (Vandenberghe et al. 2013). Es steuert in diesem Zusammenhang den Auf- und Abbau von Zell-Matrix-Kontakten, den *Focal adhesion turnover*, welcher als Teil der Reorganisation des Zytoskeletts eine Grundlage der Bewegung einer Zelle im

Raum darstellt. Orai1 und STIM1 spielen zudem *in vitro* eine fördernde Rolle in der Proliferation von Keratinozyten und in der Ca<sup>2+</sup>-*switch*-induzierten Suppression des Zellwachstums durch Aktivierung des NFAT-Signalweges (Numaga-Tomita und Putney 2013; Santini et al. 2001). In Mäusen induzierte die Applikation von BHQ (Benzohydroquinone), welches zu einer indirekten Aktivierung von Orai1 führt, eine epidermale Hyperplasie (Darbellay et al. 2014). Orai1 nimmt somit im Rahmen der Proliferationskontrolle auch Einfluss auf die Epidermisdicke. Dies scheint vor allem in alters- oder Corticosteroid-bedingter Atrophie der Epidermis zum Tragen zu kommen (Darbellay et al. 2014; Kommentar siehe Bikle und Mauro 2014). So wurde der *Knock-out* (Gwack et al. 2008) sowie der siRNA-vermittelte *Knockdown* von Orai1 (Darbellay et al. 2014) in Mäusen mit einer epidermalen Atrophie assoziiert, und auch in humaner Haut ist im Rahmen einer Alters-Atrophie die Orai1-Expression im SB deutlich verringert (Darbellay et al. 2014). Die proliferationsfördernde Wirkung von Orai1 konnte auch in NHEKs gezeigt werden (Darbellay et al. 2014).

Orai1-vermittelter SOCE scheint auch in den Beginn des Differenzierungsprozesses involviert zu sein. In HaCaT-Zellen führte ein Orai1 *knockdown* zu einer signifikant verminderten Ca<sup>2+</sup>-switch induzierten Expression des frühen Differenzierungsmarkers K1 auf mRNA Ebene (Numaga-Tomita und Putney 2013). Zudem scheint Orai1 *in vitro* für die Füllung von Ca<sup>2+</sup>-Speichern in undifferenzierten Keratinozyten wichtig zu sein, unter höherer extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zeigte sich jedoch kein Unterschied im Ca<sup>2+</sup>-Gehalt der Speicher bei unterschiedlicher Orai1-Expression (Numaga-Tomita und Putney 2013).

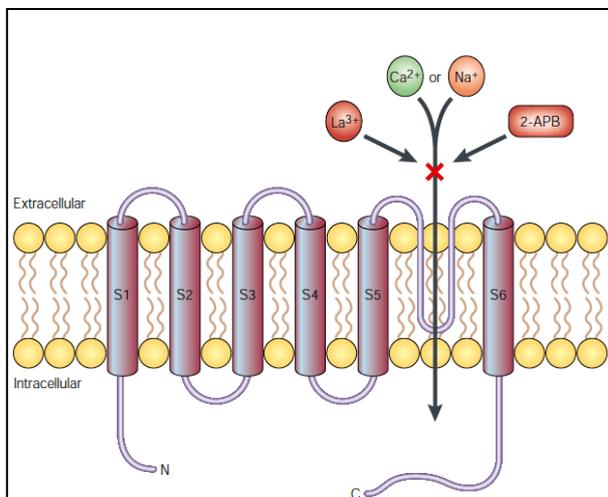
In Studien wurde außerdem gezeigt, dass Orai1-vermittelter SOCE für die Rekrutierung von TRPC1, einem ebenfalls in den SOCE verwickelten Ca<sup>2+</sup>-Kanal (siehe Kapitel...), in die Plasmamembran verantwortlich ist und dass ein Orai1-knockdown oder eine nicht-funktionale Orai1-Variante zu einer verminderten Lokalisation von TRPC1 in der Plasmamembran führt (Cheng et al. 2011).

Orai1-Polymorphismen scheinen mit der Anfälligkeit für Atopische Dermatitis assoziiert zu sein (Chang et al. 2012). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Orai1-vermittelter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Keratinozyten die Sekretion von TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) reguliert, welches über die Aktivierung von TRPA1 in sensorischen Neuronen in die Entstehung von Pruritus in der Pathogenese von AD involviert ist (Wilson et al. 2013). Über die Veränderung der Lokalisation/Expression von Orai1 in der Haut von Patienten mit AD ist nach meinem Wissen bisher nichts bekannt.

### 1.8.2 TRP-Kanäle (*Transient receptor potential channels*)

Die TRP-Kanäle sind eine umfangreiche Familie nicht-selektiver Kationenkanäle, die in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe vorkommen und vielfältige physiologische Funktionen übernehmen.

Die humane TRP-Kanal-Familie wird in sieben Unterfamilien gegliedert: TRPC (classic/canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (ANKTM1), TRPN (NOMPC), TRPML (mucolipidin) und TRPP (polycystin) (als Übersichtsartikel siehe Clapham et al. 2001; Moran et al. 2011). Die Untereinheiten der TRP-Kanäle bestehen, wie die meisten Ionenkanäle, aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6), wobei S5 und S6 an der Bildung der Kanalpore beteiligt sind. Die N- und C-terminalen Motive variieren je nach Unterfamilie. Die funktionellen TRP-Kanäle können sowohl Homo- als auch Heterotetramere sein (Moran et al. 2011) (Abb. 1.10).



**Abbildung 1.10: Aufbau von TRP-Kanälen.** Die Untereinheiten der TRP-Kanäle bestehen aus sechs Transmembransegmenten (S1-S6), von denen S5 und S6 an der Bildung der Kanalpore beteiligt sind. Die N- und C-terminalen Motive variieren je nach TRP-Unterfamilie. TRP-Kanäle können unspezifisch durch Lanthanum-Ionen ( $La^{3+}$ ) und 2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-APB) gehemmt werden (verwendet mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Neuroscience (Clapham et al. 2001)).

TRP-Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Wahrnehmung, sowohl im Nervensystem (Moran et al. 2004), als auch in der Haut (Denda und Tsutsumi 2011), und stellen somit eine wichtige Verbindung des Körpers mit der Umwelt dar. Einige Mitglieder der TRP-Kanäle werden zudem als potenzielle SOCs diskutiert (Venkatachalam et al. 2002). TRP-Kanäle sind in zahlreiche pathologische Prozesse involviert (Nilius und Owsianik 2010).

Hier werden nur diejenigen Kanäle näher besprochen, die für diese Arbeit relevant sind.

### **1.8.2.1 Transient Receptor Potential Canonical/Classic Channel 1 (TRPC1)**

TRPC1 ist an einer Reihe wichtiger physiologischer Prozesse beteiligt. In der Haut spielt TRPC1 eine Rolle in der Differenzierung der Keratinozyten. TRPC1 *knockdown* in HaCaT-Zellen bewirkt eine signifikante Verminderung des mRNA-Levels von Differenzierungsmarkern wie CK10 (Beck et al. 2008), und zeigt auch in HGKs (*human gingival keratinocytes*) eine Störung des Differenzierungsprozesses (Cai et al. 2005). Die Bedeutung von TRPC1 für die Differenzierung könnte auf molekularer Ebene durch eine Interaktion mit dem IP<sub>3</sub>R und der PLC $\gamma$ 1 (Tu et al. 2005), welche ebenso in die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Differenzierung involviert sind und durch eine in zahlreichen Studien diskutierte Rolle im SOCE (Liu et al. 2000; Tu et al. 2005; Bikle et al. 2012) vermittelt sein. Zudem bildet TRPC1 Heterokomplexe mit anderen in die Differenzierung eingebundenen Calcium-Kanälen, darunter TRPV6 (Schindl et al. 2012) und interagiert mit Orai1 (Cheng et al. 2011) und STIM1, dem Ca<sup>2+</sup>-Sensor des ER (Zhang et al. 2005; Huang et al. 2006). Die Bindung von Calmodulin, einem Ca<sup>2+</sup>-bindenden Protein, an das CIRB (*calmodulin and IP3 receptor-binding*)-Motif am C-Terminus des TRPC1-Kanals ist wichtig für die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Inaktivierung des Kanals (Zhang et al. 2001).

Des Weiteren spielt TRPC1 eine Rolle im Ablauf des Zellzyklus und in der Proliferation (Madsen et al. 2012). Das Ausmaß der TRPC1-Expression variiert in den unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. TRPC1 wird außerdem als Komponente in der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Verstärkung EGF-vermittelter Zellproliferation diskutiert (Tajeddine und Gailly 2012).

In HGKs findet sich TRPC1 in undifferenzierten und differenzierten Keratinozyten (Cai et al. 2005). Dies trifft ebenso auf HaCaT-Zellen zu, wobei dort in frühen Differenzierungsstufen eine stärkere Expression als in undifferenzierten Zellen gezeigt wurde (Beck et al. 2008). In humaner Haut zeigt sich TRPC1 immunhistochemisch vorwiegend im SB (Leuner et al. 2011). Auf zellulärer Ebene findet sich TRPC1 im Bereich der Plasmamembran in HaCaT-Zellen (Beck et al. 2008) und in HEKs zusätzlich perinukleär im Zytoplasma (Tu et al. 2005). Die Integration von TRPC1 in die Plasmamembran ist abhängig von einem Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Cheng et al. 2011).

Veränderungen in der TRPC1-Expression sind bereits in verschiedenen pathologischen Prozessen in der Haut beschrieben. Eine Herunterregulation von TRPC1 korreliert mit der Unfähigkeit von Basalzell-Karzinom-Zellen, zu differenzieren (Beck et al. 2008), sowie mit einer gestörten Proliferations-Differenzierungs-Balance der Keratinozyten in psoriatischer Haut (Leuner et al. 2011). Zudem ist TRPC1 in der Haut von Patienten mit *Darier disease* überexprimiert und geht dort mit einer erhöhten Proliferation einher (Pani et al. 2006). Über Veränderungen von TRPC1 in AD ist bisher meines Wissens nichts bekannt.

#### **1.8.2.2 Transient Receptor Potential Vanilloid Channel 4 (TRPV4)**

TRPV4-Kanäle sind in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe exprimiert und erfüllen vielseitige Funktionen. TRPV4 wurde zunächst als Osmosensor charakterisiert (Liedtke et al. 2000). Weitere Studien entschlüsselten seine Rolle in der Mechanoperzeption (Suzuki et al. 2003; Liedtke und Friedmann 2003), der Thermoregulation des Körpers (Güler et al. 2002), im Knochenstoffwechsel (Masuyama et al. 2008), der Regulation des Gefäßtonus (als Übersichtsartikel siehe Baylie und Brayden 2011) und der Blasenentleerung (Gevaert et al. 2007). Zudem wird über eine Rolle des Kanals in der Blutdruckregulation (McHugh et al. 2010) und in der Pathogenese Chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (als Übersichtsartikel siehe Vergnolle 2014) diskutiert. Mutationen des TRPV4-Gens finden sich zudem in einer Reihe verschiedener Erkrankungen des skelettalen Systems und des peripheren Nervensystems, darunter motorische und sensorische Neuropathien (als Übersichtsartikel siehe Nilius und Voets 2013).

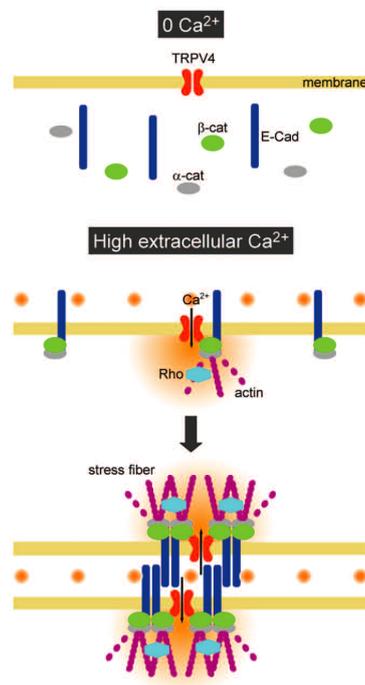
Eine Reihe endogener und exogener Stimuli vermitteln eine Aktivierung von TRPV4. Hierzu zählen neben thermischen Stimuli, Hypoosmolarität, das synthetische Phorbolsterderivat 4 $\alpha$ -PDD (Watanabe et al. 2002), das Endocannabinoid Anandamin und Metabolite der daraus entstehenden Arachidonsäure (Watanabe et al. 2003).

In humaner Haut findet sich TRPV4 sowohl im SB als auch in den suprabasalen Schichten der Epidermis, wie immunhistochemische Färbungen zeigten (Fusi et al. 2014; subzelluläre Lokalisation hier nicht näher beschrieben). In murinen Keratinozyten zeigte sich TRPV4 im Bereich der Plasmamembran sowie intrazellulär vorwiegend perinukleär (Chung et al. 2003). In der Haut besitzt TRPV4 neben seiner Rolle als Thermosensor (Chung et al. 2003), welcher bei physiologischer Hauttemperatur um 33°C aktiviert ist, und der Mechanoperzeption laut einer aktuellen Studie an Mäusen auch eine Funktion als

Prurizeptor in der Vermittlung von histaminerg induziertem Pruritus in Keratinozyten (Chen et al. 2016).

TRPV4 ist zudem ein entscheidender Spieler in der Barrierefunktion der Haut. TRPV4 ist an der Bildung und Aufrechterhaltung der auf interzellulären Zell-Zell-Verbindungen basierenden Barriere („*junction-dependent barrier*“) beteiligt (Sokabe et al. 2010). In den noch undifferenzierten Keratinozyten befinden sich die Komponenten der Adhäsionsmoleküle im Zytoplasma. Bei Anstieg der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration translozieren sie zur Plasmamembran. TRPV4 bindet dann über  $\beta$ -catenin an E-cadherin-Komplexe. Sowohl in murinen Keratinozyten (Sokabe et al. 2010) als auch in NHEKs (Kida et al. 2012) zeigte sich eine Ko-Lokalisation von TRPV4 mit den Adhäsionsmolekülen  $\beta$ -catenin und E-cadherin- an den apikalen Zellgrenzen.

Unter physiologischer Hauttemperatur führt ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über TRPV4-Kanäle zur Aktivierung von Rho, welches die Organisation von Aktinfasern an den entstehenden Zell-Zell-Kontakten fördert (Abb. 1.11).



**Abbildung 1.11: Modell zur TRPV4-abhängigen Organisation von AJs.** Die Adhäsionsmoleküle befinden sich bei niedriger extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma. Nach Anstieg der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration translozieren diese Komponenten zur Plasmamembran, wo sie dann unter Vermittlung von TRPV4 vernetzt und an das Aktin-Zytoskelett angebunden werden (verwendet im Rahmen der CC BY-NC 3.0 Lizenz nach (Sokabe und Tominaga 2010)).

TRPV4 trägt auf diese Weise maßgeblich zur Bildung von Adhärenzverbindungen (*adherens junctions*, AJs) bei. AJs sind wiederum wichtig für die ordnungsgemäße Entstehung von TJs (Tunggal et al. 2005). Die pharmakologische Aktivierung von TRPV4 durch 4αPDD stärkt die Barrierefunktion von TJs *in vitro* durch Hochregulation der TJ-Proteine Cldn-4 und Occludin; Cldn-1 und ZO-1 Proteinlevel blieben unverändert (Akazawa et al. 2013). TRPV4-defiziente Mäuse zeigen im Einklang mit diesen Studien Charakteristika einer Störung der Barrierefunktion der Haut. Neben einer erhöhten Permeabilität interzellulärer Kontakte des SG finden sich Veränderungen in der Organisation des Aktin-Netzwerkes und eine Störung der Stratifizierung der Keratinozyten (Sokabe et al. 2010; Sokabe und Tominaga 2010). Die Veränderungen gleichen denen von E-Cadherin- oder Cldn-1-defizienten Mäusen, führen jedoch im Gegensatz zu letzteren nicht zu einer Überlebensunfähigkeit (Tunggal et al. 2005; Furuse et al. 2002). Die Aktivierung von TRPV4 durch thermische oder pharmakologische Stimuli beschleunigte zudem die Regeneration der Barrierefunktion in muriner und humaner Haut (Denda et al. 2007).

Die Wirkung der TRPV4 Aktivierung scheint aber Zell-spezifisch zu sein. In murinen Brustdrüsenepithelzellen führte eine TRPV4-Aktivierung zu einer verminderten parazellulären Barrierefunktion und einer Herunterregulation von TJ-Proteinen, darunter Cldn-1 (Reiter et al. 2006).

Die Rolle von TRPV4 in der Entstehung von Hauterkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschung. Immunhistochemische Studien zeigten eine Verminderung von TRPV4 in bullösen Autoimmundermatosen (Bai et al. 2015) und zusätzlich auf mRNA-Ebene in Präkanzerosen und NMSC (*Non-melanoma skin cancers*) (Fusi et al. 2014). Nach thermischer Schädigung der Haut zeigte sich in immunhistochemischen Färbungen eine unregelmäßig verteilte TRPV4-Expression. (Radtke et al. 2011) Eine weitere Studie zeigte *in vitro* eine Aktivierung von TRPV4 durch UV-B-Exposition und eine Hochregulation von TRPV4 bei Sonnenbrand (Moore et al. 2013). Eine Studie schlägt auch eine mögliche Rolle von TRPV4 in Rosazea vor (Sulk et al. 2012). Zu Veränderungen von TRPV4 in Atopischer Dermatitis ist bisher nichts bekannt.

## **1.9 Connexine und Gap junctions**

Nahezu alle Zellen unseres Körpers kommunizieren über Gap junctions (GJs), sie sind wichtige Pforten für den Austausch von Calcium zwischen Zellen.

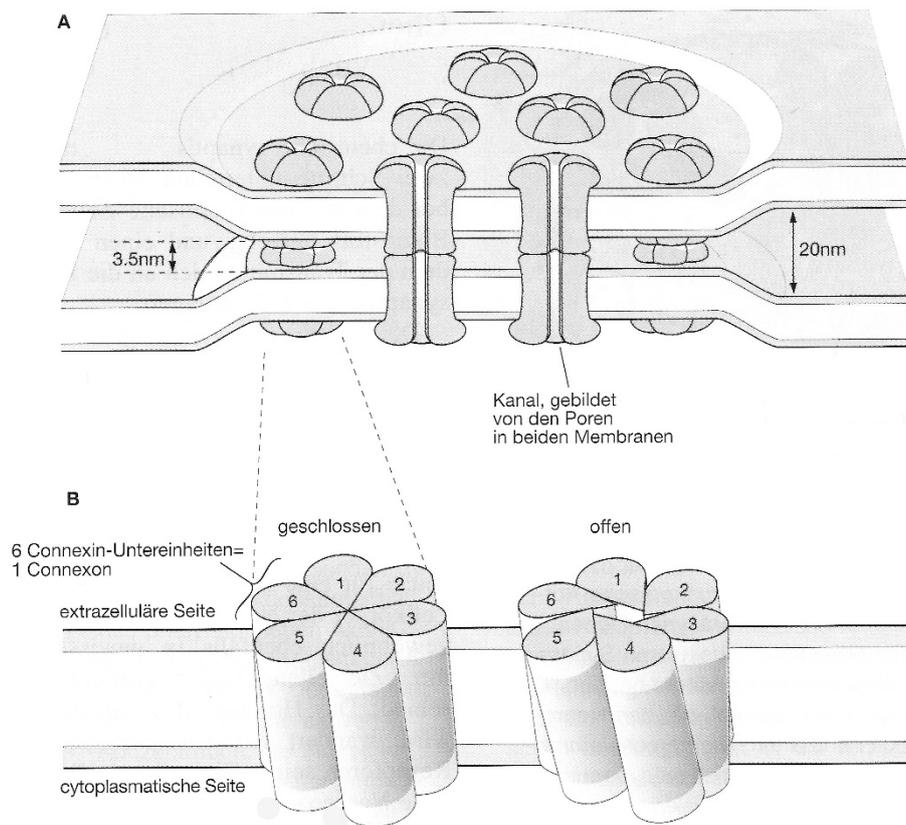
Gap junctions stellen eine direkte Verbindung zwischen dem Zytoplasma zweier benachbarter Zellen dar. Sie vermitteln den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen bis zu einer Größe von 1 kDa, darunter Metabolite (Glucose) und *second messenger* wie  $IP_3$ , ATP und  $Ca^{2+}$ , deren Transport durch GJs über Diffusion erfolgt (als Übersichtsartikel siehe Loewenstein 1981; Kumar und Gilula 1996). Auf diese Weise entsteht eine chemische und elektrische Kopplung zwischen den Zellen.

Gap junctions bestehen aus zwei Halbkanälen, Connexonen (Caspar et al. 1977) – je einem in einer der beiden Plasmamembranen gegenüberliegender Zellen. Zusammen überbrücken die Connexone einen interzellulären Spalt von etwa 3,5 nm (Makowski et al. 1977). Ein Connexon setzt sich wiederum aus sechs Connexinen zusammen, welche in ihrer Anordnung eine zentral gelegene hydrophile Pore mit einem Durchmesser von etwa 1,5 nm bilden (Loewenstein 1981) (Abb. 1.12). Connexone scheinen jedoch nicht nur als Paar in GJs, sondern auch als eigenständige Halbkanäle ein Kommunikationsmedium darzustellen. Sie fungieren dann als eine Verbindung zwischen einer Zelle und ihrer Umgebung (Evans et al. 2006; Bennett et al. 2003; Stout et al. 2004; als Übersichtsartikel siehe Goodenough und Paul (2003)). Die Zusammensetzung der Connexone kann sowohl homo- als auch heteromer sein und ist entscheidend für die Selektivität und Leitfähigkeit der GJs (Brisette 1994; als Übersichtsartikel siehe Goodenough et al. 1996; Kumar und Gilula 1996).

Die Connexin-Gen-Familie umfasst 21 Connexin-Gene im humanen und 20 Connexin-Gene im Maus-Genom (als Übersichtsartikel siehe Laird 2010 Söhl und Willecke 2004). Connexine werden nach ihrer molekularen Masse (in kDa) benannt. So ist z.B. Cx26 ein Protein von etwa 26 kDa (Beyer et al. 1987).

Die Öffnung der GJs beruht auf Konformationsänderungen der Connexone durch eine Drehbewegung der Basis der Connexine. Die Leitfähigkeit ist somit modulierbar. Die meisten Gap junctions schließen bei sinkendem intrazellulärem pH-Wert oder bei einer hohen intra- oder extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Lopez et al. 2013). Zudem wurde gezeigt, dass u.a. eine inflammatorische Umgebung die Offenwahrscheinlichkeit von Halbkanälen in der Plasmamembran erhöht, und somit den Zellschaden verstärken und den Zelltod fördern kann (Orellana et al. 2011; als Übersichtsartikel siehe Lopez et al. 2013).

GJs spielen eine wichtige Rolle in der Proliferation, Migration und Differenzierung von Keratinozyten (Salomon et al. 1993; Brisette et al. 1994).



**Abbildung 1.12: Dreidimensionales Modell von Gap junctions (GJs) auf der Basis von Röntgenstrukturanalysen.** A GJs setzen sich aus zwei Connexonen zusammen, die jeweils zu einer der beiden benachbarten Zellen gehören. Sie überbrücken einen etwa 3,5 nm breiten interzellulären Spalt und verbinden das Zytoplasma der beiden Zellen. Auf diese Weise wird ein direkter Ionenfluss ermöglicht. B Jedes Connexon setzt sich aus sechs Proteinuntereinheiten, den Connexinen, zusammen, in deren Mitte sich eine Pore befindet. Die Öffnung der GJs wird über eine Drehung der zytoplasmatischen Basis der Connexine vermittelt (modifiziert mit Erlaubnis von Springer-Verlag Berlin/Heidelberg aus Neurowissenschaften : eine Einführung, Kandel et al. 1996; Erlaubnis vermittelt durch Copyright Clearance Center, Inc.)

### 1.9.1 Cx43 und Cx26

In der Haut werden eine Reihe unterschiedlicher Connexine exprimiert, von denen Cx43 das vorherrschende ist (Richard 2000). Auch auf den gesamten Organismus bezogen, kommt Cx43 am häufigsten vor (Lairds 2006). Seine enorme Bedeutung wird an Cx43-

*Knockout*-Mäusen deutlich. Diese Mäuse versterben perinatal aufgrund einer gestörten Embryonalentwicklung des Herzens (Reaume et al. 1995).

Cx43 findet sich in humaner Haut in allen lebenden Schichten der Epidermis, mit höchster Intensität im oberen SS (Wilgenbus et al. 1992; Salomon et al. 1994; Tada und Hashimoto 1997; als Übersichtsartikel siehe Richard 2000). In Maushaut findet sich Cx43 im SB und unteren SS (Liu et al. 1997). Cx43 kann mit AJ- und TJ-Proteinen (Giepmans 2004) interagieren. E-cadherin und ZO-1 scheinen in diesem Zusammenhang den Zusammenschluss von Cx43 Einheiten zu GJs zu fördern (Chakraborty et al. 2010; als Übersichtsartikel siehe Thévenin et al. 2013).

Cx26 wird während der Embryonalentwicklung exprimiert (Choudhry et al. 1997), ist jedoch später unter physiologischen Bedingungen in der interfollikulären humanen Epidermis kaum (Richard 2000) bis gar nicht mehr zu finden (Salomon et al. 1994; Wilgenbus et al. 1992; Lucke et al. 1999). In Maushaut weisen verschiedene Studien abweichende Expressionsmuster auf. So wird zum einen beschrieben, Cx26 sei in Maushaut unter physiologischen Bedingungen nicht vorhanden, werde allerdings im Zuge der Embryonalentwicklung im SG exprimiert (Butterweck et al. 1994). Auch in weiteren Studien wurde es als nicht bis sehr gering vorhanden beschrieben (Budunova et al. 1995). In anderen Studien wurde Cx26 allerdings nachgewiesen (Salomon et al. 1994). Diese Diskrepanzen wurden auf einen möglichen Einfluss der Morphologie der Maushaut zurückgeführt, in dem eine Mehrschichtigkeit der Haut in bestimmten Arealen eine Cx26-Färbung im SG sichtbar werden lassen (Budunova 1995; Sawey et al. 1996).

Veränderungen in der Expression der Connexine Cx43 und Cx26 finden sich in der Wundheilung (Goliger und Paul 1995; Brandner et al. 2004) sowie in pathologischen Prozessen. So wurde ein Verlust der GJIC mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht (Loewenstein 1979; Yamasaki 1990; als Übersichtsartikel siehe Mesnil et al. 2005). Cx43 ist vermindert in Basalzell-Karzinom-Gewebe, wobei in dieser Haut Cx26 exprimiert wird (Wilgenbus et al. 1992; Tada und Hashimoto 1997; Mesnil et al. 2005). Connexin-Mutationen verursachen zudem verschiedene Erkrankungen mit Hautbeteiligung (als Übersichtsartikel siehe Garcia et al. 2016 b). Zudem sind Veränderungen von Connexinen mit Erkrankungen des Nervensystems assoziiert (Bergoffen et al. 1993).

In psoriatischer Haut konnte anhand von Elektronenmikroskopie eine deutliche Zunahme von GJs im SS gezeigt werden (Caputo et al. 1978). Im Gegensatz zu normaler Haut, ist Cx26 in läsionaler Haut von Psoriasis-Patienten vorhanden, wobei es in allen lebenden, jedoch vorwiegend in den suprabasalen Schichten zu finden ist (Labarthe et al.

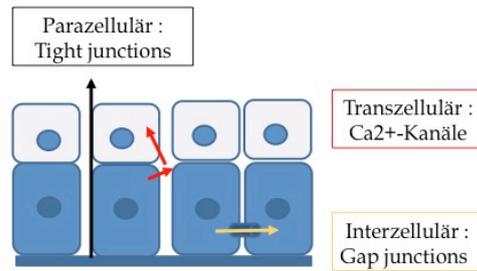
1998; Lucke et al. 1999). Dies konnte ebenfalls auf *mRNA*-Ebene gezeigt werden (Rivas et al. 1997; Labarthe et al. 1998).

In nicht-läsionaler Haut von AD-Patienten fand sich ebenfalls eine Hochregulation von Cx26 auf mRNA-Ebene (De Benedetto et al. 2011). Zusätzlich konnte in dieser Arbeit eine Hochregulation von Cx26 in einem *Cldn-1 Knockdown* in NHEKs gezeigt werden. Die Cx43 Expression war in dieser Studie in nicht-läsionaler Haut nicht signifikant verändert. In läsionaler Haut fand sich in einer Studie eine verstärkte Cx43-Expression auf mRNA-Ebene (Tawdy et al. 2011), allerdings wurde nicht spezifiziert ob die Biopsien tatsächlich aus läsionaler Haut stammen. Über die Veränderung von Cx26 in läsionaler Haut von AD-Patienten ist derzeit nichts bekannt.

### **1.10 Zielsetzung der Arbeit**

Aufgrund der essenziellen Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$  im epidermalen Gleichgewicht von Proliferation und Differenzierung, stellt  $\text{Ca}^{2+}$  einen wesentlichen Faktor für eine intakte Homöostase und Barrierefunktion der Haut dar. Es liegt daher nahe, dass Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten Ursache einer Störung der Barrierefunktion und somit all ihrer Folgen sein könnten. Bisher ist jedoch unklar, woher diese Veränderungen stammen und wie genau sie entstehen. Ziel dieser Arbeit ist es, die im AID Mausmodell beobachteten Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten besser zu verstehen.

Der Schwerpunkt liegt dabei in der Untersuchung von Proteinen, welche in die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Epidermis involviert sind und somit den Schlüssel zum Verständnis der Mechanismen darstellen könnten, die der Entstehung von Veränderungen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten zugrunde liegen. Calcium-Ionen können sich auf drei verschiedenen Wegen innerhalb der epidermalen Schichten verteilen: parazellulär, transzellulär und interzellulär (Abb. 1.13). In dieser Arbeit werden am  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport beteiligte Proteine aller drei Wege untersucht: Die TJ-Proteine *Cldn-1* und *ZO-1*, welche eine wichtige Rolle in der parazellulären Calcium-Mobilität spielen, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle *Orai1*, *TRPC1* und *TRPV4*, welche eine Verbindung zwischen intra- und extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration darstellen und eine Rolle in der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Balance von Proliferation und Differenzierung spielen, und die Connexine *Cx43* und *Cx26*, welche in Form von GJs den direkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch benachbarter Keratinozyten oder als Halbkanäle den Austausch mit dem Extrazellulärraum ermöglichen.



**Abbildung 1.13: Schematische Darstellung von Transportwegen für Calcium-Ionen innerhalb der Epidermis.**  $\text{Ca}^{2+}$  kann sich parazellulär verteilen, wobei die TJs im SG eine Barriere auf diesem Weg darstellen.  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vermitteln gemeinsam mit anderen Proteinen den transzellulären Weg. Gap junctions stellen ein direktes Austauschmedium für Calcium-Ionen zwischen dem Zytoplasma zweier benachbarter Zellen dar.

Anhand von Fluoreszenzanalysen an Paraffinschnitten wird die Lokalisation und Verteilung der Proteine innerhalb der Schichten der Epidermis ermittelt und direkt mit den in denselben Mäusen gewonnenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten-Daten (Börnchen 2013) korreliert. Zur Quantifizierung der Beobachtungen werden Intensitäts- und Längenmessungen durchgeführt.

Zudem soll untersucht werden, inwiefern diese, an der Verteilung von Calcium-Ionen beteiligten Proteine, mit der Proliferation und dem Differenzierungsstatus der Keratinozyten korrelieren.

Schließlich soll in humanen Proben von atopischer Dermatitis untersucht werden, ob dort ähnliche Veränderungen wie im Mausmodell beobachtet werden, und inwieweit man somit die aus der Maus gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragen kann.

## 2. Material

### 2.1 Gewebe

#### 2.1.1 Maus

Die in dieser Arbeit untersuchte formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Maushaut entstammt Mäusen, bei denen ein Ekzem induziert wurde (AID-Mausmodell) (s. Kap. 3.1). Es wurden jeweils Ekzem- und Kontroll-Areale derselben Maus untersucht.

Es wurden 8-9 Wochen alte Balb/c Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Insgesamt wurde Gewebe von zwölf Mäusen ausgewertet. Die amtliche Tierversuchsgenehmigung der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und

Verbraucherschutz - Lebensmittelsicherheit und Veterinarwesen in Hamburg lautet FL 109/09.

### 2.1.2 Mensch

Die ebenfalls in Paraffin eingebettete normale humane Haut (n=7), sowie die ekzematösen Hautproben (n=9) stammen von ehemaligen Patienten der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKE (Ethik-Votum: gesunde Haut W30/09, menschliche ekzematöse Hautproben WF-08/08). Zum Ursprung der normalen Haut ist nur bei einer Probe die Lokalisation bekannt, drei der Patienten sind weiblich, einer ist männlich, von den anderen ist das Geschlecht nicht bekannt, das Alter der Patienten liegt zwischen 30 und 80 Jahren, mit einem Altersdurchschnitt von 55 Jahren. Von den neun Patienten mit Ekzem sind drei männlich und sechs weiblich. Der Altersdurchschnitt liegt bei 60 Jahren, wobei der jüngste Patient 38 Jahre und der älteste 84 Jahre alt ist. Das Ekzem ist an verschiedenen Stellen lokalisiert (siehe Tabelle 2.1). Neben den allgemeinen Kriterien eines Ekzems, wie Hyperkeratose Akanthose und dermalem vorwiegend lymphozytärem Infiltrat, bestehen Hinweise auf eine atopische Genese. Hierzu zählen anamnestische und histologische Hinweise, Laborparameter wie Eosinophilie, sowie eine Erhöhung des Gesamt-IgE im Serum (>100kU/l).

**Tabelle 2.1:** Übersicht der Patienten mit atopischem Ekzem

ID	Alter	Geschlecht	[IgE] im Serum	Lokalisation
1	70	m	Im Normbereich	unbekannt
2	53	m	unbekannt	Oberarm
3	66	w	>100kU/l	Unterarm
4	84	w	Im Normbereich	Gesicht
5	38	w	unbekannt	unbekannt
6	63	w	>100kU/l	Oberschenkel Streckseite
7	84	m	unbekannt	Oberschenkel
8	42	w	unbekannt	Unterschenkel
9	38	w	unbekannt	Oberarm Innenseite

## 2.2 Chemikalien

**Tabelle 2.2:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien, ihre Bezugsquellen und deren Standort

Substanz	Bezugsquelle	Standort
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen (D)
Ethanol	Walter CMP GmbH & Co. KG	Kiel (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe (D)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA	Darmstadt (D)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA	Darmstadt (D)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA	Darmstadt (D)
Tris = Trizma®Base	Sigma-Aldrich	Steinheim (D)
Tween® 20	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
25% HCl	Sigma-Aldrich	St. Louis (USA)
Zitronensäure-Monohydrat (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> · H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA	Darmstadt (D)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA	Darmstadt (D)
EDTA	Merck KGaA	Darmstadt (D)
Trypsin	Biochrom AG	Berlin (D)
1 N HCl		
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA	Darmstadt (Germany)
Protein-Block Serum Free	Dako Deutschland GmbH	Hamburg (D)
DAPI (4',6- Diamidin-2'- phenylindol dihydrochlorid)	Roche	Mannheim (D)
Fluoromount-G™	SouthernBiotech	Birmingham (USA)

## 2.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2.3:** Übersicht über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien, ihre genaue Bezeichnung, sowie den jeweiligen Hersteller

Gerät / Material	Gerätetyp	Hersteller
Deckgläser	24 x 60 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen (D)
Vortexer	Vortex-Genie	Bender&Hobein AG, Zürich (Schweiz)
pH-Meter	Knick 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co., Berlin (D)
Mikrotom	Leica RM 2165	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Mikrotomklingen	Feather Type N35	Feather, Osaka (Japan)
Zentrifuge	Biofuge 13	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Brutschrank	37°C	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Brutschrank	55°C	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
Feinwaage	Sartorius BL3100	Sartorius AG, Göttingen (D)
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan II mit CCD-Kamera	Zeiss GmbH, Jena (D) ; Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching (D)
Markierungsstift für Paraffinschnitte	Liquid Blocker Super PAP Pen	Daido Sangyo Co., Tokyo (Japan)
Objektträger	Assistant® 72 SuperFrost/Plus	Glaswarenfels K. Hecht KG, Sondheim (D)
Pipetten	Eppendorf 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Pipettenspitzen	Eppendorf T.I.P.S Standard 2-200µl , 50-1000µl , 100-5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Eppendorf-Gefäße	Safe Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg (D)

## 2.4 Antikörper

**Tabelle 2.4:** Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper. Angegeben sind neben den Primär- und Sekundärantikörpern, die jeweilige Spezies aus der sie entstammen, die verwendete Verdünnung und genaue Behandlung, sowie die jeweilige Bezugsquelle.

Antigen (Antikörperpräparation/Klon)	Spezies	Verdünnung	Behandlung	Bezugsquelle
<b>Primärantikörper</b>				
TRPC1 (H-105)	Kaninchen	1:50	600 Watt / TEC	Santa Cruz Biotechnology (sc-20110)
TRPV4 (Polyclonal)	Kaninchen	1:8000 * 1:10000 **	600 Watt / TEC	abcam (Cambridge, UK) (#ab39260)
Orai 1 (Polyclonal)	Kaninchen	1:50	600 Watt / TEC	Sigma Aldrich (St.Louis, USA) (HPA016583)
Cx26 (Eluat 3, Polyclonal)	Meerschweinchen	1:400	600 Watt / TEC	Zellbiologisches Labor, UKE (Hamburg, D)
Cx43 (Polyclonal)	Kaninchen	1:300	600 Watt / TEC	Zymed (Carlsbad, CA, USA) (71-0700)
Cldn-1 (MH25)	Kaninchen	1:5000	360 Watt / TEC	Zymed (Carlsbad, CA, USA) (71-7800)
ZO-1 (Polyclonal)	Kaninchen	1:500	360 Watt / TEC	Zymed (Carlsbad, CA, USA) (61-7300)
CK10 (DE-K10)	Maus	1:800	600 Watt / TEC	Progen Biotechnik GmbH (Heidelberg, D)
CK14 (LL002)	Maus	1:150	600 Watt / TEC	Quartett (Berlin, D), (2110502701)
Mib (Ki67)	Kaninchen	1:350	600 Watt / Citratpuffer	abcam (Cambridge, UK) (#ab1558)
<b>Sekundärantikörper</b>				

Alexa 488 F(ab') <sub>2</sub>	Ziege gegen Kaninchen	1:500	Molecular Probes (Eugene,USA)
Alexa 488 IgG (H+L)	Ziege Gegen Meerschweinchen	1:600	
Alexa 594	Ziege gegen Maus ?	1:1250	
HRP-gekoppelt			Jackson Immuno Research

\*auf Maushaut \*\* auf humaner Haut

#### 2.4.1 Weitere Primärantikörper gegen Calcium-Kanäle

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde auch versucht, die Lokalisation der Calcium-Kanäle TRPV1 und TRPC6 sowie deren Veränderung im Ekzem zu bestimmen. Leider konnten trotz ausdrücklicher Empfehlung des Herstellers der ausgewählten Antikörper für die angewendeten Verfahren und unterschiedlicher Verdünnung und Behandlung in diesen Färbungen keine als valide einschätzbaren Ergebnisse erreicht werden.

Die vorwiegend zytoplasmatische TRPV1 Färbung entsprach nicht der in der Literatur beschriebenen vorwiegenden Lokalisation an den Zellgrenzen und wurde daher als nicht valide eingestuft und von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

In der TRPC6 Färbung zeigte sich nach mehrmaligen Versuchen mit unterschiedlichen Verdünnungen auf Maushaut keine deutliche Abgrenzung zur Isotypkontrolle, weshalb die Färbung als nicht spezifisch gewertet wurde und die Qualität des Antikörpers in Frage gestellt wurde. Durch Überprüfung der Isotypkontrolle mit einem weiteren Batch konnte ein Problem auf dieser Seite ausgeschlossen werden.

Verwendete Antikörper:

Antikörper (Klon)	Spezies	Bezugsquelle
TRPV1 (polyclonal)	Kaninchen	abcam (Cambridge, UK) (#ab74855)
TRPC6 Aminoterminal end	Kaninchen	abcam (Cambridge, UK) (#ab62461)

(polyclonal) | |

## 2.5 Isotypkontrollen

Negative Control, Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal)  
(Code No. X0903) DakoCytomation , Glostrup (Dänemark)

Negative Control Mouse IgG1  
(Code No. X0931) DakoCytomation , Glostrup (Dänemark)

Negative Control Guinea pig IgG sc-2711  
Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (Deutschland)

## 2.6 Puffer und Lösungen

### TEC – Puffer (pH 7,8)

Tris	5 g
EDTA	10 g
Tri-Natriumcitrat	6,4 g
Aqua dest. auf 1000 ml	

Stammlösung zum Gebrauch mit Aqua dest. 1:20 verdünnen.

### Citrat – Puffer

Stammlösung A: 10,5 g  $C_6H_8O_7 \times H_2O$  in 500 ml Aqua dest. lösen

Stammlösung B: 14,7 g  $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$  in 500 ml Aqua dest. lösen

Gebrauchslösung: 9 ml Stammlösung A + 41 ml Stammlösung B.

Mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen.

### PBS – Puffer (pH 7,3 – 7,5)

NaCl	160 g
KCl	4 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	23,2 g
$KH_2PO_4$	4 g

In 2 l Aqua dest. lösen

Stammlösung zum Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

TBST – Puffer (pH 7,6)

Tris 121,1 g

NaCl 175,32 g

- mit Aqua dest. auf 1,5 l auffüllen, vollständig auflösen
- 10 ml Tween hinzugeben
- pH mit 25% HCl auf 7,6 einstellen
- mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen

Stammlösung zum Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

Trypsin Stammlösung

Trypsin 0,01 g

CaCl<sub>2</sub> × H<sub>2</sub>O 0,013 g

oder CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O 0,0114 g

In 1 ml Tris-HCl 0,5 M + 9 ml Aqua dest. lösen

Trypsin Gebrauchslösung (0,001%)

1 ml Tris-HCl 0,5 M + 9 ml Aqua dest.

Davon 100 µl verwerfen und 100 µl der Stammlösung hinzugeben.

## 2.7 Software

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte mittels Openlab 5.0.2 (Improvision, Coventry, UK). Zur digitalen Datenverarbeitung wurden Adobe Photoshop 7.0.1, sowie die Microsoft Office Programme MS Word und MS Excel verwendet. Die Längenmessungen zur Expression von ZO-1 und Claudin-1 und Cx43 wurden mit Fiji (Schindelin et al., 2012) durchgeführt. Die Intensitätsmessungen der verschiedenen Calciumkanal-Färbungen sowie von Claudin-1 wurden alle mit Image J 1.41n umgesetzt. Zur statistischen Auswertung wurden die Programme IBM® SPSS® Statistics Version 21 und SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) verwendet.

### **3. Methoden**

#### **3.1 AID-Mausmodell**

Das AID-Mausmodell wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Eva Peters etabliert (Pavlovic et al. 2008; Peters et al. 2011) und die Versuche in unserem Labor von Christian Börnchen durchgeführt (Börnchen 2013). Die 8-9 Wochen alten Balb/c Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland), wurden zunächst an Tag 1 und 14 über je eine intraperitoneale Injektion mit 100µl einer Sensibilisierungslösung aus dem Hühnereiweiß Ovalbumin (Ovalbumin Grade VI (0,4 mg/ml in PBS) 1 ml und Alum-Inject (40 mg/ml in H<sub>2</sub>O) 1 ml) sensibilisiert. Nach der Rasur der Flanken an Tag 18, wurde an Tag 21 (1x Provokation) und teilweise zusätzlich an den Tagen 23 (2x Provokation) und 25 (3x Provokation) eine intradermale Injektion von 100µl einer Provokationslösung aus Ovalbumin Grade V (1 mg/ml in PBS) 0,5 ml und PBS 0,5 ml durchgeführt. Auf diese Weise wurde eine Immunreaktion ausgelöst, welche durch einen Anstieg der IgE-Konzentration im Serum (Börnchen 2013), sowie ein IL-4- und IL-13-dominiertes Zytokin-Profil in der Haut charakterisiert ist (Peters et al. 2011). Die im Modell induzierte Immunreaktion entspricht damit den immunologischen Charakteristika der Atopischen Dermatitis. Das daraufhin entstehende Ekzem ist durch Hyperproliferation und eine Störung der Differenzierung der Keratinozyten gekennzeichnet (Börnchen 2013). Insgesamt wurde Gewebe von zwölf Mäusen ausgewertet. Von jeder Maus wurde sowohl Kontrollgewebe als auch Ekzem von den Flanken gewonnen.

#### **3.2 Erstellen und Fixieren von Paraffinschnitten**

Von der in Paraffin eingebetteten Haut wurden am Mikrotom 5µm-Schnitte erstellt. Hierfür wurden die entsprechenden Paraffinblöcke zunächst auf ca. -8°C gekühlt. Für die Untersuchungen am AID-Mausmodell wurden Schnitte von nicht involvierter Haut (Kontrollhaut), sowie von unterschiedlichen Ausprägungen läsionaler muriner Haut (Ekzem) angefertigt. Zusätzlich wurden Schnitte von normaler und ekzematöser humaner Haut erstellt. Die Schnitte wurden dann einige Minuten in einem Wärmebad (Aqua dest.)

mit einer Temperatur von 45°C geglättet. Anschließend wurden jeweils zwei Schnitte auf einen Objektträger gezogen und für eine halbe Stunde bei RT zum Trocknen aufgestellt. Zum Schluss wurden die Schnitte für mind. 30 min auf einer Wärmeplatte bei 45°C zum Strecken aufgelegt und dann über Nacht bei 55°C im Brutschrank fixiert.

### 3.3 Immunhistochemische Färbung

Zur Vorbereitung der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte zunächst mit Xylol entparaffiniert. Das Xylol wurde anschließend durch eine absteigende Ethanolreihe und das Ethanol wiederum durch Aqua dest. herausgewaschen (Tab. 3.1).

**Tabelle 3.1:** Entparaffinieren und Hydratisieren von Paraffinschnitten

Xylol	20 min
Xylol	20 min
Ethanol absolut	5 min
Ethanol absolut	5 min
Ethanol 90%	Kurz
Ethanol 80%	Kurz
Ethanol 70%	Kurz
Aqua dest.	Schwenken
Aqua dest.	5 min

Durch Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin ist das Gewebe zwar morphologisch gut erhalten, dennoch können Antigene in ihrer Struktur verändert sein. Um eine Beeinträchtigung der Immunreaktivität zu vermeiden, wurden die Antigene durch Hitze demaskiert. Die Schnitte wurden hierfür 20 min in der Mikrowelle bei 600 W in TEC- bzw. Citrat-Puffer behandelt. Nach 30 min Abkühlen wurden die Schnitte mit einem PAP-Pen umkreist, um später die Verteilung des aufzutragenden Antikörpers auf den jeweiligen Schnitt zu begrenzen, und dann 2x3 min in TBST-Puffer gewaschen.

Darauf folgte eine proteolytische Behandlung mit Trypsin - gemäß dem Temperaturoptimum für Trypsin bei 37°C. Nach 10-minütiger Inkubation in einer feuchten Färbeschale, wurde die Wirkung von Trypsin in Aqua dest. gestoppt. Anschließend folgten zwei Waschschrte von je 3 min in TBST.

Zur Blockierung von freien unspezifischen Bindungsstellen wurde eine Blocklösung auf die Schnitte gegeben und diese für 30 min bei RT inkubiert. Je nach im weiteren Verlauf verwendetem Primärantikörper wurde Dako-Block oder - im Fall von TRPC1, Cx26 und Cx43 – NGS (2%) +Triton (10%) verwendet.

Darauf folgte die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper (Tab. 2.3) bei 4°C über Nacht in einer abgedeckten Färbeschale. Die Spezifität des Primärantikörpers wurde anhand einer Negativkontrolle überprüft. Als Negativkontrolle diente der Isotyp des jeweiligen Antikörpers in derselben Proteinkonzentration. Für die verwendeten Primärantikörper, die aus dem Kaninchen stammen, entsprach die Negativkontrolle beispielsweise Kaninchen-Immunglobulin.

Nach Rauswaschen von überschüssigem Primärantikörper mit TBST für 3x5 min, wurde der verdünnte Sekundärantikörper (Tab. 2.3) aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert.

Im weiteren Verlauf wurden die Schnitte 5 min in PBS gewaschen und dann zur Anfärbung der Kerne eine Minute in ein DAPI-Färbepad gegeben. Im Anschluss erfolgten drei Waschschrte à 5 min in PBS, danach zwei Waschschrte à 3 min in Aqua dest.

Abschließend wurden die Schnitte mit Fluoromount-G™ eingedeckt, welches über Nacht bei RT aushärten konnte.

Die verwendeten Antikörper und Negativkontrollen wurden jeweils mit PBS verdünnt, auf einem Vortexer gemischt und anschließend 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Es wurde nur der Überstand auf die Schnitte aufgetragen.

Während des gesamten Färbeporgangs wurde darauf geachtet, ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern.

### **3.4 Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen**

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte wurden zunächst am Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe einer CCD-Kamera und der Software Openlab 5.0.2 fotografiert und archiviert. Für jeden Schnitt wurden je eine Fluoreszenz-, Kernfärbungs- und Phasenkontrastaufnahme eines oder mehrerer Ausschnitte erstellt. Zur Gewährleistung

der Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensitäten im nächsten Schritt, wurden alle Mausechnitte mit dem 40er-Objektiv und alle humanen Schnitte mit dem 25er-Objektiv erstellt und für jedes einzelne zu untersuchende Protein eine Belichtungszeit festgelegt (Tab. 3.2). Mit dieser Belichtungszeit wurden dann alle zur Detektion dieses Proteins zuvor gemeinsam angefärbten Schnitte fotografiert und unverändert in die weiteren Auswertungsschritte übernommen.

**Tabelle 3.2:** Verwendete Belichtungszeiten in der Fluoreszenzphotografie der gefärbten Paraffinschnitte im AID-Mausmodell

<u>Protein</u>	<u>Belichtungszeit</u>
TRPC1	90 ms
TRPV4	80 ms
Orai1	140 ms
Cldn-1	250 ms

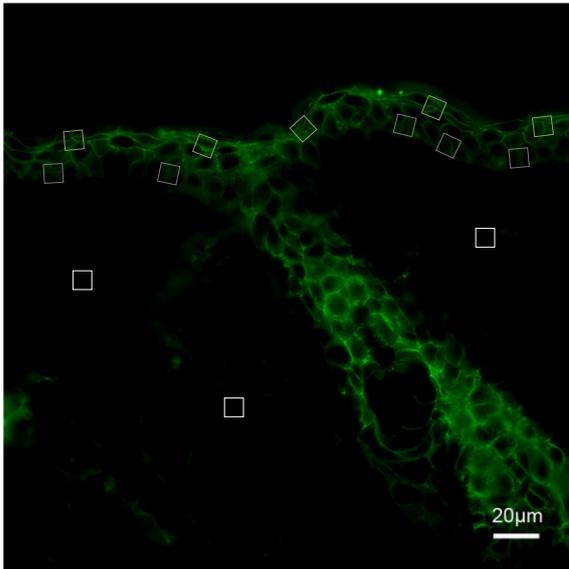
Hierbei wurden die Lokalisation und die Verteilung der Calciumkanäle und Cldn-1 innerhalb der Schichten der Epidermis, sowie die Intensität der Färbungen dokumentiert und interpretiert.

### 3.4.1 Auswertung der Intensität

Zur Quantifizierung der durchschnittlichen Fluoreszenz-Intensität wurde die Software Image J verwendet. Für die Auswertung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle wurden pro Foto sechzehn ROIs (*Regions of interest*) gleicher Größe definiert - je acht in der basalen und den suprabasalen Schichten der Epidermis -, zur Auswertung von Cldn-1 insgesamt zehn ROIs - je fünf in der basalen und den suprabasalen Schichten (Abb. 3.1).

Die Größe einer ROI wurde zur Auswertung von TRPC1, Orai1 und Cldn-1 auf 30x30 px ( $\cong 94\mu\text{m}^2$ ) festgelegt. Da die TRPV4-Färbung sich vorwiegend an den Zellgrenzen zeigte, wurde die Größe der ROIs mit 40x10 px ( $\cong 42\mu\text{m}^2$ ) darauf abgestimmt, um den Einfluss durch Zellkerne und kaum angefärbtes Zytoplasma zu minimieren. In den TRPV4-Färbungen fiel zudem bereits visuell eine verringerte Intensität im SG im Vergleich zu den anderen suprabasalen Schichten auf, weshalb die Intensitätsmessungen hier auf das SG fokussiert wurden.

Der Hintergrund der Färbungen wurde anhand eines Mittelwertes aus drei definierten, in der Dermis befindlichen ROIs von den jeweilig gemessenen Intensitäten subtrahiert.



**Abbildung 3.1:** Auswertung der Intensität am Beispiel von Cldn-1. Repräsentative Darstellung der Platzierung der ROIs (Kästchen) innerhalb der basalen (graue Kästchen) und den suprabasalen (hellgrüne Kästchen) Schichten der Epidermis, sowie der drei ROIs innerhalb der Dermis (weiße Kästchen) zur Ermittlung eines Leerwertes, welcher anschließend von der mittleren basalen bzw. suprabasalen Cldn-1-Intensität subtrahiert wird.

Die oben beschriebene Vorgehensweise wurde zur Objektivierung der Beobachtungen herangezogen. Es handelt sich dennoch um eine semi-quantitative Methode, da eine Reihe von Faktoren Einfluss auf das Ergebnis nehmen. So verschieben z.B. die dunklen, da nicht angefärbten, Zellkerne die mittlere Intensität einer ROI in einen dunkleren Bereich. Zur Gewährleistung der Aussagekraft dieser Auswertung wurde daher darauf geachtet, in jedem ROI in etwa den gleichen Bereich mit einem Kern auszufüllen. Zudem wurden die viereckigen ROIs der Orientierung der Epidermis angepasst, was durch Mängel in der verwendeten Software zu einer Flächenänderung der definierten ROIs führte. Diese wurde jedoch als vernachlässigbar gering eingestuft, da in einem Bereich gleicher Intensität durch Rotation der ROI kein nennenswerter Unterschied in der mittleren Intensität zu beobachten war. Da mittlere Intensitäten berechnet wurden, und keine Aufsummierung der Intensitäten stattfand, wird davon ausgegangen, dass die Fläche ohnehin keinen Einfluss auf das Ergebnis haben sollte.

### **3.4.2 Auswertung der Expressionsbreite innerhalb der Epidermis**

Der Schwerpunkt dieser Auswertung lag auf der Quantifizierung des Beginns und der Ausdehnung der Expression der TJ-Proteine Cldn-1 und ZO-1, sowie des Connexins Cx43 innerhalb der Schichten der Epidermis. Unter Verwendung des Programms FIJI wurde für die Auswertung von Cldn-1 und ZO-1 jeweils die Strecke von der Basallamina bis zum Beginn des angefärbten Bereiches gemessen, d.h. die Strecke ohne Expression des jeweiligen Proteins. Pro Foto wurden je zehn Messpunkte in der Epidermis definiert. Zusätzlich wurde in der Auswertung von ZO-1 die Strecke von der Basallamina bis zu Punkten sehr intensiver ZO-1 Färbung ausgemessen (Strecke ohne ZO-1 intensiv), da subjektiv betrachtet nicht nur eine Verbreiterung der ZO-1 Färbung sondern auch Unterschiede in der Intensität auffielen. Zur Auswertung von Cx43 wurde beginnend an der Basallamina die Strecke der auf Cx43 angefärbten epidermalen Schichten ausgemessen.

Da die Einheit der Länge in  $\mu\text{m}$  anstelle von Pixel angegeben werden sollte, wurden die Fotos zunächst kalibriert. Hierfür wurde ein Objektträger, welcher über eine  $\mu\text{m}$ -Skala verfügte, ebenfalls mit dem 40er-Objektiv abfotografiert und anschließend die Anzahl der Pixel pro Mikrometer ausgemessen. Diese Information wurde dann in das Programm eingegeben.

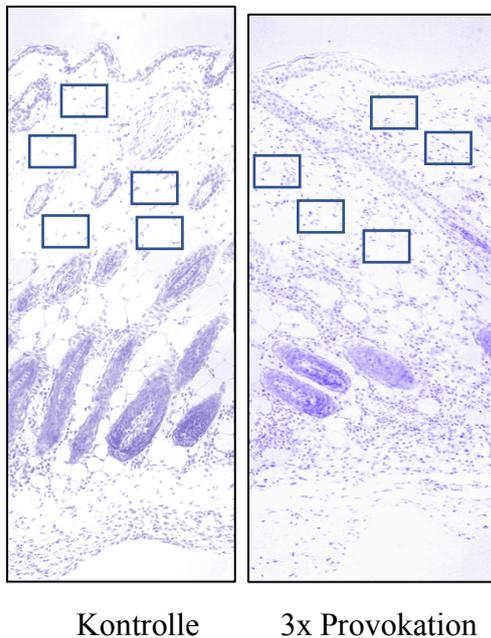
Des Weiteren wurde das Verhältnis der ZO-1-Expression, sowie der Cx43-Expression zur Epidermisdicke in der Kontrolle und im Ekzem berechnet und miteinander verglichen. Hierfür wurde nicht wie für die anderen Berechnungen dieser Arbeit die anhand des SHG-Signals ermittelte Epidermisdicke verwendet, sondern an den zugehörigen Phasenkontrastaufnahmen anhand von zehn Messpunkten pro Schnitt die Epidermisdicke ermittelt, um eine genauere Übereinstimmung der jeweiligen Bezüge zu gewährleisten.

In Abhängigkeit von der Größe des Ekzems wurden pro Maus ein bis zwei Fotos separat evaluiert und daraus der Mittelwert  $\pm$  SEM berechnet.

### **3.5 Bestimmung der Dichte des dermalen Infiltrats**

Die Dichte des dermalen Infiltrats wurde anhand von HE-Färbungen ermittelt. Pro Schnitt wurden fünf ROIs innerhalb der Dermis definiert, wobei eine ROI  $80\mu\text{m} \times 62\mu\text{m}$  maß und somit eine Fläche von etwa  $5000 \mu\text{m}^2$  einschloss (Abb. 3.2). In diesen ROIs wurde die

jeweilige Anzahl an Zellen gezählt. Da anhand dieser Methode keine adäquate Unterscheidung zwischen Immunzellen und anderen in der Dermis befindlichen Zellen, wie Fibroblasten, möglich war, wurden diese mit eingeschlossen. Da es nach bisherigem Kenntnisstand in atopisch veränderter Haut keine Anzeichen auf eine veränderte Anzahl von Bindegewebszellen gibt, wird davon ausgegangen, dass hierdurch kein entscheidender Einfluss auf das Ergebnis der Zählung zu erwarten ist. Aus der jeweilig ermittelten Anzahl in den fünf ROIs wurde schließlich der Mittelwert gebildet.



**Abbildung 3.2:** Ermittlung der Dichte des dermalen Infiltrats an HE-Färbungen in Kontrollhaut und läsionaler (3x Provokation) Haut. Repräsentative Darstellung der Platzierung der ROIs (Kästchen) innerhalb der Dermis.

### 3.6 Statistische Auswertung

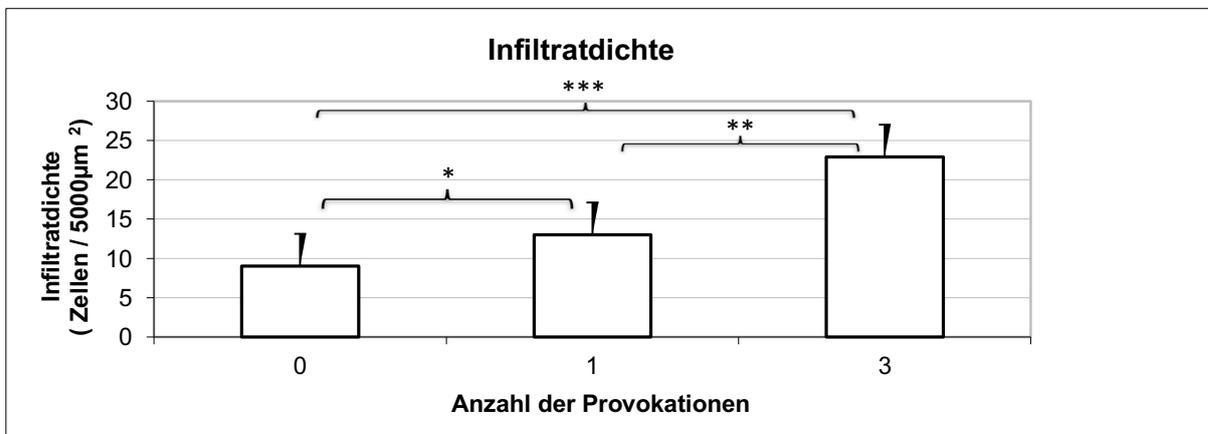
Die Planung und Umsetzung der statistischen Auswertung der Daten erfolgte in Kooperation mit Frau Anne Daubmann vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie (IMBE) des UKE. Es wurden linear gemischte Modelle unter Berücksichtigung der Abhängigkeitsstruktur erstellt (Syntax s. Anhang). Die Auswertung aller metrischen Variablen erfolgte in SPSS (s.o.). Die Auswertung von Cx26, der einzigen kategorialen Variable, wurde anhand gemischter logistischer Regression Modelle unter Berücksichtigung der Abhängigkeitsstruktur in SAS umgesetzt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Dichte des dermalen Infiltrats

Da eine wichtige Einflussgrösse zur Entwicklung des Ekzems inflammatorische Zellen sind, wurde zu Beginn der Arbeit zur Charakterisierung des inflammatorischen Geschehens im Ekzem die Infiltratdichte bestimmt (zur Bestimmung der Infiltratdichte siehe Methoden).

Die Auszählung der Gesamt-Zellzahl in der Dermis ergab in allen Fällen eine deutliche Zunahme der Zellzahl in läsionaler muriner Haut gegenüber Kontrollhaut. Sie entsprach in den meisten Fällen in etwa einer Verdopplung. Die Infiltratdichte korrelierte signifikant mit der Anzahl der gesetzten Ovalbumin-Injektionen (Provokationen) (Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1:** Darstellung der mittleren dermalen Infiltratdichte von Kontrollhaut (Anzahl der Provokationen = 0) im Vergleich zu läsionaler Haut nach einmaliger und dreimaliger Provokation mit Ovalbumin im AID-Mausmodell (n=9, Standardfehler (*SEM*), \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ )

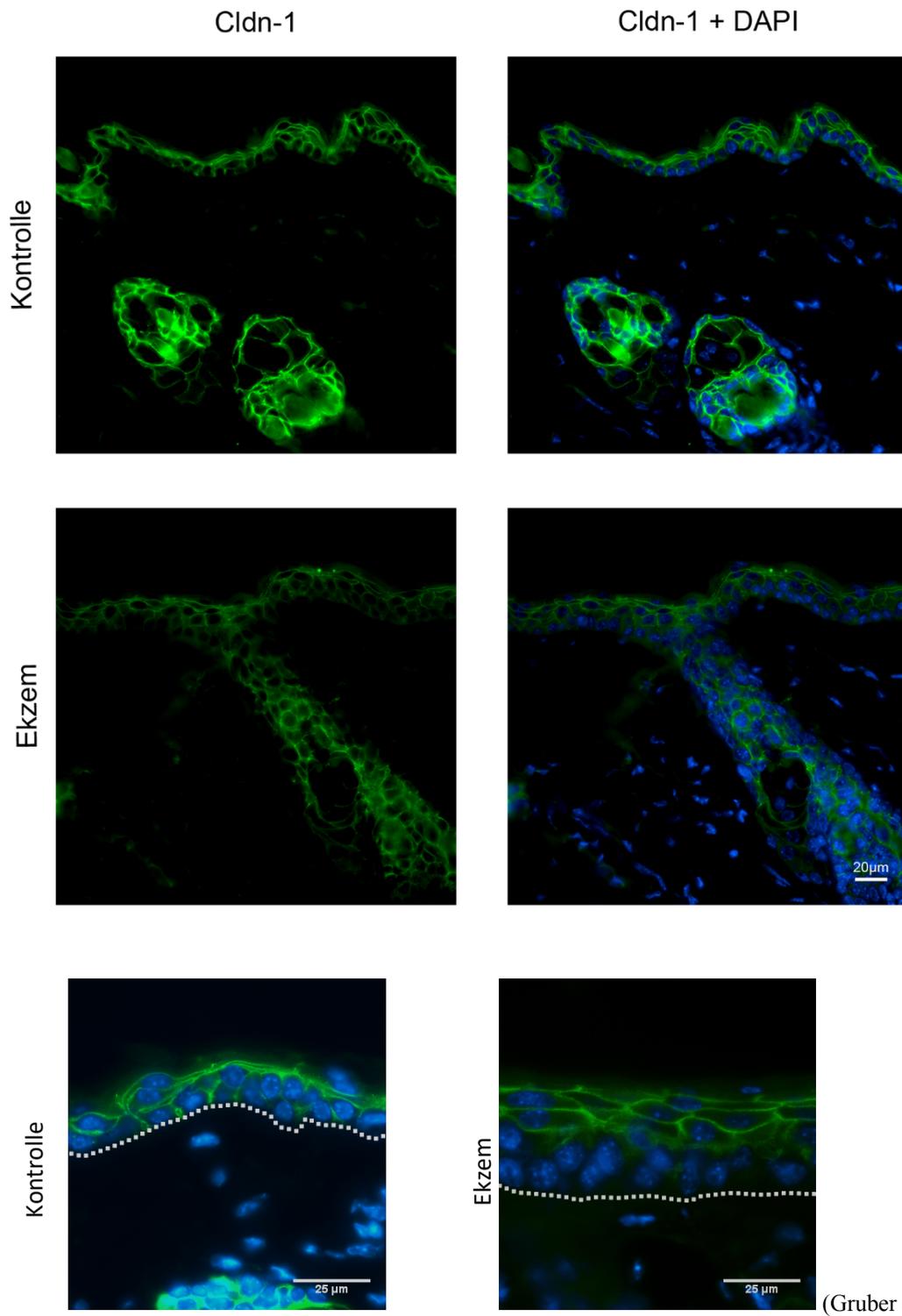
### 4.2 Lokalisation der TJ-Proteine im AID-Mausmodell

Die Lokalisation der TJ-Proteine Cldn-1 und ZO-1 wurde bereits in der Doktorarbeit von Christian Börnchen bestimmt (Börnchen 2013). Allerdings wurde dort die Lokalisation zur Quantifizierung und statistischen Auswertung in Kategorien eingeteilt. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden nun noch darüber hinaus die Intensität der Cldn-1-Färbung in

den oberen und unteren Bereichen der Epidermis bestimmt sowie die Distanz im unteren Bereich, in der kein Cldn-1 an den Zell-Zell-Grenzen zu finden ist. Darüber hinaus wurde die Strecke gemessen, in der kein ZO-1 zu finden war.

#### **4.2.1 Lokalisation von Cldn-1 im AID-Mausmodell**

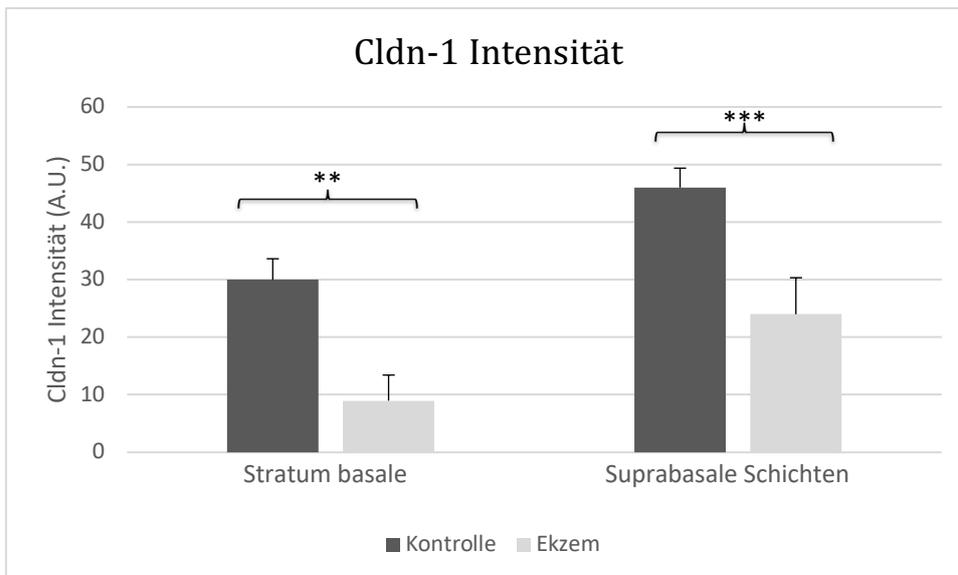
Das TJ-Protein Cldn-1 fand sich in Kontrollhaut in allen Schichten der Epidermis. In läsionaler Haut hingegen war die Intensität der Cldn-1-Färbung sowohl im Stratum basale als auch in den suprabasalen Schichten deutlich geringer (Abb. 4.2). In einigen Fällen war im Stratum basale überhaupt keine Intensität mehr messbar. Statistisch waren die semiquantitativ gemessenen Intensitätsunterschiede zwischen Kontrollhaut und läsionaler Haut signifikant (Abb. 4.3). Die beginnend an der Basallamina gemessene Strecke ohne Cldn-1 an den Zellgrenzen zeigte sich in läsionaler Haut signifikant verlängert (Abb. 4.4). Dies galt auch unter Berücksichtigung der insgesamt verbreiterten Epidermis im Ekzem (Abb. 4.5).



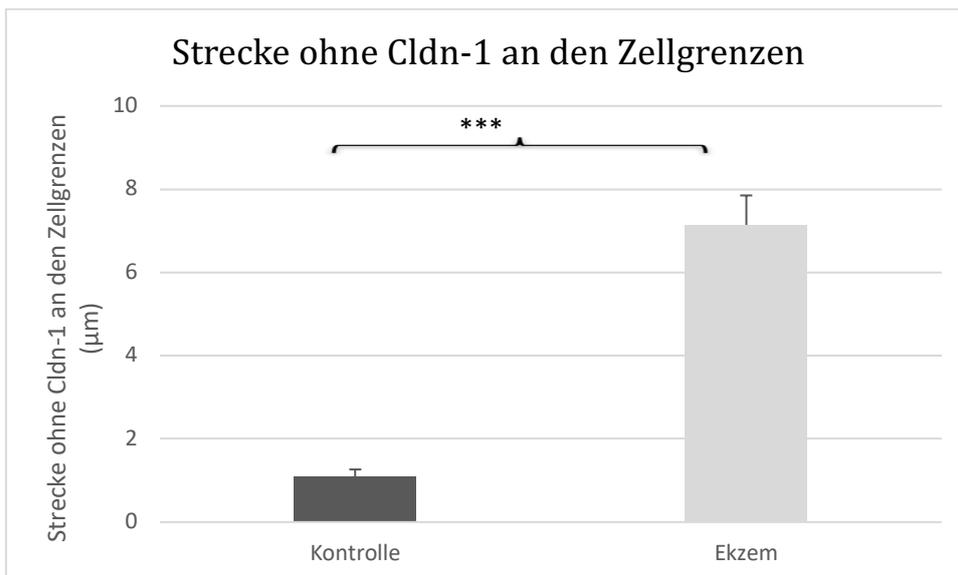
(Gruber et al. 2015)

**Abbildung 4.2:** Repräsentative immunhistochemische Färbung von Cldn-1 (grün) im AID-Mausmodell auf Paraffinschnitten von Kontrollhaut (obere Reihe) und läSIONaler Maushaut (mittlere Reihe). In Kontrollhaut fand sich Cldn-1 an den Zellgrenzen in allen epidermalen Schichten. In läSIONaler Haut zeigten sich eine deutliche Verminderung der Cldn-1-Intensität im SB, sowie eine leichtere Verminderung in den suprabasalen Schichten. Zur Verdeutlichung der Veränderungen Abbildung mit vergrößerter Darstellung (untere Reihe,

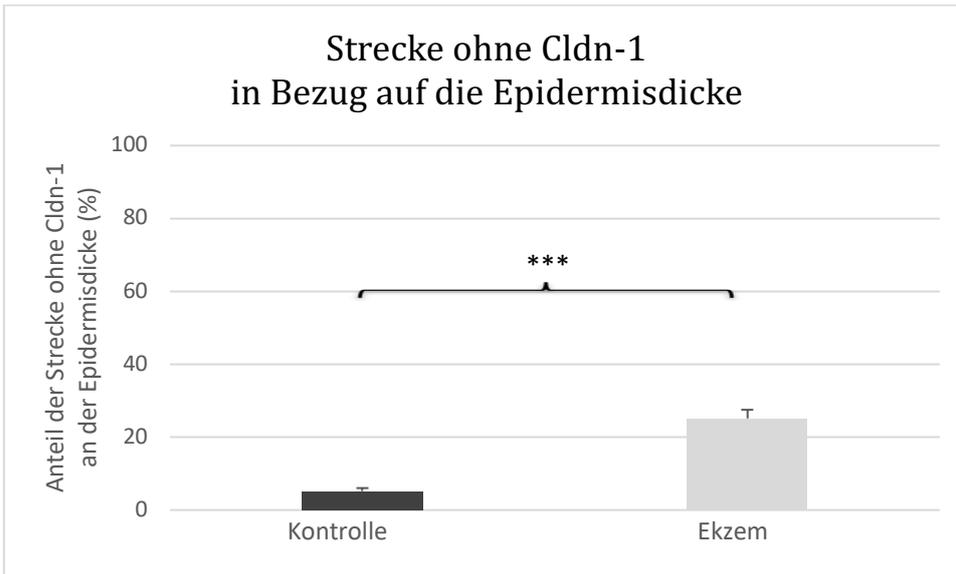
(Gruber et al. 2015)). Die Kombination mit der DAPI-Kernfärbung erleichtert die Beurteilung der Epidermisdicke und –struktur, sowie des dermalen Infiltrats.



**Abbildung 4.3:** Darstellung der Cldn-1 Intensität in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im Stratum basale und in den suprabasalen Schichten im AID-Mausmodell (n=6, Mittelwerte + Standardfehler (SEM), \*\*: p<0,01 , \*\*\*: p<0,001)



**Abbildung 4.4:** Darstellung der Strecke ohne Cldn-1 an den Zellgrenzen beginnend an der Basallamina in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im AID-Mausmodell (n=8, Mittelwerte + Standardfehler (SEM), \*\*\*: p<0,001)

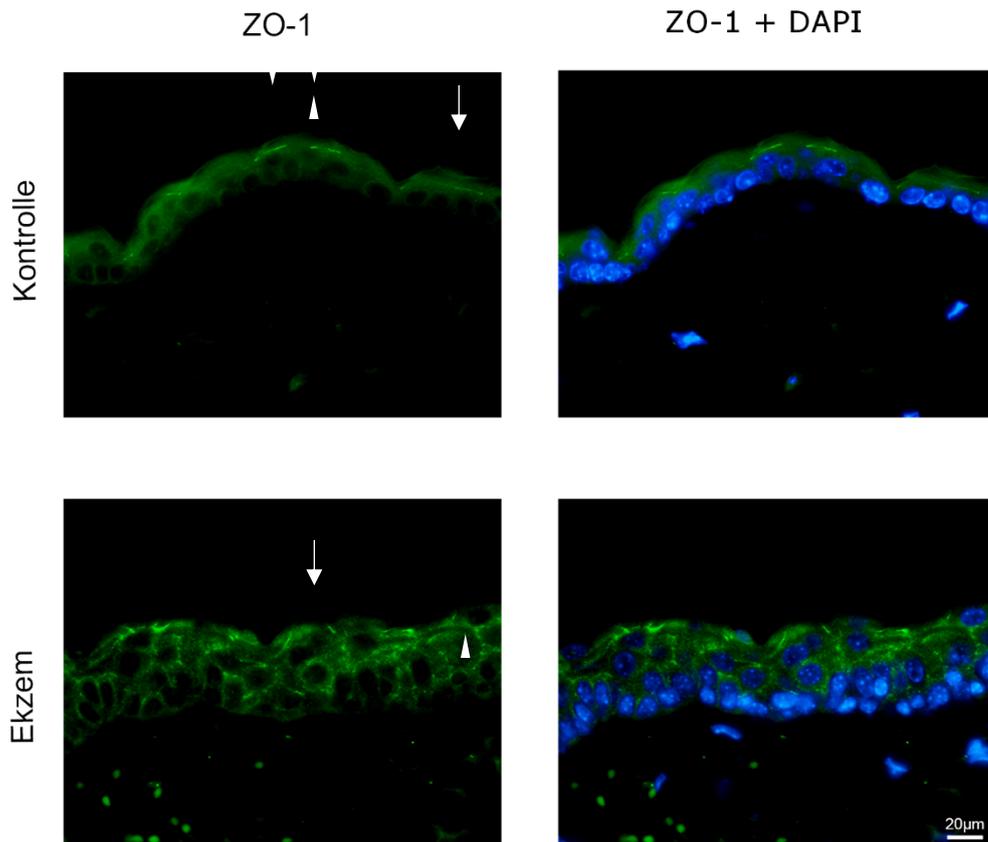


**Abbildung 4.5:** Darstellung des prozentualen Anteils der Strecke ohne Cldn-1 Färbung beginnend an der Basallamina an der Epidermisdicke in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im AID-Mausmodell (n=8, Mittelwerte + Standardfehler (*SEM*), \*\*\*:  $p < 0,001$ )

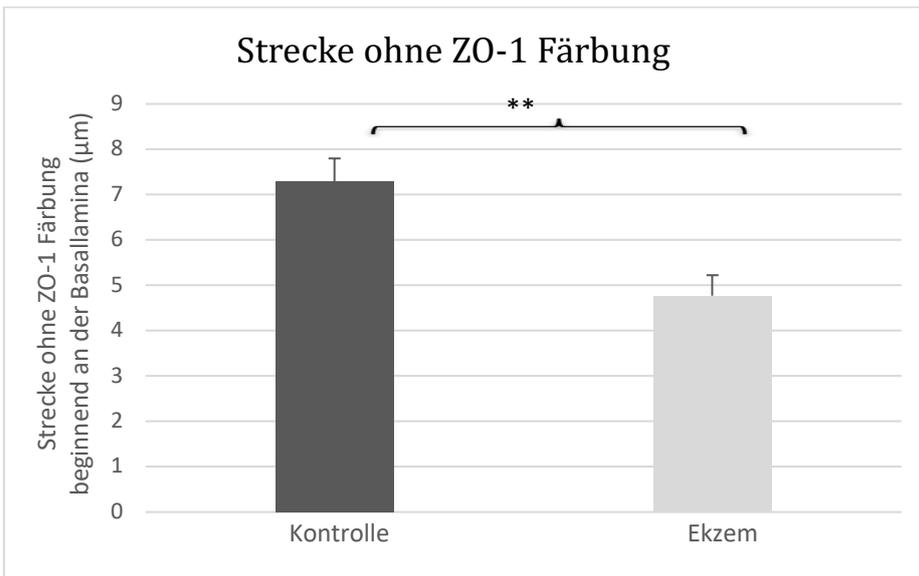
#### 4.2.2 Lokalisation von ZO-1 im AID-Mausmodell

In Kontrollhaut war die Lokalisation von ZO-1 auf das Stratum granulosum begrenzt. In läsionaler Haut hingegen wurde eine Verbreiterung der ZO-1 Färbung in Richtung der unteren suprabasalen Schichten gemessen (Abb. 4.6). Diese Veränderung im Vergleich zu Kontrollhaut war statistisch signifikant (Abb. 4.7). Trotz dieser insgesamt vermehrten ZO-1 Färbung innerhalb der Epidermis, schien eine intensive ZO-1 Färbung, wie sie in Kontrollhaut erscheint, auf die nahe der Hautoberfläche gelegenen epidermalen Schichten begrenzt zu sein, wodurch sich im Ekzem, eine verlängerte Strecke ohne intensive ZO-1 Färbung ergab (Abb. 4.8). Eine Normalisierung der Strecken auf die im Ekzem größere Epidermisdicke zeigte, dass, auch wenn diese berücksichtigt wurde, die ZO-1 Färbung insgesamt verbreitert ist (Abb. 4.9) und gleichzeitig ein signifikant längerer Anteil im

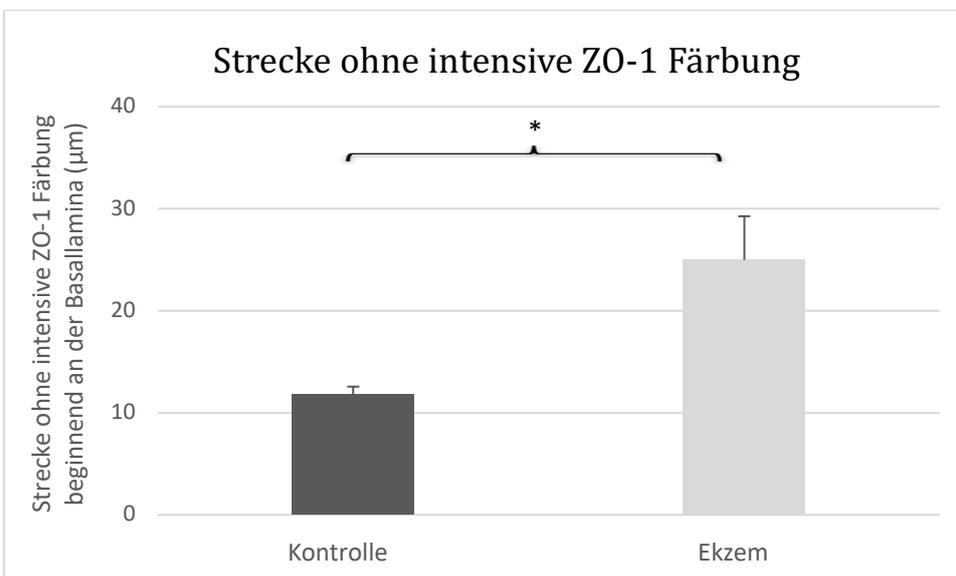
Ekzem ohne intensive ZO-1 Färbung besteht (Abb. 4.10).



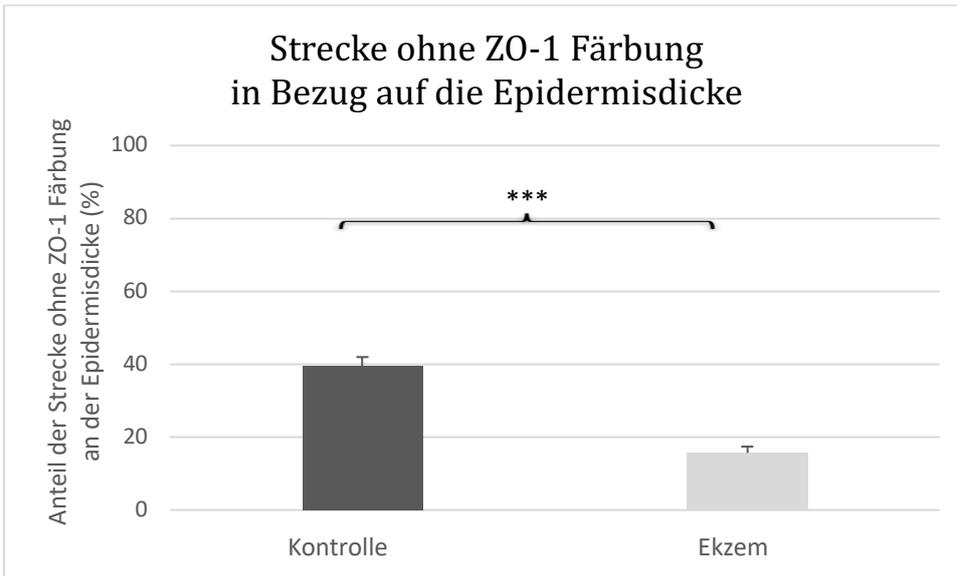
**Abbildung 4.6:** Repräsentative immunhistochemische Färbung von ZO-1 (grün) im AID-Mausmodell auf Paraffinschnitten von Kontrollhaut (obere Reihe) und läSIONALER MAUSHAUT (untere Reihe). In Kontrollhaut ist die ZO-1 Färbung auf das SG begrenzt. In läSIONALER MAUSHAUT zeigt sich eine Verbreiterung der ZO-1 Färbung in tiefere epidermale Schichten (siehe Pfeilspitzen). Intensiv gefärbte ZO-1 Punkte finden sich auch in läSIONALER MAUSHAUT vor allem in den oberen epidermalen Schichten (Pfeile). Die Kombination mit der DAPI-Kernfärbung erleichtert die Beurteilung der Epidermisdicke und -struktur, sowie des dermalen Infiltrats.



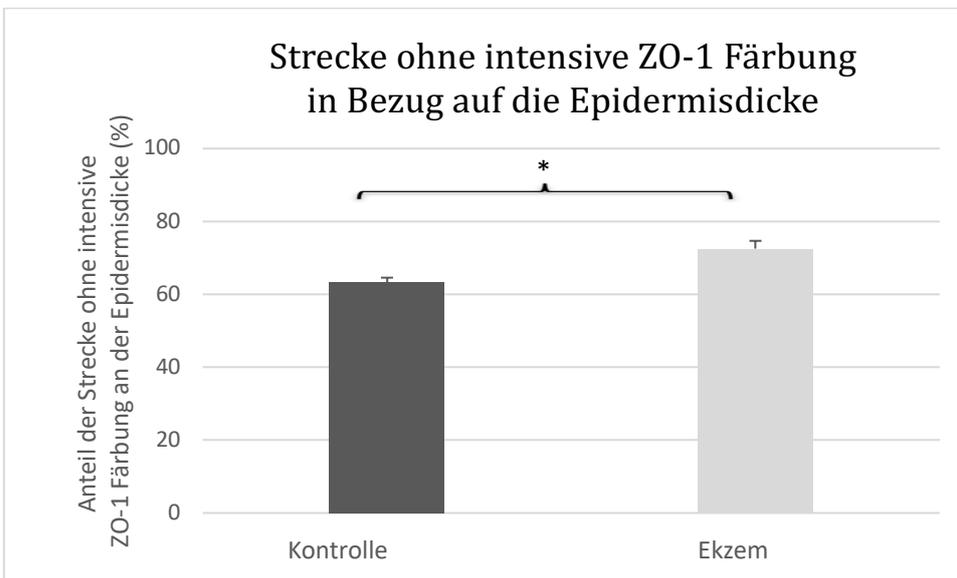
**Abbildung 4.7:** Darstellung der Strecke ohne ZO-1 Färbung beginnend an der Basallamina in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im AID-Mausmodell (n=9, Mittelwerte + Standardfehler (*SEM*), \*\*: p<0,01)



**Abbildung 4.8:** Darstellung der Strecke ohne intensive ZO-1 Färbung beginnend an der Basallamina in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im AID-Mausmodell (n=9, Mittelwerte + Standardfehler (*SEM*), \*: p<0,05)



**Abbildung 4.9:** Darstellung des prozentualen Anteils der Strecke ohne ZO-1 Färbung beginnend an der Basallamina an der Epidermisdicke in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im AID-Mausmodell (n=9, Mittelwerte + Standardfehler (*SEM*), \*\*\*:  $p < 0,001$ )

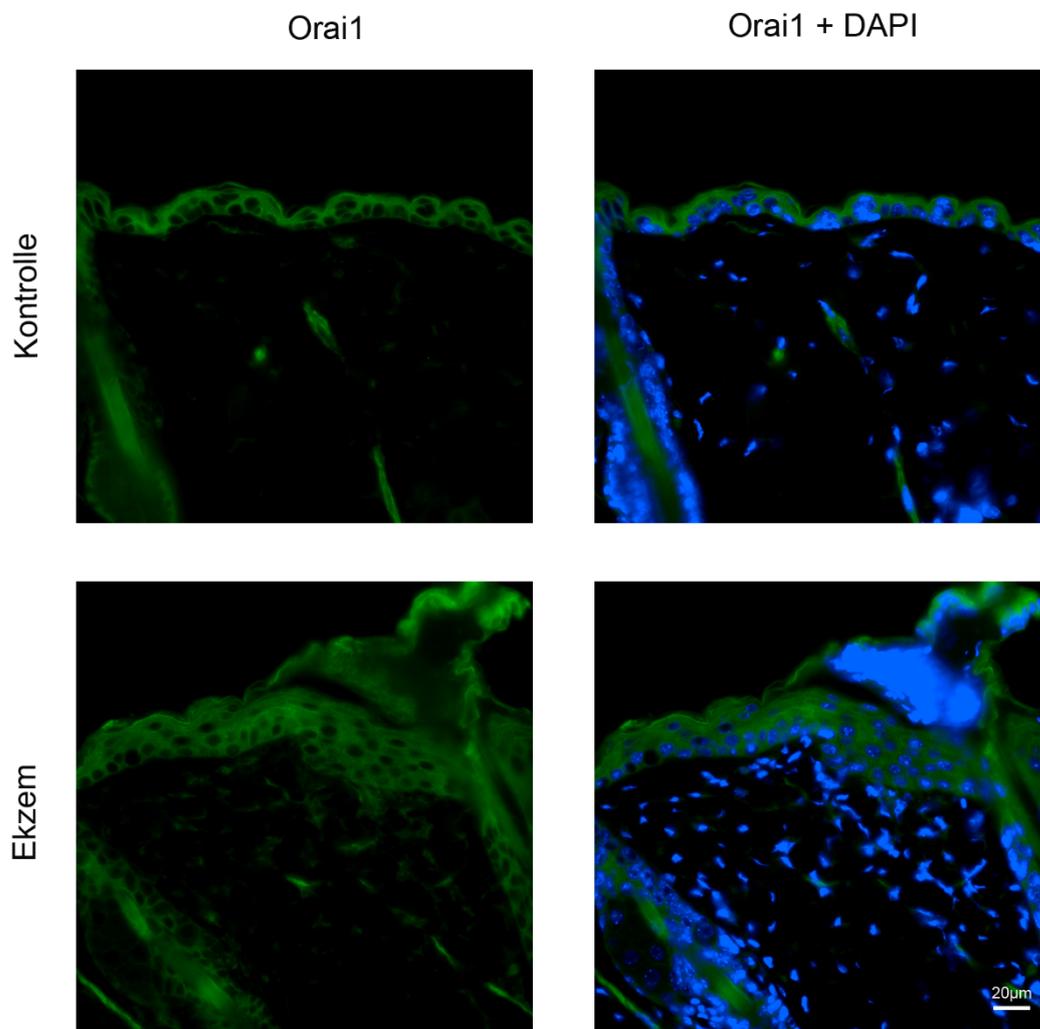


**Abbildung 4.10:** Darstellung des prozentualen Anteils der Strecke ohne intensive ZO-1 Färbung an der gesamten Epidermisdicke in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im AID-Mausmodell (n=9, Mittelwerte + Standardfehler (*SEM*), \*:  $p < 0,05$ )

### 4.3 Expression von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen im AID-Mausmodell

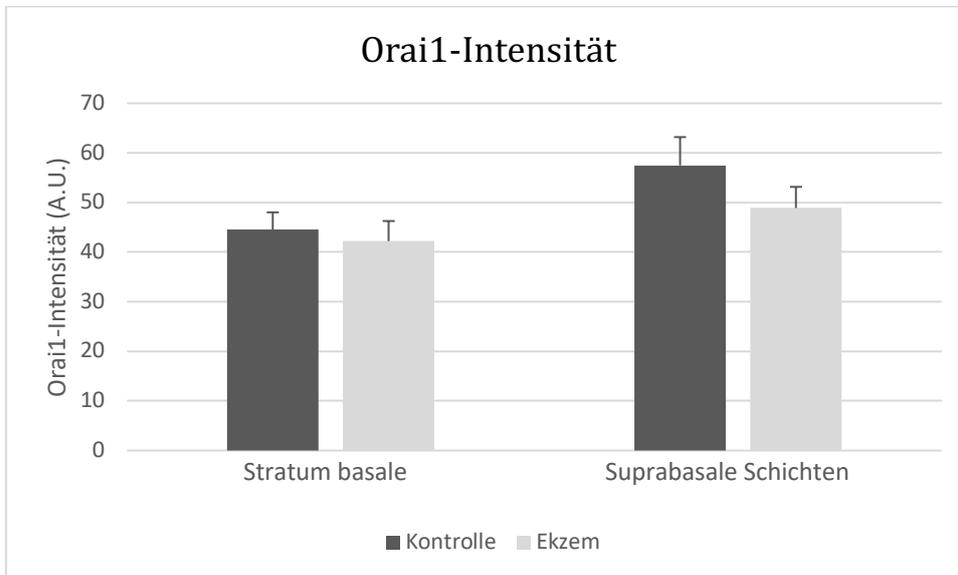
#### 4.3.1 Expression von Orai1 im AID-Mausmodell

Orai1 war in der folliculären und in allen Schichten der interfolliculären Epidermis vorhanden. Auf zellulärer Ebene war Orai1 vorwiegend an den Zellgrenzen, in geringerem Ausmaß jedoch auch im Zytoplasma lokalisiert. In läsionaler Haut im AID-Mausmodell ließen sich kaum Veränderungen in diesem Expressionsmuster erkennen (Abb. 4.11). Zur quantitativen Auswertung wurde hier die Intensität der Färbung im Stratum basale und in den suprabasalen Schichten gemessen. Die Intensitätsmessungen zeigten lediglich eine geringe, nicht signifikante Verminderung der Intensität in den suprabasalen Schichten (Abb. 4.12).



**Abbildung 4.11:** Repräsentative immunhistochemische Färbung von Orai1 (grün) im AID-Mausmodell auf Paraffinschnitten von Kontrollhaut (obere Reihe) und läsionaler Maushaut

(untere Reihe). In läsionaler Haut fand sich gegenüber Kontrollhaut eine minimal verminderte Intensität in den suprabasalen Schichten. Die Kombination der Orai1-Färbung mit der DAPI-Kernfärbung verdeutlicht die Epidermisdicke und -struktur, sowie die Zunahme des dermalen Infiltrats in läsionaler Haut.

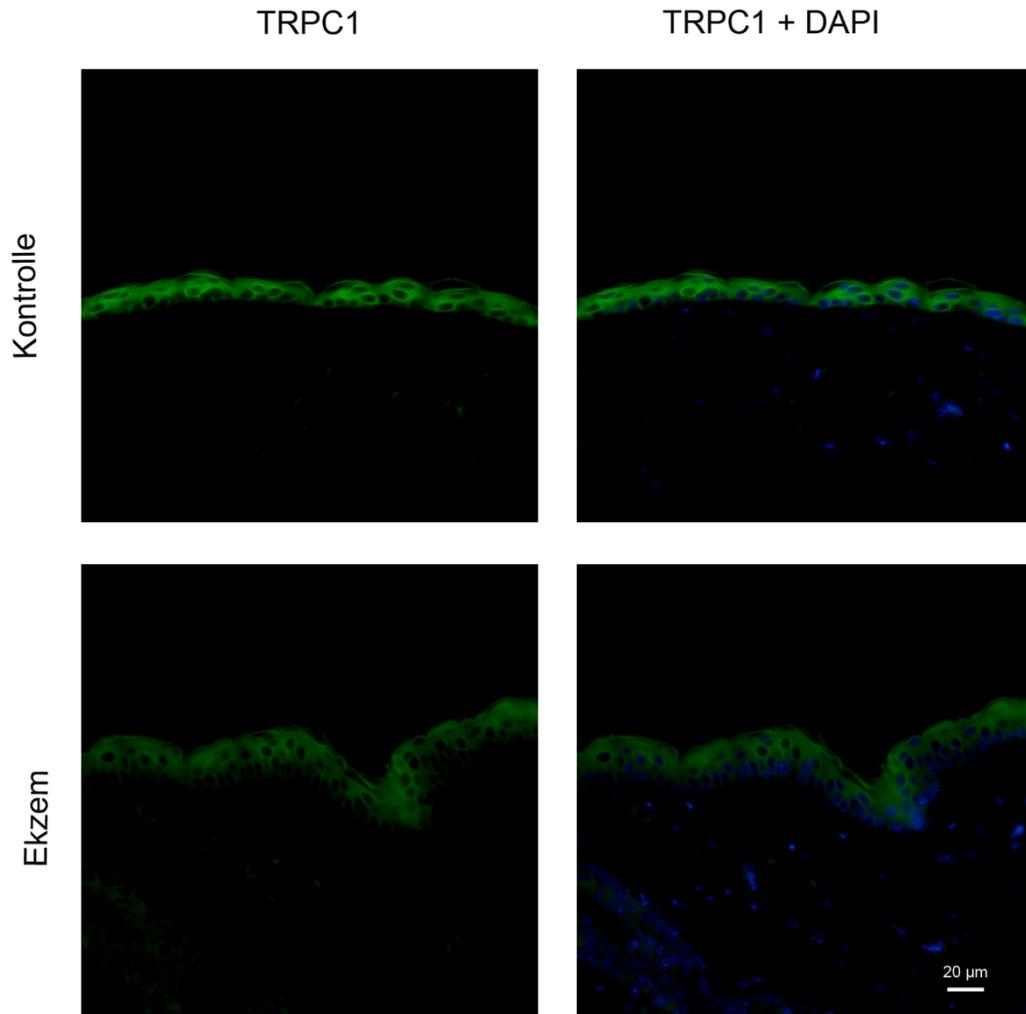


**Abbildung 4.12:** Darstellung der Orai1-Intensität in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im Stratum basale und in den suprabasalen Schichten im AID-Mausmodell (n=9, Mittelwerte + Standardfehler (*SEM*))

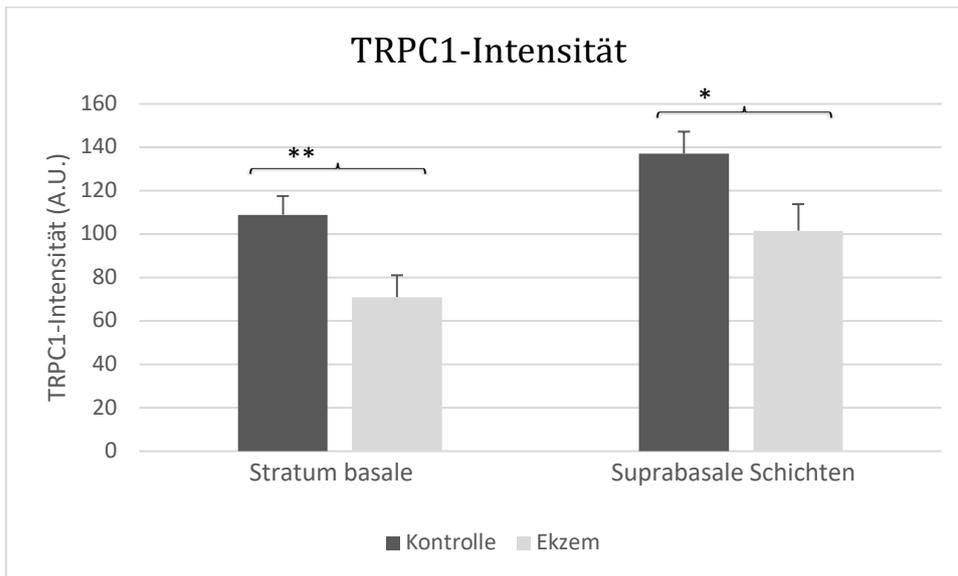
#### 4.3.2 Expression von TRPC1 im AID-Mausmodell

TRPC1 war in allen epidermalen Schichten vorhanden – sowohl in Kontrollhaut als auch in läsionaler Haut. Auf zellulärer Ebene fand sich eine Färbung der Zellgrenzen, was mit einer Lokalisation in der Plasmamembran vereinbar ist, und des Zytoplasmas der Keratinozyten (Abb. 4.13). Zur quantitativen Auswertung wurde hier die Intensität der Färbung im Stratum basale und in den suprabasalen Schichten gemessen.

Die Intensitätsauswertung zeigte eine deutliche Verminderung der Intensität in läsionaler Haut gegenüber Kontrollhaut, sowohl in der basalen als auch in den suprabasalen Schichten (Abb. 4.14).



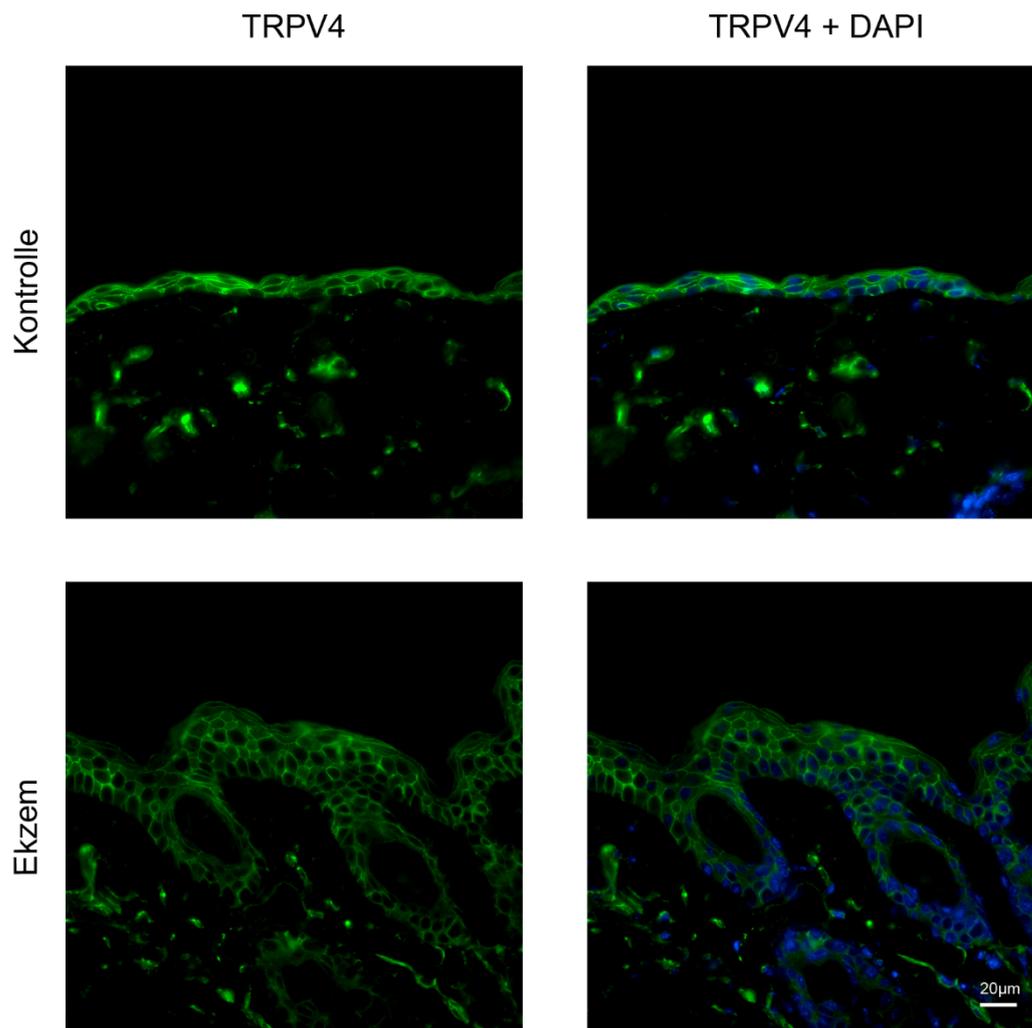
**Abbildung 4.13:** Repräsentative immunhistochemische Färbung von TRPC1 (grün) im AID-Mausmodell auf Paraffinschnitten von Kontrollhaut (obere Reihe) und läsionaler Maushaut (untere Reihe; Ekzem). Rechte Seite: Zellkerne sind mit Dapi markiert. Die TRPC1-Färbung erstreckt sich über alle epidermalen Schichten, ist jedoch in läsionaler Haut gegenüber Kontrollhaut in der basalen und den suprabasalen Schichten in ihrer Intensität gemindert.



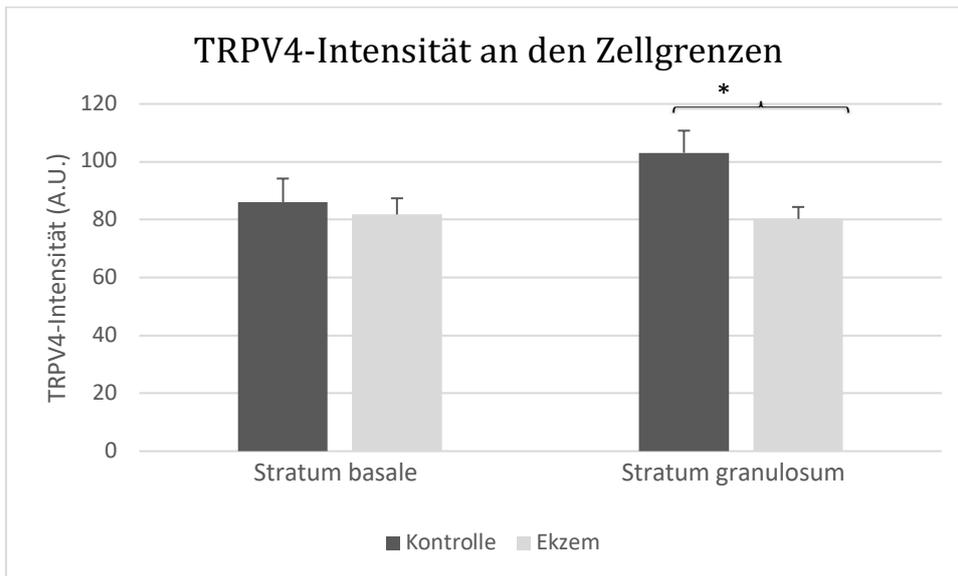
**Abbildung 4.14:** Darstellung der TRPC1-Intensität in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im Stratum basale und in den suprabasalen Schichten im AID-Mausmodell (n=9, Mittelwerte + Standardfehler (*SEM*), \*: p<0,05, \*\*: p<0,01)

#### 4.3.3 Färbung von TRPV4 im AID-Mausmodell

TRPV4 war in allen lebenden Schichten der Epidermis an den Zellgrenzen lokalisiert. Stellenweise ließ sich eine typische apikale Akzentuierung feststellen. Das Lokalisationsmuster in läsionaler und Kontrollhaut war subjektiv betrachtet sehr ähnlich (Abb. 4.15). Zur quantitativen Auswertung wurde hier die Intensität der Färbung im SB und im SG gemessen. Die Intensitätsmessungen zeigten eine signifikant reduzierte Intensität im SG, die Intensitäten im SB zeigten keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4.16).



**Abbildung 4.15:** Repräsentative immunhistochemische Färbung von TRPV4 (grün) im AID-Mausmodell auf Paraffinschnitten von Kontrollhaut (obere Reihe) und läSIONaler Maushaut (untere Reihe). In läSIONaler Haut fand sich gegenüber Kontrollhaut eine leicht reduzierte TRPV4-Intensität im Stratum granulosum. Die Kombination der TRPV4-Färbung mit der DAPI-Kernfärbung verdeutlicht die Epidermisdicke und -struktur.

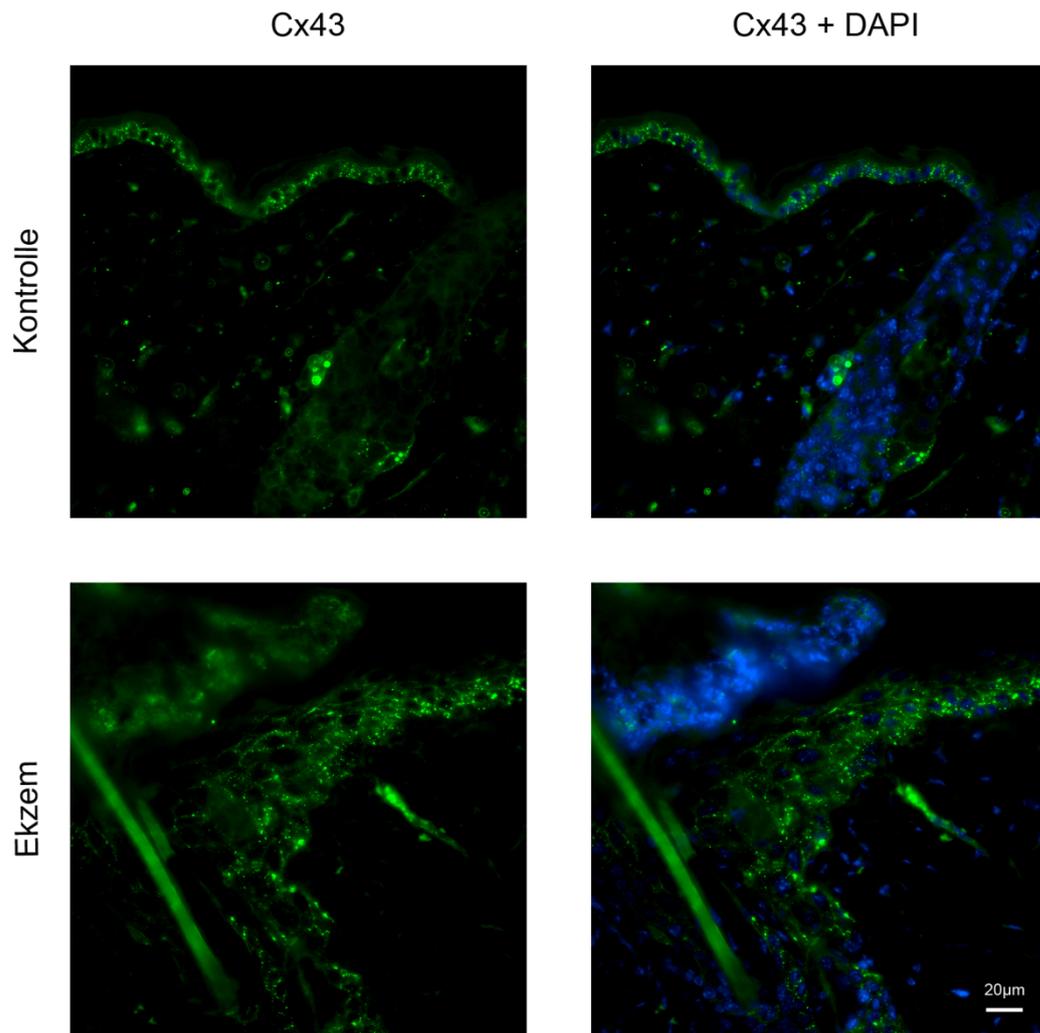


**Abbildung 4.16:** Darstellung der TRPV4-Intensität an den Zellgrenzen in Kontrollhaut (Kontrolle) und läSIONALER Haut (Ekzem) im Stratum basale und im Stratum granulosum im AID-Mausmodell (n=9, Mittelwerte + Standardfehler (*SEM*), \*:  $p < 0,05$ )

#### 4.4 Lokalisation der Connexine Cx43 und Cx26 im AID-Mausmodell

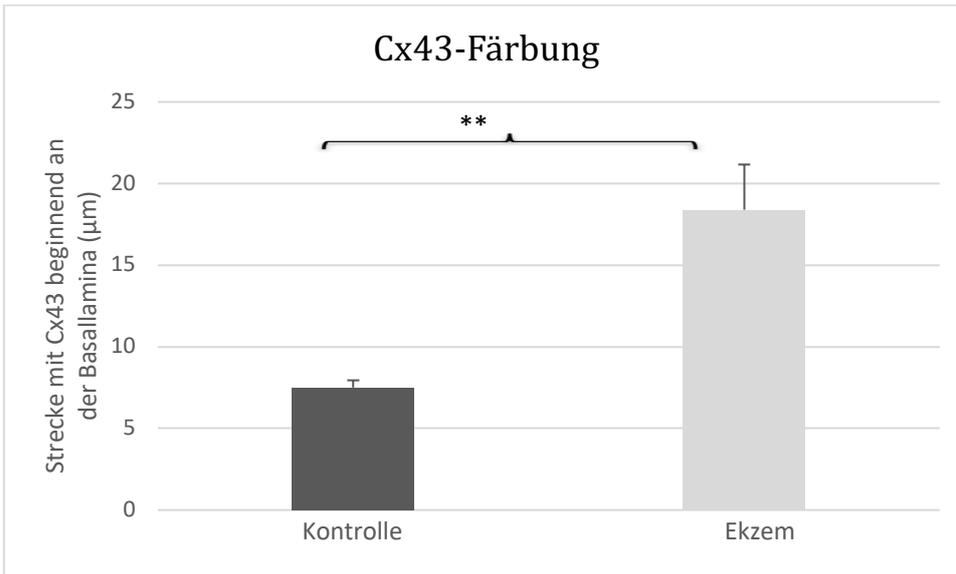
##### 4.4.1 Lokalisation von Cx43 im AID-Mausmodell

In normaler Maushaut fand sich Cx43 im Stratum basale der Epidermis. Die Cx43 Lokalisation in läSIONALER Haut erstreckte sich zusätzlich in suprabasale Schichten (Abb. 4.17).



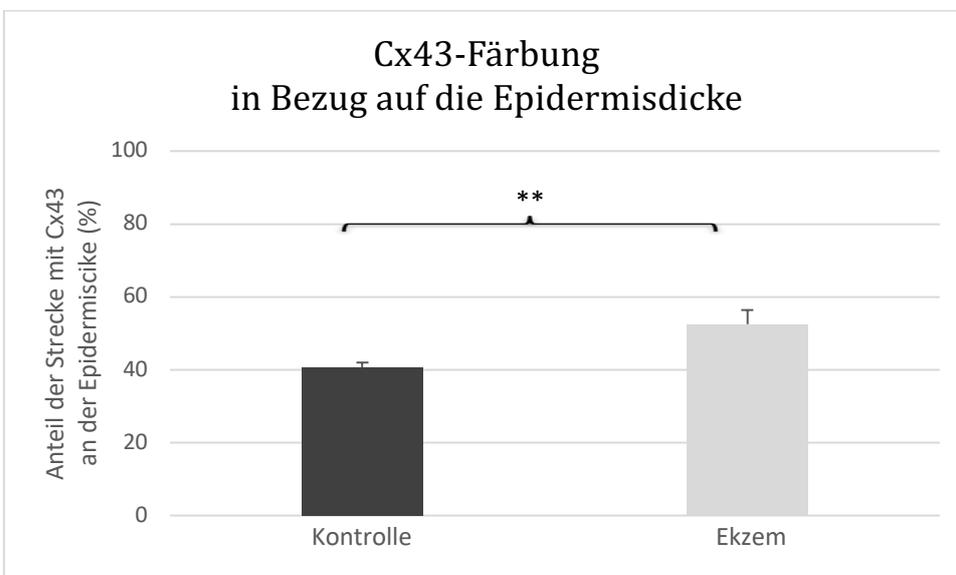
**Abbildung 4.17:** Repräsentative immunhistochemische Färbung von Cx43 (grün) im AID-Mausmodell auf Paraffinschnitten von Kontrollhaut (obere Reihe) und läsionaler Maushaut (untere Reihe). In Kontrollhaut ist die Cx43-Färbung auf das SB beschränkt. Im Ekzem findet sich zusätzlich zu der basalen Lokalisation eine typische Färbung in mehreren suprabasalen Schichten. Die Kombination mit der DAPI-Kernfärbung verdeutlicht die Veränderung der Epidermisdicke und –struktur im Ekzem.

Zur quantitativen Auswertung wurde die Strecke der Cx43-Färbung beginnend an der Basallamina ausgemessen. Diese war in läsionaler Haut signifikant verlängert (Abb. 4.18).



**Abbildung 4.18:** Darstellung der Strecke mit Cx43 beginnend an der Basallamina in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im AID-Mausmodell (n=9, Mittelwerte + Standardfehler (*SEM*), \*\*: p<0,01)

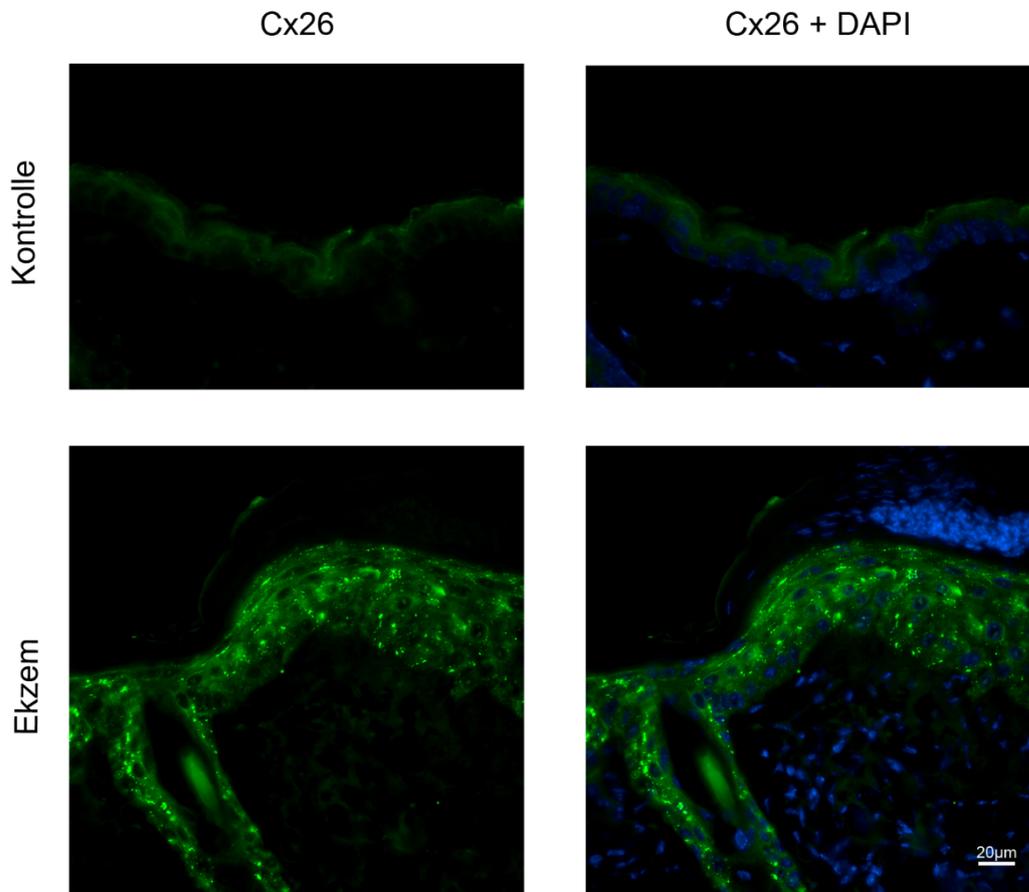
Anhand der Berechnung der anteiligen Cx43-Färbung an der jeweiligen Epidermisdicke konnte gezeigt werden, dass die Verbreiterung der Cx43-Färbung im Ekzem sich auch prozentual über einen größeren Anteil der Epidermis erstreckt, und somit nicht ausschliesslich durch die verdickte Epidermis bedingt ist (Abb. 4.19).



**Abbildung 4.19:** Darstellung des Anteils der Strecke mit Cx43 beginnend an der Basallamina an der gesamten Epidermisdicke in Kontrollhaut (Kontrolle) und läsionaler Haut (Ekzem) im AID-Mausmodell (n=9, Mittelwerte + Standardfehler (*SEM*), \*\*: p<0,01)

#### 4.4.2 Lokalisation von Cx26 im AID-Mausmodell

In Kontrollhaut fand sich keine typische, punktförmige Cx26-Färbung. In läSIONALER Haut hingegen war Cx26 in unterschiedlichem Ausmaß in der basalen und den suprabasalen Schichten vorhanden (Abb. 4.20). Für die statistische Auswertung wurde hier die Cx26-Färbung in die Kategorien ‚vorhanden‘ und ‚nicht vorhanden‘ eingeteilt.



**Abbildung 4.20:** Repräsentative immunhistochemische Färbung von Cx26 (grün) im AID-Mausmodell auf Paraffinschnitten von Kontrollhaut (obere Reihe) und läSIONALER Maushaut (untere Reihe). In Kontrollhaut findet sich keine charakteristische Cx26-Färbung. In läSIONALER Haut hingegen ist eine breite Cx26-Färbung zu sehen, welche sich über basale und suprabasale Schichten erstreckt.

Insgesamt war somit in ekzematöser Maushaut die Lokalisation von Connexinen verändert. Diese Veränderungen schlossen sowohl die Zusammensetzung, als auch die Verteilung innerhalb der Schichten ein.

#### **4.5 Korrelationen der im AID-Mausmodell erhobenen Parameter**

Die hier erhobenen Parameter wurden untereinander und mit den Daten für Proliferation (Verhältnis Ki67 positiver Zellen zu DAPI gefärbten Zellen in der Epidermis), Differenzierung (Strecke ohne CK10 und Strecke CK14 in der Epidermis), Epidermisdicke (SHG-Signal) und Calcium-Gradient (FLIM-Messungen) die dem Datensatz von Christian Börnchens Doktorarbeit entnommen wurden (Börnchen 2013), korreliert.

Da im AID-Mausmodell die Induktion des Ekzems durch Provokation einer Immunantwort erfolgt, kann davon ausgegangen werden, dass das immunologische Geschehen am Anfang der Veränderungen zu finden ist. Deshalb werden für das Infiltrat die Korrelationen „Einfluss des Infiltrats auf...“ und nicht die umgekehrten Korrelationen dargestellt. Für alle anderen Parameter wurden jeweils die Korrelationen in beide Richtungen bestimmt, der Übersichtlichkeit wegen werden hier aber nur signifikante oder knapp über der Signifikanzgrenze liegende Daten dargestellt. Die anderen Daten finden sich im Anhang. Im Sinne einer anschaulicheren Darstellung der Ergebnisse wurde eine beidseitige signifikante statistische Korrelation zweier Parameter im Folgenden als „Korrelation“ bezeichnet, während eine nur in eine „Richtung“ signifikante statistische Korrelation als „Einfluss von x auf y“ erfasst wird. Zu Bedenken ist hierbei, dass dieser Ausdruck zur besseren Übersicht verwendet wird und lediglich ein statistisches Ergebnis repräsentiert, wobei dies nicht mit einem Einfluss im biologischen Sinne und schon gar nicht mit einer Kausalität verbunden sein muss. Die Erarbeitung von möglichen Kausalketten in ihrer biologischen Plausibilität wird in der Diskussion erörtert.

#### **4.6 Einfluss der dermalen Infiltratdichte**

Um zu testen, inwieweit das dermale Infiltrat, die beobachteten Veränderungen im Ekzem antreiben könnte, wurde die Infiltratdichte mit Proliferation, Differenzierung und Epidermisdicke sowie Veränderungen des Calcium-Gradienten, den TJ Proteinen, den Calcium-Kanälen und den Connexinen korreliert.

#### 4.6.1 Korrelation der Infiltratdichte mit Proliferation, Differenzierung und Epidermisdicke

Die Infiltratdichte zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Differenzierungsmarker CK10 und CK14. Zu CK14, dem Marker für undifferenzierte Zellen, besteht eine positive Korrelation, zu CK10 eine negative (Tab. 4.1).

**Tabelle 4.1:** Korrelation der dermalen Infiltratdichte („DermInf“) mit den Differenzierungsmarkern CK10 und CK14

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
DermInf	Strecke kein CK10	7	0,22	0,01	0,43	0,043
DermInf	Strecke CK14	7	0,26	0,04	0,48	0,026

Des Weiteren bestand ein signifikant positiver Einfluss der Infiltratdichte auf die Proliferation, repräsentiert durch den Ki67-Index, und die Epidermisdicke (Tab. 4.2).

**Tabelle 4.2:** Korrelation der dermalen Infiltratdichte mit der Proliferation (Ki67-Index) und der Epidermisdicke

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
DermInf	Ki67-Index	5	0,01	0,00	0,02	0,014
DermInf	Epidermisdicke	7	0,88	0,59	1,16	< 0,001

#### 4.6.2 Korrelation der Infiltratdichte mit dem Calcium-Gradienten

Es bestand ein signifikant positiver Einfluss der Infiltratdichte auf die Ca<sup>2+</sup>-Baseline und auf die intra- und extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG (Tab. 4.3). Das dermale Infiltrat korrelierte nicht mit dem Gesamtcalcium in der Epidermis (s. Anhang). (Zur Erklärung der Begrifflichkeiten siehe auch Kapitel 1.6)

**Tab. 4.3:** Korrelation der dermalen Infiltratdichte mit der Ca<sup>2+</sup>-Baseline und der intra- und extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
DermInf	Ca <sup>2+</sup> Baseline	6	0,43	0,17	0,69	0,003
DermInf	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	7	9,63	1,58	17,69	0,025
DermInf	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	7	10,12	1,23	19,09	0,030

#### 4.6.3 Korrelation der Infiltratdichte mit der Färbung von TJ-Proteinen, Calcium-Kanälen und Connexinen

In Bezug auf die TJ-Proteine bestand ein signifikant positiver Einfluss der dermalen Infiltratdichte auf die ZO-1 Lokalisation sowie ein insgesamt negativer Einfluss auf die Cldn-1 Färbung (im Sinne einer Verlängerung der Strecke ohne Cldn-1 Färbung und einer Verminderung der Cldn-1 Intensität in den suprabasalen Schichten). Eine tendenzielle Korrelation bestand ebenfalls zu der Cldn-1 Intensität im SB (Tab. 4.4).

**Tabelle 4.4:** Korrelation der dermalen Infiltratdichte mit der Färbung der TJ-Proteine ZO-1 und Cldn-1

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
DermInf	Strecke ohne ZO-1 gesamt	7	-0,18	-0,34	-0,02	0,031
DermInf	Strecke ohne Cldn-1	6	0,57	0,21	0,94	0,006
DermInf	Cldn-1 Intensität basal	4	-2,5	-5,15	0,15	0,061
DermInf	Cldn-1 Intensität suprabasal	4	-3,69	-6,7	-0,37	0,037

Die dermale Infiltratdichte beeinflusste tendenziell, allerdings statistisch nicht signifikant, die TRPC1-Intensität in der basalen sowie in den suprabasalen Schichten (s. Anhang). Es bestand jedoch keine Korrelation mit den anderen untersuchten Ca<sup>2+</sup>-Kanälen. Zudem

bestand keine Korrelation der Infiltratdichte mit der Färbung der Connexine Cx26 und Cx43 (s. Anhang).

#### **4.7 Korrelationen weiterer immunologischer Komponenten mit den untersuchten Parametern**

Weder das Gesamt-IgE noch das spezifische IgE-OVA, die in der Arbeit von C. Börnchen bestimmt wurden, hatten einen signifikanten Einfluss auf die in dieser Arbeit untersuchten Parameter. Im Einzelnen bestand also kein Einfluss auf die Dichte des dermalen Infiltrats, die Epidermisdicke, die Expression der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, Connexine, TJ-Proteine, Differenzierungsmarker sowie Parameter der Proliferation.

#### **4.8 Korrelationen mit Parametern des Ekzems**

##### **4.8.1 Korrelation von TJ-Proteinen mit der Epidermisdicke und der Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten**

Im AID-Mausmodell bestanden signifikante Korrelationen zwischen den TJ-Proteinen Cldn-1 und ZO-1 und der Epidermisdicke (Tab. 4.5). Ein Verlust von Cldn-1 an den Zellgrenzen korrelierte mit einem Anstieg der Epidermisdicke. Eine Verbreiterung der ZO-1 Färbung korrelierte ebenfalls mit einer Zunahme der Epidermisdicke. Des Weiteren fanden sich signifikante Korrelationen der intensiven ZO-1 Färbung, sowie der Strecke ohne Cldn-1 Färbung an den Zellgrenzen beginnend an der Basallamina, mit dem Ki67-Index, welcher die Proliferation der Keratinozyten widerspiegelt (Tab. 4.6). Zudem fanden sich signifikante Korrelationen zwischen den TJ-Proteinen und dem Differenzierungsmarker CK10, sowie dem Marker für undifferenzierte Zellen, CK14 (Tab. 4.7).

**Tabelle 4.5:** Korrelationen von TJ-Proteinen mit der Epidermisdicke

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Epidermisdicke	Strecke ohne Cldn-1	8	0,46	0,24	0,68	0,001
Epidermisdicke	Cldn-1 Intensität basal	6	-1,2	-2,42	0,03	0,054

Epidermisdicke	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	-1,48	-2,95	-0,01	0,049
Epidermisdicke	Strecke ohne ZO-1 gesamt	9	-0,23	-0,39	-0,07	0,008
Epidermisdicke	Strecke ohne ZO-1 intensiv	9	0,91	0,19	1,64	0,017
Strecke ohne Cldn-1	Epidermisdicke	8	1,22	0,66	1,79	0,001
Cldn-1 Intensität basal	Epidermisdicke	6	-0,28	-0,54	-0,02	0,039
Cldn-1 Intensität suprabasal	Epidermisdicke	6	-0,25	-0,43	-0,07	0,015
Strecke ohne ZO-1 gesamt	Epidermisdicke	9	-1,67	-2,8	-0,54	0,007
Strecke ohne ZO-1 intensiv	Epidermisdicke	9	0,34	0,07	0,60	0,016

**Tabelle 4.6:** Korrelationen von TJ-Proteinen mit der Proliferation

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Strecke ohne ZO-1 intensiv	Ki67Index	7	0,01	0,00	0,01	0,007
Strecke ohne Cldn-1	Ki67Index	6	0,03	0,01	0,04	0,002
Ki67Index	Strecke ohne ZO-1 intensiv	7	64,73	20,77	108,70	0,008
Ki67Index	Strecke ohne Cldn-1	6	23,41	10,52	36,30	0,002

**Tabelle 4.7:** Korrelationen von TJ-Proteinen mit Differenzierungsmarkern

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Strecke ohne ZO-1 gesamt	Strecke Kein-CK10	9	-0,59	-1,17	-0,01	0,046
Strecke ohne ZO-1 intensiv	Strecke Kein-CK10	9	0,18	0,06	0,29	0,005

Strecke ohne ZO-1 intensiv	Strecke CK14	8	0,23	0,11	0,35	0,001
Cldn-1 Intensität basal	Strecke Kein-CK10	6	-0,16	-0,26	-0,05	0,010
Cldn-1 Intensität basal	Strecke CK14	5	-0,21	-0,39	-0,03	0,033
Cldn-1 Intensität suprabasal	Strecke Kein-CK10	6	-0,13	-0,22	-0,04	0,008
Cldn-1 Intensität suprabasal	Strecke CK14	5	-0,17	-0,30	-0,04	0,015
Strecke ohne Cldn-1	Strecke Kein-CK10	8	0,67	0,38	0,95	0,001
Strecke ohne Cldn-1	Strecke CK14	7	0,76	0,44	1,08	0,001
Strecke Kein-CK10	Strecke ohne ZO-1 gesamt	9	-0,45	-0,78	-0,12	0,014
Strecke Kein-CK10	Strecke ohne ZO-1 intensiv	9	2,25	0,77	3,72	0,005
Strecke Kein-CK10	Cldn-1 Intensität basal	6	-3,20	-5,48	-0,93	0,010
Strecke Kein-CK10	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	-3,99	-6,67	-1,31	0,008
Strecke Kein-CK10	Strecke ohne Cldn-1	8	0,99	0,55	1,43	0,001
Strecke CK14	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	-0,37	-0,71	-0,02	0,039
Strecke CK14	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	2,42	1,24	3,60	0,001
Strecke CK14	Cldn-1 Intensität basal	5	-2,60	-4,55	-0,66	0,015
Strecke CK14	Cldn-1 Intensität suprabasal	5	-3,19	-5,56	-0,82	0,015
Strecke CK14	Strecke ohne Cldn-1	7	0,94	0,53	1,35	0,001

#### 4.8.2 Korrelationen von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen mit Proliferation, Differenzierung und Epidermisdicke

Zwischen der TRPV4-Intensität im SG und dem Ki67-Index bestand eine negative Korrelation. Zudem fand sich ein signifikant negativer Einfluss des Ki67-Index auf die Orai1-Intensität in den suprabasalen Schichten (Tab. 4.8).

Des Weiteren zeigten sich signifikante Korrelationen von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen mit dem Differenzierungsprozess der Keratinozyten. Eine Verminderung der Intensität der TRPC1-Färbung im SB und in den suprabasalen Schichten, sowie der TRPV4-Färbung im SG korrelierten signifikant mit einer Verbreiterung der Lokalisation von CK14 und mit einer Verminderung der Lokalisation von CK10 in den unteren suprabasalen Schichten. (Tab. 4.9). Umgekehrt korrelierte auch der Differenzierungsstatus der Zellen mit der TRPC1-Intensität, der TRPV4-Intensität im SG, sowie der Orai1-Intensität in den suprabasalen Schichten.

Es fanden sich keine signifikanten Korrelationen der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle mit der Epidermisdicke (s. Anhang).

**Tabelle 4.8:** Korrelationen von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen mit der Proliferation

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
TRPV4-Intensität SG	Ki67-Index	6	-0,01	-0,01	-0,00	0,042
Ki67-Index	TRPV4-Intensität SG	6	-72,00	-140,75	-3,24	0,042
Ki67-Index	Orai1-Intensität suprabasal	6	-56,77	-103,06	-10,49	0,025

**Tabelle 4.9:** Korrelationen von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen mit Differenzierungsmarkern

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
TRPV4-Intensität SG	Strecke Kein-CK10	8	-0,07	-0,14	-0,00	0,045
Strecke kein CK10	TRPV4-Intensität SG	8	-3,57	-7,06	-0,09	0,045
TRPV4-Intensität SG	Strecke CK14	7	-0,1	-0,18	-0,02	0,021
Strecke CK14	TRPV4-Intensität SG	7	-3,70	-6,75	-0,65	0,021

TRPC1-Intensität basal	Strecke Kein-CK10	8	-0,04	-0,07	-0,01	0,027
Strecke kein CK10	TRPC1-Intensität basal	8	-7,87	-14,08	-1,65	0,019
TRPC1-Intensität basal	Strecke CK14	7	-0,05	-0,09	-0,02	0,007
Strecke CK14	TRPC1-Intensität basal	7	-7,94	-13,52	-2,35	0,012
TRPC1-Intensität suprabasal	Strecke Kein-CK10	8	-0,03	-0,06	0,00	0,063
Strecke kein CK10	TRPC1-Intensität suprabasal	8	-7,75	-14,65	-0,86	0,032
TRPC1-Intensität suprabasal	Strecke CK14	7	-0,04	-0,08	0,00	0,040
Strecke CK14	TRPC1-Intensität suprabasal	7	-7,05	-13,95	-0,15	0,046
Strecke CK14	Orai1-Intensität suprabasal	7	-1,80	-3,49	-0,10	0,041

#### **4.8.3 Korrelation von Connexinen mit Proliferation, Differenzierung und Epidermisdicke**

Die Cx43-Färbung korrelierte signifikant positiv mit der Proliferation der Keratinozyten und der Epidermisdicke, d.h. in je mehr epidermalen Schichten Cx43 beobachtet wurde, desto höher war die Proliferation und umso breiter war die Epidermis und umgekehrt. Das Vorhandensein von Cx26 hatte einen positiven Einfluss auf die Proliferation und die Epidermisdicke, nicht aber umgekehrt (Tab. 4.10).

Die verbreiterte Expression von Cx43 zeigte zudem eine signifikante Korrelation mit den Differenzierungsmarkern CK10 und CK14 (Tab. 4.10). Cx26 beeinflusste negativ die Lokalisation des Differenzierungsmarkers CK10 und positiv die Lokalisation von CK14, dem Marker undifferenzierter Zellen, d.h. das Vorhandensein von Cx26 beeinflusste signifikant eine spätere CK10- und eine verlängerte CK14-Lokalisation. Die Differenzierungsmarker hatten jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Färbung von Cx26 (s. Anhang).

**Tabelle 4.10:** Korrelationen von Connexinen mit Proliferation, Differenzierung und Epidermisdicke

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Cx43	Ki67-Index	6	0,02	0,01	0,03	0,001
Ki67-Index	Cx43	6	38,59	22,01	55,18	0,001
Cx26	Ki67-Index	6	-0,16	-0,27	-0,04	0,013
Cx43	Epidermisdicke	9	0,55	0,31	0,80	< 0,001
Epidermisdicke	Cx43	9	1,06	0,59	1,53	< 0,001
Cx26	Epidermisdicke	9	-8,32	-10,94	-5,81	< 0,001
Cx26	Strecke kein CK10	8	-4,20	-5,90	-2,51	< 0,001
Cx26	Strecke CK14	7	-5,15	-7,21	-3,09	< 0,001
Cx43	Strecke kein CK10	8	0,28	0,19	0,37	< 0,001
Cx43	Strecke CK14	7	0,32	0,21	0,43	< 0,001
Strecke kein CK10	Cx43	8	2,65	1,86	3,43	< 0,001
Strecke CK14	Cx43	7	2,39	1,53	3,26	< 0,001

## 4.9 Korrelationen mit dem Calcium-Gradienten

### 4.9.1 Korrelation von TJ-Proteinen mit dem Calcium-Gradienten

Sowohl die Verminderung der Cldn-1-Intensität als auch die Verbreiterung der Lokalisation von ZO-1 förderten signifikant den Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG (Tab. 4.11). Zudem bestand eine signifikant positive Korrelation mit der Ca<sup>2+</sup>-Baseline (Tab. 4.12). Die TJ-Proteine korrelierten nicht signifikant mit der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG und dem Gesamtcalcium in der Epidermis (s. Anhang).

**Tabelle 4.11:** Korrelationen der Expression der TJ-Proteine ZO-1 und Cldn-1 mit der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Strecke ohne ZO-1 gesamt	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	-25,31	-43,5	-7,14	0,011
Strecke ohne ZO-1 intensiv	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	5,17	1,00	9,33	0,020
Strecke ohne Cldn-1	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	8	15,68	5,98	25,38	0,006
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Strecke ohne Cldn-1	8	0,01	-0,00	0,026	0,056
Cldn-1 Intensität basal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	6	-5,04	-8,44	-1,64	0,012
Cldn-1 Intensität suprabasal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	6	-4,33	-6,55	-2,12	0,004

**Tabelle 4.12:** Korrelationen der Expression der TJ-Proteine ZO-1 und Cldn-1 mit der Ca<sup>2+</sup>-Baseline

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Strecke ohne ZO-1 gesamt	Ca <sup>2+</sup> -Baseline	8	-0,97	-1,68	-0,25	0,010
Strecke ohne ZO-1 intensiv	Ca <sup>2+</sup> Baseline	8	0,26	0,12	0,41	0,001
Ca <sup>2+</sup> Baseline	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	1,90	0,65	3,14	0,006
Strecke ohne Cldn-1	Ca <sup>2+</sup> Baseline	7	0,67	0,30	1,04	0,002
Ca <sup>2+</sup> Baseline	Strecke ohne Cldn-1	7	0,57	0,14	1,01	0,014
Cldn-1 Intensität basal	Ca <sup>2+</sup> Baseline	5	-0,15	-0,28	-0,02	0,027
Cldn-1 Intensität suprabasal	Ca <sup>2+</sup> Baseline	5	-0,13	-0,24	-0,02	0,026

#### 4.9.2 Korrelationen von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen mit dem Calcium-Gradienten

Die TRPC1-Intensität in der basalen und den suprabasalen Schichten hatte einen statistisch signifikant negativen Einfluss auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG (Tab. 4.13).

Die TRPV4-Intensität im SG hatte einen signifikant negativen Einfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-Baseline (Tab. 4.13). Zudem bestand eine signifikant negative Korrelation zwischen der Orai1-Intensität und der Ca<sup>2+</sup>-Baseline (Tab. 4.13).

Es bestanden keine signifikanten Korrelationen der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle mit der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG und dem Gesamtcalcium in der Epidermis (s. Anhang).

**Tabelle 4.13:** Korrelationen der Expression der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle TRPC1, TRPV4 und Orai1 mit dem Calcium-Gradienten

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Ca <sup>2+</sup> Baseline	Orai1-Intensität suprabasal	7	-2,26	-3,68	-0,83	0,007
TRPV4-Intensität SG	Ca <sup>2+</sup> Baseline	7	-0,10	-0,19	-0,02	0,021
Orai1-Intensität suprabasal	Ca <sup>2+</sup> Baseline	7	-0,22	-0,37	-0,07	0,006
TRPC1-Intensität basal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	-1,8	-2,83	-0,76	0,004
TRPC1-Intensität suprabasal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	-1,35	-2,52	-0,18	0,028

#### 4.9.3 Korrelationen von Connexinen mit dem Calcium-Gradienten

Die Lokalisation von Cx43 und Cx26 korrelierten signifikant mit der Ca<sup>2+</sup>-Baseline, wobei bei Verbreiterung der Cx43 Lokalisation sowie bei Vorhandensein von Cx26 eine Verlängerung der Ca<sup>2+</sup>-Baseline bestand und umgekehrt. Zusätzlich bestand ein statistisch signifikant positiver Einfluss der Cx43-Expression sowie der Cx26-Expression auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG (Tab. 4.14), allerdings nicht umgekehrt (s. Anhang). Es fanden sich keine signifikanten Korrelationen der Connexine mit der

extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG und dem Gesamtcalcium in der Epidermis (s. Anhang)

**Tabelle 4.14:** Korrelationen von Connexinen mit dem Calcium-Gradienten

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Cx43	Ca <sup>2+</sup> Baseline	7	0,30	0,13	0,47	0,002
Ca <sup>2+</sup> Baseline	Cx43	7	1,74	0,63	2,86	0,006
Cx43	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	7,28	2,99	11,57	0,004
Cx26	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	-99,93	-142,15	57,71	0,001
Ca <sup>2+</sup> -Baseline	Cx26	7	0,79*	0,63	0,98	0,034
Cx26	Ca <sup>2+</sup> Baseline	7	-4,28	-7,24	-1,33	0,008

\* *Odds Ratio*

#### 4.10 Korrelationen von Proteinen der Calciumhomöostase

##### 4.10.1 Korrelationen von TJ-Proteinen mit Connexinen

Die Lokalisation der TJ-Proteine Cldn-1 und ZO-1 korrelierte statistisch signifikant mit der Lokalisation von Cx43. Eine Verbreiterung der Lokalisation von Cx43 innerhalb der epidermalen Schichten korrelierte mit einer Verminderung von Cldn-1 an den Zellgrenzen sowie einer insgesamt verbreiterten Lokalisation von ZO-1 und einem schmaleren Bereich intensiver ZO-1 Färbung.

Cx26 beeinflussten statistisch signifikant die Lokalisation der TJ-Proteine Cldn-1 und ZO-1: Bei Vorhandensein von Cx26 bestand eine verminderte Lokalisation von Cldn-1 an den Zellgrenzen und eine verminderte Cldn-1 Intensität im SB und den suprabasalen Schichten, sowie eine insgesamt verbreiterte Lokalisation von ZO-1 und ein schmalerer Bereich intensiver ZO-1 Färbung. (Tab. 4.15)

**Tabelle 4.15:** Korrelationen von TJ-Proteinen mit Connexinen

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Strecke ohne ZO-1 intensiv	Cx43	8	0,50	0,12	0,87	0,014
Strecke ohne Cldn-1	Cx43	7	1,67	0,46	2,87	0,013
Cx43	Strecke ohne Cldn-1	7	0,28	0,09	0,46	0,008
Cx43	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	-0,13	-0,27	0,00	0,056
Cx43	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	0,73	0,18	1,29	0,014
Cx26	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	2,92	1,43	4,41	0,002
Cx26	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	-11,06	-20,59	-1,54	0,029
Cx26	Strecke ohne Cldn-1	7	-6,13	-8,00	-4,26	< 0,001
Cx26	Cldn-1-Intensität basal	6	18,55	8,61	28,49	0,005
Cx26	Cldn-1-Intensität suprabasal	6	24,69	17,25	32,13	< 0,001

#### 4.10.2 Korrelationen von TJ-Proteinen mit Ca<sup>2+</sup>-Kanälen

Zwischen TJ-Proteinen und Ca<sup>2+</sup>-Kanälen bestanden zum Teil statistisch signifikante Korrelationen (Tab. 4.16). Sowohl die Strecke ohne Cldn-1 an den Zell-Zell-Grenzen als auch die Cldn-1 Intensität standen in einem signifikanten Zusammenhang mit den TRPC1-Intensitäten. Eine Verminderung von Cldn-1, sowie eine Verbreiterung von ZO-1 korrelierten jeweils signifikant mit einer Verminderung der TRPC1-Intensität im SB und in den suprabasalen Schichten.

Zudem zeigte sich eine signifikante Korrelation intensiver ZO-1 Färbung mit der TRPV4-Intensität im SG, wobei eine Zunahme der TRPV4-Intensität im SG mit einer

bereits in niedrigeren epidermalen Schichten beginnenden intensiven ZO-1-Färbung korrelierte.

Es fand sich keine signifikante Korrelation der TJ-Proteine mit der Orail-Intensität (s. Anhang).

**Tabelle 4.16:** Korrelationen von TJ-Proteinen mit Ca<sup>2+</sup>-Kanälen

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Strecke ohne Cldn-1	TRPC1-Intensität basal	7	-7,70	-10,18	-5,21	< 0,001
Strecke ohne Cldn-1	TRPC1-Intensität suprabasal	7	-7,18	-10,88	-3,47	0,003
Cldn-1 Intensität basal	TRPC1-Intensität basal	6	2,54	1,59	3,49	0,001
Cldn-1 Intensität basal	TRPC1-Intensität suprabasal	6	2,18	0,42	3,93	0,024
Cldn-1 Intensität suprabasal	TRPC1-Intensität basal	6	1,87	0,69	3,05	0,009
Cldn-1 Intensität Suprabasal	TRPC1-Intensität suprabasal	6	1,66	0,03	3,30	0,047
Strecke ohne ZO-1 gesamt	TRPC1-Intensität basal	8	9,54	1,86	17,22	0,020
Strecke ohne ZO-1 gesamt	TRPC1-Intensität suprabasal	8	10,05	1,69	18,42	0,023
Strecke ohne ZO-1 intensiv	TRPV4-Intensität SG	8	-1,00	-1,89	-0,10	0,032
TRPV4-Intensität SG	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	-0,3	-0,56	-0,04	0,028
TRPC1-Intensität basal	Strecke ohne Cldn-1	7	-0,11	-0,14	-0,07	< 0,001
TRPC1-Intensität basal	Cldn-1 Intensität basal	6	0,34	0,19	0,44	0,001

TRPC1-Intensität basal	Cldn-1Intensität suprabasal	6	0,19	-0,00	0,38	0,051
TRPC1-Intensität basal	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	0,033	0,00	0,06	0,033
TRPC1-Intensität suprabasal	Strecke ohne Cldn-1	7	-0,08	-0,13	-0,03	0,010
TRPC1-Intensität suprabasal	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	0,03	0,00	0,06	0,049

#### 4.10.3 Korrelationen von Connexinen mit Ca<sup>2+</sup>-Kanälen

Cx26 hatte einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Färbung von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen: Das Vorhandensein von Cx26 hatte einen signifikant negativen Einfluss auf die Intensität der Färbung von TRPC1 in der basalen und in suprabasalen Schichten sowie auf die Intensität der TRPV4-Färbung im SG (Tab. 4.17). Umgekehrt bestand kein signifikanter Einfluss der untersuchten Ca<sup>2+</sup>-Kanäle auf die Cx26 Expression (s. Anhang). Cx43 stand in einer signifikant negativen Korrelation mit der Orail-Intensität in den suprabasalen Schichten, sowie der TRPV4-Intensität im SG.

**Tabelle 4.17:** Korrelationen von Connexinen mit Ca<sup>2+</sup>-Kanälen

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Cx26	TRPC1 Intensität basal	9	38,3	13,19	63,38	0,008
Cx26	TRPC1-Intensität suprabasal	9	35,8	4,45	67,16	0,030
Cx26	TRPV4-Intensität SG	9	16,3	0,19	32,48	0,048
Orail-Intensität suprabasal	Cx43	9	-0,22	-0,45	-0,00	0,046
TRPC1-Intensität basal	Cx43	9	-0,10	-0,20	-0,00	0,050
TRPV4-Intensität SG	Cx43	9	-0,31	-0,47	-0,15	0,001
Cx43	TRPC1-Intensität basal	9	-2,30	-4,34	-0,26	0,030
Cx43	TRPV4-Intensität SG	9	-1,57	-2,47	-0,68	0,002

Cx43	Orai1-Intensität basal	9	-0,35	-0,66	-0,05	0,029
Cx43	Orai1-Intensität suprabasal	9	-0,70	-1,37	-0,03	0,043

#### 4.10.4 Korrelationen von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen mit anderen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen

Die TRPV4-Intensität im SG hatte einen statistisch signifikant positiven Einfluss auf die Orai1-Intensität im SB (Tab. 4.18). Es fanden sich keine weiteren signifikanten Korrelationen unter den Ca<sup>2+</sup>-Kanälen (s. Anhang).

**Tabelle 4.18:** Korrelation der TRPV4-Intensität im SG mit der Orai1-Intensität im SB

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
TRPV4-Intensität SG	Orai1-Intensität basal	9	0,14	0,03	0,26	0,019

#### 4.10.5 Korrelation von Cx26 und Cx43

Cx26 und Cx43 Lokalisation korrelierten signifikant miteinander, wobei das Vorhandensein von Cx26 mit verbreiteter Cx43-Färbung korrelierte (Tab. 4.19).

**Tabelle 4.19:** Korrelation von Cx26 und Cx43

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
Cx26	Cx43	9	-9,66	-15,82	-3,50	0,007
Cx43	Cx26	9	< 0,001*	-	-	< 0,001

\* *Odds Ratio*

### 4.11 Färbung der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in normaler humaner Haut und im humanen Ekzem

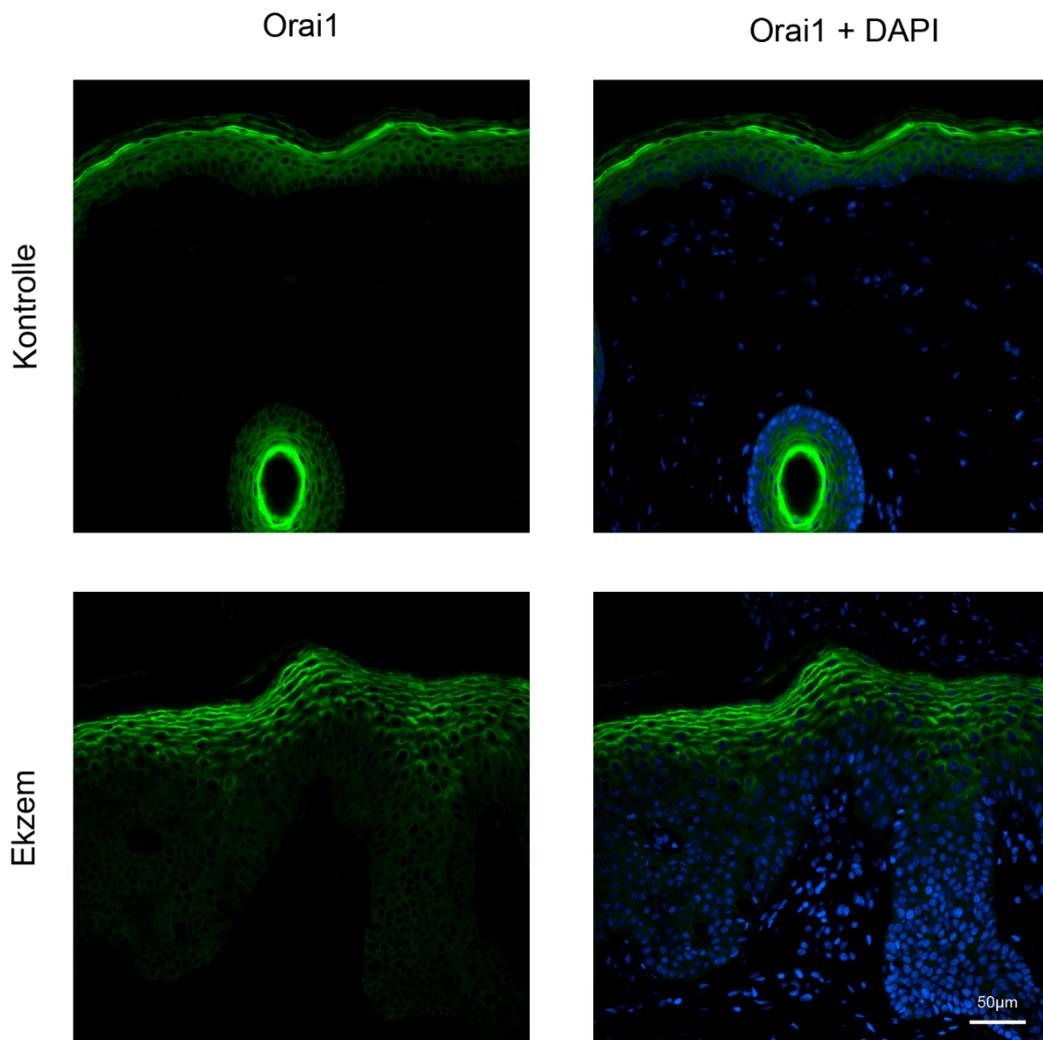
#### 4.11.1 Färbung von Orai1 in humaner Haut

Orai1 ist in normaler humaner Haut in allen Schichten der interfollikulären Epidermis, sowie in den Haarfollikeln, exprimiert. Während die Färbung im SC eher schwach war,

fand sich eine stärkere Färbung in den anderen suprabasalen Schichten, insbesondere im SG, mit relativ homogener Verteilung an den Zellgrenzen im Bereich der Plasmamembran. Die Orai1-Färbung war ebenfalls, jedoch in geringerem Ausmaß, im Zytoplasma zu finden. Die Lokalisation von Orai1 in humaner Haut ist somit zwar bezüglich der Lokalisation an den Zellgrenzen ähnlich wie in der Maus, die starke Färbung im SG lässt sich in der Maus jedoch nicht beobachten.

Die Orai1-Färbung im humanen atopischen Ekzem zeigte eine starke, vorwiegend apikale Lokalisation im SG und den oberen Schichten des SS (Abb. 4.21). Dabei bestanden individuelle Unterschiede in der Stärke der Färbung im SB.

Die Veränderungen im humanen Ekzem ähneln nicht denen im AID-Mausmodell.



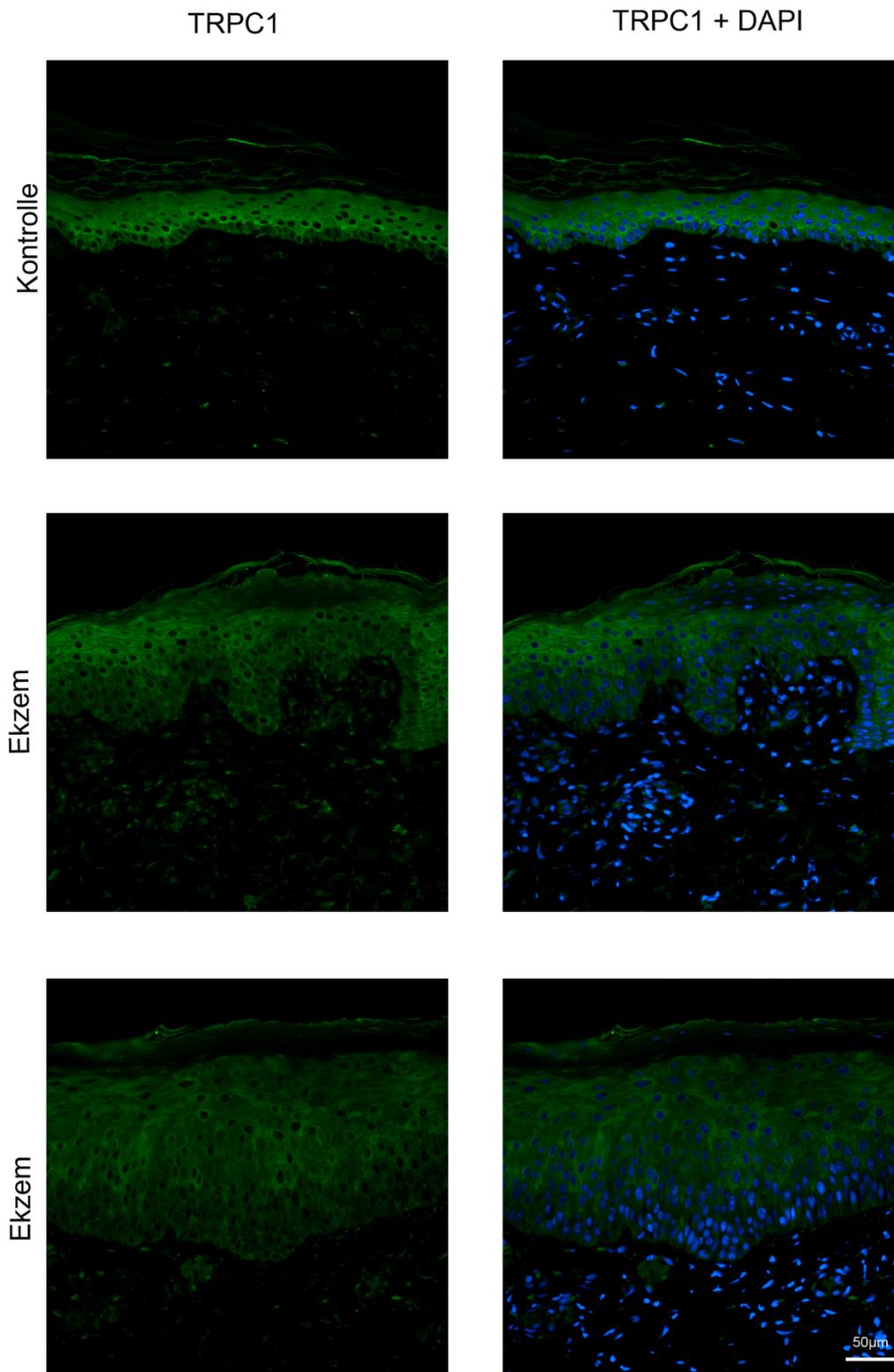
**Abbildung 4.21:** Repräsentative immunhistochemische Färbung von Orai1 (grün) in humaner Haut auf Paraffinschnitten von normaler Haut (obere Reihe) und im Ekzem (untere Reihe). Blau: Kernfärbung durch DAPI. In normaler Haut war Orai1 in allen

Schichten der interfollikulären Epidermis, sowie in Haarfollikeln zu finden. Im Ekzem fiel eine starke, vorwiegend apikale Lokalisation von Orai1 im SG und oberen SS auf. Die Kombination mit der DAPI-Kernfärbung verdeutlicht die Epidermisdicke und –struktur, sowie das dermale Infiltrat.

#### **4.11.2 Färbung von TRPC1 in humaner Haut**

In normaler humaner Haut fand sich die stärkste TRPC1-Färbung an der Grenze vom Stratum basale zum Stratum spinosum. Eine ebenfalls starke Färbung bestand in den daran anschließenden unteren Schichten des Stratum spinosum. Im Stratum basale war die TRPC1-Färbung durch eine vorwiegend apikale Lokalisation ausgezeichnet. In den suprabasalen Schichten war TRPC1 eher basolateral orientiert. Außerdem fand sich eine typische Färbung in den Haarfollikeln. Auf zellulärer Ebene war TRPC1 an den Zellgrenzen im Bereich der Plasmamembran sowie im Zytoplasma, vorwiegend perinukleär, lokalisiert. Insgesamt zeigten sich Ähnlichkeiten in der Lokalisation von TRPC1 in humaner Haut und in der Maus.

Im humanen atopischen Ekzem fiel eine Verschiebung der Färbung in höhere Schichten und damit eine Verminderung der Färbung in den unteren suprabasalen Schichten auf. Die unterschiedlich starke Färbung im Stratum basale war im Gegensatz zur normalen Haut vorwiegend basolateral lokalisiert. In zwei Drittel der atopischen Ekzeme fand sich ein „buntes Färbungsmuster“ mit Bereichen unterschiedlich starker Färbung in Schichten unabhängiger Verteilung (Abb. 4.22). Es ließ sich kein Zusammenhang der unterschiedlichen Veränderungen mit der Akuität, dem Geschlecht oder dem Alter finden. Eine recht gleichmäßige Abnahme der Färbung suprabasal und basal, wie in der Maus beobachtet, sieht man nicht.



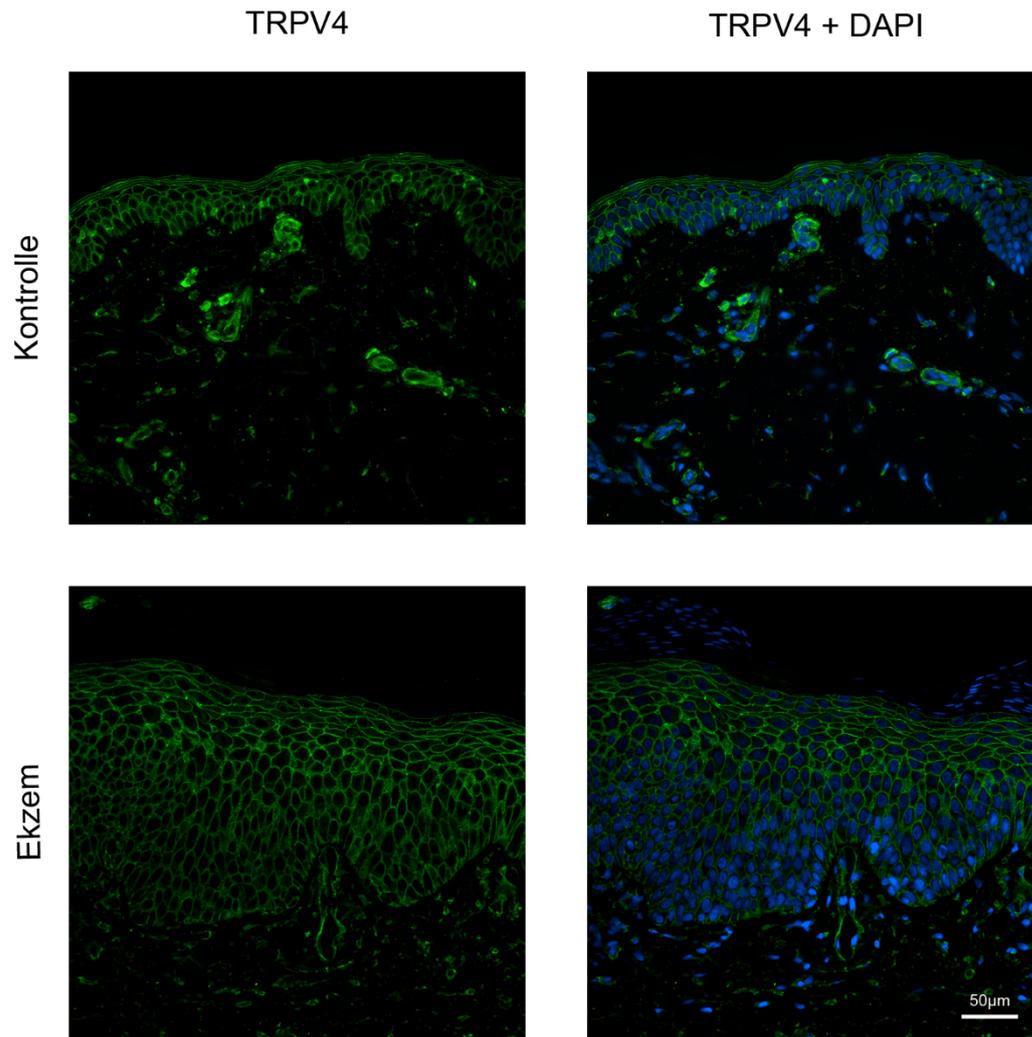
**Abbildung 4.22:** Repräsentative immunhistochemische Färbung von TRPC1 (grün) in humaner Haut auf Paraffinschnitten von normaler Haut (obere Reihe) und im Ekzem (mittlere und untere Reihe). In normaler Haut zeigte sich die TRPC1-Färbung in allen epidermalen Schichten, wobei eine starke Intensität am Übergang vom SB zum SS bestand. Im Ekzem fanden sich unterschiedliche Veränderungen dieses Musters, darunter

eine Verschiebung der TRPC1-Färbung in höhere epidermale Schichten, sowie ein „buntes Färbungsmuster“ mit Arealen unterschiedlich starker Färbung. Die Kombination mit der DAPI-Kernfärbung verdeutlicht die Epidermisdicke und –struktur, sowie das dermale Infiltrat.

#### **4.11.3 Färbung von TRPV4 in humaner Haut**

In normaler humaner Haut war TRPV4 wie in der Maus in allen Schichten der Epidermis außer dem SC zu finden. Es zeigte sich, ebenfalls wie in der Maus eine starke Färbung an den Zellgrenzen, vorwiegend im SG aber auch in den darunter liegenden Zellschichten. Vereinzelt wurde eine relativ starke Färbung im perinukleären Bereich beobachtet, vorwiegend am Übergang von SB zu SS.

Die ekzematöse humane Haut zeigte keine markanten Veränderungen der TRPV4-Färbung, ließ jedoch subjektiv eine verstärkte Färbung an den Zellgrenzen im oberen SS und SG vermuten (Abb. 4.23). Diese Veränderungen entsprechen nicht den Beobachtungen in läsionaler Maushaut (s. Kap. 4.3.3).



**Abbildung 4.23:** Repräsentative immunhistochemische Färbung von TRPV4 (grün) in humaner Haut auf Paraffinschnitten von normaler Haut (obere Reihe) und im Ekzem (untere Reihe). In normaler Haut fand sich TRPV4 in allen lebenden Schichten der Epidermis. TRPV4 war vorwiegend an den Zellgrenzen, vereinzelt auch zytoplasmatisch lokalisiert. Im Ekzem fiel eine Zunahme der zytoplasmatischen Lokalisation, sowie eine verstärkte Intensität der TRPV4-Färbung an den Zellgrenzen im oberen SS und SG auf. Die Kombination mit der DAPI-Kernfärbung verdeutlicht die Epidermisdicke und –struktur.

## 5. Diskussion

Calcium ist wichtig für die Differenzierung von Keratinozyten und für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut. Die Calcium-Verteilung in der Haut, charakterisiert als Calcium-Gradient, unterscheidet sich im atopischen Ekzem von

gesunder Haut. Dies zeigen Untersuchungen in humaner Haut und im AID-Mausmodell. Im Gleichgewicht dieses Calcium-Gradienten könnten TJ-Proteine als extrazelluläre Barriere für Calciumionen und ggf. in TJ-unabhängigen Funktionen, Calciumkanäle in der Calcium-Verteilung zwischen Extra- und Intrazellulärraum und Connexine im direkten Austausch von Calcium zwischen den Zellen eine Rolle spielen. Veränderungen dieser Parameter wurden in dieser Arbeit im AID-Mausmodell untersucht und dort mit Parametern des Calciumgradienten korreliert. Diese Ergebnisse wurden mit Beobachtungen an humaner Haut verglichen. Insgesamt fanden sich Veränderungen in der Expression von Proteinen der para-, inter- und transzellulären Calcium-Mobilität, sowie eine umfassende Anzahl signifikanter Korrelationen. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen im Folgenden in Zusammenhang gebracht und vor dem aktuellen Wissensstand diskutiert werden.

### **5.1 TJ-Proteine im AID-Mausmodell**

TJ-Proteine leisten als Komponenten der TJs im SG der Epidermis (Brandner et al. 2002), und möglicherweise auch unabhängig von diesen Strukturen, einen Beitrag zur Barrierefunktion der Haut. Als selektive parazelluläre Barriere für  $\text{Ca}^{2+}$  und andere Ionen (Kirschner et al. 2013) werden sie in der Entstehung des epidermalen Calcium-Gradienten diskutiert (Kurasawa et al. 2011). Der Calcium-Gradient ist in AD verändert. In dieser Arbeit wurde die Expression der TJ-Proteine Cldn-1 und ZO-1 im AID-Mausmodell untersucht und mit dem Calcium-Gradienten, weiteren in den Calcium-Stoffwechsel involvierten Proteinen, immunologischen Parametern und der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten korreliert.

Im AID-Mausmodell zeigte sich eine Herunterregulation der Cldn-1-Expression. Während sich die Cldn-1-Färbung in normaler Maushaut über alle epidermalen Schichten erstreckt, ist im Ekzem im SB kaum Cldn-1 an den Zellgrenzen vorhanden. Diese Erkenntnis wurde bereits anhand der Strecke von der Basallamina bis zum Beginn der Cldn-1-Färbung quantifiziert (Börnchen 2013). In dieser Arbeit konnte dies anhand von Intensitätsmessungen bestätigt werden und zusätzlich gezeigt werden, dass die Verminderung der Cldn-1 Intensität nicht auf die basale Schicht beschränkt ist, sondern ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß, in suprabasalen Schichten besteht. Auch Immunfluoreszenz-Studien in einem HD-Modell (*hapten-induced chronic dermatitis model*) ließen subjektiv eine Verminderung der Cldn-1 Intensität in der Epidermis

betroffener Mäuse erkennen (Yokouchi et al. 2015). Eine globale Verminderung der Cldn-1 Expression fand sich auch in einem AD-Modell in Hunden in nicht-läsionaler Haut (Roussel et al. 2015), welche wie wir Menschen ebenfalls häufig von AD betroffen sind. Eine andere Studie an einem AD-Hundemodell fand in nicht-läsionaler Haut keine signifikanten Veränderungen der Cldn-1 Expression (Kim et al. 2016), dafür aber in der ZO-1 Expression, welche jedoch nicht der typischen ZO-1 Lokalisation entspricht, weshalb hier nicht weiter darauf eingegangen wird.

Die ZO-1 Expression, welche unter physiologischen Bedingungen auf das SG der Epidermis begrenzt ist (Brandner et al. 2002; Brandner et al. 2006), zeigt im Ekzem eine Verbreiterung in tiefer liegende Schichten. Die ZO-1-Intensität in den höheren Schichten erscheint jedoch deutlich stärker als in den tiefer liegenden Schichten.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese, in dem Fall kategorial klassifizierte, Verbreiterung der ZO-1 Lokalisation mit einem Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im SG korreliert (Börnchen 2013).

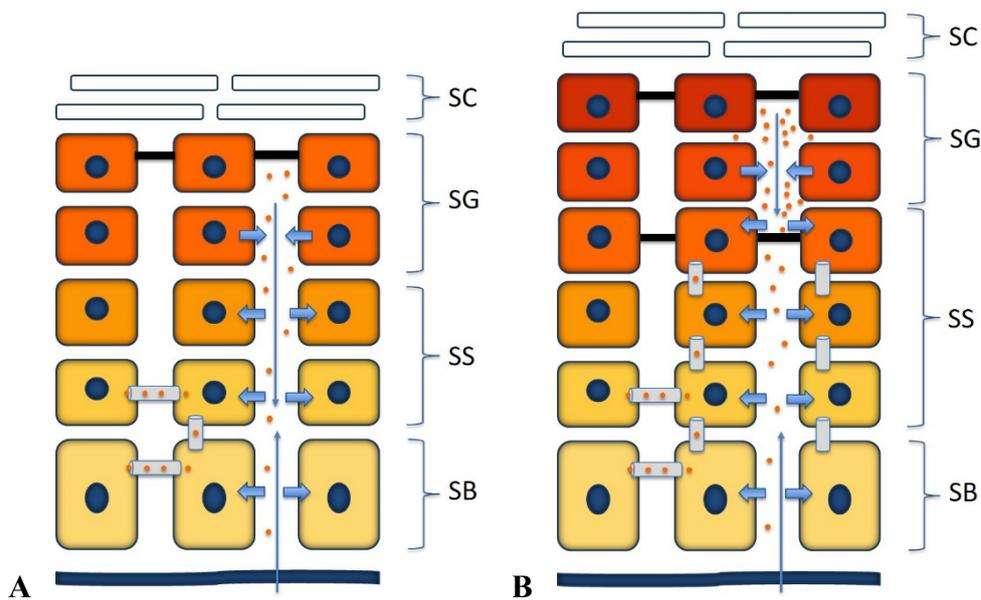
Alle in dieser Arbeit quantifizierten Parameter der TJ-Proteine Cldn-1 und ZO-1 haben einen signifikanten Einfluss auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration im SG. Bezüglich der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration konnte keine Korrelation beobachtet werden. Die hohe  $Ca^{2+}$ -Konzentration im SG ist wichtig für zahlreiche Prozesse, die im Rahmen der terminalen Differenzierung in den Keratinozyten ablaufen. In der Tat bestehen auch signifikante Korrelationen zu den Differenzierungsmarkern. Allerdings korrelierte auch der Differenzierungsstatus der Keratinozyten signifikant mit der Expression von Cldn-1 und ZO-1, sodass allein aufgrund der Statistik keine Aussage getroffen werden kann, ob die TJ-Proteine die Differenzierung oder die Differenzierung die TJs beeinflussen.

Außerdem bestanden signifikante Korrelationen zwischen den TJ-Proteinen und der  $Ca^{2+}$ -Baseline. Da dies auch auf die Expression der TJ-Proteine in tieferen epidermalen Schichten zutrifft, findet sich hier möglicherweise ein Hinweis auf TJ-unabhängige Funktionen von TJ-Proteinen, derartige Funktionen konnten vor kurzem im Kontext der Wundheilung gezeigt werden (Volksdorf et al. 2017).

Aus den quantifizierten Veränderungen der Lokalisation von Cldn-1 und ZO-1 ergibt sich eine breitere Ko-Lokalisation dieser beiden TJ-Proteine innerhalb der Epidermis. Damit besteht die Möglichkeit der Bildung von TJs, die unter physiologischen Bedingungen auf das SG begrenzt sind, zusätzlich in tieferen epidermalen Schichten. Basierend auf diesen Erkenntnissen aus dem AID-Mausmodell und unter Berücksichtigung der Literatur lässt sich eine Hypothese zur Entstehung der Veränderungen des Calcium-

Gradienten in AD aufstellen (Abb. 5.1): Möglicherweise erlaubt die Ko-Lokalisation der TJ-Proteine die Ausbildung von TJs unterhalb des SG. Diese zusätzliche, tiefer gelegene parazelluläre Barriere für  $\text{Ca}^{2+}$  würde die Diffusion von  $\text{Ca}^{2+}$  im Extrazellulärraum einschränken und könnte beispielsweise dazu führen, dass  $\text{Ca}^{2+}$  im Bereich des SG zwischen zwei Barrieren „gefangen“ ist, was die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im SG im Ekzem erklären könnte. Durch die zusätzliche TJ-Barriere würde weniger  $\text{Ca}^{2+}$  zu den unteren suprabasalen Schichten und dem SB gelangen, was dort den Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hinauszögern würde. Dies spiegelt sich wiederum in der Verlängerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Baseline wider. Die niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den unteren epidermalen Schichten erlaubt den Keratinozyten weiter zu proliferieren und zögert die Differenzierung hinaus. Dieses Hypothesenkonzept könnte somit auch die Störung der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung in AD erklären. Dieses Modell setzt allerdings voraus, dass in den unteren epidermalen Schichten  $\text{Ca}^{2+}$  von extrazellulär in die Zellen aufgenommen wird und dieses dann direkt von Zelle zu Zelle in die oberen Schichten gelangt. Connexine ermöglichen den direkten Fluss von Calciumionen zwischen benachbarten Zellen. Eine Hochregulation der Connexine, wie sie in dieser Arbeit im Ekzem im AID-Mausmodell beobachtet wurde, könnte einen interzellulären Fluss von Calciumionen bis ins SG ermöglichen und damit zu einer Verlängerung der Calcium-Baseline beitragen. Im SG würden die Keratinozyten nach dem hier vorgestellten Modell dann das Calcium in den Extrazellulärraum zurückgeben, wo es in Richtung des SB diffundiert und im Sinne eines „Recycling“ wieder aufgenommen werden kann und nicht mit dem Absterben der Zellen verloren geht.

Dies wird durch die Arbeit von Menon et al. 1994 unterstützt, in denen davon ausgegangen wird, dass Calcium zunächst in intrazellulären Organellen gesammelt wird und im Anschluss an die Initiierung der terminalen Differenzierung aus den Zellen des oberen SG wieder ausgeschleust wird (Menon et al. 1994). In einem von Adams et al. 2015 aufgestellten mathematischen Modell, das auf experimentellen Daten basiert, wird ebenfalls postuliert, dass Keratinozyten der unteren epidermalen Schichten primär Calcium aus dem Extrazellulärraum aufnehmen, beispielsweise über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, während Keratinozyten des SG mehr Calcium abgeben als aufnehmen. Im Verlauf der Differenzierung wird Calcium zur Regulierung intrazellulärer Signalwege benötigt und im SG u.a. zur Sekretion der *lamellar bodies* eingesetzt. *Lamellar bodies* selbst enthalten auch Calcium (Menon und Elias 1991).



**Abbildung 5.1:** Hypothesenkonzert zur Aufrechterhaltung des Calcium-Gradienten in gesunder Haut (A) und in AD (B). Pfeile symbolisieren die Haupt-Flussrichtung der Calcium-Ionen (orange Punkte). TJs (schwarze Balken) bilden eine parazelluläre Barriere für  $\text{Ca}^{2+}$ , Connexine (graue Tunnel) ermöglichen den direkten Austausch von  $\text{Ca}^{2+}$  zwischen benachbarten Zellen.

Es ist noch nicht klar, wie die An- bzw. Abwesenheit der verschiedenen Calcium-Kanäle in dieses Schema implementiert werden kann, da sowohl die Anwesenheit, als auch die Abwesenheit bestimmter Calcium-Kanäle zu einer erhöhten bzw. erniedrigten Permeabilität führen kann. Die Anwesenheit von TRPC1 in heteromeren Calciumkanälen beispielsweise setzt die Calcium-Permeabilität dieser Kanäle herab. Eine Verminderung von TRPC1 würde somit eine erhöhte Calciumpermeabilität bedeuten.

Im AID-Mausmodell konnte in dieser Arbeit der bereits für Epithelzellen beschriebene Einfluss von ZO-1 auf die Proliferation (Balda et al. 2003) bestätigt werden und zusätzlich gezeigt werden, dass diese proliferationsfördernde Wirkung möglicherweise für die Zunahme der Epidermisdicke mitverantwortlich ist, da eine Korrelation zwischen der ZO-1 Färbung und dem Ki67-Index sowie der Epidermisdicke gefunden wurde.

Aus Zellkulturen ist bekannt, dass auch Cldn-1 eine Rolle in der Proliferation von Keratinozyten spielt (De Benedetto et al. 2011). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nun auch in Maushaut gezeigt werden, in der eine Verminderung von Cldn-1 an den Zellgrenzen im Ekzem mit einer zunehmenden Anzahl proliferierender Zellen assoziiert war. Aufgrund der Ergebnisse der *knockdown* Studien von De Benedetto erscheint diese Kausalität wahrscheinlicher als die ebenfalls statistisch signifikante umgekehrte

Korrelation. Passend zu einer gesteigerten Proliferation, korrelierte der Verlust von Cldn-1 an den Zellgrenzen sowie eine Verminderung der Cldn-1 Intensität, wie sie im Ekzem gefunden wurden, ebenfalls signifikant mit einem Anstieg der Epidermisdicke. Dieses Erkenntnis steht im Einklang mit einer aktuellen Studie an Cldn-1 *Knockdown* Mäusen. Diese zeigen einige AD-ähnliche morphologische und immunologische Charakteristika inklusive einer Verdickung der Epidermis, der Schweregrad dieser Hautveränderungen ist dabei abhängig vom Cldn-1 Level (Tokumasu et al. 2016).

In diesem Punkt scheinen sich Maus und Mensch jedoch zu unterscheiden. In den Studien von Tokumasu et al. zumindest konnte in Immunfluoreszenz-Analysen humaner Haut von AD-Patienten keine statistisch signifikante Korrelation der semiquantitativ ermittelten Cldn-1 Intensität mit der Epidermisdicke oder dem Schweregrad der AD (nach EASI, *Eczema Area Severity Index*) gefunden werden. Diesbezüglich ist zu bedenken, dass eine Korrelation beim Menschen sicherlich schwieriger zu beobachten ist, da im Mausmodell diverse weitere Faktoren, welche den Schweregrad einer AD beeinflussen können (genetischer Background, Umwelt, bakterielle Besiedelung, Alter, Geschlecht, Ernährung) identisch sind.

In einer aktuellen Studie von Volksdorf et al. wurde gezeigt, dass im Kontext von Verwundung ein *knockdown* von Cldn-1 zu einer Verminderung der Proliferation führt. Der Effekt, den Cldn-1 letztlich auf die Proliferation hat, scheint somit von den Parametern der Umgebung abhängig zu sein (Volksdorf et al. 2017).

Bezüglich der Ursache der Veränderungen der Expression der TJ-Proteine im Ekzem könnten anhand der Ergebnisse aus unserem AID-Mausmodell sowohl immunologische Parameter als auch Calcium-Kanäle und Connexine involviert sein. Interessanterweise geben die Korrelationen im AID-Mausmodell Hinweise darauf, dass die Herabregulation von Cldn-1 und die Veränderung von ZO-1 durch die Inflammation hervorgerufen werden, und dass das Ausmaß der Herabregulation signifikant mit der Infiltratdichte korreliert. Dazu passt auch, dass die Behandlung von Epidermisäquivalenten mit IL-4, IL-13 und IL-31, d.h. Zytokinen, die in der AD eine wichtige Rolle spielen, zu einer Herabregulation von Cldn-1 an den Zellgrenzen in den unteren Schichten führt (Gruber et al. 2015). Dies wird auch durch die Arbeit von Yokouchi et al. unterstützt, die eine Herabregulation von Cldn-1 in einem Hapten-induzierten Mausmodell auf die Inflammation zurückführte (Yokouchi et al. 2015). Bezüglich eines Einflusses von Calcium-Kanälen auf TJ-Proteine ist meines Wissens bisher in der Literatur noch nichts beschrieben. Für Connexine konnte gezeigt werden, dass ZO-1 die Ausbildung von Gap Junctions beeinflusst, möglicherweise

durch Rekrutierung von Signalproteinen zu Cx43-basierten GJs (Giepmanns et al. 2001), Phosphorylierung von Cx43 (Jin et al. 2004) und Einflussnahme auf den Internalisierungsprozess von Cx43 (Duffy et al. 2004).

Es konnte aber auch ein Einfluss von Connexinen bzw. Gap Junctions auf TJs gezeigt werden. Cx26 vermittelte GJIC reduziert beispielsweise die parazelluläre Permeabilität und erhöht die TER (*transepithelial electrical resistance*) von humanen epithelialen Zell-Monolayer CaCo-2-Zellen (Morita et al. 2004). Cx32 scheint in die Expression und Funktion von TJs in murinen Hepatozyten involviert zu sein (Kojima et al. 2002). Auch in dieser Arbeit wurden signifikante Korrelationen zwischen den Connexinen und den TJ-Proteinen gefunden (siehe Kapitel 5.2).

## **5.2 Connexine im AID-Mausmodell**

In dieser Arbeit konnte anhand von Immunfluoreszenz-Studien gezeigt werden, dass in ekzematöser Maushaut die Expression von Connexinen verändert ist. Diese Veränderungen schließen sowohl die Zusammensetzung, als auch die Verteilung der Connexine innerhalb der Schichten ein. In der Untersuchung der Expression von Connexinen ist zu bedenken, dass es sich stets um eine Momentaufnahme handelt, da Connexine und GJs innerhalb kurzer Zeit gebildet und wieder abgebaut werden. Zudem kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Connexine funktionelle Halbkanäle oder GJs bilden.

Die Expression von Cx43 in Kontrollhaut, ist, wie auch in der Literatur beschrieben (Liu et al. 1997), auf das SB und untere SS beschränkt. Im Ekzem wurde eine Verbreiterung der Cx43-Expression in weitere suprabasale Schichten gemessen. Eine derartige Veränderung des Expressionsmusters wurde bereits für anderweitig induzierte Hyperproliferation beschrieben, beispielsweise nach Bestrahlung (Liu et al. 1997). Wie in Kapitel 1.9 beschrieben, bestehen unterschiedliche Erkenntnisse zur Lokalisation von Cx26 in normaler Maushaut. In dieser Arbeit konnte keine charakteristische Cx26-Färbung in Kontrollhaut verzeichnet werden, was mit den Ergebnissen mehrerer Studien im Einklang steht (Butterweck et al. 1994; Budunova et al. 1995). In läsionaler Haut ist Cx26 hochreguliert.

Die Ergebnisse der Färbungen im AID-Mausmodell passen zu Studien an humaner Haut von AD-Patienten, in denen sich eine verstärkte Cx43-Expression in läsionaler Haut fand (Tawdy et al. 2011), eine Hochregulation von Cx26 ist bisher nur in nicht-läsionaler Haut

beschrieben (De Benedetto et al. 2011), in lässionaler Haut in AD wurde Cx26 meines Wissens nach bisher nicht untersucht.

Aber in lässionaler Haut von Psoriasis-Patienten, welche ebenfalls durch eine gestörte Balance von Proliferation und Differenzierung gekennzeichnet ist, wurde eine deutlich erhöhte Cx26-Expression gezeigt (Lucke et al. 1999; Labarthe et al. 1998).

Welche Konsequenzen könnten sich aus dem veränderten Expressionsmuster der Connexine ergeben? Die vermehrte Expression von Connexinen eröffnet Wege für Calcium-Ionen, die in normaler Haut weder in dieser Konstellation noch in diesem Ausmaß gegeben sind. So könnten im Ekzem Calcium-Ionen von den basalen Schichten bis in das SG fließen, was in normaler Haut aufgrund der fehlenden Connexine in den oberen suprabasalen Schichten nicht möglich ist (siehe Abb. 5.1). Da  $Ca^{2+}$  ein zentraler Spieler in der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten ist, könnte der Einfluss der Connexine auf  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen ihre Rolle in der Proliferation und der Differenzierung erklären. Die signifikant positive Korrelation der Connexine mit dem Ki67-Index kann als Ausdruck eines proliferationsfördernden Effektes verstanden werden. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass eine ektopische Expression von Cx26 die Proliferation fördert (Djalilian et al. 2006). Die Hochregulation von Cx26 im AID-Mausmodell passt außerdem zu Studien in anderen hyperproliferativen Zuständen, darunter Psoriasis (Labarthe et al. 1998). Die Studien im AID-Mausmodell lassen vermuten, dass Connexine über eine Veränderung des Calcium-Gradienten im Sinne einer Verlängerung der  $Ca^{2+}$ -Baseline den beschriebenen Anstieg der Proliferation und folglich der Epidermisdicke vermitteln. Möglicherweise stellt Cx26 die Verbindung dar, über die eine Herunterregulation des TJ-Proteins Cldn-1 die Proliferation fördert, da ein Cldn-1 *knockdown* in PHKs auch zu einer Hochregulation von Cx26 führt (De Benedetto et al. 2011) (s.u.).

Aus *in vitro* Studien ist auch bekannt, dass das Expressionsmuster von Connexinen in Keratinozyten durch die extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration beeinflusst wird (Brisette et al. 1994). Ein Anstieg der extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, welcher den Differenzierungsprozess der Keratinozyten initiiert, zieht eine Herunterregulation von Cx43 und Cx26 nach sich. Auch dieser Umstand spiegelt sich in den Ergebnissen dieser Arbeit wider, indem zwischen der Connexin-Expression und der  $Ca^{2+}$ -Baseline eine wechselseitige Korrelation besteht. Steigt die  $Ca^{2+}$ -Konzentration erst in oberflächlicher gelegenen epidermalen Schichten an, finden sich die Connexine in suprabasalen Schichten. Hier stellt sich die Frage, wie die extrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration eine

Herunterregulation der Connexine bewirkt. Möglicherweise sind an dieser Vermittlung in intrazelluläre Signalwege Calcium-Kanäle beteiligt. Im AID-Mausmodell findet sich eine signifikante beidseitige Korrelation der Cx43-Expression mit der TRPV4-Intensität im SG. Ca<sup>2+</sup> induziert die Expression von E-cadherin, TRPV4 interagiert mit E-cadherin und TRPV4-vermittelter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom spielt eine Rolle in der Entstehung von AJs, wodurch die Zellen näher aneinander rücken und somit die GJIC erleichtert wird (Jongen et al. 1991).

Darüber hinaus zeigt sich in dieser Arbeit eine signifikante Korrelation der Connexine mit den Differenzierungsmarkern CK10 und CK14. Die Verbreiterung der Cx43-Färbung und das Auftreten von Cx26 scheinen den Beginn der Differenzierung der Keratinozyten zu verzögern. *In vitro* wurde in primären murinen Keratinozyten gezeigt, dass der Ca<sup>2+</sup>-induzierte Beginn des Differenzierungsprozesses mit einer Herunterregulation von Cx43 und Cx26 einhergeht (Brisette et al. 1994). Aufgrund der essentiellen Rolle von Ca<sup>2+</sup> in der Regulierung des Differenzierungsprozesses lässt sich vermuten, dass in diesem Sinne die Verlängerung der Ca<sup>2+</sup>-Baseline, einem verzögerten Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration entsprechend, eine Herunterregulation der Connexine verhindert. Andererseits könnte auch eine Hochregulation der Connexine in der Verlängerung der Calcium-Baseline eine Rolle spielen, in dem sie einen interzellulären Fluss von Calciumionen bis ins SG ermöglichen.

Ein ungestörter Differenzierungsprozess ist essenziell für die Barrierefunktion der Haut. Anhand von Mäusen, welche eine C-terminal verkürzte Variante von Cx43 aufwiesen, konnte die Wichtigkeit von Cx43 in der Etablierung der Barrierefunktion gezeigt werden: diese Mäuse verstarben post-partum aufgrund mangelnder Barrierefunktion der Haut (Maass et al. 2004). Basierend auf *in-vitro*-Studien an Epithelzellen wurde vorgeschlagen, dass Connexine TJ-Funktionen induzieren und aufrechterhalten (Kojima et al. 2007; Go et al. 2006). TJs sind ein wichtiger Pfeiler der Barrierefunktion. Eine Korrelation der Connexine mit TJ-Proteinen konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Sowohl Cx26 als auch Cx43 korrelieren signifikant mit der Expression der TJ-Proteine Cldn-1 und ZO-1. Das Vorhandensein von Cx26 sowie die Verbreiterung der Cx43-Expression scheinen die Expression von Cldn-1 an den Zellgrenzen zu beschränken und die Expression von ZO-1 zu fördern. Anhand von Cldn-1 *knockdown* Experimenten in PHKs konnte allerdings auch eine umgekehrte Beziehung von TJ-Proteinen und Connexinen gezeigt werden: Der Cldn-1 *knockdown* ließ eine Hochregulation von Cx26 beobachten (De Benedetto et al. 2011). Im AID-Mausmodell konnte allerdings kein signifikanter Einfluss der Cldn-1 Intensität und

der Expression von Cldn-1 an den Zellgrenzen auf die Expression von Cx26 gezeigt werden. Dies könnte beispielsweise an den unterschiedlichen Systemen liegen.

Vor dem Hintergrund der multifaktoriellen Pathogenese der AD, welche neben der Störung der Barrierefunktion eine Dysfunktion des Immunsystems einschließt, stellt sich die Frage ob Connexine möglicherweise eine Verbindung im Sinne eines Kommunikationsmediums darstellen könnten. Cx43 findet sich neben Keratinozyten auch in Zellen des Immunsystems, darunter Mastzellen und Eosinophile von Atopikern (Vliagoftis et al. 2014). Im AID-Mausmodell konnten die untersuchten immunologischen Parameter des Ekzems die Veränderungen in der Expression der Connexine nicht erklären, was zumindest eine immunologisch induzierte Hochregulation von Cx43 und Cx26 in Keratinozyten unwahrscheinlich macht.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit lassen eine Rolle von Connexinen in der Aufrechterhaltung des epidermalen Calcium-Gradienten und folglich in dem davon abhängigen Gleichgewicht von Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten vermuten. Connexine können in GJs direkte Verbindungen zwischen dem Zytoplasma benachbarter Zellen darstellen und könnten somit an der Koordination und Synchronisierung des Differenzierungsprozesses beteiligt sein (Bennett et al. 2016).

### **5.3 Calcium-Kanäle im AID-Mausmodell und im humanen atopischen Ekzem**

#### **5.3.1 Orai1 im AID-Mausmodell und im humanen atopischen Ekzem**

Orai1 fand sich in nicht läsionaler Maushaut in allen epidermalen Schichten, eine Prädominanz im SB und SS, wie in einer Studie beschrieben (Gwack et al. 2008) ließ sich in meiner Arbeit nicht herausarbeiten, in einer weiteren Studie (Darbellay et al. 2014) war diese ebenfalls nicht beschrieben. In den Intensitätsmessungen in läsionaler Haut im AID-Mausmodell fanden sich keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur nicht läsionalen Haut.

Orai1 wurde zunächst in seiner Rolle im Immunsystem bekannt (Feske et al. 2006). Neuere Studien zeigen, dass auch Keratinozyten Orai1 exprimieren und Orai1-vermittelter SOCE dort sowohl die Proliferation und den Beginn des Differenzierungsprozesses (Darbellay et al. 2014; Numaga-Tomita und Putney 2013) als auch die Sekretion von TSLP reguliert (Wilson et al. 2013). Im AID-Mausmodell zeigte sich keine signifikante Korrelation der Orai1-Färbung mit der Proliferation und Differenzierung der

Keratinocyten. Die zuvor beschriebene proliferationsfördernde Wirkung in muriner Epidermis (Darbellay et al. 2014) ließ sich im AID-Mausmodell nicht abbilden. In beiden Untersuchungen handelte es sich dabei um die Auswertung immunhistochemischer Färbungen muriner Epidermis. Allerdings handelte es sich in den Studien von Darbellay et al. nicht um ein AID-Mausmodell. Die mögliche Rolle von Orai1 in der Initiierung des Differenzierungsprozesses wurde in HaCaT-Zellen gezeigt (Numaga-Tomita und Putney 2013), so ist es möglich, dass Orai1-Proteine in der Maus und/oder unter dem Einfluss anderer Proteine andere Aufgaben besitzen, auch die Komplexität des Systems könnte hier einen Einfluss nehmen. Zudem wurde in der Studie von Numaga-Tomita und Putney bezüglich der Differenzierung Keratin 1, ein anderer früher Differenzierungsmarker, untersucht als in meiner Arbeit. Weiterhin ist zu beachten, dass sich trotz einer deutlichen Verminderung von Orai1 in atrophierte Epidermis ein normaler Differenzierungsprozess findet (Darbellay et al. 2014). Die Rolle von Orai1 in der Differenzierung von Keratinocyten ist somit zur Zeit noch nicht vollständig verstanden.

Umgekehrt zeigte sich im Mausmodell auch kein signifikanter statistischer Einfluss der Differenzierungsmarker auf die Intensität der Orai1-Färbung. Dies wiederum ist vereinbar mit den Ergebnissen aus Studien an HaCaT-Zellen, in denen keine Veränderung der Orai1-Expression im Verlauf des Differenzierungsprozesses festzustellen war (Numaga-Tomita und Putney 2013). Auch die Zunahme der Epidermisdicke im Ekzem korrelierte nicht signifikant mit der Orai1-Färbung.

Dennoch zeigte sich im AID-Mausmodell eine signifikante Korrelation der Orai1-Intensität in den suprabasalen Schichten mit der Ca<sup>2+</sup>-Baseline. Eine Verlängerung der Ca<sup>2+</sup>-Baseline korrelierte mit einer niedrigeren suprabasalen Orai1-Intensität und umgekehrt. Die Orai1-Intensität war in läsionaler Maushaut gegenüber Kontrollhaut jedoch lediglich geringfügig und statistisch nicht signifikant verändert. Dennoch lässt diese Korrelation den Schluss zu, dass Orai1 eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Ca<sup>2+</sup>-Gradienten der Haut spielt.

In Studien wurde außerdem gezeigt, dass Orai1-vermittelter SOCE für die Rekrutierung von TRPC1, einem ebenfalls in den SOCE verwickelten Calcium-Kanal (s. Kap. 1.8.2.1), in die Plasmamembran verantwortlich ist und dass ein Orai1 *knockdown* oder eine nicht-funktionale Orai1-Variante zu einer verminderten Lokalisation von TRPC1 in der Plasmamembran führt (Cheng et al. 2011). Im AID-Mausmodell zeigte sich keine signifikante Korrelation der Orai1-Intensität mit der TRPC1-Intensität. Dies lässt vermuten, dass Orai1 nicht für die beobachtete Verminderung der TRPC1 Intensität

verantwortlich ist, was letztendlich auch dazu passt, dass die Orai1-Intensität selbst in läsionaler Maushaut nicht deutlich verändert scheint. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine veränderte Aktivität von Orai1 und damit verbundene Veränderungen im SOCE an der Herunterregulation von TRPC1 beteiligt sind. Die Veränderung von TRPC1 könnte aber auch durch andere Moleküle reguliert werden. Vorstellbar wären beispielsweise Veränderungen in der Expression oder Funktion von STIM1, dem ER-Ca<sup>2+</sup>-Sensor, welcher sowohl mit Orai1 als auch mit TRPC1 interagiert.

Zusätzlich zeigte sich im AID-Mausmodell eine Korrelation der Intensität der Orai1-Färbung mit der verbreiterten Lokalisation von Cx43. Dies könnte über die Beeinflussung des Calcium-Gradienten vermittelt werden. Bisher ist zumindest kein direkter Zusammenhang der Expression von Orai1 und Cx43 beschrieben.

Innerhalb der letzten Jahre zeigten Studien bereits eine mögliche Rolle von Orai1 in der Pathogenese von AD, da verschieden SNPs im Orai1 Gen mit der Anfälligkeit für AD assoziiert sind (Chang et al. 2012). Die Rolle von Orai1 in AD ist jedoch bisher unbekannt. Im AID-Mausmodell finden sich nun erstmals Hinweise darauf, dass Orai1 über eine Modulation des Calcium-Gradienten in die Pathogenese von AD involviert sein könnte. Da Orai1-vermittelter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in Keratinozyten die Sekretion von TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) reguliert, welches in die Entstehung von Pruritus in der Pathogenese von AD involviert ist (Wilson et al. 2013), könnte eine Modulation von Orai1 als supportive Therapie zum Schutz der Barriere dienen. Wilson et al. stellten auch eine mögliche Verbindung der Wirkung von Ciclosporin A, welches in schweren Formen der AD therapeutisch Anwendung findet, mit der Orai1-vermittelten Aktivierung des NFAT Signalweges, welcher durch Ciclosporin A gehemmt wird, dar. Möglicherweise ist die Wirksamkeit der immunsuppressiven Therapie in AD nicht allein seiner Wirkung auf das Immunsystem, sondern ebenfalls der Unterbrechung von Signalwegen in Keratinozyten, zu verdanken.

In den immunhistochemischen Färbungen von normaler humaner Haut fand sich eine Färbung in allen Schichten mit Prädominanz im SG. Dieses Muster weicht von dem in der Literatur vorbeschriebenen Muster ab, in dem eine Prädominanz in undifferenzierten Keratinozyten des SB beschrieben wurde (Darbellay et al. 2014; Vandenberghe et al. 2013). Im humanen atopischen Ekzem fiel eine Veränderung der Orai1-Lokalisation innerhalb der Plasmamembran im Sinne einer Apikalisierung auf. Die Veränderungen in läsionaler humaner Haut glichen nicht denen im AID-Mausmodell. Die Unterschiede zwischen Maus und Mensch könnten jedoch aufgrund der Abweichungen der Färbung in

normaler humaner Haut von der Literatur auf eine unspezifische Färbung in humaner Haut zurückzuführen sein.

### **5.3.2 TRPC1 im AID-Mausmodell und im humanen atopischen Ekzem**

In nicht-läsionaler Maushaut ließ sich eine TRPC1-Färbung in allen epidermalen Schichten darstellen. In der Literatur finden sich zwar immunhistochemische Färbungen von TRPC1 in muriner Epidermis (Pani et al. 2006), eine genaue Beschreibung der Lokalisation innerhalb der epidermalen Schichten fand sich allerdings nicht. Die Intensitätsauswertung von TRPC1 im AID-Mausmodell zeigte eine deutliche Verminderung der Intensität in läsionaler Haut, sowohl in der basalen als auch in den suprabasalen Schichten. Dies deutet auf eine Herunterregulation von TRPC1 in allen Schichten hin. Eine Herunterregulation von TRPC1 wurde zuvor in nicht-läsionaler und läsionaler Haut von Psoriasis-Patienten auf mRNA- und Protein-Ebene (Western Blot) beschrieben (Leuner et al. 2011). Zur TRPC1-Expression in AD ist bisher nichts bekannt. Im AID-Mausmodell bestanden keine signifikanten Korrelationen der TRPC1-Expression mit dem Ki67-Index, dem Marker proliferierender Zellen und der Epidermisdicke. Passend hierzu fand sich auch keine signifikante Korrelation mit der Ca<sup>2+</sup>-Baseline.

TRPC1 wird eine Rolle in der Differenzierung von Keratinozyten zugeschrieben (Cai et al. 2005; Tu et al. 2005). In Basalzellkarzinom-Zellen korrelierte die Herunterregulation von TRPC1 mit der Unfähigkeit der Zellen zu differenzieren (Beck et al. 2008). In dieser Arbeit konnte nun in Maushaut bestätigt werden, dass TRPC1 einen signifikanten Einfluss auf den Differenzierungsprozess hat. Eine Verminderung der TRPC1-Intensität korreliert mit einer Verbreiterung der Expression von CK14 und mit einer Verminderung der Expression von CK10 in den unteren suprabasalen Schichten. In welcher Weise TRPC1 nun Einfluss auf den Differenzierungsprozess nimmt, ist unklar. Dennoch legt die signifikant positive Korrelation mit der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration im SG nahe, dass TRPC1 in die Calcium-Homöostase der Haut involviert ist. TRPC1 bildet Heterokomplexe mit anderen TRPs. TRPC1 Untereinheiten scheinen, beteiligt an der Bildung der Kanalpore, die Calcium-Permeabilität der Heteromere zu verringern; in diesem Sinne führte eine Herunterregulation von TRPC1 in GnRH Neuronen zu einer erhöhten Calcium-Permeabilität und einer erhöhten zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Storch et al. 2012). In Einklang mit dieser Studie konnte in dieser Arbeit in Maushaut gezeigt werden, dass die Verminderung der TRPC1-Expression in der gesamten Epidermis

mit einer erhöhten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration im SG korreliert –möglicherweise eben durch eine dadurch verursachte erhöhte Calcium-Permeabilität von heteromeren Calcium-Kanälen bereits im SB. Es ist zudem bekannt, dass TRPC1 durch Bildung von Heterokomplexen mit anderen in die Differenzierung eingebundenen Calcium-Kanälen Einfluss auf den Differenzierungsprozess nimmt (Schindl et al. 2012). In meiner Arbeit wurde auch untersucht, inwiefern andere Calciumkanäle im AID-Mausmodell verändert sind und mit der Herunterregulation von TRPC1 zusammenhängen.

Im AID-Mausmodell bestand keine signifikante Korrelation mit der Expression von Orai1 oder TRPV4. Dennoch könnte TRPC1 mit diesen Kanälen interagieren – was im Fall von Orai1 bereits beschrieben wurde (Cheng et al. 2011) - und ihre Aktivität modulieren. Dieser mögliche indirekte Einfluss auf die Differenzierung kann anhand der hier angewandten Methoden nicht näher beleuchtet werden, ist aber durchaus interessant. Die molekularen Mechanismen anhand derer TRPC1-vermittelter  $Ca^{2+}$ -Einstrom die Differenzierung fördert ist noch unklar. Da die Expression von Keratinen vorwiegend auf Transkriptionsebene reguliert wird (Fuchs und Green 1980), könnte TRPC1-vermittelter  $Ca^{2+}$ -Einstrom möglicherweise über  $Ca^{2+}$ -abhängige Transkriptionsfaktoren in die Expression von Keratinen involviert sein.

Die Herunterregulation von TRPC1 im AID-Mausmodell korrelierte zudem signifikant mit der Expression der TJ-Proteine Cldn-1 und ZO-1 und umgekehrt. Ein derartiger Zusammenhang wurde bisher nicht beschrieben, weshalb noch offen bleibt, ob und in welcher Richtung eine kausale Beziehung dieser verschiedenen in die Calcium-Homöostase involvierten Proteine besteht. *Knockdown*-Studien sollten hier in Zukunft Aufschluss geben. Das gleiche gilt für die Connexine Cx26 und Cx43. Während zu Cx43 ebenfalls eine beidseitige Korrelation bestand, kann in Bezug auf Cx26 gezeigt werden, dass die Expression von Cx26 in läsionaler Haut statistisch die Herunterregulation von TRPC1 im SB beeinflusst. Connexine ermöglichen den Austausch von *second messengern* zwischen Zellen und könnten möglicherweise über diesen Weg in die Expression von Calcium-Kanälen eingreifen.

Die immunhistochemischen Färbungen im humanen atopischen Ekzem zeigten ebenfalls eine Herunterregulation von TRPC1 zumindest in den basalen Schichten, welche sich jedoch im Gegensatz zu muriner Haut innerhalb der Schichten nicht homogen, sondern als ein „buntes“ Färbungsmuster mit Bereichen unterschiedlich starker Färbung in Schichten unabhängiger Verteilung darstellte. Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Muster wäre das Vorhandensein von proliferierenden Zellen in suprabasalen Schichten des

Ekzems da die TRPC1-Expression abhängig von Zellzyklus-Stadien ist (Madsen et al. 2012). In jedem Fall konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von TRPC1 sowohl in einem AID-Mausmodell als auch im humanen atopischen Ekzem verändert ist. Dies lässt eine mögliche, bisher nicht bekannte Rolle von TRPC1 in der Pathogenese von AD vermuten, die anhand von weiteren Studien im Detail untersucht werden könnte.

### **5.3.3 TRPV4 im AID-Mausmodell und im humanen atopischen Ekzem**

Meine Untersuchungen zeigten eine verminderte Intensität der TRPV4-Färbung im SG in läsionaler Maushaut. TRPV4 spielt eine entscheidende Rolle in der Barrierefunktion der Haut, wobei TRPV4 die Integrität der TJ-vermittelten Barriere positiv beeinflusst. In meiner Arbeit fand sich eine signifikante Korrelation der TRPV4-Intensität im SG mit intensiv angefärbten ZO-1-Punkten. Eine Verminderung der TRPV4-Intensität korrelierte mit einer Verminderung intensiv angefärbter ZO-1-Punkte. Eine Korrelation zwischen TRPV4 Expression und ZO-1 wurde meines Wissens nach bisher in der Literatur nicht untersucht. Nach TRPV4-Aktivierung blieben die ZO-1 Level *in vitro* unverändert (Akazawa et al. 2013), aber die Aktivierung geht vermutlich auch nicht mit einer veränderten TRPV4-Expression einher. Eine Korrelation der TRPV4-Expression mit der Cldn-1 Expression zeigte sich hingegen nicht, was im Einklang mit Studien an TRPV4-defizienten murinen Keratinozyten steht, in denen sich auf mRNA- und Protein-Ebene kein Unterschied in der Expression von Cldn-1 gegenüber dem Wildtyp zeigte (Sokabe et al. 2010). Die Rolle von TRPV4 in der Differenzierung von Keratinozyten ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung und wird kontrovers diskutiert. Während in TRPV4-defizienten murinen Keratinozyten keine Veränderungen in der Expression der Differenzierungsmarker CK10 und CK14 beobachtet wurden (Sokabe et al. 2010), berichtete eine aktuelle Studie von einer Erhöhung der CK10-Expression in HaCaT Zellen nach Baicalein-induzierter TRPV4-Aktivierung (Huang et al. 2016). Im AID-Mausmodell zeigte sich eine signifikante Korrelation mit der Differenzierung der Keratinozyten, wobei aber die statistischen Berechnungen auch umgekehrt einen Einfluss des Differenzierungsstatus der Zellen auf die TRPV4-Expression nicht ausschließen. Aufgrund der kontroversen Studienlage kann anhand dieser statistischen Korrelationen keine eindeutige Aussage getroffen werden, ein positiver Einfluss von TRPV4 auf die Differenzierung erscheint jedoch plausibel, da ein funktionierender

Differenzierungsprozess die Basis dafür darstellt, dass Keratinozyten ihre Aufgabe in der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut wahrnehmen können.

Die verminderte Intensität der TRPV4-Färbung im SG begünstigt in signifikantem Ausmaß eine Verlängerung der Ca<sup>2+</sup>-Baseline - wie sie im Ekzem zu finden ist. Außerdem bestand eine signifikant negative Korrelation zum Ki67-Index. TRPV4 scheint somit neben seinem differenzierungsfördernden Effekt auch proliferationshemmend zu wirken.

Interessanterweise zeigte sich eine signifikante Korrelation der TRPV4-Intensität im SG mit der Orai1-Intensität in den suprabasalen Schichten. Eine Verbindung dieser beiden Calcium-Kanäle ist bisher nicht bekannt. Orai1 ist vor allem für das Auffüllen von intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Speichern verantwortlich. TRPV4 vermittelter Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ist für die Etablierung von Zell-Zell-Kontakten und damit für die Barrierefunktion wichtig. Orai1 und TRPV4 werden beide STIM1 vermittelt zur Plasmamembran transloziert (Shin et al. 2015). Möglicherweise zeigt die Korrelation der Herunterregulation der beiden Kanäle in der Plasmamembran im SG bzw. in den suprabasalen Schichten keine Kausalität zwischen diesen Proteinen, sondern eine parallele Entwicklung aufgrund einer gemeinsamen Basis.

Die TRPV4 Expression im AID-Mausmodell korrelierte signifikant mit der Expression von Connexinen, in welcher Weise und Richtung bleibt offen. Auf jeden Fall zeigt dieser Umstand, dass Proteine, die in die Calcium-Homöostase der Haut involviert sind, miteinander in Verbindung stehen. Bisher ist über eine Verbindung von TRPV4 zu Connexinen in der Literatur noch nichts bekannt.

Im humanen atopischen Ekzem fand sich keine deutliche Veränderung der Expression von TRPV4.

#### **5.4 Diskussion des AID-Mausmodells und des Modellsystems „Maus“ im Allgemeinen**

Das in dieser Arbeit verwendete AID-Mausmodell birgt, wie jedes Modell, Vor- und Nachteile. Diese sollen, zur besseren Einordnung der gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit, im Folgenden diskutiert werden.

Das AID-Mausmodell spiegelt wesentliche Charakteristika der Atopischen Dermatitis wider, darunter die Th2-dominierte Immunreaktion mit typischem Zytokinprofil (Peters et al. 2011) und Erhöhung des Serum-IgE (Börnchen 2013). Ein Kritikpunkt an diesem Modell ist jedoch die festgeschriebene Rolle des Immunsystems. Durch die Injektion von Ovalbumin wird eine Immunreaktion getriggert, welche eine vorher nicht vorhandene Störung der epidermalen Barrierefunktion nach sich zieht. Verursacher der Barrierestörung

ist somit das Immunsystem. Nach dem aktuellen Wissenstand über die Pathogenese der AD, hat sich die vermutete Rolle des Immunsystems jedoch vom primären zum sekundären Spieler gewandelt (als Übersichtsartikel siehe Elias et al. 2008). Das Immunsystem wird nicht mehr als Ausgangspunkt der vorhandenen Barrierestörung betrachtet, sondern scheint durch vermehrtes Eindringen von Allergenen und Pathogenen in die Haut als Folge einer dysfunktionalen Barriere aktiv zu werden. Erst als Folge hiervon führen die immunologischen Veränderungen dann zu einer weiteren, forcierten Verschlechterung der Barrierefunktion – in einer Art Teufelskreis. Die Simulation einer multifaktoriellen Erkrankung, wie der Atopischen Dermatitis, in einem Modell bringt zudem die Schwierigkeit mit sich, zahlreiche verschiedene Faktoren mit einzubeziehen. So repräsentiert dieses Mausmodell zwar die Charakteristika auf immunologischer Basis, bezieht jedoch die genetische Komponente in der Pathogenese von AD nicht mit ein. Zur Optimierung dieses Modells wäre beispielsweise eine Kombination mit einem FLG-*Knockout* möglich, da Mutationen im FLG-Gen bei etwa einem Drittel der Patienten mit AD bekannt sind. Zudem würde dies eine vorbestehende Störung der Barrierefunktion beinhalten und somit der aktuellen Auffassung der Pathogenese näher kommen.

Des Weiteren ist bei den Ergebnissen dieser Arbeit zu beachten, dass läsionale Haut mit Kontrollhaut behandelte Tiere verglichen wird. Die Versuche mit normaler Haut unbehandelte Tiere zur Kontrolle befinden sich derzeit noch in der Durchführung. Selbstverständlich nehmen diese Versuche keinerlei Einfluss auf die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, könnten jedoch interessante Zusatzinformationen liefern. So wäre beispielsweise denkbar, dass die in dieser Arbeit ermittelten Veränderungen und Korrelationen sich im Vergleich mit normaler Haut noch ausgeprägter finden, oder signifikante Korrelationen auftreten, die zwischen läsionaler Haut und Kontrollhaut nicht bestehen.

Die oben aufgeführten, in Maus und Mensch voneinander abweichenden, Beobachtungen in Immunfluoreszenz-Färbemustern von Calcium-Kanälen sind ebenfalls bemerkenswert. Da die in dieser Arbeit verwendeten Präparate von Maus und Mensch jeweils in Paraffin eingebettet waren und sich auch die weitere Methodik nicht wesentlich unterscheidet, lassen sich diesbezüglich am ehesten Spezies-bedingte Unterschiede vermuten. Dies wurde auch zuvor bereits für Connexine beschrieben (siehe Kapitel 1.9). Im Gegensatz zur sehr dünnen Maushaut ließ sich die Färbung der Calcium-Kanäle in der vielschichtigen humanen Haut differenzierter betrachten. Bezüglich der Heterogenität einiger Ergebnisse könnte eine gezielte Auswahl der Spender von normaler humaner Haut

von Vorteil sein, was in dieser Arbeit jedoch aufgrund unzureichender Dokumentation von Patientendaten erschwert war. Einige der untersuchten Proteine könnten zudem in ihrer Expression vom Alter der Patienten und von der Lokalisation des entnommenen Gewebes abhängen.

Es ist bereits bekannt, dass die Modulation eines TRP-Kanals, des TRPC6, anhand eines für diesen Kanal spezifischen Aktivators, dem Hyperforin (Leuner et al. 2007), das aus Johanniskraut gewonnen wird, eine klinische Verbesserung des Hautbildes von Patienten mit Atopischer Dermatitis bewirkt (Schempp et al. 2003). Dies lässt eine Rolle dieses TRP-Kanals in der Pathogenese der Atopischen Dermatitis vermuten (Sun et al. 2012). Eine Untersuchung der Expression von TRPC6 erzielte aufgrund unspezifischer Färbung in dieser Arbeit zunächst keine Ergebnisse, erscheint aber sowohl im AID-Mausmodell als auch in der Haut von AD-Patienten weiterhin sehr interessant.

Bei aller Kritik an dem Mausmodell ist es jedoch wichtig festzuhalten, dass Mausmodelle ein oft unabdingbares Medium der Forschung darstellen. Viele Zusammenhänge werden zunächst im Mausmodell erforscht bevor die Forschung auf den Menschen ausgeweitet wird. Daher sind die Ergebnisse aus dem Mausmodell, obwohl es neben Ähnlichkeiten auch markante Unterschiede zum Menschen beinhalten kann, dennoch als potenziell wegweisend zu betrachten.

## **6. Zusammenfassung/Summary**

Die Epidermis weist einen charakteristischen Calcium-Gradienten auf. Dieser Calcium-Gradient ist Grundlage der Balance von Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten und essenziell in der Etablierung und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut.

Veränderungen des Calcium-Gradienten im Ekzem gehen mit Hyperproliferation und einem gestörten Differenzierungsprozess einher, welche in einer Störung der Barrierefunktion münden. Aufgrund der Bedeutung von Calcium in der Steuerung dieser Prozesse könnte die Veränderung des Calcium-Gradienten ein Schlüssel zu wichtigen Aspekten der Pathogenese der Atopischen Dermatitis sein. Veränderungen in Calcium-Signalwegen sind bereits für einige Hauterkrankungen entschlüsselt, welche ebenfalls eine Störung im Gleichgewicht von Proliferation und Differenzierung aufweisen, für die Atopische Dermatitis ist jedoch bisher nichts bekannt.

Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit die Expression von Proteinen untersucht, die in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport involviert sind. Die Auswahl umfasst die drei wichtigen Transportwege mithilfe derer sich Calcium-Ionen innerhalb der epidermalen Schichten bewegen: parazellulär – über Tight Junctions -, transzellulär – über Calcium-Kanäle - und interzellulär – über Gap Junctions. In läsionaler Haut fanden sich in der semiquantitativen Auswertung immunhistochemischer Färbungen von in Paraffin eingebettetem murinen und humanen Gewebe Veränderungen in der Färbung der Proteine aller drei Wege. Diese Erkenntnis unterstreicht die Komplexität des  $\text{Ca}^{2+}$ -*signaling*. Aus der Integration der Daten dieser Arbeit und dem aktuellen Kenntnisstand in der Literatur konnten mögliche Zusammenhänge zwischen den Parametern  $\text{Ca}^{2+}$ -Verteilung, Gap-Junctions, Tight-Junctions, Calcium-Kanäle, Differenzierung, Proliferation und Inflammation erarbeitet werden. In der Expression der Calcium-Kanäle fielen zum Teil Unterschiede zwischen dem Mausmodell und der humanen Haut auf, worin deutlich wird, dass Ergebnisse aus Mäusen nicht immer komplett auf den Menschen übertragbar sind, aber dennoch wichtige Erkenntnisse ermöglichen, die eine gezielte Auswahl weiterer Forschungsschwerpunkte erlauben.

The epidermis displays a characteristic calcium gradient. The calcium gradient is important for keratinocyte proliferation and differentiation and is therefore vital in establishing and maintaining the epidermal barrier function.

In eczema, alterations of the calcium gradient have been observed which correlate with hyperproliferation and an impaired differentiation process, resulting in an epidermal barrier dysfunction. Given the essential role of calcium in these processes, uncovering the mechanisms behind the formation and maintenance of the epidermal calcium gradient could be the key to understanding aspects of the pathogenesis of atopic dermatitis. Currently, the reason for these alterations in calcium distribution remains unknown.

In my study, I focussed on the expression of proteins involved in calcium homeostasis, including the three major pathways allowing calcium ions to travel within the epidermal layers: paracellular – via tight junctions –, transcellular – via calcium channels – and intercellular – via gap junctions. In lesional skin, semi-quantitative analyses of immunohistochemically stained sections of paraffin-embedded murine and human skin showed alterations in protein expression in all of the three implicated pathways. These findings underline the complexity of the interactions of calcium signalling. Further, considering the data of my work in the context of the existing body of knowledge, possible

causalities between parameters of calcium distribution, gap junctions, tight junctions, calcium channels, differentiation, proliferation and inflammation have been proposed. Finally, even though differences in the expression pattern of calcium channels between the mouse model and human skin may point to limitations in applying data from mice to humans, the information gained in mouse models helps define the focus of future research into calcium profiles and the pathogenesis of atopic dermatitis.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
A. dest	Aqua destillatum
AID	<i>Atopic Dermatitis-like Allergic Dermatitis</i>
AQP	Aquaporin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium Ionen
CaR	<i>Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor</i>
CE	<i>Cornified Envelope</i>
Cldn-1	Claudin 1
CRAC	<i>Ca<sup>2+</sup>-release-activated Ca<sup>2+</sup></i>
Cx	Connexin
DAG	Diacylglycerol
DAPI	(4',6'-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochlorid)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FLG	Filaggrin
FLIM	<i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i> (Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie)
GJ	<i>Gap Junction</i>
HEKs	<i>Human Epidermal Keratinocytes</i>
hPKs	<i>Human Primary Keratinocytes</i>
IF	Immunofluorescence
IgE	Immunglobulin E
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Trisphosphate
IVL	Involucrin
K	Zytokeratin
LB	<i>Lamellar body</i>
LOR	Loricrin
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>

OVA	Ovalbumin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	potentium hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PIP5K1a	Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-kinase, Typ I
PIXE	Proton Induced X-ray Emission
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROI	<i>Region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SEM	Standardfehler des Mittelwerts ( <i>standard error of the mean</i> )
SERCA	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
SG	Stratum granulosum
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOC	Store Operated Channel
SOCE	Store Operated Calcium Entry
SPCA	<i>secretory pathway Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
STIM1	<i>Stromal Interaction Molecule 1</i>
Tab.	Tabelle
TBST	Tris Buffer Saline Tween20
TEC	TRIS/ EDTA/Citrate solution
TER	Transepithelialer elektrischer Widerstand ( <i>transepithelial electrical resistance</i> )
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust ( <i>transepidermal water loss</i> )
TJ(s)	<i>Tight junction(s)</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TRPC	<i>Transient receptor potential canonical</i>
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
ZO-1	Zonula occludens Protein 1

## **Einheiten**

g	Gramm
h	Stunde
min	Minute
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (Zentrifugalkraft)
sec	Sekunde
ms	Millisekunde
M	Molar (Mol pro Liter)
mM	Milimolar (mMol pro Liter)
l	Liter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
W	Watt
kDa	kilo Dalton

## 8. Literaturverzeichnis

- Adams MP, Mallet DG, Pettet GJ (2015) Towards a quantitative theory of epidermal calcium profile formation in unwounded skin. *PLoS One*. 10(1):e0116751.
- Alberts B. *Molekularbiologie der Zelle*, 5. Auflage (2011), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Akazawa Y, Yuki T, Yoshida H, Sugiyama Y, Inoue S (2013) Activation of TRPV4 strengthens the tight-junction barrier in human epidermal keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol*. 26(1):15-21.
- Asad S, Winge MC, Wahlgren CF, Bilcha KD, Nordenskjöld M, Taylan F, Bradley M (2016) The tight junction gene Claudin-1 is associated with atopic dermatitis among Ethiopians. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 30(11):1939-1941.
- Asher M, Montefort S, Björkstén B et al. Group IPTS (2006) Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC phases one and three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 368:733–743.
- Bai J, Zou X, Jiang Y, Wang Q (2015) [Expression of transient receptor potential vanilloid receptor 4 protein in autoimmune bullous skin disorders]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 35(9):1349-51.
- Balda MS, Garrett MD, Matter K (2003) The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160:423-32.
- Baylie RL, Brayden JE (2011) TRPV channels and vascular function. *Acta Physiol (Oxf)*. 203(1):99-116.
- Beck B, Lehen'kyi V, Roudbaraki M, Flourakis M, Charveron M, Bordat P, Polakowska R, Prevarskaya N, Skryma R (2008) TRPC channels determine human keratinocyte differentiation: new insight into basal cell carcinoma. *Cell Calcium*. 43(5):492-505.
- Bennett BC, Purdy MD, Baker KA, Acharya C, McIntire WE, Stevens RC, Zhang Q, Harris AL, Abagyan R, Yeager M (2016) An electrostatic mechanism for Ca<sup>2+</sup>-mediated regulation of gap junction channels. *Nat Commun*. 7:8770.
- Bennett MV, Contreras JE, Bukauskas FF, Sáez JC (2003) New roles for astrocytes: gap junction hemichannels have something to communicate. *Trends Neurosci*. 11: 610–617.
- Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science*. 262: 2039–42.

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1):11-21.
- Berridge MJ, Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* 312(5992):315-21.
- Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA (1987) Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol.* 105(6 Pt 1):2621-9.
- Bieber T (2008) Atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 358(14):1483-94.
- Bikle DD, Mauro TM (2014) Calcium, Orai1, and epidermal proliferation. *J Invest Dermatol.* 134(6):1506-8.
- Bikle DD, Xie Z, Tu CL (2012) Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 7(4): 461–472.
- Börnchen C (2013) Untersuchung von epidermalen Ca<sup>2+</sup>-Gradienten in einem Mausmodell für Atopische Dermatitis unter Verwendung von 2-Photonen-Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie.
- Brandner JM, Schulzke JD (2015) Hereditary barrier-related diseases involving the tight junction: lessons from skin and intestine. *Cell Tissue Res.* 360(3):723-48.
- Brandner JM, Zorn-Kruppa M, Yoshida T, Moll I, Beck LA, De Benedetto A (2015) Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers.* 3(1-2):e974451.
- Brandner JM, Kief S, Wladykowski E, Houdek P, Moll I (2006) Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol Physiol.* 19(2):71-7.
- Brandner JM, Houdek P, Hüsling B, Kaiser C, Moll I (2004) Connexins 26, 30, and 43: Differences Among Spontaneous, Chronic, and Accelerated Human Wound Healing. *J Invest Dermatol.* 122:1310 –20.
- Brandner JM, Kief S, Grund C, Rendl M, Houdek P, Kuhn C, Tschachler E, Franke WW, Moll I (2002) Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol.* 81(5):253-63.
- Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, Hall JE, Dotto GP (1994) Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(14):6453-7.
- Budunova IV, Carbajal S, Slaga TJ (1995) The expression of gap junctional proteins during different stages of mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 16(11): 2717-24.
- Butterweck A, Elfgang C, Willecke K, Traub O (1994) Differential expression of the gap junction proteins connexin45, -43, -40, -31, and -26 in mouse skin. *Eur J Cell Biol.* 65(1):152-63.

- Cai S, Fatherazi S, Presland RB, Belton CM, Izutsu KT (2005) TRPC channel expression during calcium-induced differentiation of human gingival keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 40(1):21-8.
- Calautti E, Grossi M, Mammucari C, Aoyama Y, Pirro M, Ono Y, Li J, Dotto GP (2002) Fyn tyrosine kinase is a downstream mediator of Rho/PRK2 function in keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 156(1):137-48.
- Calautti E, Cabodi S, Stein PL, Hatzfeld M, Kedersha N, Paolo Dotto G (1998) Tyrosine phosphorylation and src family kinases control keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 141(6):1449-65.
- Candi E., Schmidt R., Melino G. (2005) The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(4):328-40.
- Caputo R, Innocenti M, Gasparini G, Peluchetti D (1978) Plasma membranes in psoriatic cells. A freeze-fracture study. *J Invest Dermatol.* 71(4): 245–9.
- Caspar DLC, Goodenough DA., Markowski L, Phillips WC (1977) Gap junction structures.I. Correlated electron microscopy and X-ray diffraction. *J Cell Biol.* 74:605-628.
- Celli A, Sanchez S, Behne M, Hazlett T, Gratton E, Mauro T (2010) The Epidermal Ca<sup>2+</sup> Gradient: Measurement Using the Phasor Representation of Fluorescent Lifetime Imaging. *Biophys J.* 98(5): 911–921.
- Chakraborty S, Mitra S, Falk MM, Caplan SH, Wheelock MJ, Johnson KR, Mehta PP (2010) E-cadherin differentially regulates the assembly of Connexin43 and Connexin32 into gap junctions in human squamous carcinoma cells. *J Biol Chem.* 285(14):10761-76.
- Chang WC, Lee CH, Hirota T, Wang LF, Doi S, Miyatake A, Enomoto T, Tomita K, Sakashita M, Yamada T, Fujieda S, Ebe K, Saeki H, Takeuchi S, Furue M, Chen WC, Chiu YC, Chang WP, Hong CH, Hsi E, Juo SH, Yu HS, Nakamura Y, Tamari M (2012) ORAI1 genetic polymorphisms associated with the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. *PLoS One.* 7(1):e29387.
- Chen Y, Fang Q, Wang Z, Zhang JY, MacLeod AS, Hall RP, Liedtke WB (2016) Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Ion Channel Functions as a Pruriceptor in Epidermal Keratinocytes to Evoke Histaminergic Itch. *J Biol Chem.* 291(19):10252-62.
- Cheng KT, Ong HL, Liu X, Ambudkar IS (2011) Contribution of TRPC1 and Orail to Ca(2+) entry activated by store depletion. *Adv Exp Med Biol.* 704:435-49.
- Choudhry R, Pitts JD, Hodgins MB (1997) Changing patterns of gap junctional intercellular communication and connexin distribution in mouse epidermis and hair follicles during embryonic development. *Dev Dynamics.* 210:417–30.

- Chung MK, Lee H, Caterina MJ (2003) Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem.* 278(34):32037-46.
- Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell.* 80:259–68.
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2(6):387-96.
- Darbellay B, Barnes L, Boehncke WH, Saurat JH, Kaya G (2014) Reversal of murine epidermal atrophy by topical modulation of calcium signaling. *J Invest Dermatol.* 134(6):1599-608.
- De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T, Boguniewicz M, Hata T, Schneider LC, Hanifin JM, Gallo RL, Novak N, Weidinger S, Beaty TH, Leung DYM, Barnes KC, Beck LA (2011) Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 127(3):773-86.
- Deleuran M, Hvid M, Kemp K, Christensen GB, Deleuran B, Vestergaard C (2012) IL-25 induces both inflammation and skin barrier dysfunction in atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy.* 96:45-49.
- Denda M, Tsutsumi M (2011) Roles of Transient Receptor Potential Proteins (TRPs) in Epidermal Keratinocytes. *Adv Exp Med Biol.* 704:847-60.
- Denda M, Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Tominaga M (2007) Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol.* 127(3):654-9.
- Denda M, Hosoi J, Asida Y (2000) Visual imaging of ion distribution in human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun.* 272(1):134-7.
- Djalilian AR, McGaughey D, Patel S, Seo EY, Yang C, Cheng J, Tomic M, Sinha S, Ishida-Yamamoto A, Segre JA (2006) Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. *J Clin Invest.* 116(5):1243-53.
- Duffy HS, Ashton AW, O'Donnell P, Coombs W, Taffet SM, Delmar M, Spray DC (2004) Regulation of connexin43 protein complexes by intracellular acidification. *Circ Res.* 94(2):215-22.
- Elias PM (2005) Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol.* 125(2):183-200.
- Elias PM, Hatano Y, Williams ML (2008) Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol.* 121(6):1337-43.

- Elias PM, Nau P, Hanley K, Cullander C, Crumrine D, Bench G, Sideras-Haddad E, Mauro T, Williams ML, Feingold KR (1998) Formation of the epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. *J Invest Dermatol.* 110(4):399-404.
- Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L (2006) The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J.* 397(1): 1–14.
- Fasolato C, Nilius B (1998) Store depletion triggers the calcium release-activated calcium current (ICRAC) in macrovascular endothelial cells: a comparison with Jurkat and embryonic kidney cell lines. *Pflugers Arch.* 436(1):69-74.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A (2006) A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.* 441(7090):179-85.
- Foggia L, Hovnanian A (2004) Calcium pump disorders of the skin. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 131C(1):20-31.
- Fritsch, P. (2009) *Dermatologie und Venerologie für das Studium.* Springer, Heidelberg.
- Fuchs E (1990) Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol.* 111(6 Pt 2):2807-14.
- Fuchs E, Green H (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell.* 19:1033-42.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 156(6):1099-111.
- Fusi C, Materazzi S, Minocci D, Maio V, Oranges T, Massi D, Nassini R (2014) Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is downregulated in keratinocytes in human non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol.* 134(9):2408-17.
- Gevaert T, Vriens J, Segal A, Everaerts W, Roskams T, Talavera K, Owsianik G, Liedtke W, Daelemans D, Dewachter I, Van Leuven F, Voets T, De Ridder D, Nilius B (2007) Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding. *J Clin Invest.* 117(11):3453-62.
- Giepman BN (2004) Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res.* 62(2):233-45.
- Giepman BN, Verlaan I, Moolenaar WH (2001) Connexin-43 interactions with ZO-1 and alpha- and beta-tubulin. *Cell Commun Adhes.* 8(4-6):219-23.

- Go M, Kojima T, Takano K, Murata M, Koizumi J, Kurose M, Kamekura R, Osanai M, Chiba H, Spray DC, Himi T, Sawada N (2006) Connexin 26 expression prevents down-regulation of barrier and fence functions of tight junctions by Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor ouabain in human airway epithelial cell line Calu-3. *Exp Cell Res.* 312(19):3847-56.
- Goliger JA, Paul DL (1995) Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol Biol Cell.* 6:1491–1501.
- Goodenough DA, Paul DL (2003) Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(4):285-94.
- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996) Connexins, connexons, and gap junction mediated intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* 65:475–502.
- Gruber R, Börnchen C, Rose K, Daubmann A, Volksdorf T, Wladykowski E, Vidal-Y-Sy S, Peters E, Danso M, Bouwstra J, Hennies H, Moll I, Schmuth M, Brandner J (2015) Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. *Am J Pathol.* 185(10):2777-89.
- Güler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci.* 22(15):6408-14.
- Gwack Y, Srikanth S, Oh-Hora M, Hogan PG, Lamperti ED, Yamashita M, Gelinac C, Neems DS, Sasaki Y, Feske S, Prakriya M, Rajewsky K, Rao A (2008) Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Mol Cell Biol.* 28(17):5209-22.
- Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems DS, Hogan PG, Rao A (2007) Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem.* 282(22):16232-43.
- Hänel KH, Cornelissen C, Lüscher B, Baron JM (2013) Cytokines and the skin barrier. *Int J Mol Sci.* 14(4):6720-45.
- Hennings H, Holbrook KA (1983) Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res.* 143(1):127-42.
- Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH (1980) Calcium Regulation of Growth and Differentiation of Mouse Epidermal Cells in Culture. *Cell.* 19(1):245-54.
- Holleran WM, Takagi Y, Uchida Y (2006) Epidermal sphingolipids: metabolism, function and roles in skin disorders. *FEBS Lett.* 580(23):5456-66
- Hoth M, Penner R (1993) Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol.* 465:359-86.
- Hoth M, Penner R (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* 355(6358):353-6.

- Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DY (2009) Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol.* 124(3 Suppl 2):R7-R12.
- Hu Z, Bonifas JM, Beech J, Bench G, Shigihara T, Ogawa H, Ikeda S, Mauro T, Epstein EH Jr. (2000) *Nat Genet.* 24(1):61-5.
- Huang KF, Ma KH, Liu PS, Chen BW, Chueh SH (2016) Baicalein increases keratin 1 and 10 expression in HaCaT keratinocytes via TRPV4 receptor activation. *Exp Dermatol.* 25(8):6239.
- Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, Worley PF (2006) STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol.* 8(9):1003-10.
- Irvine AD, McLean WHI, Leung DYM (2011) Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases. *N Engl J Med.* 365:1315-27.
- Jensen JM, Fölster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, Schütze S, Proksch E (2004) Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 122(6):1423–31.
- Jin C, Martyn KD, Kurata WE, Warn-Cramer BJ, Lau AF (2004) Connexin43 PDZ2 binding domain mutants create functional gap junctions and exhibit altered phosphorylation. *Cell Commun Adhes.* 11(2-4):67-87.
- Jongen WM, Fitzgerald DJ, Asamoto M, Piccoli C, Slaga TJ, Gros D, Takeichi M, Yamasaki H (1991) Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca<sup>2+</sup> in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *J Cell Biol.* 114(3):545-55.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Neurowissenschaften: Eine Einführung* (1996), Spektrum Akademischer Verlag
- Kida N, Sokabe T, Kashio M, Haruna K, Mizuno Y, Suga Y, Nishikawa K, Kanamaru A, Hongo M, Oba A, Tominaga M (2012) Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes. *Pflugers Arch.* 463:715–725.
- Kim HJ, 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. *Vet Dermatol.* 27(1):40-e11.
- Kirschner N, Rosenthal R, Furuse M, Moll I, Fromm M, Brandner JM (2013) Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 133(5):1161-9.

- Kirschner N, Brandner JM (2012) Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci.* 1257:158–66.
- Kirschner N, Houdek P, Fromm M, Moll I, Brandner JM (2010) Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol.* 89(11):839-42.
- Kojima T, Murata M, Go M, Spray DC, Sawada N (2007) Connexins induce and maintain tight junctions in epithelial cells. *J Membr Biol.* 217(1-3):13-9.
- Kojima T, Spray DC, Kokai Y, Chiba H, Mochizuki Y, Sawada N (2002) Cx32 formation and/or Cx32-mediated intercellular communication induces expression and function of tight junctions in hepatocytic cell line. *Exp Cell Res.* 276(1):40-51.
- Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M (2009) External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med.* 206(13):2937-46.
- Kumar NM, Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell.* 84(3): 381-8.
- Kurasawa M, Maeda T, Oba A, Yamamoto T, Sasaki H (2011) Tight junction regulates epidermal calcium ion gradient and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 406(4):506-11.
- Labarthe MP, Bosco D, Saurat JH, Meda P, Salomon D (1998) Upregulation of connexin 26 between keratinocytes of psoriatic lesions. *J Invest Dermatol.* 111:72–6.
- Lairds DW (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 394(Pt 3):527-43.
- Leuner K, Kraus M, Woelfle U, Beschmann H, Harteneck C, Boehncke WH, Schempp CM, Müller WE (2011) Reduced TRPC channel expression in psoriatic keratinocytes is associated with impaired differentiation and enhanced proliferation. *PLoS One.* 6(2): e14716.
- Leuner K, Kazanski V, Müller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, Harteneck C, Müller WE (2007) Hyperforin - a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J.* 21(14):4101-11.
- Lewis RS (2007) The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature.* 446(7133):284-7.
- Liedtke W, Friedman JM (2003) Abnormal osmotic regulation in *trpv4*<sup>-/-</sup> mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(23):13698-703.
- Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell.* 103(3):525-35.

- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr, Meyer T (2005) STIM is a  $Ca^{2+}$  sensor essential for  $Ca^{2+}$ -store-depletion-triggered  $Ca^{2+}$  influx. *Curr Biol.* 15(13): 1235–41.
- Liu X, Wang W, Singh BB, Lockwich T, Jadlowiec J, O'Connell B, Wellner R, Zhu MX, Ambudkar IS (2000) Trp1, a candidate protein for the store-operated  $Ca^{2+}$  influx mechanism in salivary gland cells. *J Biol Chem.* 4;275(5):3403-11.
- Liu K, Kasper M, Bierhaus A, Langer S, Müller M, Trott KR (1997) Connexin 43 expression in normal and irradiated mouse skin. *Radiat Res.* 147(4):437-41.
- Loewenstein WR (1981) Junctional Intercellular Communication: The Cell-to-Cell Membrane Channel. *Physiol Rev.* 61(4):829-913.
- Loewenstein WR (1979) Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochim Biophys Acta.* 560(1): 1-65.
- Lopez W, Gonzalez J, Liu Y, Harris AL, Contreras JE (2013) Insights on the mechanisms of  $Ca^{2+}$  regulation of connexin26 hemichannels revealed by human pathogenic mutations (D50N/Y). *J Gen Physiol.* 142(1):23-35.
- Lucke T, Choudhry R, Thom R, Selmer IS, Burden AD, Hodgkins MB (1999) Upregulation of connexin 26 is a feature of keratinocyte differentiation in hyperproliferative epidermis, vaginal epithelium, and buccal epithelium. *J Invest Dermatol.* 112(3):354–61.
- Luik RM, Wu MM, Buchanan J, Lewis RS (2006) The elementary unit of storeoperated  $Ca^{2+}$  entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER–plasma membrane junctions. *J Cell Biol.* 174(6):815–25.
- Maass K, Ghanem A, Kim JS, Saathoff M, Urschel S, Kirfel G, Grümmer R, Kretz M, Lewalter T, Tiemann K, Winterhager E, Herzog V, Willecke K (2004) Defective epidermal barrier in neonatal mice lacking the C-terminal region of connexin43. *Mol Biol Cell.* 15(10):4597-608.
- Madsen CP, Klausen TK, Fabian A, Hansen BJ, Pedersen SF, Hoffmann EK (2012) On the role of TRPC1 in control of  $Ca^{2+}$  influx, cell volume, and cell cycle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 303(6):C625-34.
- Makowski L, Caspar DL, Phillips WC, Goodenough DA (1977) Gap junction structures. II. Analysis of the X-ray diffraction data. *J Cell Biol.* 74(2): 629–45.
- Masuyama R, Vriens J, Voets T, Karashima Y, Owsianik G, Vennekens R, Lieben L, Torrekens S, Moermans K, Vanden Bosch A, Bouillon R, Nilius B, Carmeliet G (2008) TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell Metab.* 8(3):257-65.

- Mauro T, Bench G, Sidderas-Haddad E, Feingold K, Elias P, Cullander C (1998) Acute barrier perturbation abolishes the Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. *J Invest Dermatol.* 111(6):1198-201.
- McHugh J, Keller NR, Appalsamy M, Thomas SA, Raj SR, Diedrich A, Biaggioni I, Jordan J, Robertson D (2010) Portal osmopressor mechanism linked to transient receptor potential vanilloid 4 and blood pressure control. *Hypertension.* 55(6):1438-43.
- Mehrel T, Hohl D, Rothnagel JA et al. (1990) Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell.* 61:1103–12.
- Menon GK, Elias PM, Feingold KR (1994) Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *Br J Dermatol.* 130(2):139-47
- Menon GK, Elias PM (1991) Ultrastructural localization of calcium in psoriatic and normal human epidermis. *Arch Dermatol.* 127(1):57-63.
- Menon GK, Grayson S, Elias PM (1985) Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol.* 84(6):508-12.
- Mesnil M, Crespin S, Avanzo JL, Zaidan-Dagli ML (2005) Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta.* 1719(1-2):125-45.
- Mihm MC Jr, Soter NA, Dvorak HF, Austen KF (1976) The structure of normal skin and the morphology of atopic eczema. *J Invest Dermatol.* 67(3):305-12.
- Misery L (2014) [TSLP, the key of pruritus in atopic dermatitis] *Med Sci (Paris).* 30(2):142-4.
- Moll I. *Duale Reihe Dermatologie, 8.Auflage* (2016), Georg Thieme Verlag KG.
- Moore C, Cevikbas F, Pasolli HA, Chen Y, Kong W, Kempkes C, Parekh P, Lee SH, Kontchou NA, Yeh I, Jokerst NM, Fuchs E, Steinhoff M, Liedtke WB (2013) UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(34):E3225-34.
- Moran MM, McAlexander MA, Biró T, Szallasi A (2011) Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov.* 10(8):601-20.
- Moran MM, Xu H, Clapham DE (2004) TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 14(3):362-9.
- Morita H, Katsuno T, Hoshimoto A, Hirano N, Saito Y, Suzuki Y (2004) Connexin 26-mediated gap junctional intercellular communication suppresses paracellular permeability of human intestinal epithelial cell monolayers. *Exp Cell Res.* 298(1):1-8.

- Ng DC, Shafae S, Lee D, Bikle DD (2000) Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. *J Biol Chem.* 275(31):24080-8.
- Nilius B, Voets T (2013) The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO.* 14(2):152-63.
- Nilius B, Owsianik G (2010) Channelopathies converge on TRPV4. *Nat Genet.* 42(2):98-100.
- Numaga-Tomita T, Putney JW (2013) Role of STIM1- and Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup> entry in Ca<sup>2+</sup>-induced epidermal keratinocyte differentiation. *J Cell Sci.* 126(Pt 2):605-12.
- Oda Y, Tu CL, Pillai S, Bikle DD (1998) The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratinocyte differentiation. *J Biol Chem.* 273(36):23344-52.
- Orellana JA, Figueroa XF, Sánchez HA, Contreras-Duarte S, Velarde V, Sáez JC (2011) Hemichannels in the neurovascular unit and white matter under normal and inflamed conditions. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 10:404–414
- Pallon J, Malmqvist KG, Werner-Linde Y, Forslind B (1996) Pixe analysis of pathological skin with special reference to psoriasis and atopic dry skin. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 42(1):111-8.
- Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJD, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SH, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WHI (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 38(4):441-6.
- Pani B, Cornatzer E, Cornatzer W, Shin DM, Pittelkow MR, Hovnanian A, Ambudkar IS, Singh BB (2006) Up-regulation of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) following sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase 2 gene silencing promotes cell survival: a potential role for TRPC1 in Darier's disease. *Mol Biol Cell.* 17(10):4446-58.
- Parekh AB, Penner R (1997) Store-operated calcium influx. *Physiol Rev.* 77(4): 901–30.
- Parekh AB, Putney JW (2005) Store-operated calcium channels. *Jr Physiol Rev.* 85(2):757-810.
- Pavlovic S, Daniltchenko M, Tobin DJ, Hagen E, Hunt SP, Klapp BF, Arck PC, Peters EM (2008) Further exploring the brain-skin connection: stress worsens dermatitis via substance P-dependent neurogenic inflammation in mice. *J Invest Dermatol.* 128(2):434-46.
- Peters EM, Liezmann C, Spatz K, Daniltchenko M, Joachim R, Gimenez-Rivera A, Hendrix S, Botchkarev VA, Brandner JM, Klapp BF (2011) Nerve growth factor partially recovers inflamed skin from stress-induced worsening in allergic inflammation. *J Invest Dermatol.* 131:735-43.

- Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*. 443(7108):230-3.
- Proksch E, Fölster-Holst R, Jensen JM (2006) Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci*. 43(3):159-69.
- Putney JW Jr (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*. 11(10):611-24.
- Putney JW Jr (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. 7(1):1-12.
- Radtke C, Sinis N, Sauter M, Jahn S, Kraushaar U, Guenther E, Rodemann HP, Rennekampff HO (2011) TRPV channel expression in human skin and possible role in thermally induced cell death. *J Burn Care Res*. 32(1):150-9.
- Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, Juneja SC, Kidder GM, Rossant J (1995) Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*. 267: 1831–4.
- Reiter B, Kraft R, Günzel D, Zeissig S, Schulzke JD, Fromm M, Harteneck C (2006) TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability. *FASEB J*. 20(11):1802-12.
- Richard G (2000) Connexins: a connection with the skin. *Exp Dermatol*. 9(2):77–96
- Ring J (2012) *Neurodermitis – Atopisches Ekzem*. Thieme Verlag
- Ring J, Bauer P, Bachert C, Czech W (2010) *Weißbuch Allergie in Deutschland*. 3. Auflage. München: Urban & Vogel.
- Rivas M, Jarvis E, Morisaki S, Carbonaro H, Gottlieb A, Krueger J (1997) Identification of aberrantly regulated genes in diseased skin using the cDNA differential display technique. *J Invest Dermatol*. 108:188–94.
- Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, Irvine AD, Weidinger S (2009) Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 123(6):1361-70.e7.
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G, Stauderman KA (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol*. 169(3):435-45.
- Ross-Hansen K, Linneberg A, Johansen JD, Hersoug LG, Brasch-Andersen C, Menné T, Thyssen JP (2013) The role of glutathione S-transferase and claudin-1 gene polymorphisms in contact sensitization: a cross-sectional study. *Br J Dermatol*. 168(4):762-70.
- Roussel AJ, Bruet V, Marsella R, Knol AC, Bourdeau PJ (2015) Tight junction proteins in the canine epidermis: a pilot study on their distribution in normal and in high IgE-producing canines. *Can J Vet Res*. 79(1):46-51.

- Sakuntabhai A, Ruiz-Perez V, Carter S, Jacobsen N, Burge S, Monk S, Smith M, Munro CS, O'Donovan M, Craddock N, Kucherlapati R, Rees JL, Owen M, Lathrop GM, Monaco AP, Strachan T, Hovnanian A (1999) Mutations in ATP2A2, encoding a Ca<sup>2+</sup> pump, cause Darier disease. *Nat Genet.* 21(3): 252–253.
- Salomon D, Masgrau E, Vischer S, Ullrich S, Dupont E, Sappino P, Saurat JH, Meda P (1994) Topography of mammalian connexins in human skin. *103(2):240-7.*
- Salomon D, Masgrau E, Vischer S, Chanson M, Saurat J-H, Spray D, Meda P (1993) Gap-junction proteins and communication in human epidermis. *Prog Cell Res* 3:225–231.
- Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L, Dotto GP (2001) Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(17):9575-80.
- Sator PG, Schmidt JB, Hönigsmann H (2003) Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 48(3):352-8
- Sawey MJ, Goldschmidt MH, Risek B, Gilula NB, Lo CW (1996) Perturbation in connexin 43 and connexin 26 gap-junction expression in mouse skin hyperplasia and neoplasia. *Mol Carcinog.* 17(2): 49-61.
- Schempp CM, Windeck T, Hezel S, Simon JC (2003) Topical treatment of atopic dermatitis with St. John's wort cream--a randomized, placebo controlled, double blind half-side comparison. *Phytomedicine.* 10 Suppl 4:31-7.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 9(7):676-82.
- Schindl R, Fritsch R, Jardin I, Frischauf I, Kahr H, Muik M, Riedl MC, Groschner K, Romanin C (2012) Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem.* 287(42):35612-20.
- Schlaud M, Atzpodien K, Thierfelder W. (2007) Allergic diseases. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 50:701–10.
- Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286(6):C1213-28.
- Seguchi, T, Cui CY, Kusuda S, Takahashi M, Aisu K, Tezuka T (1996) Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch. Dermatol. Res.* 288(8): 442–6.

- Shin SH, Lee EJ, Chun J, Hyun S, Kang SS (2015) Phosphorylation on TRPV4 Serine 824 Regulates Interaction with STIM1. *Open Biochem J.* 9:24-33.
- Söhl G, Willecke K (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research.* 62:228– 32.
- Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, Mizuno A, Tominaga M (2010) The TRPV4 Channel Contributes to Intercellular Junction Formation in Keratinocytes *J.Biol.Chem.* 285(24):18749–58.
- Sokabe T, Tominaga M (2010) The TRPV4 cation channel: A molecule linking skin temperature and barrier function. *Commun Integr Biol.* 3(6):619-21.
- Storch U, Forst AL, Philipp M, Gudermann T, Mederos y Schnitzler M (2012) Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes. *J Biol Chem.* 287(5):3530-40.
- Stout C, Goodenough DA, Paul DL (2004) Connexins: functions without junctions. *Curr Opin Cell Biol.*16(5): 507-12.
- Sudbrak R, Brown J, Dobson-Stone C, Carter S, Ramser J, White J, Healy E, Dissanayake M, Larrègue M, Perrussel M, Lehrach J, Munro CS, Strachan T, Burge S, Hovnanian A, Monaco AP (2000) Hailey-Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca(2+) pump. *Hum Mol Genet.* 9(7):1131-40.
- Sugawara T, Iwamoto N, Akashi M, Kojima T, Hisatsune J, Sugai M, Furuse M (2013) Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *J Dermatol Sci.* 70(1):12-8.
- Sulk M, Seeliger S, Aubert J, Schwab VD, Cevikbas F, Rivier M, Nowak P, Voegel JJ, Buddenkotte J, Steinhoff M (2012) Distribution and expression of non-neuronal transient receptor potential (TRPV) ion channels in rosacea. *J Invest Dermatol.* 132(4):1253-62.
- Sun XD, You Y, Zhang L, Zheng S, Hong Y, Li J, Gao XH (2012) The possible role of TRPC6 in atopic dermatitis. *Med Hypotheses.* 78(1):42-4.
- Suzuki M, Watanabe Y, Oyama Y, Mizuno A, Kusano E, Hirao A, Ookawara S (2003) Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. *Neurosci Lett.* 353(3):189-92.
- Tada J, Hashimoto K (1997) Ultrastructural localization of gap junction protein connexin 43 in normal human skin, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 24: 628–35.
- Tajeddine N, Gailly P (2012) TRPC1 protein channel is major regulator of epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem.* 287(20):16146-57.

- Thévenin AF, Kowal TJ, Fong JT, Kells RM, Fisher CG, Falk MM (2013) Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. *Physiology (Bethesda)*. 28(2):93-116.
- Thyssen JP, Kezic S (2014) Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 134(4):792-9.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. pii: 201525474. [Epub ahead of print]
- Tu CL, Chang W, Xie Z, Bikle DD (2008) Inactivation of the calcium sensing receptor inhibits E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and calcium-induced differentiation in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*. 283(6):3519-28.
- Tu CL, Chang W, Bikle DD (2005) Phospholipase cgamma1 is required for activation of store-operated channels in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 124(1):187–97.
- Tu CL, Oda Y, Komuves L, Bikle DD (2004) The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell Calcium*. 35(3):265-73.
- Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, Schwarz H, Günzel D, Fromm M, Kemler R, Krieg T, Niessen CM (2005) E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J*. 24(6):1146-56.
- Vandenbergh M, Raphael M, Lehen'kyi V, Gordienko D, Hastie R, Oddos T, Rao A, Hogan PG, Skryma R, Prevarskaya N (2013) ORA11 calcium channel orchestrates skin homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(50):E4839-48.
- Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HAT, Gill DL (2002) The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol*. 4(11):E263-72.
- Vergnolle N (2014) TRPV4: new therapeutic target for inflammatory bowel diseases. *Biochem Pharmacol*. 89(2):157-61.
- Vliagoftis H, Ebeling C, Ilarraza R, Mahmudi-Azer S, Abel M, Adamko D, Befus AD, Moqbel R (2014) Connexin 43 expression on peripheral blood eosinophils: role of gap junctions in transendothelial migration. *Biomed Res Int*. 2014:803257.
- Volksdorf T, Heilmann J, Eming SA, Schawjinski K, Zorn-Kruppa M, Ueck C, Vidal-Y-Sy S, Windhorst S, Jücker M, Moll I, Brandner JM (2017) Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Are Important for Cutaneous Wound Healing. *Am J Pathol*. 187(6):1301-1312.

- Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B (2003) Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*. 424(6947):434-8.
- Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, Nilius B (2002) Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem*. 277(16):13569-77.
- Watt FM (1983) Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol*. 81:100s-3s.
- Werfel T, Aberer W, Ahrens F, Augustin M, Biedermann T, Diepgen T, Fölster-Holst R, Gieler U, Heratizadeh A, Kahle J, Kapp A, Nast A, Nemat K, Ott H, Przybilla B, Roecken M, Schlaeger M, Schmid-Grendelmeier P, Schmitt J, Schwennesen T, Staab D, Worm M (2016) Leitlinie Neurodermitis. *JDDG*. 14(1): e1–e75.
- Wilgenbus KK, Kirkpatrick CJ, Knuechel R, Willecke K, Traub O (1992) Expression of cx26, cx32 and cx43 gap junction proteins in normal and neoplastic human tissues. *Int J Cancer*. 51(4): 522–9.
- Williams HC (2005) Clinical practice. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 352:2314-24.
- Wilson SR, Thé L, Batia LM, Beattie K, Katibah GE, McClain SP, Pellegrino M, Estandian DM, Bautista DM (2013) The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*. 155(2):285-95.
- Xie Z, Bikle DD (2007) The recruitment of phosphatidylinositol 3-kinase to the E-cadherin-catenin complex at the plasma membrane is required for calcium-induced phospholipase C-gamma1 activation and human keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*. 282(12):8695-703.
- Xu P, Lu J, Li Z, Yu X, Chen L, Xu T (2006) Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1. *Biochem Biophys Res Commun*. 350(4):969–76.
- Yamasaki H (1990) Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 11:1051-8.
- Yokouchi M, Kubo A, Kawasaki H, Yoshida K, Ishii K, Furuse M, Amagai M (2015) Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. *J Dermatol Sci*. 77(1):28-36.
- 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. *J Dermatol Sci*. 71:89–99.

- Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR (1989) Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol.* 109(3):1207-17.
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH, Stauderman KA, Cahalan MD (2005) STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature.* 437(7060):902–5.
- Zhang Z, Tang J, Tikunova S, Johnson JD, Chen Z, Qin N, Dietrich A, Stefani E, Birnbaumer L, Zhu MX (2001) Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(6):3168-73.
- Zihni C, Mills C, Matter K, Balda MS (2016) Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 17(9):564-80.

## 9. Anhang

### 9.1 Gesamttabelle der statistischen Auswertung

Einflussgröße	Zielgröße	n	Schätzung	Konfidenzintervall 95%		Signifikanz
DermInf	Strecke kein CK10	7	0,22	0,01	0,43	0,043
DermInf	Strecke CK14	7	0,26	0,04	0,48	0,026
DermInf	Ki67-Index	5	0,01	0,00	0,02	0,014
DermInf	Epidermisdicke	7	0,88	0,59	1,16	<0,001
DermInf	Ca <sup>2+</sup> Baseline	6	0,43	0,17	0,69	0,003
DermInf	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	7	9,63	1,58	17,69	0,025
DermInf	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	7	10,12	1,23	19,09	0,030
DermInf	MeC	6	0,79	-9,61	11,19	0,875
DermInf	Strecke ohne ZO-1 gesamt	7	-0,18	-0,34	-0,02	0,031
DermInf	Strecke ohne ZO-1 intensiv	7	0,46	-0,39	1,32	0,263
DermInf	Strecke ohne Cldn-1	6	0,57	0,21	0,94	0,006
DermInf	Cldn-1 Intensität basal	4	-2,5	-5,15	0,15	0,061
DermInf	Cldn-1 Intensität suprabasal	4	-3,69	-6,7	-0,37	0,037
DermInf	Cx43	6	0,49	-0,36	1,34	0,225
DermInf	Cx26	6	0,70*	0,42	1,16	0,145
DermInf	TRPC1-Intensität basal	6	-2,97	-6,10	0,16	0,061
DermInf	TRPC1-Intensität suprabasal	6	-3,27	-6,65	0,10	0,056
DermInf	TRPV4-Intensität basal	6	-0,53	-2,50	1,44	0,564
DermInf	TRPV4-Intensität SG	6	-0,84	-2,69	1,01	0,335

DermInf	Orai1-Intensität basal	6	0,06	-0,71	0,83	0,848
DermInf	Orai1-Intensität suprabasal	6	-0,83	-2,14	0,49	0,174
DermInf	IgE	7	45,57	-46,08	137,22	0,257
IgE	DermInf	7	0,01	-0,01	0,02	0,271
IgE	Ki67-Index	7	7,08E-5	-7,98E-5	0,00	0,326
IgE	Epidermisdicke	9	0,00	-0,01	0,01	0,867
IgE	Strecke ohne ZO-1 gesamt	9	-0,00	-0,00	0,00	0,605
IgE	Strecke ohne ZO-1 intensiv	9	0,00	-0,01	0,01	0,763
IgE	Strecke ohne Cldn-1	8	-1,21	-0,00	0,00	0,995
IgE	Cldn-1 Intensität basal	6	-0,00	-0,02	0,01	0,552
IgE	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	-0,01	-0,03	0,01	0,395
IgE	Cx43	8	-0,00	-0,01	0,01	0,783
IgE	Cx26	8	1,00*	1,00	1,00	1,000
IgE	TRPC1-Intensität basal	8	-0,02	-0,07	0,04	0,459
IgE	TRPC1-Intensität suprabasal	8	-0,03	-0,09	0,03	0,253
IgE	TRPV4-Intensität basal	8	0,00	-0,02	0,03	0,904
IgE	TRPV4-Intensität SG	8	0,00	-0,02	0,02	0,981
IgE	Orai1-Intensität basal	8	0,01	-0,01	0,03	0,222
IgE	Orai1-Intensität suprabasal	8	0,01	-0,02	0,04	0,357
IgE <sub>OVA</sub>	DermInf	7	0,10	-0,07	0,26	0,191

IgE <sub>OVA</sub>	Strecke kein CK10	9	0,02	-0,03	0,06	0,484
IgE <sub>OVA</sub>	Strecke CK14	8	0,02	-0,04	0,07	0,538
IgE <sub>OVA</sub>	Ki67-Index	7	0,00	-0,00	0,00	0,612
IgE <sub>OVA</sub>	Epidermisdicke	9	0,03	-0,08	0,13	0,603
IgE <sub>OVA</sub>	Strecke ohne ZO-1 gesamt	9	-0,01	-0,04	0,03	0,749
IgE <sub>OVA</sub>	Strecke ohne ZO-1 intensiv	9	0,02	-0,15	0,19	0,821
IgE <sub>OVA</sub>	Strecke ohne Cldn-1	8	-0,01	-0,07	0,05	0,777
IgE <sub>OVA</sub>	Cldn-1 Intensität basal	6	-0,07	-0,35	0,21	0,579
IgE <sub>OVA</sub>	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	-0,13	-0,46	0,21	0,410
IgE <sub>OVA</sub>	Cx43	8	0,00	-0,17	0,18	0,954
IgE <sub>OVA</sub>	Cx26	8	1,00*	0,96	1,04	1,000
IgE <sub>OVA</sub>	TRPC1-Intensität basal	8	-0,53	-1,41	0,36	0,194
IgE <sub>OVA</sub>	TRPC1-Intensität suprabasal	8	-0,68	-1,65	0,29	0,137
IgE <sub>OVA</sub>	TRPV4-Intensität basal	8	-0,02	-0,48	0,44	0,927
IgE <sub>OVA</sub>	TRPV4-Intensität SG	8	0,07	-0,33	0,46	0,714
IgE <sub>OVA</sub>	Orai1-Intensität basal	8	0,02	-0,45	0,49	0,914
IgE <sub>OVA</sub>	Orai1-Intensität suprabasal	8	-0,02	-0,58	0,54	0,936
TRPC1-Intensität basal	Orai1-Intensität basal	9	144,56	50,29	415,53	0,063
TRPC1-Intensität basal	Orai1-Intensität suprabasal	9	0,09	-0,09	0,27	0,318
TRPC1-Intensität basal	TRPV4-Intensität basal	9	-0,01	-0,26	0,24	0,915

TRPC1-Intensität basal	TRPV4-Intensität SG	9	0,14	-0,11	0,39	0,244
TRPC1-Intensität basal	Cx43	9	-0,10	-0,20	-0,00	0,050
TRPC1-Intensität basal	Strecke kein CK10	8	-0,04	-0,07	-0,01	0,027
TRPC1-Intensität basal	Strecke CK14	7	-0,05	-0,09	-0,02	0,007
TRPC1-Intensität basal	Ki67-Index	6	-0,00	-0,00	0,00	0,147
TRPC1-Intensität basal	Epidermisdicke	9	-0,03	-0,12	0,05	0,376
TRPC1-Intensität basal	Ca <sup>2+</sup> Baseline	7	-0,05	-0,10	0,01	0,088
TRPC1-Intensität basal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	-1,80	-2,83	-0,76	0,004
TRPC1-Intensität basal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	9	-1,01	-3,44	1,41	0,380
TRPC1-Intensität basal	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	0,033	0,00	0,06	0,033
TRPC1-Intensität basal	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	-0,10	-0,24	0,04	0,164
TRPC1-Intensität basal	Strecke ohne Cldn-1	7	-0,11	-0,14	-0,07	< 0,001
TRPC1-Intensität basal	Cldn-1 Intensität basal	6	0,34	0,19	0,44	0,001
TRPC1-Intensität basal	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	0,19	-0,00	0,38	0,051
TRPC1-Intensität suprabasal	Orai1-Intensität basal	9	0,00	-0,08	0,10	0,845
TRPC1-Intensität suprabasal	Orai1-Intensität suprabasal	9	0,08	-0,09	0,24	0,328
TRPC1-Intensität suprabasal	TRPV4-Intensität basal	9	-0,06	-0,28	0,16	0,555
TRPC1-Intensität suprabasal	TRPV4-Intensität SG	9	0,07	-0,15	0,30	0,494
TRPC1-Intensität suprabasal	Cx43	9	-0,07	-0,16	0,03	0,147

TRPC1-Intensität suprabasal	Strecke kein CK10	8	-0,03	-0,06	0,00	0,063
TRPC1-Intensität suprabasal	Strecke CK14	7	-0,04	-0,08	0,00	0,040
TRPC1-Intensität suprabasal	Ki67-Index	6	-0,00	-0,00	0,00	0,283
TRPC1-Intensität suprabasal	Epidermisdicke	9	-0,02	-0,09	0,06	0,619
TRPC1-Intensität suprabasal	Ca <sup>2+</sup> Baseline	7	-0,04	-0,09	0,01	0,119
TRPC1-Intensität suprabasal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	-1,35	-2,52	-0,18	0,028
TRPC1-Intensität suprabasal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	9	-0,58	-2,83	1,67	0,585
TRPC1-Intensität suprabasal	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	0,03	0,00	0,06	0,049
TRPC1-Intensität suprabasal	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	-0,04	-0,17	0,10	0,566
TRPC1-Intensität suprabasal	Strecke ohne Cldn-1	7	-0,08	-0,13	-0,03	0,010
TRPC1-Intensität suprabasal	Cldn-1 Intensität basal	6	0,10	-0,06	0,26	0,202
TRPC1-Intensität suprabasal	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	0,14	-0,04	0,33	0,111
TRPV4-Intensität basal	TRPC1-Intensität basal	9	-0,10	-1,22	1,02	0,859
TRPV4-Intensität basal	TRPC1-Intensität suprabasal	9	-0,44	-1,66	0,78	0,457
TRPV4-Intensität basal	Orai1-Intensität basal	9	159,66	57,11	446,37	0,057
TRPV4-Intensität basal	Orai1-Intensität suprabasal	9	-0,01	-0,40	0,37	0,945

TRPV4-Intensität basal	Cx43	9	-0,01	-0,26	0,23	0,904
TRPV4-Intensität basal	Strecke kein CK10	8	0,01	-0,07	0,10	0,716
TRPV4-Intensität basal	Strecke CK14	7	0,00	-0,10	0,11	0,929
TRPV4-Intensität basal	Ki67-Index	6	0,00	-0,00	0,01	0,660
TRPV4-Intensität basal	Epidermisdicke	9	0,02	-0,16	0,19	0,829
TRPV4-Intensität basal	Ca <sup>2+</sup> Baseline	7	-0,00	-0,12	0,12	0,982
TRPV4-Intensität basal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	0,08	-3,36	3,53	0,958
TRPV4-Intensität basal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	9	0,10	-5,14	5,34	0,967
TRPV4-Intensität basal	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	0,02	-0,05	0,09	0,503
TRPV4-Intensität basal	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	0,07	-0,25	0,38	0,648
TRPV4-Intensität basal	Strecke ohne Cldn-1	7	0,04	-0,07	0,15	0,444
TRPV4-Intensität basal	Cldn-1 Intensität basal	6	-0,10	-0,55	0,36	0,641
TRPV4-Intensität basal	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	-0,10	-0,66	0,45	0,693
TRPV4-Intensität SG	TRPC1-Intensität basal	9	0,62	-0,39	1,64	0,204
TRPV4-Intensität SG	TRPC1-Intensität suprabasal	9	0,45	-0,71	1,60	0,414
TRPV4-Intensität SG	Orai1-Intensität basal	9	0,14	0,03	0,26	0,019
TRPV4-Intensität SG	Orai1-Intensität suprabasal	9	0,14	-0,17	0,45	0,332
TRPV4-Intensität SG	Cx43	9	-0,31	-0,47	-0,15	0,001
TRPV4-Intensität SG	Strecke Kein-CK10	8	-0,07	-0,14	-0,00	0,045
TRPV4-Intensität SG	Strecke CK14	7	-0,1	-0,18	-0,02	0,021
TRPV4-Intensität SG	Ki67-Index	6	-0,01	-0,01	-0,00	0,042

TRPV4-Intensität SG	Epidermisdicke	9	-0,14	-0,29	0,01	0,072
TRPV4-Intensität SG	Ca2+ Baseline	7	-0,10	-0,19	-0,02	0,021
TRPV4-Intensität SG	(Ca2+)intrazellulär SG	9	-2,21	-4,66	0,24	0,071
TRPV4-Intensität SG	(Ca2+)extrazellulär SG	9	-2,15	-6,68	2,37	0,311
TRPV4-Intensität SG	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	0,03	-0,03	0,10	0,316
TRPV4-Intensität SG	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	-0,3	-0,56	-0,04	0,028
TRPV4-Intensität SG	Strecke ohne Cldn-1	7	-0,09	-0,19	0,01	0,079
TRPV4-Intensität SG	Cldn-1 Intensität basal	6	0,26	-0,10	0,61	0,140
TRPV4-Intensität SG	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	0,29	-0,15	0,73	0,175
Orail-Intensität basal	TRPC1-Intensität basal	9	0,61	-1,11	2,33	0,438
Orail-Intensität basal	TRPC1-Intensität suprabasal	9	0,40	-1,62	2,43	0,661
Orail-Intensität basal	TRPV4-Intensität basal	9	0,06	-0,76	0,87	0,879
Orail-Intensität basal	TRPV4-Intensität SG	9	-0,06	-0,81	0,69	0,867
Orail-Intensität basal	Cx43	9	-0,23	-0,54	0,07	0,125
Orail-Intensität basal	Strecke Kein-CK10	8	-0,06	-0,17	0,05	0,269
Orail-Intensität basal	Strecke CK14	7	-0,05	-0,19	0,09	0,427
Orail-Intensität basal	Ki67-Index	6	0,01	-0,00	0,01	0,128
Orail-Intensität basal	Epidermisdicke	9	-0,01	-0,25	0,23	0,934
Orail-Intensität basal	Ca2+ Baseline	7	0,01	-0,23	0,25	0,923
Orail-Intensität basal	(Ca2+)intrazellulär SG	9	0,61	-7,66	8,88	0,876
Orail-Intensität basal	(Ca2+)extrazellulär SG	9	7,32	-2,12	16,76	0,115

Orai1-Intensität basal	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	0,00	-0,10	0,10	0,975
Orai1-Intensität basal	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	0,04	-0,40	0,48	0,842
Orai1-Intensität basal	Strecke ohne Cldn-1	7	0,02	-0,14	0,18	0,838
Orai1-Intensität basal	Cldn-1 Intensität basal	6	0,11	-0,62	0,85	0,738
Orai1-Intensität basal	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	0,21	-0,67	1,09	0,609
Orai1-Intensität suprabasal	TRPC1-Intensität basal	9	0,60	-0,64	1,83	0,311
Orai1-Intensität suprabasal	TRPC1-Intensität suprabasal	9	0,63	-0,80	2,05	0,356
Orai1-Intensität suprabasal	TRPV4-Intensität basal	9	-0,09	-0,68	0,49	0,730
Orai1-Intensität suprabasal	TRPV4-Intensität SG	9	-0,02	-0,59	0,56	0,947
Orai1-Intensität suprabasal	Strecke Kein-CK10	8	-0,07	-0,15	0,02	0,106
Orai1-Intensität suprabasal	Strecke CK14	7	-0,07	-0,17	0,03	0,163
Orai1-Intensität suprabasal	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	0,00	-0,07	0,08	0,921
Orai1-Intensität suprabasal	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	-0,04	-0,39	0,31	0,809
Orai1-Intensität suprabasal	Strecke ohne Cldn-1	7	-0,02	-0,14	0,11	0,748
Orai1-Intensität suprabasal	Cldn-1 Intensität basal	6	-0,04	-0,62	0,54	0,881
Orai1-Intensität suprabasal	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	-0,02	-0,72	0,69	0,958

Orai1-Intensität suprabasal	Cx43	9	-0,23	-0,45	-0,00	0,046
Orai1-Intensität suprabasal	(Ca2+)intrazellulär SG	9	-0,07	-5,16	5,02	0,978
Orai1-Intensität suprabasal	(Ca2+)extrazellulär SG	9	3,47	-3,23	10,17	0,284
Orai1-Intensität suprabasal	Epidermisdicke	9	-0,07	-0,25	0,11	0,432
Orai1-Intensität suprabasal	Ki67-Index	6	-0,00	-0,01	0,01	0,939
Orai1-Intensität suprabasal	Ca2+ Baseline	7	-0,22	-0,37	-0,07	0,006
Cx26	Ca2+ Baseline	7	-4,28	-7,24	-1,33	0,008
Cx26	(Ca2+)intrazellulär SG	9	-99,93	-142,15	57,71	0,001
Cx26	(Ca2+)extrazellulär SG	9	-80,00	-217,06	57,07	0,215
Cx26	TRPC1 Intensität basal	9	38,3	13,19	63,38	0,008
Cx26	TRPC1-Intensität suprabasal	9	35,8	4,45	67,16	0,030
Cx26	TRPV4-Intensität basal	9	-1,24	-18,92	16,44	0,884
Cx26	TRPV4-Intensität SG	9	16,3	0,19	32,48	0,048
Cx26	Orai1-Intensität basal	9	2,08	-2,73	6,89	0,349
Cx26	Orai1-Intensität suprabasal	9	5,65	-4,05	15,35	0,216
Cx26	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	2,92	1,43	4,41	0,002
Cx26	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	-11,06	-20,59	-1,54	0,029
Cx26	Strecke ohne Cldn-1	7	-6,13	-8,00	-4,26	< 0,001

Cx26	Cldn-1 Intensität basal	6	18,55	8,61	28,49	0,005
Cx26	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	24,69	17,25	32,13	< 0,001
Cx26	Cx43	9	-9,66	-15,82	-3,50	0,007
Cx26	Strecke kein CK10	8	-4,20	-5,90	-2,51	< 0,001
Cx26	Strecke CK14	7	-5,15	-7,21	-3,09	< 0,001
Cx26	Epidermisdicke	9	-8,32	-10,94	-5,81	< 0,001
Cx26	Ki67-Index	6	-0,16	-0,27	-0,04	0,013
TRPC1-Intensität basal	Cx26	9	1,04*	0,79	1,38	0,304
TRPC1-Intensität suprabasal	Cx26	9	1,03*	0,83	1,28	0,341
TRPV4-Intensität basal	Cx26	9	0,10*	0,70	1,43	0,901
TRPV4-Intensität SG	Cx26	9	1,07*	0,66	1,74	0,322
Orai1-Intensität basal	Cx26	9	1,01*	0,62	1,66	0,781
Orai1-Intensität suprabasal	Cx26	9	1,02*	0,96	1,09	0,469
Strecke kein CK10	Cx26	9	< 0,001*	< 0,001	>999,999	0,911
Strecke CK14	Cx26	8	< 0,001*	< 0,001	>999,999	0,891
Ki67-Index	Cx26	7	< 0,001*	< 0,001	>999,999	0,254
Epidermisdicke	Cx26	10	0,32*	0,06	1,60	0,152
Ca <sup>2+</sup> -Baseline	Cx26	7	0,79*	0,63	0,98	0,034
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Cx26	10	1,00*	0,99	1,00	0,113
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Cx26	10	1,00*	0,99	1,00	0,197
Strecke ohne ZO-1 gesamt	Cx26	9	2,71*	0,01	950,856	0,275

Strecke ohne ZO-1 intensiv	Cx26	9	0,57*	0,01	36,886	0,334
Strecke ohne Cldn-1	Cx26	8	< 0,001*	< 0,001	>999,999	0,924
Cldn-1 Intensität basal	Cx26	6	>999,999*	< 0,001	>999,999	0,939
Cldn-1 Intensität suprabasal	Cx26	6	5,82*	< 0,001	>999,999	0,938
Cx43	TRPC1-Intensität basal	9	-2,30	-4,34	-0,26	0,030
Cx43	TRPC1-Intensität suprabasal	9	-2,13	-4,49	0,23	0,073
Cx43	TRPV4-Intensität basal	9	-0,07	-1,22	1,09	0,904
Cx43	TRPV4-Intensität SG	9	-1,57	-2,47	-0,68	0,002
Cx43	Orai1-Intensität basal	9	-0,35	-0,66	-0,05	0,029
Cx43	Orai1-Intensität suprabasal	9	-0,70	-1,37	-0,03	0,043
Cx43	Strecke kein CK10	8	0,28	0,19	0,37	< 0,001
Cx43	Strecke CK14	7	0,32	0,21	0,43	< 0,001
Cx43	Ki67-Index	6	0,02	0,01	0,03	0,001
Cx43	Epidermisdicke	9	0,55	0,31	0,80	< 0,001
Cx43	Ca <sup>2+</sup> -Baseline	7	0,30	0,13	0,47	0,002
Cx43	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	7,28	2,99	11,57	0,004
Cx43	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	9	4,08	-6,49	14,65	0,411
Cx43	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	-0,13	-0,27	0,00	0,056
Cx43	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	0,73	0,18	1,29	0,014
Cx43	Strecke ohne Cldn-1	7	0,28	0,09	0,46	0,008

Cx43	Cldn-1 Intensität basal	6	-0,70	-1,49	0,09	0,075
Cx43	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	-0,85	-1,81	0,10	0,075
Cx43	Cx26	9	< 0,001*	-	-	< 0,001
Strecke ohne ZO-1 gesamt	Cx43	8	-1,72	-3,63	0,18	0,072
Strecke ohne ZO-1 intensiv	Cx43	8	0,50	0,12	0,87	0,014
Strecke ohne Cldn-1	Cx43	7	1,67	0,46	2,87	0,013
Cldn-1 Intensität basal	Cx43	6	-0,41	-0,88	0,07	0,082
Cldn-1 Intensität suprabasal	Cx43	6	-0,34	-0,73	0,06	0,083
Strecke ohne ZO-1 gesamt	Epidermisdicke	9	-1,67	-2,80	-0,54	0,007
Strecke ohne ZO-1 intensiv	Epidermisdicke	9	0,34	0,07	0,60	0,016
Strecke ohne Cldn-1	Epidermisdicke	8	1,22	0,66	1,79	0,001
Cldn-1 Intensität basal	Epidermisdicke	6	-0,28	-0,54	-0,02	0,039
Cldn-1 Intensität suprabasal	Epidermisdicke	6	-0,25	-0,43	-0,07	0,015
Strecke ohne Cldn-1	TRPC1-Intensität basal	7	-7,70	-10,18	-5,21	< 0,001
Strecke ohne Cldn-1	TRPC1-Intensität suprabasal	7	-7,18	-10,88	-3,47	0,003
Strecke ohne Cldn-1	TRPV4-Intensität basal	7	1,22	-2,13	4,56	0,444
Strecke ohne Cldn-1	TRPV4-Intensität SG	7	-2,64	-5,65	0,36	0,079
Strecke ohne Cldn-1	Orai1-Intensität basal	7	-0,27	-1,15	0,61	0,478
Strecke ohne Cldn-1	Orai1-Intensität suprabasal	7	-0,95	-2,87	0,97	0,274

Cldn-1 Intensität basal	TRPC1-Intensität basal	6	2,54	1,59	3,49	0,001
Cldn-1 Intensität basal	TRPC1-Intensität suprabasal	6	2,18	0,42	3,93	0,024
Cldn-1 Intensität basal	TRPV4-Intensität basal	6	-0,23	-1,29	0,84	0,641
Cldn-1 Intensität basal	TRPV4-Intensität SG	6	0,80	-0,31	1,90	0,140
Cldn-1 Intensität basal	Orai1-Intensität basal	6	0,18	-0,16	0,51	0,235
Cldn-1 Intensität basal	Orai1-Intensität suprabasal	6	-0,04	-0,43	0,35	0,812
Cldn-1 Intensität suprabasal	TRPC1-Intensität basal	6	1,87	0,69	3,05	0,009
Cldn-1 Intensität Suprabasal	TRPC1-Intensität suprabasal	6	1,66	0,03	3,30	0,047
Cldn-1 Intensität Suprabasal	TRPV4-Intensität basal	6	-0,16	-1,04	0,72	0,693
Cldn-1 Intensität Suprabasal	TRPV4-Intensität SG	6	0,61	-0,32	1,54	0,175
Cldn-1 Intensität Suprabasal	Orai1-Intensität basal	6	0,15	-0,12	0,42	0,210
Cldn-1 Intensität suprabasal	Orai1-Intensität suprabasal	6	-0,04	-0,36	0,27	0,729
Strecke ohne ZO-1 gesamt	TRPC1-Intensität basal	8	9,54	1,86	17,22	0,020
Strecke ohne ZO-1 gesamt	TRPC1-Intensität suprabasal	8	10,05	1,69	18,42	0,023
Strecke ohne ZO-1 gesamt	TRPV4-Intensität basal	8	1,46	-3,10	6,02	0,503
Strecke ohne ZO-1 gesamt	TRPV4-Intensität SG	8	2,22	-2,36	6,81	0,316

Strecke ohne ZO-1 gesamt	Orai1-Intensität basal	8	0,80	-0,69	2,28	0,251
Strecke ohne ZO-1 gesamt	Orai1-Intensität suprabasal	8	0,69	-2,41	3,78	0,627
Strecke ohne ZO-1 intensiv	TRPC1-Intensität basal	8	-1,64	-3,54	0,25	0,082
Strecke ohne ZO-1 intensiv	TRPC1-Intensität suprabasal	8	-0,88	-3,16	1,41	0,418
Strecke ohne ZO-1 intensiv	TRPV4-Intensität basal	8	0,22	-0,80	1,25	0,648
Strecke ohne ZO-1 intensiv	TRPV4-Intensität SG	8	-1,00	-1,89	-0,10	0,032
Strecke ohne ZO-1 intensiv	Orai1-Intensität basal	8	-0,19	-0,51	0,13	0,210
Strecke ohne ZO-1 intensiv	Orai1-Intensität suprabasal	8	-0,45	-1,04	0,13	0,110
MeC	TRPC1-Intensität basal	7	0,04	-0,09	0,17	0,504
MeC	TRPC1-Intensität suprabasal	7	0,05	-0,09	0,18	0,477
MeC	TRPV4-Intensität basal	7	-0,01	-0,07	0,05	0,703
MeC	TRPV4-Intensität SG	7	0,00	-0,06	0,07	0,881
MeC	Orai1-Intensität basal	7	0,00	-0,02	0,03	0,782
MeC	Orai1-Intensität suprabasal	7	-0,00	-0,05	0,05	0,895
MeC	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	-0,00	-0,01	0,00	0,630
MeC	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	-0,01	-0,03	0,01	0,333
MeC	Cldn-1 Intensität basal	5	-0,01	-0,07	0,06	0,811

MeC	Cldn-1 Intensität suprabasal	5	-0,01	-0,07	0,06	0,811
MeC	Cx43	7	-0,01	-0,04	0,02	0,467
TRPC1-Intensität basal	MeC	7	0,58	-1,60	2,76	0,588
TRPC1-Intensität suprabasal	MeC	7	0,42	-1,63	2,48	0,678
TRPV4-Intensität basal	MeC	7	-0,14	-4,80	4,53	0,952
TRPV4-Intensität SG	MeC	7	0,38	-3,31	4,07	0,834
Orai1-Intensität basal	MeC	7	-1,26	-10,46	7,94	0,756
Orai1-Intensität suprabasal	MeC	7	-0,47	-6,49	5,54	0,869
Strecke ohne ZO-1 gesamt	MeC	8	-20,31	-55,44	14,83	0,243
Strecke ohne ZO-1 intensiv	MeC	8	-1,68	-9,35	5,98	0,652
Cldn-1 Intensität basal	MeC	5	-0,03	-8,38	8,31	0,994
Cldn-1 Intensität suprabasal	MeC	5	-1,39	-8,61	5,83	0,689
Cx43	MeC	7	-2,52	-10,74	5,71	0,536
Cx26	MeC	7	-67,59	-197,68	62,51	0,294
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	TRPC1 Intensität basal	9	-0,02	-0,12	0,09	0,748
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	TRPC1-Intensität suprabasal	9	0,01	-0,11	0,12	0,878
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	TRPV4-Intensität basal	9	-0,01	-0,05	0,04	0,790
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	TRPV4-Intensität SG	9	-0,02	-0,07	0,02	0,263
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Orai1-Intensität basal	9	0,01	-0,01	0,03	0,275

(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Orai1-Intensität suprabasal	9	0,01	-0,03	0,05	0,445
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Strecke ohne ZO-1 gesamt	9	-0,00	-0,01	0,00	0,313
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Strecke ohne ZO-1 intensiv	9	0,02	-0,01	0,05	0,167
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Strecke ohne Cldn-1	8	0,01	-0,00	0,02	0,097
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Cldn-1 Intensität basal	6	-0,03	-0,09	0,03	0,307
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	-0,03	-0,11	0,04	0,378
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Cx43	9	0,00	-0,02	0,02	0,645
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Strecke kein CK10	9	0,00	-0,01	0,01	0,458
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	Strecke CK14	8	0,00	-0,01	0,02	0,473
Strecke ohne ZO-1 gesamt	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	9	-18,08	-53,29	17,13	0,288
Strecke ohne ZO-1 intensiv	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	9	5,63	-1,90	13,16	0,130
Strecke ohne Cldn-1	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	8	17,71	-5,29	40,70	0,113
Cldn-1 Intensität basal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	6	-3,53	-10,83	3,77	0,307
Cldn-1 Intensität suprabasal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	6	-2,61	-9,08	3,86	0,364
Strecke kein CK10	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	9	13,88	-12,64	40,40	0,268
Strecke CK14	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>extrazellulär</sub> SG	8	11,47	-5,77	28,72	0,162
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	TRPC1 Intensität basal	9	-0,07	-0,20	0,07	0,289
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	TRPC1-Intensität suprabasal	9	-0,02	-0,17	0,12	0,727
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	TRPV4-Intensität basal	9	-0,01	-0,07	0,04	0,610

(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	TRPV4-Intensität SG	9	-0,03	-0,08	0,02	0,186
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Orai1-Intensität basal	9	-0,01	-0,04	0,03	0,745
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Orai1-Intensität suprabasal	9	0,01	-0,04	0,07	0,621
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Strecke ohne ZO-1 gesamt	9	-0,01	-0,02	0,00	0,088
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Strecke ohne ZO-1 intensiv	9	0,02	-0,02	0,06	0,305
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Strecke ohne Cldn-1	8	0,01	-0,00	0,03	0,056
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Cldn-1 Intensität basal	6	-0,02	-0,09	0,04	0,429
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	-0,03	-0,11	0,05	0,453
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Cx43	9	0,01	-0,01	0,03	0,399
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Strecke kein CK10	9	0,00	-0,01	0,01	0,420
(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	Strecke CK14	8	0,01	-0,01	0,02	0,230
Strecke ohne ZO-1 gesamt	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	-25,31	-43,47	-7,14	0,011
Strecke ohne ZO-1 intensiv	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	5,17	1,00	9,33	0,020
Strecke ohne Cldn-1	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	8	15,68	5,98	25,38	0,006
Cldn-1 Intensität basal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	6	-5,04	-8,44	-1,64	0,012
Cldn-1 Intensität suprabasal	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	6	-4,33	-6,55	-2,12	0,004
Strecke kein CK10	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	9	17,46	5,55	29,38	0,009
Strecke CK14	(Ca <sup>2+</sup> ) <sub>intrazellulär</sub> SG	8	17,44	7,43	27,46	0,004
Ca <sup>2+</sup> Baseline	TRPC1-Intensität basal	7	-2,73	-8,86	3,39	0,350

Ca2+ Baseline	TRPC1-Intensität suprabasal	7	-2,06	-8,57	4,45	0,505
Ca2+ Baseline	TRPV4-Intensität basal	7	-0,09	-3,01	2,83	0,946
Ca2+ Baseline	TRPV4-Intensität SG	7	-2,06	-4,90	0,77	0,139
Ca2+ Baseline	Orai1-Intensität basal	7	-0,44	-1,65	0,76	0,412
Ca2+ Baseline	Orai1-Intensität suprabasal	7	-2,26	-3,68	-0,83	0,007
Ca2+ Baseline	Cx43	7	1,74	,063	2,86	0,006
Ca2+ Baseline	Strecke ohne ZO-1 gesamt	8	-0,27	-0,57	0,03	0,070
Ca2+ Baseline	Strecke ohne ZO-1 intensiv	8	1,90	0,65	3,14	0,006
Ca2+ Baseline	Cldn-1 Intensität basal	5	-2,32	-4,77	0,13	0,061
Ca2+ Baseline	Cldn-1 Intensität suprabasal	5	-2,60	-5,39	0,19	0,064
Ki67-Index	TRPC1-Intensität basal	6	-128,35	-301,41	44,71	0,123
Ki67-Index	TRPC1-Intensität suprabasal	6	-108,69	-294,19	76,80	0,204
Ki67-Index	TRPV4-Intensität basal	6	24,47	-80,86	129,79	0,602
Ki67-Index	TRPV4-Intensität SG	6	-72,00	-140,75	-3,24	0,042
Ki67-Index	Orai1-Intensität basal	6	3,81	-27,46	35,07	0,768
Ki67-Index	Orai1-Intensität suprabasal	6	-56,77	-103,06	-10,49	0,025
Ki67-Index	Cx43	6	38,59	22,01	55,18	0,001
Epidermisdicke	TRPC1-Intensität basal	9	-2,42	-5,43	0,59	0,105
Epidermisdicke	TRPC1-Intensität suprabasal	9	-2,29	-5,69	1,10	0,164

Epidermisdicke	TRPV4-Intensität basal	9	0,16	-1,43	1,76	0,829
Epidermisdicke	TRPV4-Intensität SG	9	-1,35	-2,84	0,14	0,072
Epidermisdicke	Orai1-Intensität basal	9	-0,18	-0,71	0,35	0,455
Epidermisdicke	Orai1-Intensität suprabasal	9	-0,77	-1,70	0,17	0,096
Epidermisdicke	Cx43	9	1,06	0,59	1,53	< 0,001
Epidermisdicke	Strecke ohne ZO-1 gesamt	9	-0,23	-0,39	-0,07	0,008
Epidermisdicke	Strecke ohne ZO-1 intensiv	9	0,91	0,19	1,64	0,017
Epidermisdicke	Strecke ohne Cldn-1	8	0,46	0,24	0,68	0,001
Epidermisdicke	Cldn-1 Intensität basal	6	-1,2	-2,42	0,03	0,054
Epidermisdicke	Cldn-1 Intensität suprabasal	6	-1,48	-2,95	-0,01	0,049
Strecke kein CK10	TRPC1-Intensität basal	8	-7,87	-14,08	-1,65	0,019
Strecke kein CK10	TRPC1-Intensität suprabasal	8	-7,75	-14,65	-0,86	0,032
Strecke kein CK10	TRPV4-Intensität basal	8	0,68	-3,24	4,59	0,716
Strecke kein CK10	TRPV4-Intensität SG	8	-3,57	-7,06	-0,09	0,045
Strecke kein CK10	Orai1-Intensität basal	8	-0,71	-1,78	0,36	0,163
Strecke kein CK10	Orai1-Intensität suprabasal	8	-1,85	-3,83	0,13	0,063
Strecke kein CK10	Cx43	8	2,65	1,87	3,43	< 0,001
Strecke CK14	TRPC1-Intensität basal	7	-7,94	-13,52	-2,35	0,012
Strecke CK14	TRPC1-Intensität suprabasal	7	-7,05	-13,95	-0,15	0,046
Strecke CK14	TRPV4-Intensität basal	7	0,16	-3,67	3,99	0,929

Strecke CK14	TRPV4-Intensität SG	7	-3,70	-6,75	-0,65	0,021
Strecke CK14	Orai1-Intensität basal	7	-0,67	-1,69	0,35	0,161
Strecke CK14	Orai1-Intensität suprabasal	7	-1,80	-3,49	-0,10	0,041
Strecke CK14	Cx43	7	2,39	1,53	3,26	< 0,001

\* Odds Ratio

## 9.2 Syntax

**\* ZG auf Behandlungsebene, EG auf Behandlungsebene.**

GET DATA

/TYPE=XLS

/FILE='D:\Statistiktermin 12.14\Die Liste\_20130917\_HillSlope\_GesamtMittel\_Ki67.xls'

/SHEET=name 'Daten'

/CELLRANGE=full

/READNAMES=on

/ASSUMEDSTRWIDTH=32767.

EXECUTE.

DATASET NAME DatenSet1 WINDOW=FRONT.

DATASET ACTIVATE DatenSet1.

USE ALL.

COMPUTE filter\_\$=(Lokalisation = 1 and ExIntra.Calcium = 1).

VARIABLE LABELS filter\_\$ 'Lokalisation = 1 and ExIntra.Calcium = 1 (FILTER)'.  
 VALUE LABELS filter\_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.

FORMATS filter\_\$ (f1.0).

FILTER BY filter\_\$.

EXECUTE.

MIXED Cx43 with Ki67Index

/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1)  
 SINGULAR(0.000000000001) HCONVERGE(0,

ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)



FILTER BY filter\_\$.

EXECUTE.

MIXED TRPC1basalLW with IgE

/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1)  
SINGULAR(0.000000000001) HCONVERGE(0,

ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)

/FIXED= IgE | SSTYPE(3)

/METHOD=REML

/PRINT=CPS DESCRIPTIVES SOLUTION TESTCOV

/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(ID) COVTYPE(VC).

**\*Filtern nach extra bzw. intrazellulärem Calcium. D.h. Mittelwert der extra. Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der 3 versch. Lokalisationen.**

**\*1.Filtern nach extrazellulärem Calcium.**

USE ALL.

COMPUTE filter\_\$=(ExIntra.Calcium = 1).

VARIABLE LABELS filter\_\$ 'ExIntra.Calcium = 1 (FILTER)'.  
VALUE LABELS filter\_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.

FORMATS filter\_\$ (f1.0).

FORMATS filter\_\$ (f1.0).

FILTER BY filter\_\$.

EXECUTE.

AGGREGATE

/OUTFILE=\* MODE=ADDVARIABLES

/BREAK=ID ExIntra.Calcium Behandlung

/CalciumKonz\_mean\_1=MEAN(CalciumKonz).

USE ALL.

COMPUTE filter\_\$=(Lokalisation = 1 and ExIntra.Calcium = 1).

VARIABLE LABELS filter\_\$ 'Lokalisation = 1 and ExIntra.Calcium = 1 (FILTER)'.  
VALUE LABELS filter\_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.

FORMATS filter\_\$ (f1.0).

FORMATS filter\_\$ (f1.0).

FILTER BY filter\_\$.

EXECUTE.

MIXED CalciumKonz\_mean\_1 with TRPC1basalLW

/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1)  
SINGULAR(0.000000000001) HCONVERGE(0,

ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)

/FIXED= TRPC1basalLW | SSTYPE(3)

/METHOD=REML

/PRINT=CPS DESCRIPTIVES SOLUTION TESTCOV

/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(ID) COVTYPE(VC).

## **\*2. Filtern nach intrazellulärem Calcium im SG.**

USE ALL.

COMPUTE filter\_\$=(ExIntra.Calcium = 2).

VARIABLE LABELS filter\_\$ 'ExIntra.Calcium = 2 (FILTER)'.  
VALUE LABELS filter\_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.  
FORMATS filter\_\$ (f1.0).  
FILTER BY filter\_\$.  
EXECUTE.

AGGREGATE

/OUTFILE=\* MODE=ADDVARIABLES

/BREAK=ID ExIntra.Calcium Behandlung

/CalciumKonz\_mean\_2=MEAN(CalciumKonz).

USE ALL.

COMPUTE filter\_\$=(Lokalisation = 1 and ExIntra.Calcium = 2).

VARIABLE LABELS filter\_\$ 'Lokalisation = 1 and ExIntra.Calcium = 2 (FILTER)'.  
VALUE LABELS filter\_\$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.  
FORMATS filter\_\$ (f1.0).  
FILTER BY filter\_\$.  
EXECUTE.

```

MIXED    CalciumKonz_mean_2 with TRPC1basalLW
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1)
SINGULAR(0.000000000001) HCONVERGE(0,
    ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED= TRPC1basalLW | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS DESCRIPTIVES SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(ID) COVTYPE(VC).

```

### **\*EG auf Lokalisationsebene, ZG auf Behandlungsebene.**

```

USE ALL.
SORT CASES BY ID Behandlung ExIntra.Calcium.
AGGREGATE
/OUTFILE='D:\Statistik\von Chrischi\agregiertneu2.sav'
/PRESORTED
/BREAK=ID Behandlung ExIntra.Calcium
/EpidermisHE_mean=MEAN(EpidermisHE)
/EpidermisHEMITTEL_mean=MEAN(EpidermisHEMITTEL)
/DermisHE_mean=MEAN(DermisHE)
/DermisHEMITTEL_mean=MEAN(DermisHEMITTEL)
/Infiltrathöhe_mean=MEAN(Infiltrathöhe)
/InfiltrathöheMITTEL_mean=MEAN(InfiltrathöheMITTEL)
/EpidermisSHG_mean=MEAN(EpidermisSHG)
/EpidermisSHGMittel_mean=MEAN(EpidermisSHGMittel)
/realCa2Mittel_mean=MEAN(realCa2Mittel)
/realCa2_mean=MEAN(realCa2)
/Ca2_mean=MEAN(Ca2)
/Ca2SG_mean=MEAN(Ca2SG)
/SteigungSCTop_mean=MEAN(SteigungSCTop)
/SteigungTopDermis_mean=MEAN(SteigungTopDermis)
/SteigungUmkehrTop_mean=MEAN(SteigungUmkehrTop)

```

/StreckeDermisUmkehr\_mean=MEAN(StreckeDermisUmkehr)  
/StreckeKeinCld1\_mean=MEAN(StreckeKeinCld1)  
/StreckeKeinCK10\_mean=MEAN(StreckeKeinCK10)  
/StreckeCK14\_mean=MEAN(StreckeCK14)  
/Ki67Index\_mean=MEAN(Ki67Index)  
/Lokalisation\_mean=MEAN(Lokalisation)  
/realCalciumKonz.mean\_mean=MEAN(realCalciumKonz.mean)  
/realCalciumKonz\_first=FIRST(realCalciumKonz)  
/CalciumKonz\_mean=MEAN(CalciumKonz)  
/IgE\_mean=MEAN(IgE)  
/IgEOVA\_mean=MEAN(IgEOVA)  
/TEWL\_mean=MEAN(TEWL)  
/Corneometrie\_mean=MEAN(Corneometrie)  
/Cld1\_mean=MEAN(Cld1)  
/Cld1Inten\_mean=MEAN(Cld1Inten)  
/Cld4\_mean=MEAN(Cld4)  
/Cld4Inten\_mean=MEAN(Cld4Inten)  
/JAMA\_mean=MEAN(JAMA)  
/JAMAInten\_mean=MEAN(JAMAInten)  
/Occ\_mean=MEAN(Occ)  
/OccInten\_mean=MEAN(OccInten)  
/ZO1\_mean=MEAN(ZO1)  
/ZO1Inten\_mean=MEAN(ZO1Inten)  
/Trpc1\_mean=MEAN(Trpc1)  
/Trpc1Inten\_mean=MEAN(Trpc1Inten)  
/Trpc45\_mean=MEAN(Trpc45)  
/Trpc45Inten\_mean=MEAN(Trpc45Inten)  
/Trpc367\_mean=MEAN(Trpc367)  
/Trpc367Inten\_mean=MEAN(Trpc367Inten)  
/CK110\_mean=MEAN(CK110)  
/CK110Inten\_first=FIRST(CK110Inten)  
/CK514\_mean=MEAN(CK514)  
/CK514Inten\_mean=MEAN(CK514Inten)

```

/CK6_mean=MEAN(CK6)
/CK6Inten_mean=MEAN(CK6Inten)
/Filaggrin_mean=MEAN(Filaggrin)
/FilaggrinInten_mean=MEAN(FilaggrinInten)
/Involuvrin_mean=MEAN(Involuvrin)
/InvoluvrinInten_mean=MEAN(InvoluvrinInten)
/Loricrin_mean=MEAN(Loricrin)
/Loricrininten_mean=MEAN(Loricrininten)
/TRPC1basalLW_mean=MEAN(TRPC1basalLW)
/TRPC1suprabasalLW_mean=MEAN(TRPC1suprabasalLW)
/TRPV4basalLW_mean=MEAN(TRPV4basalLW)
/TRPV4suprabasalLW_mean=MEAN(TRPV4suprabasalLW)
/Orai1basalLW_mean=MEAN(Orai1basalLW)
/Orai1suprabasalLW_mean=MEAN(Orai1suprabasalLW)
/Cx43_mean=MEAN(Cx43)
/Cx43Epi_mean=MEAN(Cx43Epi)
/Cx26_mean=MEAN(Cx26)
/ZO1gesamt_mean=MEAN(ZO1gesamt)
/ZO1gesamtEpi_mean=MEAN(ZO1gesamtEpi)
/ZO1intensiv_mean=MEAN(ZO1intensiv)
/ZO1intensivEpi_mean=MEAN(ZO1intensivEpi)
/Cldn1Intbasal_mean=MEAN(Cldn1Intbasal)
/Cldn1Intsupra_mean=MEAN(Cldn1Intsupra)
/DermInf_mean=MEAN(DermInf)
/Ca2LifetimespsmitnFaktor_mean=MEAN(Ca2LifetimespsmitnFaktor)
/N_BREAK=N.

```

GET FILE='D:\Statistik\von Chrischi\agregiertneu2.sav'.

dataset name aggr WINDOW=FRONT.

DATASET ACTIVATE aggr.

USE ALL.

COMPUTE filter\_3\$=(ExIntra.Calcium = 1).

```
VARIABLE LABELS filter_3$ 'ExIntra.Calcium = 1 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_3$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
FORMATS filter_3$ (f1.0).
FILTER BY filter_3$.
EXECUTE.
```

```
MIXED TRPC1basalLW_mean with StreckeDermisUmkehr_mean
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1)
SINGULAR(0.000000000001) HCONVERGE(0,
ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED= StreckeDermisUmkehr_mean | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS DESCRIPTIVES SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(ID) COVTYPE(VC).
```

**\* ZG auf Lokalisationssebene gemessen, EG auf Behandlungsebene.**

```
DATASET ACTIVATE DatenSet1.
USE ALL.
COMPUTE filter_2$=(ExIntra.Calcium = 1).
VARIABLE LABELS filter_2$ 'ExIntra.Calcium = 1 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_2$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
FORMATS filter_2$ (f1.0).
FILTER BY filter_2$.
EXECUTE.
```

```
MIXED Ca2LifetimespsmitnFaktor with TRPC1basalLW
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1)
SINGULAR(0.000000000001) HCONVERGE(0,
ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
/FIXED= TRPC1basalLW | SSTYPE(3)
/METHOD=REML
/PRINT=CPS DESCRIPTIVES SOLUTION TESTCOV
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(ID) COVTYPE(VC)
```

```
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(ID*lokalisation) COVTYPE(VC).
```

### Rechnungen zur Signifikanz zwischen Kontrolle und Ekzem eines Parameters

```
RECODE behandlung (0=0) (1 2 3=1) (else=COPY) into behandlung1.
```

```
RECODE behandlung (0=0) (1=1) (2=SYSMIS) (3=3) (else=COPY) into behandlung2.
```

execute.

```
MIXED ZO1gesamt by behandlung1
```

```
/CRITERIA=CIN(95) MXITER(100) MXSTEP(10) SCORING(1)  
SINGULAR(0.000000000001) HCONVERGE(0,
```

```
ABSOLUTE) LCONVERGE(0, ABSOLUTE) PCONVERGE(0.000001, ABSOLUTE)
```

```
/FIXED= behandlung1 | SSTYPE(3)
```

```
/EMMEANS=TABLES(behandlung1)
```

```
/METHOD=REML
```

```
/PRINT=CPS DESCRIPTIVES SOLUTION TESTCOV
```

```
/RANDOM=INTERCEPT | SUBJECT(ID) COVTYPE(VC).
```

## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation so großartig unterstützt haben, ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Johanna Brandner für die herausragende Betreuung, die Zeit und Energie, die Freiheit und Unterstützung bei der Ausarbeitung des Themas und für die vielen interessanten Diskussionen. Als meine Mentorin ist sie zudem eine wichtige Begleiterin auch über die Dissertation hinaus und ich bedanke mich hiermit auch für ihr außergewöhnliches Engagement auf meinem Weg durch das Medizinstudium, insbesondere bei der Planung von Aufenthalten in anderen Teilen der Welt.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei Sabine Vidal-y-Sy und Ewa Wladykowski für die Einführung in die Arbeit im Labor, die vielen wertvollen Ratschläge zur Durchführung der experimentellen Arbeit und die Hilfsbereitschaft. Auch Pia Houdek möchte ich hiermit besonders danken, es war mir eine große Freude einen Arbeitsplatz mit ihr teilen zu dürfen und von ihrer Erfahrung zu profitieren. Bedanken möchte ich mich auch bei Germar Schüring, der mir insbesondere bei der graphischen Auswertung zur Seite stand und bei Frau Anne Daubmann vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie (IMBE) des UKE für die Hilfe bei der umfassenden statistischen Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Zudem danke ich dem gesamten Team der Arbeitsgruppe für ein sehr produktives und angenehmes Arbeitsklima und für die sehr nette Zeit im Labor.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Paul und Marietta, für die liebevolle, unglaublich großartige Unterstützung und die Hilfe bei der Erstellung der Graphiken bedanken.

## **11. 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 an 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 kann.

Unterschrift: .....