

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Vergleich der klassischen Atopischen Dermatitis mit der
Prurigoform der Atopischen Dermatitis sowie der Prurigo
Nodularis bei Nicht-Atopikern hinsichtlich der Anamnese, der
Klinik, des Immunsystems, der Molekulargenetik und des
Mikrobioms**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Alina Hohmuth
aus Bamberg
Kiel 2019

1. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Regina Fölster-Holst, Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Helmut Fickenscher, Institut für Infektionsmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 31.08.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.06.2022

gez.: Prof. Dr. Jürgen Harder (Vorsitzender der Prüfungskommission)

Doktorarbeit: Vergleich der klassischen Atopischen Dermatitis mit der Prurigoform der Atopischen Dermatitis sowie der Prurigo Nodularis bei Nicht-Atopikern hinsichtlich der Anamnese, der Klinik, des Immunsystems, der Molekulargenetik und des Mikrobioms

Die vorliegende Doktorarbeit wurde unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Fölster-Holst, Dermatologische Klinik, Universitätsklinikum Kiel, angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	1
<i>I. Einleitung</i>	1
1.1 Die Haut - Aufbau und Funktion	1
1.2 Atopische Dermatitis	2
1.2.1 Epidemiologie und Umwelt-Risikofaktoren	3
1.2.2 Klinik und Verlauf der Atopischen Dermatitis	4
1.2.3 Diagnostik der Atopischen Dermatitis	4
1.2.4 Ätiopathogenese der Atopischen Dermatitis	5
1.2.4.1 Die Rolle der epidermalen Barriere	5
1.2.4.2 Die Rolle der genetischen Prädisposition	6
1.2.4.3 Die Rolle des Immunsystem	7
1.2.4.4 Die Rolle des Mikrobioms	11
1.2.5 Therapie der Atopischen Dermatitis	12
1.3 Prurigo Nodularis	14
1.3.1 Epidemiologie und Risikofaktoren der Prurigo Nodularis	14
1.3.2 Klinik, Verlauf und Diagnostik der Prurigo Nodularis	14
1.3.3 Ätiopathogenese der Prurigo Nodularis	15
1.3.3.1 Die Rolle der epidermalen Barriere	16
1.3.3.2 Die Rolle des Immunsystems	16
1.3.3.3 Die Rolle der neuronalen Dysregulation	17
1.3.4 Therapie der Prurigo Nodularis	17
1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit	18
<i>II. Material und Methoden</i>	20
2.1 Studie	20
2.1.1 Studiendesign	20
2.1.2 Studienpopulation	20
2.1.3 Studienablauf	20
2.1.3.1 Einverständniserklärung, Aufklärung und Vorbereitung	20
2.1.3.2 Anamnese und klinische Beurteilung	21
2.1.3.3 Probenentnahme und Messungen	21
2.2 Methodik	22
2.2.1 Klinische Beurteilung	23
2.2.2 Biophysikalische Messungen	24
2.2.2.1 Das Corneometer®	24
2.2.2.2 Durchführung der Hydratationsmessung	25
2.2.2.3 Das Tewameter®	25
2.2.2.4 Messung des Transepidermalen Wasserverlustes	26
2.2.3 Hautbiopsien	27
2.2.4 Blutentnahme	27
2.2.5 <i>Filaggrin</i> -Gen-Mutationsanalyse	28
2.2.6 Immunhistochemie	28
2.2.6.1 Fixierung und Einbettung	30
2.2.6.2 Färbung	30
2.2.6.3 Auswertung	31
2.2.7 Zytokinbestimmung im Blut	32
2.2.8 IgE- Messung	33
2.2.9 Mikrobiom-Sequenzierung	34
2.2.9.1 Isolation der bakteriellen DNA aus Stuhlproben	34
2.2.9.2 Isolation der bakteriellen DNA aus Hautabstrichen	35
2.2.9.3 PCR für das Next Generation Sequencing des Mikrobioms	37
2.2.9.4 Aufreinigung der DNA	37

2.3	Ethikvotum	38
2.4	Statistische Analyse	38
<i>III. Ergebnisse</i>		40
3.1	Klinische Beurteilung	40
3.1.1	Hautstatus und Juckreiz	40
3.1.2	Atopie-Status abgeleitet nach Diepgen	41
3.1.3	Erstmanifestationsalter und weitere Erkrankungen	43
3.1.4	Aktuelle Therapien und Vortherapien	43
3.1.5	Umweltfaktoren	44
3.1.6	Lebensqualität	45
3.2	Biophysikalische Messungen	45
3.3	<i>Filaggrin</i> -Gen-Mutationsanalyse	46
3.4	Bestimmung von Gesamt-IgE und spezifischen IgE-AK im Serum	47
3.5	Expression von Zytokinen und Immunzellmediatoren	48
3.5.1	IL-4 Expression	48
3.5.2	IL-5 Expression	51
3.5.3	IL-13 Expression	51
3.5.4	IL-31 Expression	53
3.5.5	TNF- α Expression	56
3.5.6	Thymic Stromal Lymphopoietin Expression	56
3.5.7	Mast Cell Tryptase Expression	58
3.6	Mikrobiomsequenzanalyse	60
<i>IV. Diskussion</i>		62
4.1	Klinische Beurteilung	62
4.2	Die Rolle der epidermalen Barriere	64
4.3	Die Rolle von <i>Filaggrin</i> -Mutationen	65
4.4	Die Rolle des Immunsystems	66
4.4.1	IgE	66
4.4.2	Zytokine	67
4.5	Die Rolle des Mikrobioms	70
4.6	Zusammenfassung	71
<i>V. Literatur</i>		74
<i>VI. Anhang</i>		81
7.1	Abkürzungen	81
7.2	Einschluss- und Ausschlusskriterien	83
7.2.1	Einschlusskriterien	83
7.2.2	Ausschlusskriterien	84
7.3	Anhang Methodik	84
7.3.1	Chemikalien	84
7.3.2	Puffer und Lösungen	85
7.3.3	Details zum Verfahren der <i>Filaggrin</i> -Mutationsmessung	86
7.3.3.1	DNA-Extraktion	86
7.3.3.2	DNA-Verdünnung und Beladung der PCR-Platten	87
7.3.3.3	Das Prinzip der Genotypisierung mit TaqMan®	87
7.3.3.4	Durchführung des TaqMan® Verfahrens	90
7.3.4	Re- und Dehydrierungsprotokolle	91
7.3.4.1	Dehydrierungsprotokoll	91
7.3.4.2	Entparaffinierungs- und Rehydrierungsprotokoll	91
7.3.5	Inhalte der Kits	92
7.3.5.1	Kits, Reagenzien und Pipettierschema für die TaqMan® Genotypisierung	92
7.3.5.2	Kit für die Zytokinmessung	93
7.3.5.3	Kit für die IgE-Messung	94
7.3.6	Primer und Sonden	99
7.3.7	Antikörper	102
7.3.7.1	Antikörper für die Immunhistochemie	102
7.3.7.2	Antikörper der Zytokinmessung	103
7.4	Verwendete Materialien	104

<i>VII. Danksagung</i>	108
<i>VIII. Lebenslauf</i>	109

I. Einleitung

1.1 Die Haut - Aufbau und Funktion

Die Haut besteht aus drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Epidermis ist die äußere Schicht und schützt den Organismus vor dem Eindringen von Umweltstoffen. Sie bildet die Grenzschicht zur Umwelt und ist nicht nur eine mechanische, sondern auch eine chemische und immunologische Barriere (Proksch et al., 2008, Proksch et al., 2006). Aufgebaut ist die Epidermis vorwiegend aus Keratinozyten. Weitere Zellarten sind Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkelzellen. Mit der darunterliegenden Dermis, vornehmlich aus Fibroblasten bestehend, ist sie sägezahnartig verbunden. Die untere Schicht der Haut, die Subkutis, dient durch das Fettgewebe als Schutzpolster.

Die Epidermis ist ca. 0,1 mm dick und besteht aus vier Schichten. Von innen nach außen gliedern sie sich wie folgt: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum, Stratum corneum (Lüllmann-Rauch, 2006, Goebeler W, 2011, Hohmuth, 2012). Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

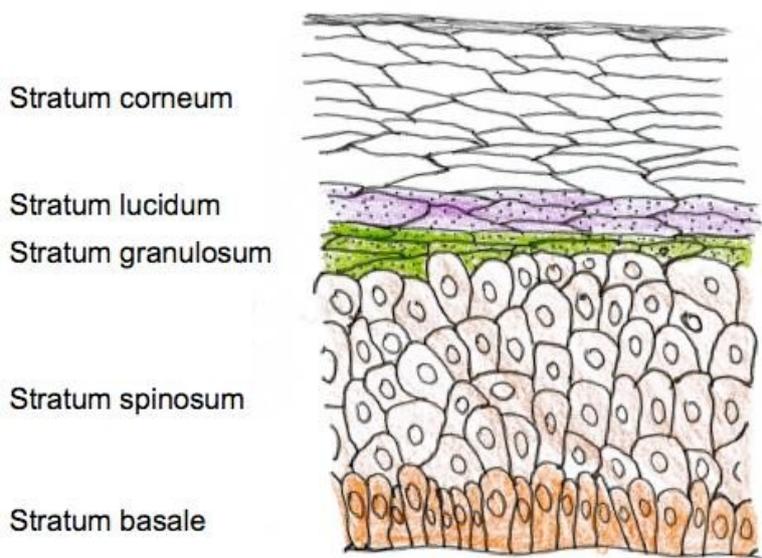


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Epidermis modifiziert nach (Hohmuth, 2012)

Die epidermale Barriere wird maßgeblich durch das Stratum corneum gebildet. Es besteht aus mehrschichtigen, toten, zellkernlosen, abgeflachten Keratinozyten und intrazellulären Lipiden (v.a. Cholesterol, freie Fettsäuren und Ceramide), die

lamellenartig angeordnet sind (Proksch et al., 2009).

Durch starke Interaktion der Keratinozyten miteinander entsteht eine schützende Permeabilitätsbarriere. Während ihrer Entwicklung durchlaufen sie, vom Stratum basale aus, Richtung Hautoberfläche verschiedene Differenzierungsgrade, welche durch unterschiedliche Markerproteine gekennzeichnet sind (Ekanayake-Mudiyanselage et al., 1998). Die Proteine Involucrin, Loricrin und Filaggrin werden im späten terminalen Differenzierungsstadium von den Keratinozyten exprimiert. Es kommt zum Abbau der intrazellulären Organellen und somit zur Bildung des sogenannten Cornified-Envelope (Lee et al., 2006). Das Cornified-Envelope besteht aus quervernetzenden Proteinen wie Involucrin, Loricrin, Elafin und Envoplakin und wird seinerseits von einer Lipidhülle umgeben. Durch die Interaktion des Cornified-Envelopes mit der Lipiddoppelschicht entsteht eine mechanische Barriere. Filaggrin spielt eine wichtige Rolle bei der Vernetzung der Keratinfilamente zu Bündeln und ist maßgeblich bei der Initiierung der Verhornung beteiligt.

Unter der Epidermis liegt die Dermis, auch Corium genannt. Sie führt zur Aufrechterhaltung der mechanischen Widerstandsfähigkeit der Haut. Lichtmikroskopisch sind von der Dermis aus Papillen zu erkennen, die in die Epidermis ragen. Sie werden als Stratum papillare zusammengefasst. Den übrigen Teil der Dermis bezeichnet man als Stratum reticulare. Die dominierenden Zellen der Dermis sind Fibroblasten, die Kollagen synthetisieren. Weitere Zelltypen sind an den Gefäßen lokalisierte Endothelzellen und Zellen des Immunsystems wie Mastzellen, dendritische Zellen (DC) und Makrophagen.

Die Subkutis stellt die Verbindung zu den darunter liegenden Strukturen, wie z.B. Faszien und Periost, dar und ist wichtig für die Verschieblichkeit der Haut. Zusätzlich dient sie als Pufferzone für einwirkenden Druck und als Isolator. In der Subkutis, die aus lockerem Bindegewebe aufgebaut ist, sind epifasziale Leitungsbahnen eingebettet (Lüllmann-Rauch, 2006).

1.2 Atopische Dermatitis

Die Atopische Dermatitis (AD, auch „Atopisches Ekzem“, „Neurodermitis) ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung. Sie gehört zum Formenkreis der atopischen Erkrankungen, welche äthopathogenetisch durch Wechselwirkungen zwischen Umwelt und Organismus charakterisiert sind (Leung and Bieber, 2003).

Die AD ist eine multifaktorielle Erkrankung und es werden verschiedene Ebenen der Einflussfaktoren zur Entstehung der AD diskutiert: die Umwelt, das Immunsystem, die Genetik, die epidermale Barriere und das Mikrobiom, wobei eine komplexe Interaktion der Einflussfaktoren besteht. Im Folgenden wird auf die einzelnen Einflussfaktoren eingegangen. Durch die Komplexität der Wechselwirkungen stellt die Therapie und Erforschung der Krankheitsursache eine große Herausforderung dar.

1.2.1 Epidemiologie und Umwelt-Risikofaktoren

Die Prävalenz der Atopischen Dermatitis (AD) unterscheidet sich zwischen den Ländern. In Deutschland beträgt sie 10-12 % der Vorschulkinder und 3 % der Erwachsenen (Illi et al., 2004, Worm et al., 2006), in Dänemark z.B. liegt sie bei 22,9 % der Kinder. Die AD ist weltweit zunehmend (Asher et al., 2006). Es gibt keinen Unterschied der Prävalenz der AD zwischen den Geschlechtern (Illi et al., 2004, Schlaud et al., 2007).

Als bekannter Risikofaktor der Umwelt gilt z.B. die aktive und passive Tabakrauchexposition (Schafer et al., 1997). Des Weiteren wird auch das Aufwachsen in der Stadt verglichen mit dem Aufwachsen auf dem Land als Risikofaktor der AD gesehen (Fölster-Holst, 2011). Weitere Umweltfaktoren, die das Risiko einer AD erhöhen, sind die westliche Ernährung mit viel Zucker und ungesättigten Fettsäuren und das Aufwachsen in Kleinfamilien (Werner et al., 2002, Weidinger and Novak, 2016). Auch das Klima spielt eine Rolle. Der Großteil der Patienten berichtet eine verminderte Symptomatik im Sommer (Fölster-Holst, 2011). Dass der Lebensstil und die Umwelt eine Rolle spielen, zeigt auch eine Studie, bei der beobachtet wurde, dass es bei der Migration von Personen aus Herkunftsländern mit niedriger AD-Prävalenz in Länder mit häufigem AD-Vorkommen zu einer entsprechend höheren Manifestation der AD der Migranten kommt (Burrell-Morris C, 2000).

Neben den Risikofaktoren gibt es auch protektive Faktoren. Laut der S3-Leitlinien zur Allergieprävention von 2014 wirkt das Stillen ab vier Monaten präventiv auf die AD Entstehung. Gezeigt wird auch, dass unspezifische Stimulationen des Immunsystems wie z.B. das Aufwachsen auf einem Bauernhof, das Besuchen einer Kindertagesstätte oder eine große Anzahl von Geschwistern ebenfalls einen protektiven Einfluss haben (Schafer et al., 2014).

1.2.2 Klinik und Verlauf der Atopischen Dermatitis

Die Atopische Dermatitis (AD) zeigt sich meist mit Rötung, trockener Haut und Pruritus (Fölster-Holst, 2011, Geoghegan et al., 2018). Die Klinik ist heterogen und geprägt durch einen starken Juckreiz (Beltrani, 1999a). Akut treten erythematöse, nässende Plaques mit Papeln auf, als Sekundärererscheinungen des Kratzens Exkoriationen. Das chronische Stadium ist durch Lichenifikationen und Schuppung gekennzeichnet (Beltrani, 1999b).

Das klinische Erscheinungsbild der AD ist abhängig vom Alter. Bei Säuglingen bestehen exsudative Läsionen im Gesicht und am behaarten Kopf sowie ekzematöse Läsionen an den Streckseiten der Extremitäten. Der Windelbereich ist typischerweise frei von Hautläsionen (Fölster-Holst, 2011). Später tritt die AD symmetrisch in den Beugen der Extremitäten, am Hals und an den Händen auf und verläuft meist in Schüben. In 60 % der Fälle kommt es innerhalb der ersten fünf Lebensjahre zur Erstmanifestation (Weidinger and Novak, 2016).

Als Atopie wird die Überempfindlichkeitsreaktion auf Allergene mit reaktiver Immunglobulin (Ig)-E-Sekretion verstanden. Zur Atopie zählen neben der AD die allergische Rhinokonjunktivitis, das allergische Asthma bronchiale und Nahrungsmittelallergien. Sie werden zum Allergietyp 1, der „Sofortallergie“, gezählt und sind durch ein erhöhtes allergiespezifisches IgE gekennzeichnet (Schlaud et al., 2007, Johansson et al., 2004). Zu den Stigmata der Atopie zählen die vermehrte Hand- und Fußlinienzeichnung (Ichthyosis-Hand/Fuß), die gedoppelte Lidfalte (Dennie-Morgan-Falte), die Rarefizierung der lateralen Augenbraue (Hertogh-Zeichen) und das Weißwerden der ekzemfreien Haut nach Reiz, der weißer Dermographismus (Fölster-Holst, 2011).

Der Juckreiz und daraus resultierende Schlafstörungen und soziale Einschränkungen auf Grund der Stigmatisierung führen oft zu einer starken psychosozialen Belastung. Das Risiko für das Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) ist 1,5fach erhöht. Zudem ist die Prävalenz von Depression, Angststörungen und Autismus bei Patienten mit AD erhöht (Weidinger and Novak, 2016).

1.2.3 Diagnostik der Atopischen Dermatitis

Die Diagnose der Atopischen Dermatitis (AD) wird primär klinisch gestellt. Nach Hanifin und Rajka, die 1980 vier Haupt- und mehrere Nebenkriterien erstellten,

müssen mindestens drei Kriterien erfüllt sein, um eine AD zu diagnostizieren (Eigenmann, 2001).

Durch weitere Untersuchungen und eine ausführliche Anamnese werden, wenn möglich, Provokationsfaktoren identifiziert und das Krankheitsbild der AD weiter spezifiziert. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei die allergologische Abklärung mit Messung des Gesamt-IgEs, dem Prick- und Intrakutantest. Über die RAST-Methode (Radio-Allergo-Sorbent-Test) wird die IgE-Sensibilisierung in-vitro gemessen (Zollner TM 2002).

1.2.4 Ätiopathogenese der Atopischen Dermatitis

Die Pathogenese der Atopischen Dermatitis (AD) wird schon seit vielen Jahren erforscht und es wurden mehrere Krankheitsmechanismen beschrieben, die zu dem klinischen Bild einer AD führen. Als Circulus vitiosus verstärken sie sich häufig gegenseitig. Im Weiteren wird auf folgende Einflussfaktoren und Wechselwirkungen bei der Entstehung von AD eingegangen: die epidermale Barriere, das Immunsystem, die Genetik und das Mikrobiom.

1.2.4.1 Die Rolle der epidermalen Barriere

Wie schon in Kapitel 1.1 beschrieben, ist die epidermale Barriere eine wichtige Grenze zur Umwelt. Sie schützt vor Noxen von außen, wie z.B. Bakterien, Chemikalien, Allergenen etc. als sogenannte „outside-inside-Barriere“ und vor Wasserverlust von innen, also „inside-outside-Barriere“. Es kommt bei beiden Konzepten zu einer durch das Immunsystem getriggerten Entzündungsreaktion, die auf eine überschießende Immunreaktion auf harmlose Allergene und irritierende Substanzen zurückzuführen ist. Die atopische, entzündete Haut führt zu vermehrtem Juckreiz, auf welchen die Patienten mit Kratzen reagieren. Hierdurch wird die Barriere weiter beschädigt (Elias and Feingold, 2001). Defekte der epidermalen Barriere führen zu vermehrtem transepidermalem Wasserverlust (TEWL) und zu einer verminderten Hydratation der Haut im Vergleich zu gesunder Haut. Dieser Effekt kann bei Patienten mit AD sowohl läsional, als auch nicht-läsional gemessen werden, wobei er läsional meist stärker ausgeprägt ist (Proksch et al., 2009).

1.2.4.2 Die Rolle der genetischen Prädisposition

Die AD ist eine komplexe, polygene Erkrankung. Wie groß der genaue Einfluss der Genetik auf die Entstehung von AD ist, wird von verschiedenen Forschungsgruppen kontrovers diskutiert. Im Rahmen von Zwillingsstudien wurde gezeigt, dass die Heritabilität bei monozygoten Zwillingen bei 80 % und unter dizygoten Zwillingen bei 15 % liegt (Larsen et al., 1986, Thomsen et al., 2007, Weidinger and Novak, 2016).

Ein wichtiger genetischer Risikofaktor für die Entstehung von AD ist die Mutation des *Filaggrin*-Gens, die bei 50 % der Patienten mit schwerer AD vorkommt (Palmer et al., 2006, Weidinger et al., 2006). Als wichtiger Bestandteil der epidermalen Barriere führt die *Filaggrin*-Mutation zu trockener und rissiger Haut, was ein Eindringen von Umweltfaktoren begünstigt, die wiederum das Immunsystem triggern können. Das *Filaggrin*-Gen liegt auf Chromosom 1q21.3 im sogenannten epidermalen Differenzierungskomplex (Palmer et al., 2006).

Es sind momentan über sechzig Mutationen des Gens bekannt (Meng et al., 2014). Die häufigsten *Filaggrin*-Mutationen sind R510X und 2282del4. Die meisten Mutationen führen als Null- oder Leserastermutationen zur Bildung eines „defekten“ oder fehlenden Filaggrin-Proteins. Die Mutationen sind mit acht Prozent der Europäer und fünfundzwanzig Prozent der AD-Patienten recht häufig. Ein Vorliegen der Mutation erhöht das Risiko, eine AD zu entwickeln, um drei Prozent (Rodriguez et al., 2009, Palmer et al., 2006). Beobachtet wird, dass Patienten mit einem vererbten Filaggrin-Mangel an schwereren Verläufen der AD leiden und sich die Erkrankung meist schon früher manifestiert. Dazu kommen häufig Nahrungsmittelallergien und Asthma. Auch ein Zusammenhang zwischen *Filaggrin*-Mutationen und Kontaktallergien sowie Heuschnupfen wurde bei Patienten beobachtet (Weidinger et al., 2008, Rodriguez and Weidinger, 2015, Foelster-Holst R, 2012).

Die *Filaggrin*-Mutation alleine erklärt die AD nicht. Liegen *Filaggrin*-Mutationen vor, so zeigt sich in nur 30-50 % der Fälle eine AD. Zudem bessert sich die AD trotz Mutation häufig im Verlauf (Fölster-Holst, 2011).

Filaggrin wird auch bei Patienten ohne Mutation vermindert exprimiert (Howell et al., 2009). Hier wird die Verbindung zum Immunsystem ersichtlich. Bei Patienten mit AD liegt eine T-Helfer-2-Prädominanz vor, auf die im Abschnitt 1.2.4.3 eingegangen wird. Die T-Zellen sezernieren vermehrt Interleukin (IL)-4 und IL-13, was zu einer Reduktion der Filaggrin-Expression auf Genebene führt. Werden therapeutisch IL-4

und IL-13 durch Antikörper neutralisiert, kann eine Verbesserung der Hautbarriere beobachtet werden (Howell et al., 2009). Aber auch mechanische Schäden und niedrige Luftfeuchtigkeit können zu einer verminderten Filaggrin-Dichte in der Haut führen (Weidinger and Novak, 2016).

1.2.4.3 Die Rolle des Immunsystems

Ein weiterer bedeutender Faktor bei der Entstehung der AD ist die schon erwähnte Fehlregulation des Immunsystems. In einer Studie konnte die Übertragung der AD durch Knochenmarkspende von einem Spender mit AD gezeigt werden. Auch die Abheilung von AD nach Knochenmarkspende von einem hautgesunden Spender wurde beobachtet (Pucci and Incorvaia, 2008).

Durch die defekte Barriere der Haut kommt es zur Penetration von Antigenen in tiefe Hautschichten und dadurch zur Aktivierung von Dendritischen Zellen. Die aktivierten, mit Antigenen beladenen Dendritischen Zellen migrieren dann in die Lymphknoten und aktivieren T-Zellen. Diese sezernieren verschiedene Zytokine, was wiederum andere Zellen heranlockt und aktiviert. Im Falle der AD kommt es in der akuten Phase v.a. zur Aktivierung von T-Helfer-2-Zellen, die IL-4, IL-5 und IL-13 ausschütten. IL-4 und IL-13 triggern die IgE-Sekretion aus B-Zellen und aktivieren Eosinophile (Fölster-Holst et al., 2016, Weidinger and Novak, 2016). IL-5 führt zur Proliferation, Differenzierung und Aktivierung der eosinophilen Granulozyten (Fölster-Holst, 2011).

Die IgE-Antikörper binden an hochaffine Fc ϵ R1-Rezeptoren der Mastzellen und basophilen Granulozyten. Dies stimuliert die Sekretion von verschiedenen Entzündungsmediatoren wie Histamin, Leukotrine und weitere Zytokine. Als Folge kommt es zu einem extensiven Juckreiz (Milgrom, 2002).

In der chronischen Phase der AD, die sich durch trockene, schuppige Haut auszeichnet, sind vermehrt aktivierte T-Helfer-1-Zellen mit gesteigerter IFN- γ und IL-2 Sekretion vorzufinden. Sie bewirken eine Apoptose der Keratinozyten (Fölster-Holst, 2011). Biopsien von chronischen AD-Hautläsionen zeigen eine verminderte Anzahl von T-Helfer-17- und T-Helfer-22-Zellen im Vergleich zu akuten Läsionen. T-Helfer-17- und T-Helfer-22-Zellen führen zusammen mit Chemokinen und Zytokinen aus Fibroblasten und Keratinozyten, wie z.B. das Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), zum Umbau des Hautgewebes und zur Fibrose. TSLP stimuliert zudem die

Reifung und Proliferation von Dendritischen Zellen und T-Helfer-2-Zellen und die B-Zell-Differenzierung (Weidinger and Novak, 2016). Der Wechsel zwischen der T-Helfer-1- und T-Helfer-2-Zell-Prädominanz wird durch IL-12, IL-4 und TSLP induziert. Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Pathogenese der AD ist IL-31. Es wird vor allem von T-Helfer-2-Zellen ausgeschüttet und liegt bei der AD in erhöhter Expression vor (Neis et al., 2006). IL-31 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Juckreizes. Rezeptoren des IL-31 sind u.a. auf epithelialen Zellen und neuronalen Zellen der dorsalen Wurzelganglien des Rückenmarks zu finden, welche den Juckreiz vermitteln. In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von IL-31 bei zuvor hautgesunden Mäusen zu einem klinischen Erscheinungsbild der AD mit Ekzemen und Juckreiz führt (Raap et al., 2008, Sonkoly et al., 2006, Raap et al., 2012, Raap et al., 2011). Beobachtet wurde auch, dass Histamin und Staphylococccen-Superantigene zur Expression von IL-31 in der Haut führen. Der Schweregrad der AD korreliert mit dem Serumspiegel von IL-31 und kann somit als Aktivitätsmarker angesehen werden. Er korreliert mit dem Score of Atopic Dermatitis (SCORAD) der AD, auf welchen in Punkt 2.2.1 noch genauer eingegangen wird (Raap et al., 2008, Sonkoly et al., 2006, Raap et al., 2012, Raap et al., 2011). Das proinflammatorische Zytokin Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α trägt auch zu der Störung der epidermalen Barriere bei. Es führt zusammen mit IL-4, IL-13 und IL-31 zu einer Spongiose der Haut, einer durch Lymphozyten getriggerten Ödembildung zwischen den Keratinozyten. Verstärkt wird dies zusätzlich durch die Sekretion von TSLP durch Keratinozyten. Einen weiteren Einfluss auf die Störung der epidermalen Barriere hat TNF- α , indem es eine Reduktion von freien Fettsäuren und Ceramiden in der Epidermis induziert (Danso et al., 2014). Eine Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Interleukine mit deren Wirkung und sezernierenden Zellen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Zytokine und deren sezernierende Zellen und Wirkung in Bezug auf das Immunsystem und die epidermale Barriere. In Anlehnung an eine Abbildung (Fölster-Holst, 2011) mit TH-Zellen = T-Helfer-Zellen, IL = Interleukin, TNF = Tumor Nekrose Faktor.

Zytokin	Sekretion von	Wirkung
IL-4	TH-2-Zellen, Mastzellen	IgE-Isotopenwechsel, Stimulation B- und T-Zellen, Förderung der TH-2-Prädominanz
IL-5	TH-2-Zellen, Mastzellen, Eosinophile	Differenzierung von Basophilen, Reifung und Aktivierung von Eosinophilen
IL-13	TH-Zellen, Eosinophile, Monozyten	IgE-Isotopenwechsel, Förderung TH-2-Prädominanz
IL-31	TH-Zellen	Auslösen von Juckreiz, Freisetzung proinflammatorischer Zytokine
TNF- α	Mastzellen	Spongiose, Reduktion von freien Fettsäuren und Ceramiden, Induktion von Apoptose

Man unterscheidet bei der AD zwischen einem extrinsischen und intrinsischen Typ. Der extrinsische „allergische“ Typ liegt bei 80-90 % der Patienten mit AD vor und umfasst einen erhöhten IgE-Spiegel (IgE > 200 kU/L), spezifische IgE-Antikörper und weitere atopische Erkrankungen.

Der intrinsische „nicht-allergische“ Typ zeichnet sich durch einen IgE < 200kU/L und Fehlen von spezifischen Antikörpern und Fehlen von weiterer atopischen Erkrankungen aus (Fölster-Holst et al., 2006).

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-5 und IL-13 beim extrinsischen Typ höher als beim intrinsischen Typ ist. IL-13 führt zu einer erhöhten Expression von IgE in B-Zellen (Akdis et al., 1999).

Neben dem Gesamt-IgE liegt meist auch ein erhöhtes spezifisches IgE vor. Hier werden das inhalative IgE und das nutritive IgE unterschieden. Das erhöhte inhalative IgE ist assoziiert mit Rhinokonjunktivitis und Asthma bronchiale allergicum. Es liegt eine erhöhte Sensibilisierungsrate bei Patienten mit AD vor und die Exposition des Allergens kann zu einem Schub der AD führen (Folster-Holst et al., 2015). Eine Allergenkarrenz führt zu einer Besserung der AD (Samochocki et al., 2007, Fölster-Holst et al., 2006).

33 % der Kinder mit mittelschwerer und schwerer AD weisen eine Nahrungsmittelallergie v.a. mit Allergenen von Kuhmilch, Hühnereiweiß, Fisch, Soja, Nüssen, Erdnüssen und Weizen auf (Fölster-Holst, 2011). Bei 67 % der Kinder unter zwei Jahren kommt es zu einer Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene jedoch nur in unter zehn Prozent zu einer klinischen Allergie (Eller et al., 2009, Weidinger and Novak, 2016).

Über die Ausschüttung von Zytokinen beeinflussen auch Mastzellen die Pathogenese der AD. Die Mastzellendichte kann über die Mast Cell Tryptase (MCT) gemessen werden. Die MCT wird bei der Degranulation von Mastzellen ausgeschüttet und ist ein Marker für die Aktivierung von Mastzellen (Payne and Kam, 2004). Studien zeigen eine erhöhte Mastzellendichte in der Haut von Patienten mit AD (Guerra Junior et al., 1995, Horsmanheimo et al., 1994, Barata et al., 1998). Allerdings korreliert die gemessene Dichte nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung (Damsgaard et al., 1997). Laut der Forschungsgruppe Amon et. al sind im Blut von Patienten mit AD keine erhöhten Mastzellmediatoren wie Histamin, MCT und Prostaglandin D2 zu finden (Amon et al., 1994).

1.2.4.4 Die Rolle des Mikrobioms

Als humanes Mikrobiom ist die Gesamtheit aller den Körper besiedelnder Mikroorganismen und deren genetischen Elementen und Interaktionen definiert (Huang et al., 2017). Dies spielt eine besondere Bedeutung bei Organen der Grenzflächen, die im direkten Kontakt mit der Umwelt stehen, wie z.B. der Darm und die Haut. Eine Hypothese bezüglich der zunehmenden Inzidenz der AD in westlichen Ländern ist, dass die zunehmende Hygiene zu einer Abnahme der Stimulation des Immunsystems führt und so zu einer Dysregulation des Immunsystems mit Zunahme von Erkrankungen allergischer Genese (Geoghegan et al., 2018). Laut der „Hygiene Hypothese“ des Epidemiologen David Strachan kommt es bei Kindern, die in frühen Jahren im Alltag wenig mit Erregern in Kontakt gekommen sind, zu gehäuften Immunantworten auf harmlose Antigene im späteren Verlauf. Eine verminderte Exposition mit Mikroben in frühen Jahren führt also zu Störungen des Immunsystems (Strachan, 1989). Studien zeigen, dass die frühkindliche Einnahme von Antibiotika und antimikrobiellen Seifen zu einer verminderten Exposition mit bakteriellen Antigenen führt und dies als Risikofaktor für die Entstehung der AD gilt (Powers et al., 2015).

Die Art der Geburt ist entscheidend für das Mikrobiom des Neugeborenen. Kinder, die vaginal auf die Welt kommen, werden mit der vaginalen Flora der Mutter exponiert. Bei ihnen dominiert der *Lactobacillus*, *Prevotella* and *Sneathia* spp bei der Besiedelung. Nach einem Kaiserschnitt wird das Kind mit der Hautflora der Mutter „angeimpft“ mit entsprechendem dominierendem Bakterienspektrum: *Staphylococcus*, *Corynebacterium* und *Propionibacterium* spp. (Dominguez-Bello et al., 2010). Während der ersten Jahre differenziert sich das Mikrobiom abhängig von der anatomischen Lokalisation und physiologischen Bedingung und führt dann zu einer lang anhaltenden Stabilität des individuellen Mikrobioms (Human Microbiome Project, 2012). Hierbei zeichnet eine große Diversität ein ausgewogenes Mikrobiom aus. Studien über das Mikrobiom des Darms zeigen, dass bei Gesunden folgende Bakterien im Darm dominieren: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria (Huang et al., 2017). In Tabelle 2 sind verschiedene bei AD untersuchte Bakterien-Spezies mit deren Wirkung auf die AD dargestellt.

Tabelle 2: Bakterien mit deren Wirkung auf die AD, angelehnt an (Huang et al., 2017).

Bakterium	Effekt auf AD
Staphylococcus epidermidis	Protektiv
Staphylococcus hominis	Protektiv
Staphylococcus aureus	Risikofaktor
Streptococccen Gruppe A	Risikofaktor

Wie schon beschrieben gibt es Zusammenhänge zwischen dem Mikrobiom und dem Immunsystem. In Versuchen mit Mäusen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Einnahme von Antibiotika in den ersten Lebensjahren die Entstehung einer AD fördert, indem es zu einer TH-2-Prädominanz kommt (Oyama N, 2001).

Die Haut ist physiologisch von vielen verschiedenen Keimen besät. Die Mikrobionten der Haut spielen eine wichtige Rolle bei der Homöostase, indem sie beispielsweise das pathologische Wachstum von Staphylococcus aureus verhindern (Powers et al., 2015). Bei der AD ist die Diversität des Haut-Mikrobioms vermindert (Geoghegan et al., 2018).

Staphylococcus aureus kann über verschiedene Mechanismen die AD triggern und die kutane Besiedelung korreliert mit dem Schweregrad der AD (Gong et al., 2006). Staphylococcus aureus induziert beispielsweise die IL-31 Expression in der Haut, stimuliert Mastzellen, schädigt Keratinozyten über Toxine. Zudem stimulieren sezernierte Enterotoxine als Superantigene T- und B-Zellen. Proteasen des Staphylococcus aureus zerstören die epidermale Barriere (Geoghegan et al., 2018, Fölster-Holst, 2011), was klinisch zur Exazerbation der AD führt.

1.2.5 Therapie der Atopischen Dermatitis

Die Atopische Dermatitis (AD) kann bis heute nicht geheilt, jedoch deutlich gebessert werden. Patienten werden aufgeklärt, bekannte Auslöser zu meiden und möglichst nicht an den betroffenen Stellen zu kratzen.

Die Therapie der AD wird laut Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) in vier Stufen eingeteilt. Hierbei stellt die erste Stufe die Basistherapie mit regelmäßiger Hautpflege durch Emollientien dar. Dies stärkt die epidermale Barriere, indem die Haut mit exogenen Lipiden versorgt wird und der Wasserverlust durch Bildung einer okklusiven Schicht

vermindert wird. Zusätzliche Stoffe wie Urea und Glycerine können zu zusätzlicher Wasserbindung im Stratum corneum führen (Weidinger and Novak, 2016, Fölster-Holst, 2011). Zur Basistherapie gehören auch die Patientenschulung und das Meiden von bekannten Provokationsfaktoren wie z.B. bestimmte Nahrungsmittel sowie inhalative Allergene. Auch das Vermeiden von unspezifischen Faktoren wie direkter Kontakt mit Wolle in Kleidung, extremen Temperaturen und Stress wirkt sich positiv auf die AD aus (Langan et al., 2009, Langan and Williams, 2006).

Die zweite Stufe bei leichtem Ekzem stellt die zusätzliche topische Therapie dar, bei der in Abhängigkeit vom Alter Kortikosteroide der Klasse I-III, Antiseptika, Antipruriginosa und / oder Calcineurininhibitoren eingesetzt werden. Kortikosteroide wirken immunsuppressiv, antiinflammatorisch, antiproliferativ und vasokonstriktiv. Topische Calcineurininhibitoren (Tacrolimus, Pimecrolimus) hemmen die Sekretion der T-Zellen von proinflammatorischen Zytokinen.

Die dritte Therapiestufe bei mittelschwerem Ekzem beinhaltet die topische Anwendung von Kortikosteroiden Klasse II und III und/ oder topische Calcineurininhibitoren oder Biologika wie Dupilumab.

Bei schweren Verläufen der AD stehen als vierte Stufe systemische Immunsuppressiva wie z.B. Ciclosporin zur Verfügung.

Aktuelle Studien zeigen zudem positive Therapieeffekte bei der Behandlung der AD mit Biologicals wie z.B. dem IL-13-Antikörper Lebrikizumab und Tralokinumab und dem IL-31-Rezeptor-Antikörper Nemolizumab (Simpson et al., 2018, Nguyen et al., 2019).

Bei allen genannten medikamentösen Therapien müssen die Nebenwirkungen beachtet werden und das Ansprechen der Therapie durch regelmäßige Kontrolltermine überprüft werden.

Parallel zu der beschriebenen Stufentherapie kommen adjuvante Therapieansätze zum Einsatz wie UV-Therapie, systemische Antibiotika bei stark ausgeprägter Impetiginisierung und Psychotherapie bei starker psychischer Belastung (Fölster-Holst, 2011).

1.3 Prurigo Nodularis

Die Prurigo nodularis (PN; auch PN Hyde, Prurigo simplex chronica und Lichen obtusus corneus) ist eine chronische entzündliche Hauterkrankung, die erstmals von Hyde 1909 beschrieben wurde. Die PN kann primär auf entzündlicher oder nicht-entzündlicher Haut entstehen und führt zu massivem Juckreiz. Die genauen Ursachen der PN sind noch nicht ausreichend untersucht und auch die Therapieoptionen unspezifisch. Im Folgenden werden verschiedene Einflussfaktoren vorgestellt.

1.3.1 Epidemiologie und Risikofaktoren der Prurigo Nodularis

Die Inzidenz der Prurigo Nodularis (PN) ist nicht bekannt. Am häufigsten wird sie im 60. Lebensjahrzehnt beobachtet. Sie kann aber auch schon in jüngeren Jahren auftreten. (Accioly-Filho et al., 2000). Frauen sind häufiger betroffen (Werner et al., 2002).

In verschiedenen Veröffentlichungen und Fallstudien werden Zusammenhänge zwischen PN und der Einnahme von Medikamenten, Schwangerschaft und metabolischen, infektiologischen, neurologischen und fokalen Erkrankungen hergestellt (Eigelshoven, 2009). Payne et al. sehen beispielsweise eine Anämie, Leber- und Nierenerkrankungen als mögliche Ursachen für die PN (Payne et al., 1985a, Berger et al., 1995, Fina et al., 1991). Auch der Zusammenhang zwischen PN und einer Glutenenteropathie wird mehrfach beschrieben (McKenzie et al., 1976, Suarez et al., 1984). Hierbei wurde beobachtet, dass sich die PN-Symptomatik nach Einhalten einer glutenfreien Diät bessert (McKenzie et al., 1976, Suarez et al., 1984). Als Einflussfaktor beschrieben wurden auch psychische Einflüsse wie z.B. Stress. Diese Einflüsse sind allerdings schwer quantifizierbar (Accioly-Filho et al., 2000, Schneider et al., 2006).

1.3.2 Klinik, Verlauf und Diagnostik der Prurigo Nodularis

Das klinische Bild der Prurigo Nodularis (PN) äußert sich durch multiple Knoten, welche sich hart und gerötet darstellen. Die Oberfläche der Knoten ist oft rau und beträgt im Durchmesser ein bis drei Zentimeter (cm), z.T. finden sich lichenifizierte Plaques. Hauptsächlich sind die Streckseiten der Extremitäten betroffen. Aber auch an anderen Körperstellen können Charakteristika der PN zu finden sein. Meist sind

an den Körperstellen, die nicht mit den Händen erreicht werden können, keine Hautläsionen zu finden. Die Hand- und Fußinnenflächen und Schleimhäute bleiben frei. Typischerweise sind die Läsionen symmetrisch verteilt und als hyperkeratotische, erosive Papeln oder Knoten beschrieben (Schedel F, 2014). Sekundär entwickeln sich durch extensives Kratzen oft Exkoriationen, Ulzerationen und hämorrhagische Krusten.

Das Hauptsymptom der PN ist das von den Knoten ausgehende Hautjucken, welches in der Stärke den Alltag und v.a. den Schlaf der Patienten stark beeinträchtigen kann. Durch das Kratzen imponieren die Knoten oft krustig oder blutig. Offene Hautläsionen können sich mit Bakterien superinfizieren. Nach Abheilung bleiben häufig Narben.

Diskutiert wird heutzutage, ob es sich bei der PN anstelle einer eigenen Entität um eine sekundäre Veränderung als kratzinduzierte Reaktion handelt (Eigelshoven, 2009) und als klinisches Bild eines chronischen Pruritus gesehen werden kann (Vaidya and Schwartz, 2008). Andere Autoren unterscheiden zwischen zwei Typen der PN: die Atopie-assoziierte PN (auch „early-onset atopic“), die 50 % der Patienten betrifft und meist bei jüngeren Patienten (Durchschnittsalter der Erstmanifestation: 19 Jahre) auftritt und die nicht-atopische PN (auch „late-onset non-atopic“), die v.a. bei älteren Patienten (Durchschnittsalter der Erstmanifestation: 48 Jahre) vorkommt und nicht im Zusammenhang mit Umweltallergenen steht (Tanaka et al., 1995, Zeidler et al., 2018, Eigelshoven, 2009).

Die Diagnose wird klinisch gestellt (Accioly-Filho et al., 2000). Zur Absicherung können Hautbiopsien entnommen und untersucht werden. Wichtig bei der Diagnostik ist die umfangreiche Abklärung der möglichen Ursachen.

1.3.3 Ätiopathogenese der Prurigo Nodularis

Die zugrunde liegende Pathophysiologie der Prurigo Nodularis (PN) ist weitgehend unbekannt (Accioly-Filho et al., 2000). Nach heutigem Verständnis entsteht die PN durch eine Kaskade, die durch massiven Juckreiz ausgelöst wird. Es kommt in Folge durch das Kratzen zum klinischen Erscheinungsbild der PN, indem es zu Rekrutierung von Immunzellen, wie z.B. Lymphozyten kommt ebenso zur Proliferation der Keratinozyten und zu einer reaktiven Vermehrung von kollagenem Bindegewebe sowie Aktivierung von peripheren sensorischen Neuronen

(Eigelshoven, 2009, Vaidya and Schwartz, 2008). Es gibt mehrere Ansätze, um die genaueren Ursachen der Erkrankung zu erklären, auf welche im Folgenden eingegangen wird. Genetische Faktoren sind bis heute nicht bekannt.

1.3.3.1 Die Rolle der epidermalen Barriere

Die Untersuchungen von Patienten mit PN zeigen Auffälligkeiten in der Histologie der läsionalen Haut, was Einfluss auf die epidermale Barriere hat. Beschrieben wurden Hyperkeratosen, Akanthose, fokale Parakeratose, Hypergranulose und vermehrte Infiltrate mit Lymphozyten und Makrophagen an betroffenen Hautläsionen sowie Papillomatosen und unregelmäßige Proliferation der Epidermis (Wong and MacDonald, 1982, Jorizzo et al., 1981, Weigelt et al., 2010). Auf einen Differenzierungsdefekt als Ursache der PN schließen Juhlin et al.. Die Arbeitsgruppe zeigt, dass Keratinozyten betroffener Hautareale bei PN-Patienten weniger Loricrin exprimieren und somit weniger differenziert sind (Juhlin et al., 1992).

1.3.3.2 Die Rolle des Immunsystems

In der Dermis von PN-Läsionen wurden spezifische Infiltrate von Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen, DCs und Eosinophilen beschrieben (Wong and MacDonald, 1982, Jorizzo et al., 1981, Weigelt et al., 2010, Eigelshoven, 2009). Wie es ursächlich zu diesen Infiltraten kommt, ist noch nicht geklärt. Möglicherweise führen entzündungsfördernde Zytokine wie IL-1 und TNF- α , die nach mechanischem Kratzreiz ausgeschüttet werden, zur kaskadenartigen Aktivierung weiterer Zytokine aus Keratinozyten und Zellen des Immunsystems (Eigelshoven, 2009). Bei der PN spielen, wie bei der AD, die TH-2-Zellen eine entscheidende Rolle (Fukushi et al., 2011).

Wie schon in Kapitel 1.2.4.3 beschrieben, spielt IL-31 eine Rolle bei der Entstehung von Juckreiz. Es konnte gezeigt werden, dass in der Haut von Patienten mit PN, verglichen mit der Atopischen Dermatitis (AD) eine höhere IL-31 Expression vorliegt, was den massiven Juckreiz dieser Erkrankung erklärt. Im Vergleich zum Hautgesunden liegt bei der PN sogar eine 50fache Erhöhung der IL-31 Expression vor (Sunkoly et al., 2006). Da auch bakterielle Superantigene, wie in Kapitel 1.2.4.4 beschrieben, zur Aktivierung von IL-31 führen können, ist die Analyse des Hautmikrobioms bei PN ein interessanter Ansatz.

1.3.3.3 Die Rolle der neuronalen Dysregulation

Untersuchungen der Nervenfasern der Haut an läsionalen Stellen der PN ergaben eine erhöhte Expression von Substanz P und Calcitonin-gene-related protein (CGRP). Als starke Histaminfreisetzer können sie beide direkt oder indirekt zu starkem Juckreiz der Haut führen und im Zusammenhang mit neurogenen Entzündungen, allergischen und entzündlichen Hautprozessen stehen (Vaalasti et al., 1989). In weiteren Veröffentlichungen wird eine erhöhte Anzahl an Nerven, gemessen über das S-100 Protein, in der Dermis von PN-Patienten beschrieben. Auch dieser Befund führt zur Annahme, dass die Erkrankung eine neurokutane Komponente hat (Harris et al., 1992). Weitere Studien zeigen Zusammenhänge zwischen der PN und Neuropathien (Schuhknecht et al., 2011). Dies würde das gute Ansprechen auf Gabapentin bei einigen PN-Patienten erklären (Dereli et al., 2008, Gencoglan et al., 2010).

1.3.4 Therapie der Prurigo Nodularis

Aufgrund der hohen Refraktärität der Therapie ist die Behandlung der Prurigo Nodularis (PN) aufwendig. Die Therapie ist bis heute unspezifisch und die Erkrankung kann nicht geheilt werden. Patienten werden aufgeklärt, möglichst nicht an den betroffenen Stellen zu kratzen und zu reiben, um eine Verstärkung des Juckreizes und Infektionen zu verhindern. Da die Ursache der PN kaum erforscht ist, wird meist ein multimodales Therapiekonzept angewendet und es bedarf einer engmaschigen Betreuung des Patienten. Es fehlen randomisierte klinische Studien zur leitliniengerechten Behandlung von PN. Viele Medikamente werden deshalb Off-Label verschrieben (Eigelshoven, 2009).

Um die Entzündung zu reduzieren, kommen bei der PN medikamentös häufig topische Kortikosteroide zum Einsatz. Auch orale Antihistaminika können den Juckreiz zu mindern. Eine weitere unspezifische Therapieoption ist topisches Capsaicin. Klinisch eingesetzt wird auch die Therapie mit UV-Licht oder die Kryotherapie. Diese Therapieansätze können die Anzahl der Knoten vermindern und das Auftreten neuer Knoten und somit den Juckreiz reduzieren. In schweren Fällen kommen systemische Therapien in Frage. Verabreicht werden z.B. Trizyklische Antidepressiva, Antikonvulsiva bei neuropathischen Schmerzen und Juckreiz oder

Naltrexon. Immunsuppressiv wirken systemische Kortikosteroide, Ciclosporin und Azathioprin. Thalidomid wird nur unter strenger Indikation verabreicht, da es embryotoxisch ist. Eine Verkleinerung der Knoten wird auch durch systemische Retinoide wie Acitretin oder Isotretinoin erzielt. Bei Superinfektionen der Haut kommen Antibiotika zum Einsatz. Studien zeigen zudem die antipuritische Wirksamkeit von Aprepitant, das als Neurokinin-1-Rezeptor Antagonist die Bindung von Substanz P an den genannten Rezeptor blockiert (Lotts and Stander, 2014). Aktuelle Studien zeigen Erfolge bei der Behandlung des Juckreizes mit Dupilumab, einem Antikörper gegen den IL-4 Rezeptor (Tanis et al., 2019). Neue Ansatzpunkte für eine spezifische Therapie sind das langfristige Ziel dieser Doktorarbeit.

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Mit einer Prävalenz von 10-20 % der Kinder und 2-10 % der Erwachsenen ist die Atopische Dermatitis (AD) eine häufige Hauterkrankung (Illi et al., 2004, Worm et al., 2006). Sie gehört zum Formenkreis der atopischen Erkrankungen, welche als multifaktorielle Erkrankung durch komplexe Wechselwirkungen zwischen Umwelt und Organismus charakterisiert sind (Leung and Bieber, 2003). Es gibt verschiedene klinische Manifestationen der AD wie z.B. die klassische AD und die AD-assoziierte Prurigo Nodularis (PN). Allen gemeinsam ist ein starker Pruritus, der die Lebensqualität der Patienten stark einschränkt (Beltrani, 1999a).

Das klinische Bild der Prurigo Nodularis (PN) äußert sich durch stark juckende Knoten und Papeln der Haut, hauptsächlich an den Streckseiten der Extremitäten (Accioly-Filho et al., 2000). Neben dem Zusammenhang mit der AD wird die PN auch mit anderen Erkrankungen assoziiert beschrieben (Iijima, 1951, Payne et al., 1985b, McKenzie et al., 1976, Suarez et al., 1984, Fina et al., 1991, Berger et al., 1995). Die Ursachen, Zusammenhänge und Unterschiede zwischen der klassischen AD, der atopischen PN und der nicht-atopischen PN sind weitgehend unbekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, anamnestische, klinische, physikalische, immunologische, bakteriologische und molekulargenetische Charakteristika der beiden Erscheinungsformen der AD und der nicht-atopischen PN herauszuarbeiten. Hierfür wurden neben einer detaillierten Anamnese die dermatologische Untersuchung des Hautstatus, physikalische Hautmessungen (Hydratation, Transepidermaler Wasserverlust), immunologische Untersuchungen des Blutes, histologische und

immunhistochemische Untersuchungen von Hautbiopsien, Untersuchungen des Mikrobioms (kutan, Stuhl) und Mutationsanalysen (*Filaggrin*) vorgenommen.

Als Pilotstudie sollten in dieser Arbeit neue Erkenntnisse gewonnen werden, die ein spezifischeres Therapiekonzept, das an die Pathogenese der Erkrankung angepasst ist, zulässt.

II. Material und Methoden

2.1 Studie

2.1.1 Studiendesign

Bei der durchgeführten Pilotstudie handelt es sich sowohl um eine prospektive, nicht interventionelle klinische Studie, welche im Zeitraum Oktober 2014 bis August 2017 in der Neurodermitis-Ambulanz der Universitätshautklinik Kiel stattfand. Für die Studie wurden die Patienten und hautgesunden Kontrollen jeweils einmal in der Ambulanz vorstellig.

2.1.2 Studienpopulation

Die Studienpopulation umfasste neun Patienten mit klassischer Atopischer Dermatitis (AD) (78 % weibliche Studienteilnehmer, Alter-Mittelwert: 33 Jahre), neun Patienten mit nicht-atopischer Prurigo Nodularis (PN) (67 % weibliche Studienteilnehmer, Alter-Mittelwert: 51 Jahre), sieben Patienten mit atopischer Prurigo Nodularis (APN) (71 % weibliche Studienteilnehmer, Alter-Mittelwert: 40 Jahre) und 10 hautgesunde Kontrollen (60 % weibliche Studienteilnehmer, Alter-Mittelwert: 27 Jahre). Die Patienten wurden über Aushänge in der Universitätsklinik Kiel, über die ambulante Sprechstunde und stationäre Behandlung der Universitätshautklinik Kiel rekrutiert. Die Altersspanne der weiblichen und männlichen Studienteilnehmer/-innen lag zwischen 18 und 60 Jahren. Finanziell wurde die Teilnahme an der Studie mit 50 Euro Aufwandsentschädigung vergütet.

2.1.3 Studienablauf

2.1.3.1 Einverständniserklärung, Aufklärung und Vorbereitung

Nachdem der Antrag der Studie durch die Ethikkommission bewilligt wurde, wurden die Patienten rekrutiert und kontaktiert. Die Patienten wurden ausführlich aufgeklärt und unterzeichneten jeweils zwei Exemplare der Einverständniserklärung, ein Exemplar für die Unterlagen der Universitätsklinik und eines für den Patienten.

Die Patienten wurden gebeten, Medikation wie Kortikosteroide, Calcineurin-inhibitoren und Antihistaminika mindestens sieben Tage vor der Untersuchung abzusetzen, die Pflegesubstanzen sollten an dem Tag der Vorstellung morgens nicht mehr angewendet werden. Zudem wurden die Patienten gebeten, innerhalb von 24

Stunden vor der Untersuchung und Biopsieentnahme nicht zu duschen. Die Rekrutierung von PN- und APN-Patienten stellte sich schwierig dar. Aus diesem Grund wurden auch Patienten mit systemischer immunsuppressiver Therapie und topischer Glukokortikoidtherapie mit in die Studie aufgenommen.

Den Patienten wurden drei Wochen vor Untersuchungstermin postalisch ein Stuhlproben-Kit mit einem Stuhlröhrchen mit und einem ohne Stabilisator mit detaillierten schriftlichen Hinweisen zur Entnahme der Probe zugesandt. Die Stuhlproben wurden von den Patienten innerhalb 24 Stunden vor Untersuchungstermin entnommen und zum Termin mitgebracht. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.1.3.2 Anamnese und klinische Beurteilung

Am Untersuchungstermin wurde eine umfangreiche Anamnese und klinische Untersuchung einschließlich des Schweregrades der Hauterkrankung (Severity Scoring of Atopic Dermatitis, SCORAD und Objective Component Of SCORAD ,OSCORAD) durchgeführt. Die subjektiven Symptome Juckreiz und Schlaglosigkeit wurden anhand einer visuellen Analogskala (Visual Analog Scale, VAS) erhoben. Das Ausmaß der Hautmanifestation bzw. Hautstatus wurde zudem subjektiv in vier Kategorien eingeordnet: gut/ leicht betroffen/ mittelgradig betroffen/ stark betroffen. Zur Erfassung des Atopie-Status wurde das Vorliegen von allergischer Rhinitis, Allergien, Asthma, die Familienanamnese und anderen Ekzemerkrankungen erfragt. Auch der Zeitpunkt des erstmaligen Auftretens der Hauterkrankung wurde erfasst. Ferner wurden weitere Vor- und Begleiterkrankungen, aktuelle Medikation und Vormedikation der letzten Jahre dokumentiert. Die Anamnese beinhaltete zudem weitere Fragen wie den Kontakt zu Haustieren und Raucheranamnese. Zusätzlich füllten die Patienten standardisierte Fragebögen zur Lebensqualität und zum Thema Ernährung und Verdauung aus, welche die Einnahme von Antibiotika und Probiotika innerhalb der letzten sechs Monate erfasste sowie das Vorhandensein von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Besonderheiten der Ernährung.

2.1.3.3 Probenentnahme und Messungen

Alle Untersuchungen und Probeentnahmen erfolgten jeweils an einer läsionalen und nicht-läsionalen Lokalisation der Haut in möglichst direkter Umgebung. Bei den

hautgesunden Kontrollen wurden die physikalischen Hautuntersuchungen und Entnahme der Hautbiopsie nur an einer Lokalisation vorgenommen. Um eine Standardisierung zu erreichen, wurden die Untersuchungen der Patienten und der Kontrollpersonen an der unteren Extremität vorgenommen. Waren bei den Patienten die Beine nicht betroffen, wurden die Untersuchungen jeweils am Arm oder Rücken durchgeführt. Abbildung 2 zeigt die Untersuchungslokalisierung der vier verschiedenen Gruppen in Prozent, läsional und nicht-läsional.

Zuerst wurden die physikalischen Messungen der Haut-Hydratation und des Transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) vorgenommen. Darauf folgte der mikrobiologische Hautabstrich (Skin Swab). Es wurde für eine transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchung ein Hautabriss durchgeführt, welcher Teil einer assoziierten Dissertation ist. Die Blutentnahme schloss sich an und abschließend wurde in Lokalanästhesie die Hautbiopsie entnommen. Die mitgebrachte Stuhlprobe wurde eingefroren, die Hautprobe für die histologische und immunhistochemische Untersuchung in Formalin fixiert. Details der Weiterverarbeitung werden im Kapitel 2.2 erläutert.

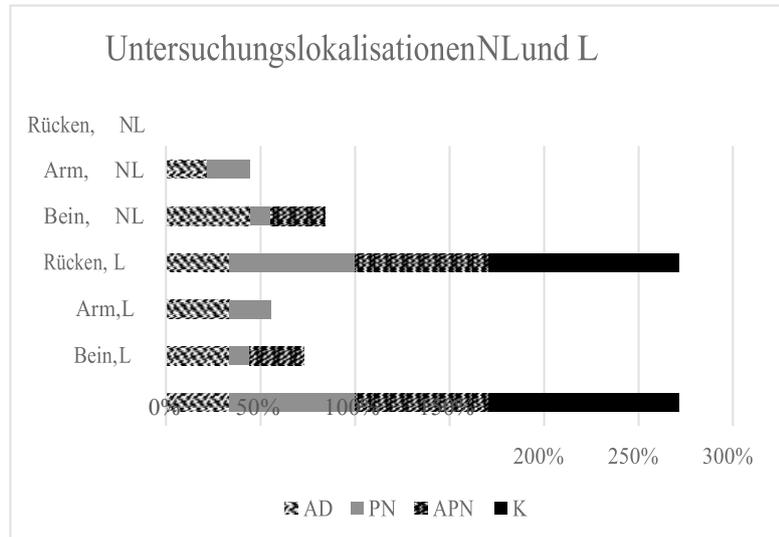


Abbildung 2: Nicht-Läsionale (NL) und Läsionale (L) Untersuchungslokalisierung in % im Vergleich der verschiedenen Gruppen mit AD = Atopische Dermatitis; PN = Prurigo Nodularis; APN = Atopische PN; K= hautgesunde Kontrolle

2.2 Methodik

Chemikalien, Materialien und Antikörper, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, werden im Abschnitt der jeweiligen Methode genannt. Detaillierte Informationen zu den Herstellern und den Zusammensetzungen befinden sich im Anhang.

2.2.1 Klinische Beurteilung

Die klinische Beurteilung des Schweregrad der Atopischen Dermatitis (AD) erfolgte über den Scoring of Atopic Dermatitis (SCORAD). Der SCORAD wird klinisch verwendet, um den Schweregrad und die objektiven Parameter wie Intensität und Ausdehnung und die subjektiven Parameter wie Juckreiz und Schlaflosigkeit zu bestimmen und über eine Formel zu berechnen (Fölster-Holst, 2011). Auch die Prurigo Nodularis (PN) wurde über diesen Score erfasst, um die Beurteilung zu vereinheitlichen.

Der SCORAD umfasst sechs Merkmale der AD wie das Erythem, die Infiltration, die Krusten, die Kratzartefakte, die Lichenifikation und die Trockenheit nicht befallener Haut. Es werden jeweils Punkte auf einer Skala von null bis drei vergeben (mit null = nicht vorhanden, eins = mild, zwei = moderat, drei = schwer). Subjektive Merkmale wie Schlaflosigkeit und täglicher Juckreiz werden miteinbezogen.

Die Formel zum Berechnen des SCORADS lautet:

$$A/5 + 7B/2 + C$$

A = Ausmaß (0 -100 Punkten)
B = Intensität (0 - 18 Punkten)
C = Subjektive Symptome (0 - 20 Punkten)

Maximal können 103 Punkte erreicht werden.

Der Objective Component Of SCORAD (OSCORAD) umfasst das Ausmaß und die Intensität mit der Formel:

$$A/5 + 7B/2$$

A = Ausmaß (0 -100 Punkten)
B = Intensität (0 - 18 Punkten)

Der maximale Wert des OSCORAD beträgt 83 Punkte.

Zur Gesamtbeurteilung wurde der Anteil der betroffenen Hautoberfläche in % dokumentiert und die subjektive Empfindung von Juckreiz anhand der Visual Analog Scale (VAS) mit 0 = kein Juckreiz bis 10 = maximaler Juckreiz angegeben. Die Beurteilung des SCORADS wurde von Ärzten der Neurodermitis Sprechstunde vorgenommen.

2.2.2 Biophysikalische Messungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die individuelle Barrierefunktion der Epidermis über Messungen der Hydratation der Haut mittels Corneometer® sowie des Transepidermale Wasserverlusts (TEWL) mittels Tewameter® durchgeführt.

2.2.2.1 Das Corneometer®

Die Hydratation der Haut wurde mittels Corneometer® CM 825 (Fa. Courage+Khazaka Electronic GmbH, Köln) gemessen. Die Funktion des Gerätes basiert auf einer kapazitiven Messmethode durch ein dielektrisches Medium. Die Eindringtiefe des Geräts beträgt 10 - 20 µm, also im Bereich des Stratum corneums. Die geringe Tiefe verhindert die Beeinflussung der Werte durch tiefer gelegene Strukturen wie z.B. Blutgefäße. Es werden durch das Corneometer® CM 825 Veränderungen des Wassergehaltes des Stratum corneums durch die Änderung der Dielektrizitätskonstanten detektiert (Fischer et al., 2001).

Die Sonde des Corneometers® umfasst ein Messvolumen von 49 mm². Sie wurde mit leichtem Druck von ca. 1,0 N auf die Haut des Patienten aufgebracht, dadurch wurde ein elektrisches Streufeld erzeugt. Es wurde die Kapazitätsänderung, abhängig vom Wassergehalt des Stratum corneums, bei einer Messfrequenz von ca. 1,0 MHz gemessen.

Die Messgenauigkeit des Corneometer® liegt bei $\pm 3 \%$ (Gebrauchsanweisung Corneometer® CM 825, Fa.Courage und Khazaka, Köln, <http://www.courage-khazaka.de>). Die Einsatzbedingungen des Corneometers® CM 825 liegt bei einer Raumtemperatur von 10 - 40°C und einer Luftfeuchtigkeit von 30 - 70 %. Die Messergebnisse liegen im Bereich von 0 bis 130 und sind als relativer Wert dimensionslos (mit 0 = kein Wasser und 130 = nur Wasser). Die Referenzwerte der Hydratation an verschiedenen Hautlokalisationen unter normalen Raumbedingungen (20°C und 40 - 60 % Luftfeuchtigkeit) sind in Tabelle 3 angegeben. Durch Veränderung der Temperatur und der Raumfeuchtigkeit kann es zu Abweichungen der Messwerte kommen.

Tabelle 3: Referenzwerte der Hydratation unter normalen Raumbedingungen (20°C und 40 - 60 % Luftfeuchtigkeit), dimensionslos, modifiziert aus der Gebrauchsanweisung Corneometer® CM 825 der Fa.Courage+ Khazaka, Köln

	Stirn, T-Zone, Kopfhaut, Wange, Augenlid, Schläfe, Mundwinkel, Oberkörper, Rücken, Hals	Arme, Hand, Ellenbogen, Beine
Sehr trocken	< 75	< 60
Trocken	75 - 85	60 - 75
Ausreichend feucht	> 85	> 75

2.2.2.2 Durchführung der Hydratationsmessung

Die Messungen der Hydratation wurden unter möglichst konstanten Raumbedingungen durchgeführt, um die Vergleichbarkeit der Werte innerhalb der Gruppen zu gewährleisten. Die Raumtemperatur betrug $23 \pm 2^\circ\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit $44 \% \pm 2 \%$. Um möglichst exakte Werte zu erhalten, wurden die Messareale der Patienten unbedeckt für ca. 10 min akklimatisiert. Zudem wurden die Luftbewegungen sowie direkte Wärmestrahlung möglichst minimiert.

Für die Messung wurde die Sonde des Corneometers® senkrecht auf die Haut aufgesetzt und ein leichter Druck für ein bis zwei Sekunden ausgeübt. Es wurden jeweils drei Messungen derselben Hautlokalisation durchgeführt und der jeweilige Mittelwert berechnet.

2.2.2.3 Das Tewameter®

Die Messung des Transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) wurde mit dem Tewameter® TM 210 (Fa. Courage+Khazaka Electronic GmbH, Köln) durchgeführt. Das Prinzip des Tewameter® basiert auf der Messung der Abdunstung der Haut, welche unter physiologischen Bedingungen konstant stattfindet und zu den normalen Stoffwechselprozessen der Haut gehört. Ist die Haut bzw. die epidermale Barriere jedoch beschädigt, kommt es zu einem erhöhten Wasserverlust.

Der Aufbau der Sonde des Tewameters® ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Die Sonde ist ein Hohlzylinder und umfasst zwei Sensorenpaare für

Temperaturmessung und Feuchtigkeitsmessung in einem offenen Hohlzylinder.

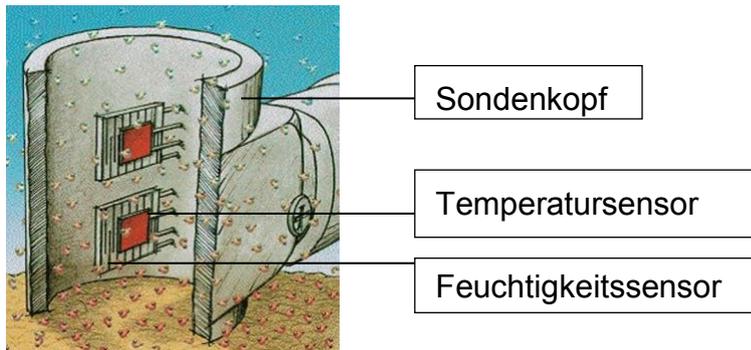


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Sonde des Tewameters® TM 210 mit einem Sensorpaar für Temperatur- und Feuchtigkeitsmessung. Mit freundlicher Genehmigung der Fa. Courage+Khazaka,

Legt man die Sonde auf die Haut auf, so tritt das verdunstete Wasser durch den Hohlzylinder der Sonde. Hierbei wird der Dichtegradient über den Sensoren gemessen und über einen integrierten Mikroprozessor als transepidermalen Wasserverlust angegeben. Die gemessene Wasserabdamprate wird in der Einheit g/h/m^2 angegeben. Das Gerät gibt also an, wie viel Gramm Wasser pro Stunde und Quadratmeter von der Haut abgedunstet wird.

Die Tewameter®-Messkammer hat eine Höhe von 2 cm und ein Durchmesser von 1 cm. Messunsicherheiten durch das Tewameter® ergeben sich laut Gebrauchsanweisungen der Firma bei einer relativen Feuchtigkeit von 30 - 90 % mit $\pm 1,5 \%$ und zwischen 10 - 30 % bzw. 90 - 100 % mit $\pm 2,5 \%$. Bei Messungen des Wasserverlusts liegen die Messunsicherheiten bei $\pm 0,5 \text{ g/h/m}^2$ für $\text{RH} \geq 30 \%$ und $\pm 1,0 \text{ g/h/m}^2$ für relative Luftfeuchtigkeit $\leq 30 \%$.

2.2.2.4 Messung des Transepidermalen Wasserverlustes

Wie schon bei der Messung der Hydratation bei Punkt 2.2.2.2 erwähnt, muss auch die Messung des Transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) unter möglichst konstanten Raumbedingungen durchgeführt werden.

Die Raumtemperatur betrug $23 \pm 1^\circ\text{C}$ bei einer Luftfeuchtigkeit von $44 \pm 2 \%$. Auch bei dieser Messung wurden, um möglichst exakte Werte zu erhalten, die Messareale der Patienten unbedeckt für ca. 10 Minuten akklimatisiert. Minimiert wurden sowohl die Luftbewegungen als auch die Wärmestrahlung.

Für die Messung wurde die Sonde des Corneometers® senkrecht auf die Haut aufgesetzt und ein leichter Druck ausgeübt. Die Messung dauerte an, bis sich ein stabiler Wert darstellte, was im Durchschnitt ein bis zwei Minuten dauerte. Es wurden

jeweils drei Messungen an derselben Stelle durchgeführt und der jeweilige Mittelwert berechnet.

2.2.3 Hautbiopsien

Zur immunologischen und histologischen Untersuchung wurden den Patienten jeweils eine läsionale und nicht-läsionale Hautprobe mittels Stanzbiopsie mit einer 5mm-Einweg-Stanze entnommen. Verwendet wurden Hautbiopsie-Sets mit steril verpackten Utensilien inklusive Schere, Pinzette, Tupfer, Nadelhalter und Nahtmaterial. Der entnommene Hautzylinder reichte bis in die Subkutis.

Zur Probeentnahme wurde die Haut vorerst mit Octenisept® desinfiziert und die Einwirkzeit von 60 Sekunden abgewartet. Im Anschluss wurde die zu biopsierende Hautstelle mit ca. 0,5 ml des Lokalanästhetikums Xylonest® 1 % (Prilocain mit Adrenalin 1: 200 000) mit einer Nadel unterspritzt. Die Wirkung der Lokalanästhesie wurde überprüft und nach erfolgreicher Anästhesie wurde eine Hautprobe unter sterilen Bedingungen mittels der Hautbiopsie-Stanze aus der Zielläsion entnommen. Die Läsion wurde mit einer Einzelknopfnah mit Ethicon®-Nahtmaterial der Stärke 4 genäht.

Nach der Entnahme wurde die Biopsie zweigeteilt und die Hälften mit einer Pinzette vorsichtig, ohne sie zu quetschen, in jeweils einem beschrifteten 1,5 ml Eppendorf Röhrchen in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Die genähte Läsion wurde mit einem sterilen Leukomed®-Wundverband abgedeckt. Die Patienten wurden aufgeklärt, sich zur Wundkontrolle und Fadenentfernung in 8- 10 Tagen bei Ihrem Hausarzt vorzustellen und sich bei auftretenden Komplikationen umgehend in der Universitätshautklinik Kiel zu melden.

2.2.4 Blutentnahme

Zur Untersuchung verschiedener Parameter im Blut wurde bei den Patienten eine Blutentnahme durchgeführt. Hierfür wurde der Arm des Patienten mit einem Staugurt gestaut und eine geeignete Vene gewählt. An der Entnahmestelle wurde die Haut mit Octenisept® desinfiziert und die Einwirkzeit von 60 Sekunden abgewartet. Mit einem Safety-Multifly® 21G wurde die Vene punktiert und Blut entnommen.

Abhängig von der Zieluntersuchung wurden für die Untersuchung der *Filaggrin*-Mutation und Zytokin-Messung je ein EDTA-Röhrchen und für die IgE-Messung ein

Heparin-Röhrchen abgenommen. Für die Messung der Zytokine und des IgEs wurde das Blut nach Abnahme für jeweils 4300 rpm für 10 min in der Zentrifuge Labofuge®200 (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) zentrifugiert und das Serum in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.5 Filaggrin-Gen-Mutationsanalyse

Die Analyse der *Filaggrin*-Mutationen R2447, S3247, R501 und S2282del4 erfolgte in der Abteilung von Prof. Weidinger aus der DNA von Patienten-Blut über das TaqMan® Verfahren (Applied Biosystems, Foster City, USA), welches mittels Polymerase Chain Reaction (PCR). Die Genotypisierung über das TaqMan® Verfahren misst Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) in Individuen, indem es bestimmte SNP-Allele in aufgereinigter Patienten-DNA vervielfältigt und detektiert. Die DNA musste hierfür zuerst aus dem EDTA-Blut extrahiert und anschließend quantifiziert und analysiert werden. Folgende Schritte werden für die genannten Verfahren durchlaufen:

1. DNA-Extraktion aus EDTA-Blut
2. DNA-Verdünnung
3. PCR nach TaqMan® Verfahren

Die genaue Durchführung des Verfahrens ist im Anhang dargestellt.

2.2.6 Immunhistochemie

Die Expression von Filaggrin auf Ebene der Epidermis wurde mittels Immunhistochemie semiquantitativ untersucht. Auch Komponenten des Immunsystems wie IL-4, IL-13 und der IL-31 Rezeptor (IL-13R), Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) und die Mast Cell Tryptase (MCT) wurden immunhistochemisch untersucht und im Hautschnitt dargestellt.

Die Grundlage der immunhistologischen Färbungen ist die spezifische Reaktion zwischen einem Antigen, z.B. einem Protein auf der Zelloberfläche, mit einem Antikörper. Mittels Immunhistochemie können Proteine lokalisiert und im Gewebe

detektiert werden.

Die Färbungen wurden im Rahmen dieser Arbeit an histologischen Schnitten der Haut durchgeführt. Dafür wurden Hautstanzen fixiert, dünne Schnitte hergestellt und anschließend mithilfe von Antikörpern spezifisch gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Für die in dieser Arbeit durchgeführte immunhistochemische Färbung wurde die sogenannte Labelled-Streptavidin-Biotin (LSAB)-Methode benutzt, die schematisch in Abbildung 5 dargestellt ist.

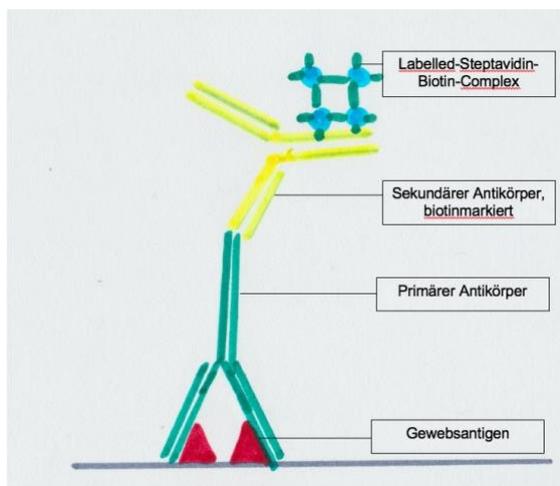


Abbildung 5: Schematisches Prinzip der Labelled-Streptavidin-Biotin (LSAB)-Methode modifiziert nach Fa.Agilent, Santa Clara, USA aus Education Guide Pathology – Immunohistochemical Staining Methods

Für die LSAB-Methode werden mono- oder polygonale Primär-Antikörper gewählt, die das gesuchte Antigen, z.B. Filaggrin, spezifisch binden. Der Sekundär-Antikörper, auch Brückenantikörper genannt, ist an das Vitamin Biotin gekoppelt und bindet den Primär-Antikörper. Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* bindet Biotin wiederum mit hoher Affinität und besitzen jeweils vier Biotin-Bindungsstellen. Der Labelled-Streptavidin-Biotin Komplex ist an eine Peroxidase konjugiert. Durch Zugabe eines Chromogens kann die gesuchte Struktur durch Spaltung durch das Enzym Peroxidase farbig dargestellt werden. Somit ist durch das Farbsignal das gesuchte Antigen lokalisierbar.

Damit dieses Farbsignal spezifisch für das Antigen ist, werden die physiologisch im Gewebe vorhandenen Peroxidasen vor der Färbung blockiert. Zudem wird die unspezifische Bindung der Antikörper an geladenes Kollagen und andere geladene nicht-spezifische Bestandteile der Haut durch Normalserum blockiert. Das Normalserum wird vom gleichen Tier gewählt, von dem der Sekundär-Antikörper stammt, damit letzterer nicht an Inhalte des Normalserums bindet. Im Rahmen dieser Arbeit stammt es vom Hasen oder Schwein. Unter dem Lichtmikroskop lässt sich die

Intensität des Farbumschlags beurteilen, welcher mit der quantitativen Expression des Proteins korreliert.

2.2.6.1 Fixierung und Einbettung

Zur Fixierung des Gewebes wurde es in 4%igem Formalin fixiert und durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Anschließend wurden die Präparate mithilfe des Gewebeinfiltrationsautomaten ASP300 S (Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) in Paraffinblöcken eingebettet. Mit dem Mikrotom Microm® HM355 (Thermo Fisher scientific, Waltham, USA) wurden 5 µm Gewebsschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger SuperFrost® Plus aufgebracht und über Nacht bei 37°C getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Die detaillierten De- und Rehydrierungsprotokoll sind im Anhang zu finden.

2.2.6.2 Färbung

Im ersten Schritt der Färbung wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung durchgeführt. Für die HE-Färbung wurden die Schnitte für 6 min mit dem Farbstoff Shandon Gill III Hematoxylin inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 10 sek mit Eisessigwasser (5 ml Eisessig mit 1000 ml Aqua dest.) gewaschen. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte für 1 min in Eosinalkohol (1 g Eosin in 1000 ml 96%igem Alkohol und 10 ml Eisessig) inkubiert. Danach wurden sie für je 8 sek 1x in 70%igem Alkohol, 2x in 96%igem Alkohol, 3x in 100 % Alkohol, 2 x in 1:1 Alkohol-Xylol und 5x in Xylol inkubiert. Am Ende wurden die Schnitte mit Eukitt® eingedeckt. Im zweiten Schritt erfolgte die immunhistochemische Färbung. Hierfür wurden die Schnitte 5 min mit 3%igem Wasserstoffperoxid inkubiert, um die endogene Peroxidase im Gewebe zu blockieren. Um durch den Schritt eventuell denaturierte Proteine wieder in ihre physiologische Raumstruktur zu bringen, der sogenannten Antigen-Demaskierung, wurden die Schnitte für je 25 min bei 90°C im Dampfgerar Multiquick Food Steamer FS 20 (Fa. Braun, Frankfurt, Deutschland) in 10 mM Citratpuffer bei pH 6,0 gekocht und dann für 45 min im Puffer abgekühlt. Die Zusammensetzung des Citratpuffers ist im Anhang zu finden. Es folgte die Spülung mit Aqua dest. und eine Inkubation von 5 min in TBS-Puffer (Zusammensetzung im Anhang).

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde das Gewebe mit Tierserum inkubiert. Für die Färbung mit dem monoklonalen Anti-Mast Cell Tryptase (MCT)-Antikörper wurde das Gewebe zuvor mit Hasennormalserum (Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) in 1:5 Verdünnung mit TBS für 30 min vorbehandelt. Die Färbungen der Anti-Filaggrin-, Anti-IL-4-, Anti-IL-13-, Anti-IL-31-R-, Anti-Thymic Stromal Lymphopietin (TSLP)-Antikörper wurden mit Schweinnormalserum (Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) in 1:20 Verdünnung mit TBS für 30 min inkubiert.

Es folgte die Inkubation mit Primär-Antikörpern für 60 min bei Raumtemperatur bzw. für IL-4 und IL-13 bei 4°C über Nacht. Details bezüglich der Primär-Antikörper sind im Anhang zu finden. Nach der Inkubation wurden die Schnitte 3x für 5 min mit TBS gespült.

Die Schnitte wurden dann mit einem biotinylierten Sekundär-Antikörper für jeweils 30 min inkubiert. Details der Sekundär-Antikörper sind im Anhang zu finden. Die Schnitte wurden anschließend 3x für je 5 min mit TBS gespült. Für die Gewebsschnitte, die mit Anti-Mast Cell Tryptase (AA1)-Antikörper behandelt wurden, wurde der biotinylierte Hasen-anti-Maus-Antikörper (1:250 Verdünnung mit TBS) gewählt. Für die restlichen Färbungen wurde der biotinylierte Schwein-Anti-Hasen-Antikörper (1:600 Verdünnung mit TBS) verwendet.

Danach erfolgte die 30minütige Inkubation mit dem LSAB, welcher aus 50 µl Lösung A mit Streptavidin (Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) und 50 µl Lösung B mit Horseradish-Peroxidase (HRP) in TBS (Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) hergestellt wurde. Nach erneutem Spülen mit TBS wurden die Schnitte für 10 min mit 100 µl Peroxidase-Substrat-Lösung (Fa. BioGenex, Duiven, Niederlande) inkubiert, welche das Chromogen DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) beinhaltet. Nach Spülung mit Aqua dest. folgte eine unspezifische Färbung der Zellkerne mit der Mayer's Hämalaun-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) für 10 sek und anschließendem Waschen mit Aqua dest. und Leitungswasser für 10 min. Zuletzt wurden die gefärbten Gewebsschnitte mit Glycergel® Mounting Medium (Fa. Dako, Hamburg, Deutschland) eingedeckt.

2.2.6.3 Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte am Lichtmikroskop Axioskop 40 (Fa. Zeiss, Jena, Deutschland) in 400-facher Vergrößerung. Die Expression der verschiedenen Proteine und Botenstoffe wurde mithilfe folgender Einteilung

deskriptiv und semiquantitativ bewertet: Grad 0 = normale Signalstärke, Grad 1 = leichte Signalstärke, Grad 2 = mittlere Signalstärke und Grad 3 = starke Signalstärke.

2.2.7 Zytokinbestimmung im Blut

Die Zytokinbestimmung aus EDTA-Serum wurde mit dem Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Hierfür wurden speziell dafür vorgesehene mit spezifischem Antikörper beschichtete 96er Platten (Microwell Plate coated, Fa. Affymetrix, Santa Clara, USA) mit einem speziellen Kit der Firma Affymetrix, Santa Clara, USA verwendet. Alle verwendeten Reagenzien sind im Anhang aufgelistet. Die spezifischen Antikörper der Platten richteten sich jeweils gegen das gesuchte Molekül bzw. Antigen, nämlich TNF- α , IL-4, IL-5 und IL-31. Sie binden die jeweiligen Moleküle im Blut bei Zugabe der Patientenprobe und die überschüssigen nicht-gebundenen Bestandteile werden durch mehrere Waschschriffe entfernt. Dann wird die Platte mit einem zweiten Biotin-konjugierter Antikörper inkubiert, der ebenfalls an das gesuchte Molekül bindet. Nach einem weiteren Waschschriff wird die Platte mit Streptavidin-HRP (Affymetrix, Santa Clara, USA) inkubiert, welcher wiederum an den Biotin-konjugierter Antikörper bindet. Nach Zugabe von einem Substrat, das durch das HRP zu einem Farbsignal führt, kann ein Lichtsignal gemessen werden, das proportional zu dem gebundenen gesuchten Antigen ist. Die Reaktion wird durch eine Stopp-Lösung beendet und die photometrische Absorption bei 450 nm gemessen.

Zur Durchführung der Messung wurden die Antikörper-beschichteten 96er Microwell Platten 2x mit dem Waschpuffer für je 15 sek gewaschen. Im nächsten Schriff wurde eine Verdünnungsreihe des vorgefertigten Human-Standard-IL-4, -IL-5, -IL-31 und -TNF- α hergestellt auf 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml und 7,8 pg/ml. Jede Microwell wurde jeweils mit 100 μ l der jeweiligen Verdünnung bestückt. Die Zusammensetzung des genauen Pipettierschemas der verschiedenen Zytokine und Kontrollen ist im Anhang dargestellt. Zur internen Kontrolle und Kalibration wurden Human-Standard-Verdünnungen auf jeweils zwei Microwells aufgetragen. Als Negativkontrollen wurden Testpuffer, Kalibratorpuffer und/ oder Probenverdünner in zwei Microwells pipettiert. Für die Messung der Proben wurden je 50 μ l des Testpuffers bzw. Probenverdünner in die jeweiligen Microwells vorgelegt und je 50 μ l der Patientenproben dazu pipettiert.

Zu allen bestückten Microwells wurde im Anschluss je 50 µl des entsprechenden monoklonalen Biotin-konjugierten Anti-Mensch-Antikörper gegen IL-4, IL-5, IL-31 bzw. TNF- α gegeben. Die Platten wurden dann mit einer Folie abgedeckt und für 2 Stunden bei einer Raumtemperatur von 21°C inkubiert. Danach wurde 100 µl des Streptavidin-HRP in alle bestückten Microwells pipettiert und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Microwells mit Waschpuffer 3x gewaschen und 100 µl der Substrat-Lösung mit Tetramethyl-Benzidine (TMB) dazugegeben und 10 min bei Raumtemperatur damit inkubiert. Hierbei wurde direkte Sonneneinstrahlung vermieden. Unverzüglich im Anschluss wurde die Farbreaktion durch 100 µl der Stopp-Lösung beendet und die optische Dichte (OD) direkt im Anschluss photometrisch mit dem Photometer Freedom EVO® (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 450nm gemessen. Anhand der mitgelaufenen Verdünnungsreihe mit entsprechenden vorgefertigten Zytokin-Human-Standards mit bekannter Konzentration konnte die Zytokin-Konzentration der Proben aus der OD-Messung berechnet werden.

2.2.8 IgE- Messung

Die IgE-Messungen wurden mit Heparin-Blut der Studienteilnehmer durchgeführt. Für die Messung der IgE-Konzentration im Blut wurden sogenannte ImmunoCAPs eingesetzt. Die verwendeten ImmunoCAPs und Reagenzien der Firma Thermo Fisher scientific, Waltham, USA sind im Anhang aufgelistet.

Das Prinzip der Messung basiert auf spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen. Die ImmunoCAPs sind Zellulosederivate aus hydrophilen Polymerträgern mit kovalent gebundenen Antigenen oder Antikörpern. Im Falle der Gesamt-IgE-Messung sind an die ImmunoCAPs Anti-IgE-Antikörper gebunden, die alle IgEs aus dem Serum binden. Der Radio-Allergo-Sorbent-Test (RAST) ist eine laborchemische Methode zum Nachweis von spezifischem IgE gegen verschiedene Allergene. Bei der Messung von nutritiven und inhalativen IgEs sind dementsprechend spezifische Anti-IgE-nutritiv-Antikörper bzw. Anti-IgE-inhalativ-Antikörper an die ImmunoCaps gebunden. Nach der Inkubation mit dem Serum und der spezifischen Bindung wird das restliche Serum mit ungebundenen Bestandteilen herausgewaschen. Im darauffolgenden Schritt wird ein Enzym-markierter Antikörper gegen IgE, auch Konjugat genannt, verwendet. Er bindet den IgE-Antikörper, der ungebundene Anteil

wird in einem Waschschrift entfernt. Bei Zugabe der Entwicklungslösung wird durch das Enzym des Konjugats ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur IgE-Konzentration der Serumprobe. Durch zuvor durchgeführte Kalibrierungen kann das Fluoreszenzsignal dann in die IgE-Konzentration umgewandelt werden. Der Messbereich für Gesamt-IgE in unverdünntem Serum liegt bei 2 - 5000 kU/l und für spezifisches IgE bei 0 - 100 kU/l. Sollte die IgE-Konzentration außerhalb des Messbereichs liegen, kann die Messung nach Verdünnung wiederholt werden.

Die Messung des IgE wurde vollautomatisiert mit dem Gerät Phadia®250-Gerät (Thermo Fisher scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Hierfür wurde das Gerät mit den Serum-Proben bestückt und ImmunoCAPs und Reagenzien (Konjugat Kalibrator, Negativkontrollen, Verdünnungslösung, Waschlösung, Aqua dest., Stopplösung und Entwicklerlösung) der Firma Thermo Fisher scientific dazugegeben, welche im Anhang aufgelistet sind.

Das Gerät führte nach vorgeschalteter Kalibrierung folgende Schritte durch: Zuerst wurden die ImmunoCAPs gewaschen, dann 40 µl Serum-Probe hinzu pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die ImmunoCAPs gewaschen und 50 µl des Konjugats dazu pipettiert und erneut bei 37°C für 24 min inkubiert. Nach dreifachem Waschen und Inkubation in 50 µl Entwicklungslösung in der Entwicklungskammer für 9 min bei 37°C wurde die Stopplösung zugefügt und es folgte die Fluoreszenzmessung und Auswertung der Ergebnisse bzw. Berechnung des Gesamt-IgEs und spezifischen IgEs.

2.2.9 Mikrobiom-Sequenzierung

Die Mikrobiom-Sequenzierung aus Stuhl und Haut erfolgte in mehreren Schritten. Zuerst wurden die Bakterien aus den Proben extrahiert. Danach wurde die DNA über eine PCR vervielfältigt und die PCR-Produkte anschließend normalisiert und aufgereinigt. Über das Next Generation Sequencing wurde das Mikrobiom der Haut- und Stuhlproben anschließend sequenziert. Die genauen Schritte sind im Folgenden dargestellt.

2.2.9.1 Isolation der bakteriellen DNA aus Stuhlproben

Für die Extraktion der bakteriellen DNA aus dem Stuhl wurden die Stuhlproben, die

bei -80°C gelagert waren, aufgetaut und die DNA mit dem QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die Reagenzien sind im Anhang aufgeführt.

Um die bakteriellen Zellen im ersten Schritt zu lysieren, wurde je 200 mg der Stuhlprobe in ein 0,70 mm Garnet Bead Röhrchen (Dianova, Hamburg, Germany) mit 1,1 ml ASL-Puffer gegeben und im Gerät SpeedMill PLUS (Analytik Jena, Jena, Germany) für 45 sek bei 50 Hz durchmischt und dann für 5 min auf den Heizblock bei 95°C gestellt. Die Proben wurden in der Zentrifuge Rotana 460 (Hettich, Bäch, Schweiz) bei 15 000 U/min für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf zwei 2 ml Eppendorf Röhrchen mit je 600 µl aufgeteilt und eine Tablette des InhibitEX Puffers (Qiagen, Hilden, Deutschland) pro Röhrchen beigesetzt und für 2 min gevortext. Dieser Puffer dient der Inaktivierung von Enzymen und anderen Proteinen, welche die DNA denaturieren oder die folgende PCR inhibieren. Die Proben wurden dann 2 min bei 15 000 U/min zentrifugiert. 350 µl des Überstands wurden in die vorbereiteten 1,5 ml Röhrchen mit je 15 µl der Proteinase K und 200 µl des AL Puffers pipettiert, für 15 sek gevortext und für 10 min bei 70°C inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl von 96%igem Alkohol zu dem Lysat zugefügt und gevortext. Das Lysat wurde vorsichtig auf ein QIAamp Spin Column pipettiert und auf ein 2 ml Sammelröhrchen gesteckt und für 1 min zentrifugiert. Die DNA bindet in diesem Schritt an die Membran des Spin Columns und das Sammelröhrchen wurde verworfen. Zum Waschen in zwei Schritten wurde das Spin Column auf ein neues Sammelröhrchen gesteckt und 500 µl AW1 Puffer dazu pipettiert und erneut bei 1 min zentrifugiert. Das Sammelröhrchen wurde verworfen und das Spin Column auf ein neues Sammelröhrchen gesteckt. Für den zweiten Waschschrift wurden 500 µl des AW2 Puffer dazu pipettiert und erneut für 3 min zentrifugiert und das Sammelröhrchen verworfen. Für die Elution wurde das Spin Column dann in ein 1,5 ml Röhrchen gesteckt und 200 µl AE Puffer direkt auf die Membran pipettiert, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 1 min zentrifugiert. Die DNA Konzentration betrug zwischen 10 und 40 µg pro Probe. Die Proben wurden dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.9.2 Isolation der bakteriellen DNA aus Hautabstrichen

Die Isolation der mikrobiellen DNA aus den Hautabstrichen wurde mit der MoYsis™ Complete5 Technik (Fa. Molzym, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Alle

Reagenzien, die im MoLYsis™Complete5 enthalten waren, sind im Anhang aufgeführt. Zudem ist im Anhang eine Tabelle mit Bakterien aufgeführt, die durch die MoLYsis™Complete5 Technik analysierbar sind.

Für die Isolation wurden die Haut Swabs zuerst in je 1 ml Extraktions-Puffers SU gelöst und in ein steriles 50 ml Röhrchen pipettiert. Es wurden danach 2 ml des Extraktions-Puffers CM dazugegeben, für 15 sek gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Schritt wurden die humanen Zellen lysiert. Anschließend wurden 2 ml des Extraktions-Puffers DB1 und 10 µl MoIDNase B zum Lysat gegeben, für 15 sek gevortext und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei wurde die freigesetzte humane DNA abgebaut. Das Röhrchen wurde für 10 min in der Zentrifuge Rotana 460 (Hettich, Bäch, Schweiz) zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Sediment wurde in 1 ml Extraktions-Puffers RS resuspendiert und gevortext, bis sich das Pellet wieder vollkommen aufgelöst hatte. Die Suspension wurde mit einer sterilen Pipette in ein steriles 2,0 ml Röhrchen übertragen und erneut für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Durch diesen Waschschrift wurden die Reagenzien aus der Suspension gewaschen. Das Pellet besteht aus Zelltrümmern und mikrobiellen Zellen. Im nächsten Schritt wurde die Probe mit 80 µl des Extraktions-Puffers RL gevortext und dadurch das Pellet wieder aufgelöst. Darauffolgend wurden die Zellwände der gram-positiven Bakterien abgebaut. Dies erfolgte durch die Zugabe von 20 µl BugLysis Lösung und 1,4 µl β-Mercaptoethanol, die 15 sek gevortexen und im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 37°C und 1000 rpm inkubiert wurden. Um die Zellwand der gram-negativen Bakterien zu lysieren wurde anschließend die Temperatur auf 56°C erhöht und 150 µl des Extraktions-Puffers RP und 20 µl der Proteinase K dazu pipettiert, gevortext und bei 56°C und 1000 rpm für 10 min inkubiert. Um die Zellen weiter abzubauen und die Proteine zu denaturieren wurde 250 µl des Extraktions-Puffers CS dazugegeben und die Suspension gevortext. Im Anschluss wurden 250 µl des Bindungs-Puffers AB dazu pipettiert und gevortext.

Das Lysat wurde in ein sogenanntes Spin Column Röhrchen übertragen und für 30 sek zentrifugiert. Hierbei bindet die mikrobielle DNA an den Filter des Spin Column Röhrchens. Das Sammelröhrchen, in welchem das Spin Column Röhrchen steckt, wurde verworfen und ein neues Sammelröhrchen eingesetzt. Es wurden 400 µl des Extraktions-Puffers WB auf den Filter pipettiert und für 30 sek zentrifugiert. Das

Sammelröhrchen wurde erneut verworfen und das Spin Column Röhrchen in ein neues Sammelröhrchen gesteckt. Durch die Zugabe von 400 µl 70%igem Alkohol und dem Zentrifugieren für 3 min wurden Salze aus dem Filter entfernt. Das Sammelröhrchen wurde verworfen und das Spin Column Röhrchen auf ein 1,5 ml Röhrchen gesteckt. Vorsichtig wurde 100µl deionisiertes Wasser, was in der Zwischenzeit im Thermomixer auf 70°C erwärmt wurde, mittig auf das Spin Column Röhrchen aufgetragen und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss für 1 min zentrifugiert um die DNA zu eluieren. Die DNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -20°C gefroren.

2.2.9.3 PCR für das Next Generation Sequencing des Mikrobioms

Das Prinzip der Polymerase Chain Reaction (PCR) wird im Rahmen der Methodik der Filaggrin-Mutationsmessungen in Anhang beschrieben. Als Vorschrift des Next Generation Sequencing des Mikrobioms, wurde am Gerät PCR System 9700 (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Hierfür wurde eine 96er Platte mit je zwei Mulden pro Patientenprobe bestückt. Pro Mulde wurde 7,5 µl des Master-Mix vorgelegt. Das detaillierte Pipettierschema und Reagenzien sind im Anhang zu finden. Zudem wurden je 2 µl der Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit je 0,27 µM Verdünnung beigemischt. Anschließend wurde je 3 µl der jeweiligen DNA-Probe mit einer 1:10 Verdünnung dazu pipettiert und dann die Platte mit Folie abgedeckt und für 1 min auf niedriger Stufe zentrifugiert, damit sich die Reagenzien vermengen. Es folgte die PCR mit folgenden Schritten:

- | | |
|---|-----------|
| 1. Aktivierung der DNA-Polymerase (98°C, 30 sek): | 1 Zyklus |
| 2. Denaturierung (98°C, 9 sek): | 30 Zyklen |
| 3. Primer-Hybridisierung (55°C, 60 sek) | 30 Zyklen |
| 4. Elongation (72°C, 90 sek): | 30 Zyklen |
| 5. Abkühlen (12°C, 10 min) | 1 Zyklus |

2.2.9.4 Aufreinigung der DNA

Vor der Durchführung des Next Generation Sequencing wurden die PCR-Amplifikationsprodukte aufgereinigt und normalisiert. Hierfür wurde das SequelPrep™ Normalization Plate Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Es

basiert auf dem sogenannten Charge Switch System, bei dem die Oberfläche die Ladung je nach pH des zugegebenen Puffers ändern kann. Bei niedrigem pH-Wert ist die Oberfläche positiv geladen und die negativ geladene Nukleinsäure der DNA kann binden. Proteine und andere Kontaminanten wie z.B. Primer binden nicht und können somit ausgewaschen werden. Jede Mulde der SequalPrep™ Normalization Platte kann hierbei 25 ng der PCR-Amplifikationsprodukte binden.

Pro Mulde der 96er SequalPrep™ Normalization Platte wurden je 10 µl (mit mindestens 250 ng Amplikon pro Mulde) der PCR Produkte aufgetragen und mit 10 µl des Bindungspuffers gemischt. Damit die DNA an der Platte bindet, wurde sie für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die Mulden mit 50 µl des Waschpuffers gewaschen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die aufgereinigten PCR Produkte mit je 20 µl Elutionspuffer pro Mulde für 5 min inkubiert. Pro Mulde betrug die DNA-Konzentration 25 ng. Die normalisierten und aufgereinigten Proben wurden dann mit dem Illumina MiSeq v3 2x300bp (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) vollautomatisch sequenziert und analysiert.

2.3 Ethikvotum

Das Pilotprojekt wurde von Seiten der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Kiel vor Beginn der Studie am 13.10.2015 bewilligt. Die Teilnehmer der Studie wurden vor Studienbeginn ausführlich aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung ab.

2.4 Statistische Analyse

Die Daten wurden im Programm Exel (Fa. Microsoft, Redmond, USA) zusammengefasst. Die Auswertung und Analyse erfolgte über Exel und SPSS (Fa. IBM, Armonk, USA). Zum Vergleich zwischen den Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test für nicht-normalverteilte Daten angewendet. Er eignet sich besonders für kleine Kohorten zum Test unabhängiger Stichproben, wie im Rahmen dieser Studie. Er ist ein nicht-parametrischer Test, d.h. es gibt geringe Anforderungen an die Messwert-Verteilung. Um die Signifikanz der Daten anzugeben, wurde die Standardabweichung mit P-Wert angegeben. Hierbei zeigt der P-Wert die Abweichung einzelner Daten vom Mittelwert innerhalb einer Stichprobe mit einem P-

Wert < 0.05 , der als statistisch signifikant angenommen wird. Der Mann-Whitney-Test wurde zum Vergleich zwischen einer Gruppe zur gesunden Kontrolle verwendet. Er eignet sich für den Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben. Auch dieser Test ist ein nicht-parametrischer Test, der sich für die statistische Analyse kleiner Kohorten anbietet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde mit Word (Fa. Microsoft, Redmond, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse der Färbungen wurden semiquantitativ beurteilt und mittels T-Test statistisch ausgewertet.

III. Ergebnisse

3.1 Klinische Beurteilung

3.1.1 Hautstatus und Juckreiz

Das klinische Bild der jeweiligen Patientengruppen mit klassischer Atopischer Dermatitis (AD), Prurigo Nodularis (PN) und Atopischen PN (APN) ist exemplarisch in Abbildung 6 dargestellt. Zu sehen sind bei der AD die typischen akuten Läsionen in der Kniebeuge mit erythematösen, nässenden Plaques und Exkorationen. Bei der PN sind multiple typische erythematöse, z.T. mit Krusten versehene Knoten zu sehen. Das klinische Bild der APN zeigte eine Kombination aus beiden genannten Hauterkrankungen mit Knoten auf einem erythematösen z.T. nässenden Grund mit Exkorationen und Krusten.

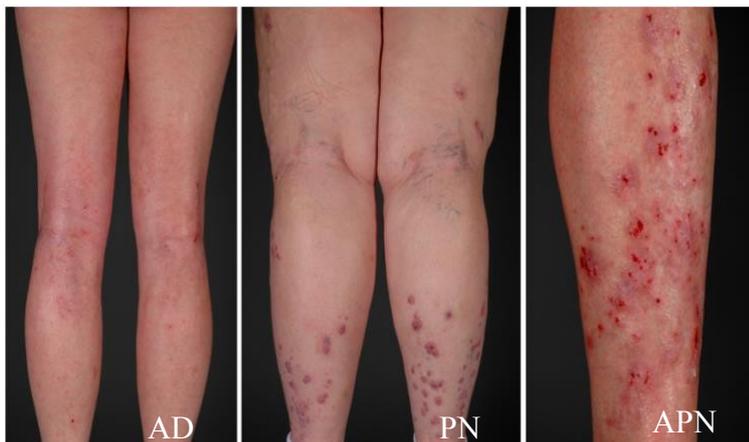


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung des klinischen Bildes am Bein der verschiedenen Gruppen, AD = Atopische Dermatitis; PN = Prurigo Nodularis; APN = atopische PN

Alle Teilnehmer der Kontrollgruppe waren frei von Hautveränderungen. Mit 14,3 % des Schweregrad „schwer betroffen“ zeigt die Gruppe der APN-Patienten ausgeprägte Hautläsionen auf. Der Großteil der Patientengruppen mit PN und APN wies einen mittelgradig betroffenen Hautstatus auf.

Der Severity Scoring of Atopic Dermatitis (SCORAD) der Gruppe mit AD zeigte einen Mittelwert von 39 Punkten und einen Objective Component Of SCORAD (OSCORAD) von 32 Punkten. Bei der APN lag der SCORAD bei 32 Punkten und der OSCORAD bei 26 Punkten. Die Daten der Visual Analog Scale (VAS) bezüglich der Selbsteinschätzung der Studienteilnehmer bezüglich des aktuellen Pruritus im Vergleich zwischen den Gruppen sind in Abbildung 7 dargestellt. Es wurde ein signifikanter Unterschied der VAS zwischen den Patientengruppen im Vergleich zu

den hautgesunden Kontrollen festgestellt (*p = 0,01). Die PN-Patientengruppe gab mit einem Mittelwert von 3,7 Punkten die größte Juckintensität an, gefolgt von der APN mit 3,1 Punkten und der AD-Gruppe mit 2,5 Punkten. Unter den Kontrollen lag der Mittelwert der VAS bei 0,2 Punkten.

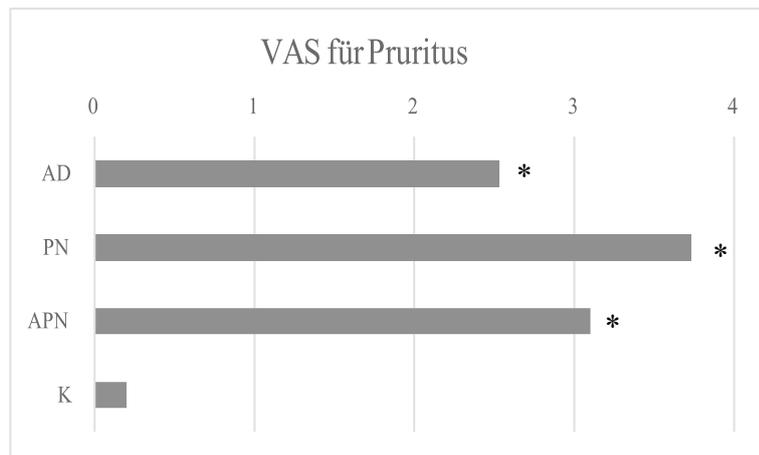


Abbildung 7: Mittelwert der Visual Analog Scale (VAS), dimensionslos (0 - 10 Punkte), verglichen zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n = 10, mit * = P-Wert < 0.05

3.1.2 Atopie-Status abgeleitet nach Diepgen

Der Atopie-Status wurde von der Erfassung nach Diepgen abgeleitet (Diepgen TL and Diepge, 1991). Die Punkte der Atopie-Stigmata der verschiedenen Gruppen mit 15 maximal erreichbaren Punkten ist in Abbildung 8 gezeigt. Der Mittelwert der Atopischen Dermatitis (AD)-Gruppe betrug 3 Punkte und in der Atopischen Prurigo Nodularis (APN)-Gruppe 2 Punkte. Der Mittelwert der Atopie-Stigmata betrug bei den Kontrollen und der Prurigo Nodularis (PN)-Gruppe 1 Punkt.

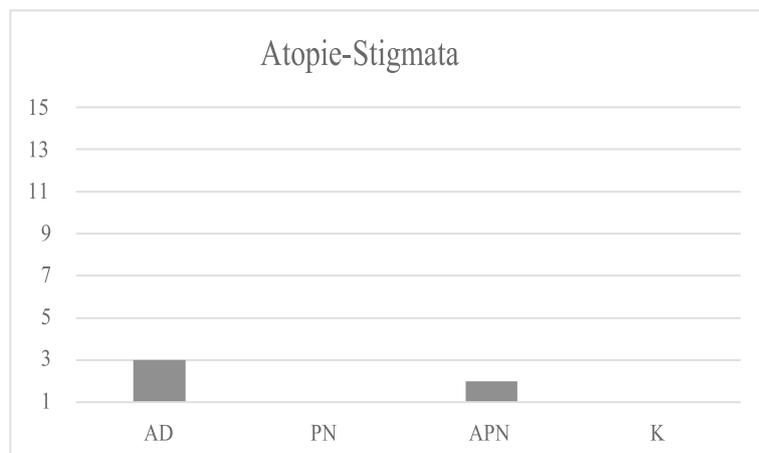


Abbildung 8: Mittelwert der Atopie-Stigmata, dimensionslos (0 - 15 Punkte), verglichen zwischen den verschiedenen Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n = 10, mit * = P-Wert < 0.05

In der Gruppe der AD und APN lag der höchste prozentuale Anteil an Asthma und Rhinokonjunktivitis vor, was in Abbildung 9 graphisch dargestellt ist. Vor allem Asthma war mit 71 % in der Gruppe der APN deutlich erhöht. Die Familienanamnese der Studienteilnehmer ergab, dass eine Atopie innerhalb Verwandten ersten Grades bei 78 % der AD, 22 % der PN, 86 % der APN und in 50 % der Kontrollen vorlag.

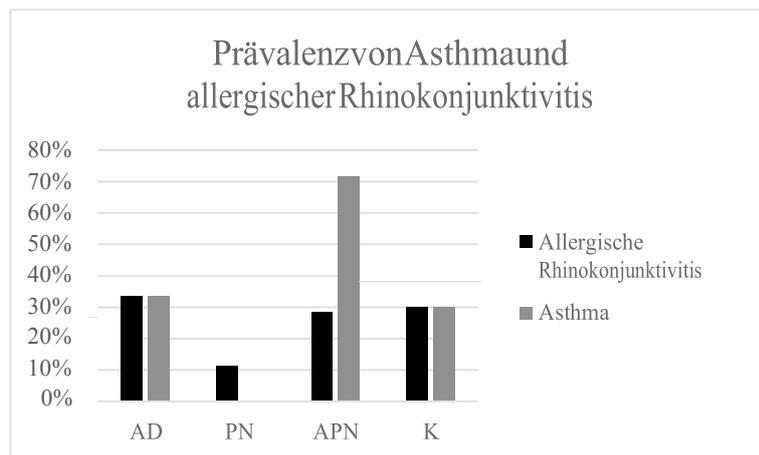


Abbildung 9: Prävalenz von Asthma und allergischer Rhinokonjunktivitis in % im Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n = 10, mit * = P-Wert < 0.05

In der anamnestischen Abklärung von Allergien zwischen den Gruppen zeigte sich ein gehäuftes Vorkommen von Allergien in der Gruppe der AD und APN, was in Abbildung 10 dargestellt ist. In der Gruppe der AD wiesen 22 % eine Nahrungsmittelallergie, 78 % eine Pollenallergie, 33 % eine Tierhaarallergie und 22 % eine Hausstaubmilbenallergie auf. In der Gruppe der APN war die Verteilung mit 14 % Nahrungsmittelallergien, 14 % Pollenallergien, 43 % Tierhaarallergien und 22 % Hausstaubmilbenallergien ebenfalls im Vergleich zu fehlenden atopischen Erkrankungen in der Kontrollgruppe und der Gruppe der PN erhöht. Kontaktallergien kamen in den Gruppen bei 11 % der AD, 33 % der PN und 14 % der APN vor. In der Kontrollgruppe lagen keine Kontaktallergien vor.

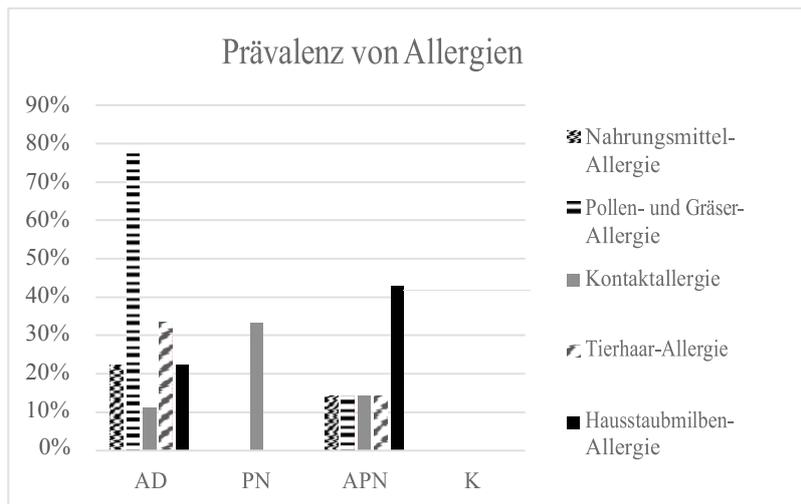


Abbildung 10: Nahrungsmittel-, Pollen-, Kontakt-, Tierhaar- und Hausstaubmilben-Allergie in % im Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n = 10, mit * = P-Wert < 0.05

3.1.3 Erstmanifestationsalter und weitere Erkrankungen

In der Gruppe der Atopischen Dermatitis (AD) kam es im Durchschnitt mit 15 Jahren erstmals zur Hautmanifestation der Erkrankung, in der Gruppe der Prurigo Nodularis (PN) mit 40 Jahren. In der Gruppe mit Atopischer Prurigo Nodularis (APN) sind AD-Hautläsionen im Durchschnitt erstmals mit 22 Jahren und die PN-Läsionen mit 26 Jahren aufgetreten.

Neben den Hauterkrankungen lagen bei 22 % der AD-Patienten (mit arterieller Hypertonie, chronisch venöser Insuffizienz), 33 % der PN-Patienten (mit arterieller Hypertonie, Diabetes Typ 2, Ulcus Mooren) und 10 % der hautgesunden Kontrollen (mit Hypothyreose) weitere Erkrankungen vor. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen kamen bei 11 % in der PN-Gruppe und 29 % in der APN-Gruppe vor. In der AD- und Kontrollgruppe waren keine chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bekannt.

3.1.4 Aktuelle Therapien und Vortherapien

Zum Zeitpunkt der Untersuchung war eine systemische immunsuppressive Therapie bei 22 % der Prurigo Nodularis (PN)-Patienten und 14 % der Atopischen PN (APN)-Patienten vermerkt. Eine topische Glukokortikoid-Therapie wurde von 67 % der Atopischen Dermatitis (AD)-, 44 % der PN- und 57 % der APN-Gruppe angewandt. Die Einnahme von Antibiotika innerhalb der letzten 6 Monaten wurde von 11 % der AD-, 22 % der PN-, 14 % der APN-Patienten und 10 % der Kontrollen angegeben. 22 % der AD- und PN-Patienten haben die Vorgabe innerhalb von 24 Stunden vor

Untersuchung nicht zu duschen und keine Hautpflege aufzutragen nicht eingehalten. Innerhalb der APN-Gruppe betraf dies 14 %.

3.1.5 Umweltfaktoren

Im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen wurden Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD), Prurigo Nodularis (PN) und Atopischer PN (APN) signifikant seltener gestillt (Abbildung 11, *p = 0,02). Beim Vergleich zwischen den Gruppen bezüglich Haustierhaltung, natürlicher Geburt, und Besuch eines Kindergartens gab es keine signifikanten Unterschiede.

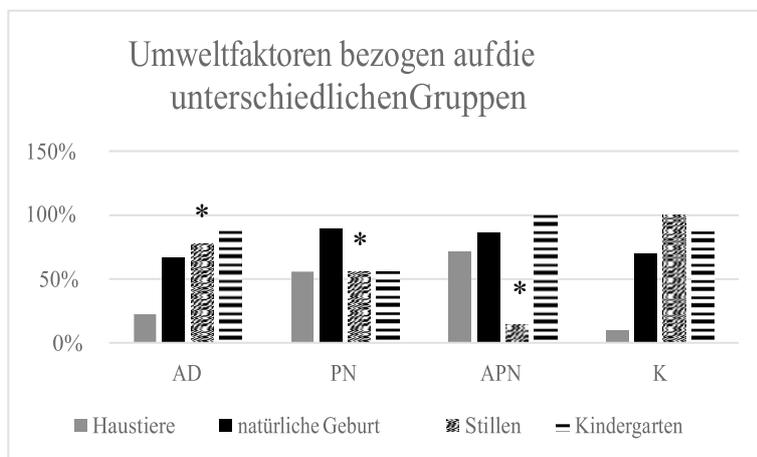


Abbildung 11: Anteil (in %) der Haustierhaltung, natürlichen Geburt, Stillen, Besuch eines Kindergartens im Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n = 10, mit * = P-Wert < 0.05

Verglichen zu den Kontrollen war ein signifikanter Unterschied (*p = 0,038) zwischen den Patientengruppen und den hautgesunden Kontrollen bezüglich der Rauchanamnese festzustellen, was in Abbildung 12 dargestellt ist.

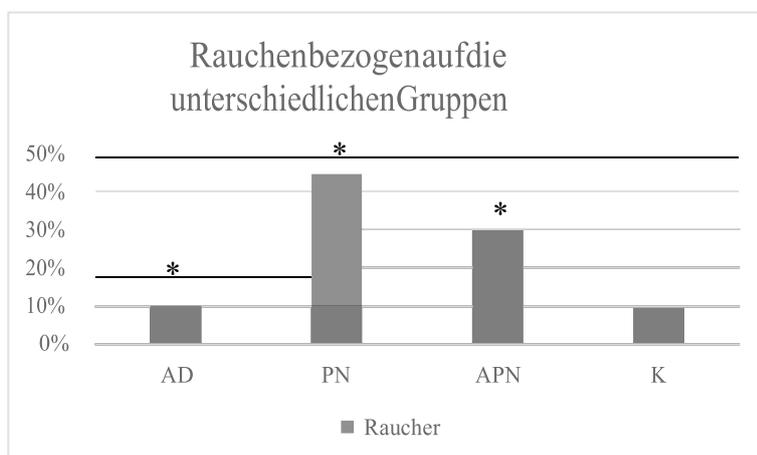


Abbildung 12: Anteil an Rauchern im Gruppenvergleich (in %), AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n = 10, mit * = P-Wert < 0.05

3.1.6 Lebensqualität

Die Lebensqualität der Patientengruppen wurde über standardisierte Fragebögen evaluiert. Die Auswertung der Mittelwerte des „Dermatologischen Fragebogen zur Lebensqualität“ (mit maximal 15 Punkten) zeigte eine im Vergleich zu den hautgesunden Kontrollen Minderung der Lebensqualität gegenüber den Patientengruppen (AD = 7 Punkte, PN = 11 Punkte, APN = 9 Punkte).

3.2 Biophysikalische Messungen

Die Messung der Hydratation und des Transepidermale Wasserverlusts (TEWL) wurde unter möglichst konstanten Umgebungsbedingungen durchgeführt. Bei den Messungen betrug der Mittelwert der Raumtemperatur 23 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 44 %. Bei der Nicht-Läsionalen (NL) Messung des TEWLs lag der Mittelwert der Raumtemperatur bei 24°C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 43 %.

Die Messung der Hydratation (Abbildung 13) zeigte signifikant erniedrigte Werte der Nicht-Läsionalen (NL)-Haut der Gruppe mit Atopischer Dermatitis (AD) ($p = 0,022$) und Gruppe mit Prurigo Nodularis (PN) ($p = 0,022$) im Vergleich zu den Kontrollen. Die Werte der Hydratation der Läsionalen (L)-Haut waren im Vergleich zur Nicht-Läsionalen (NL)-Haut in der AD-Gruppe ($p = 0,002$), PN-Gruppe ($p = 0,002$), Atopische PN (APN)-Gruppe ($p = 0,005$) signifikant erniedrigt.

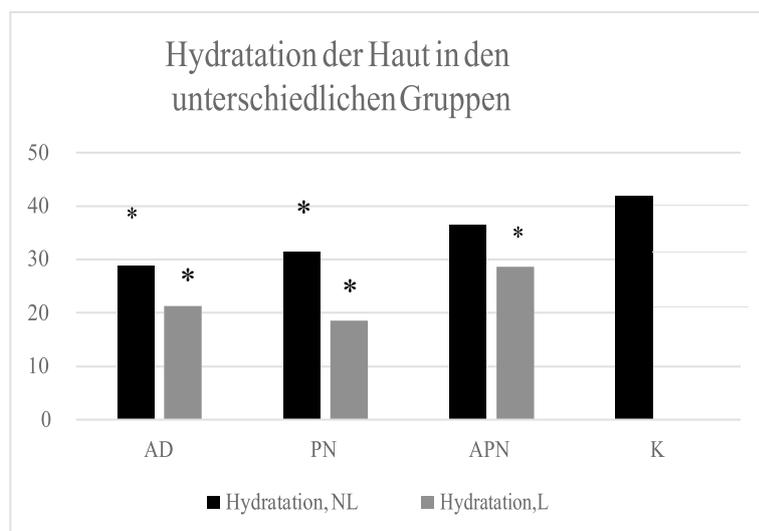


Abbildung 13: Mittelwert der Hydratation, dimensionslos, der Nicht-Läsionalen (NL) und Läsionalen (L)-Haut im Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, $n = 9$; PN = Prurigo Nodularis, $n = 9$; APN = Atopische PN, $n = 7$; K = hautgesunde Kontrollen, $n = 10$, mit * = P -Wert < 0.05

Abbildung 14 zeigt die Messungen des TEWLs der Nicht-Läsionalen (NL)- und Läsionalen (L)-Haut der verschiedenen Gruppen im Vergleich. Die Messung des TEWLs an der Nicht-Läsionaler (NL)-Haut ergab in der Gruppe der AD-Patienten ($p = 0,008$), PN-Patienten ($p = 0,008$) und APN-Patienten ($p = 0,018$) einen signifikant erhöhten TEWL im Vergleich zu den Kontrollen. Auch beim Vergleich des TEWLs von L-Haut zu den Kontrollen wurden signifikant erhöhte Werte bei der AD-Gruppe ($p = 0,001$), PN-Gruppe ($p = 0,001$) und APN-Gruppe ($p = 0,005$) gemessen.

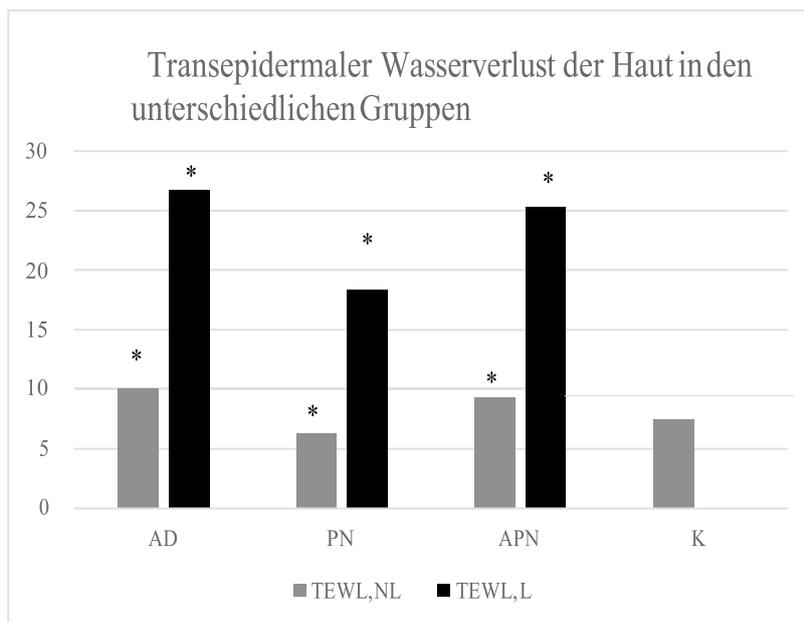


Abbildung 14: Mittelwert des Transepidermale Wasserverlusts (TEWL) (in g/h/m²) der Nicht-Läsionalen (NL) und Läsionalen (L)-Haut im Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, $n = 9$; PN = Prurigo Nodularis, $n = 9$; APN = Atopische PN, $n = 7$; K = hautgesunde Kontrollen, $n = 10$, mit * = P -Wert < 0.05

3.3 Filaggrin-Gen-Mutationsanalyse

Es wurden in keiner Gruppe R2447-, S3247- oder R501-*Filaggrin*-Mutationen festgestellt. Die *Filaggrin*-Mutation S2282del4 kam bei 22 % der Atopischen Dermatitis (AD)-Patienten, 11 % der Prurigo Nodularis (PN)-Patienten und 10 % der Kontrollen vor (Abbildung 15). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gemessen.

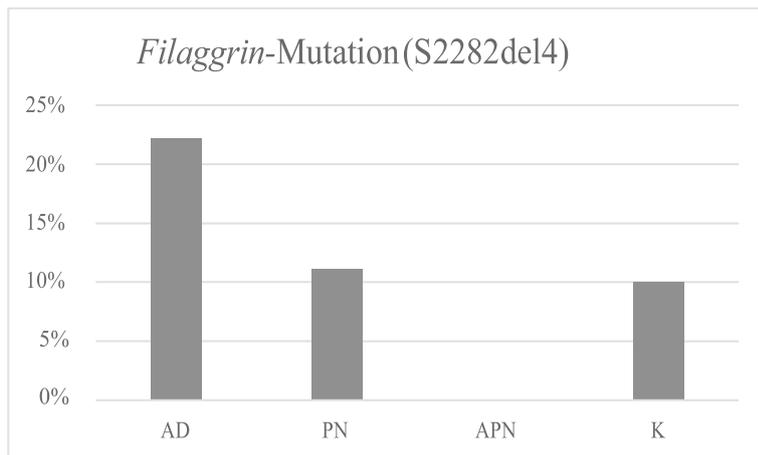


Abbildung 15: Filaggrin-Mutation S2282del4 (in %), AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n = 10, mit * = P-Wert < 0.05

3.4 Bestimmung von Gesamt-IgE und spezifischen IgE-AK im Serum

Im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen wurde im Blut von Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD) (*p = 0,043) ein signifikant erhöhter Gesamt-IgE Spiegel gemessen, siehe Abbildung 16. Kein signifikanter Unterschied war beim Vergleich der Prurigo Nodularis (PN) und Atopischen PN (APN) zur Kontrolle oder der Patientengruppen untereinander zu sehen.

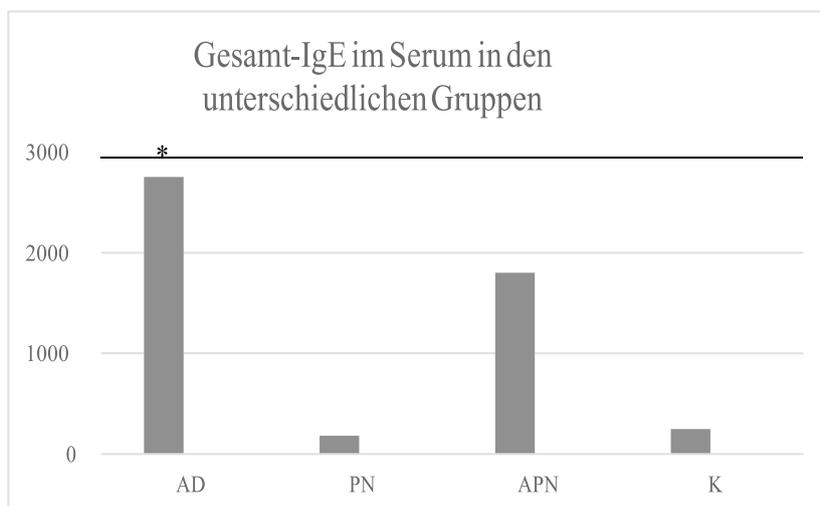


Abbildung 16: Mittelwert des im Serum gemessenen Gesamt-IgEs (in kU/l) im Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n = 10, mit * = P-Wert < 0.05

Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen dem gemessenen spezifischen nutritiven oder inhalativen IgE im Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen. Das spezifische nutritive IgE in der Kontrollgruppe lag bei 0 %. Die Daten sind in Abbildung 17 dargestellt.

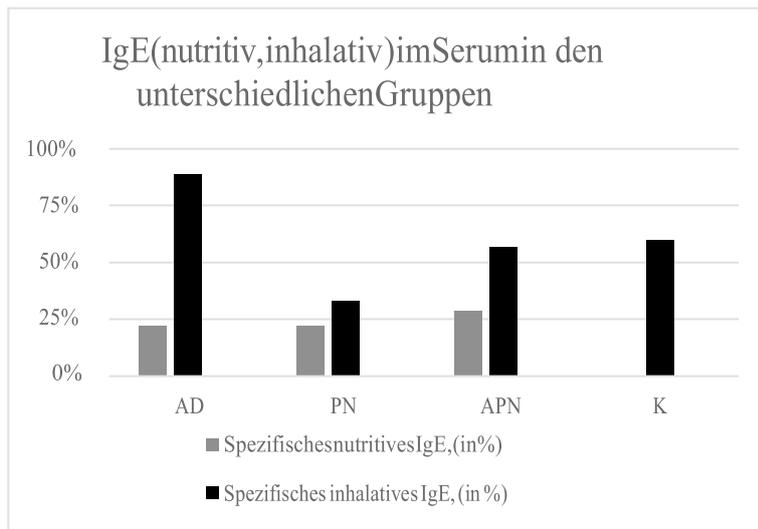


Abbildung 17: Mittelwert des im Serum gemessenen spezifischen inhalativen und nutritiven IgEs (in %) im Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n =

3.5 Expression von Zytokinen und Immunzellmediatoren

Abbildung 18 stellt exemplarisch eine Immunhistochemische Färbung einer hautgesunden Kontrolle dar. Eingezeichnet sind die verschiedenen Schichten der Epidermis.

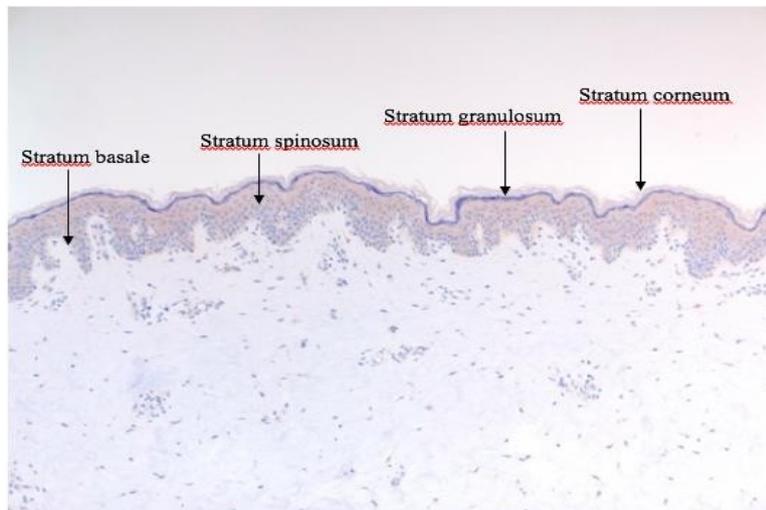


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung eines Immunhistochemie- Hautschnitts mit den verschiedenen Schichten der Epidermis einer hautgesunden Kontrolle

3.5.1 IL-4 Expression

Die Abbildung 19 zeigt die graphische Auswertung der IL-4 Expression in der Nicht-Läsionalen (NL)- und Läsionalen (L)-Haut der verschiedenen Gruppen, welche mittels Immunhistochemie semiquantitativ gemessen wurde. Verglichen mit hautgesunden Kontrollen wurde in der Nicht-Läsionalen (NL)-Haut von Patienten eine signifikant verminderte IL-4 Expression in der Gruppe der Prurigo Nodularis (PN) ($p = 0,19$) und Atopischen PN (APN) ($p = 0,027$) gemessen. Läsional war sie in

der PN-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ($p = 0,010$). Der Vergleich zwischen der Expression von IL-4 in Läsionaler (L)- und Nicht-Läsionaler (NL)-Haut innerhalb einer Gruppe ergab sowohl bei der Atopischen Dermatitis (AD) ($p = 0,024$), der PN ($p = 0,011$) als auch der APN ($p = 0,042$) signifikante Unterschiede mit jeweils einer erhöhten IL-4 Expression im läsionalen Hautareal.

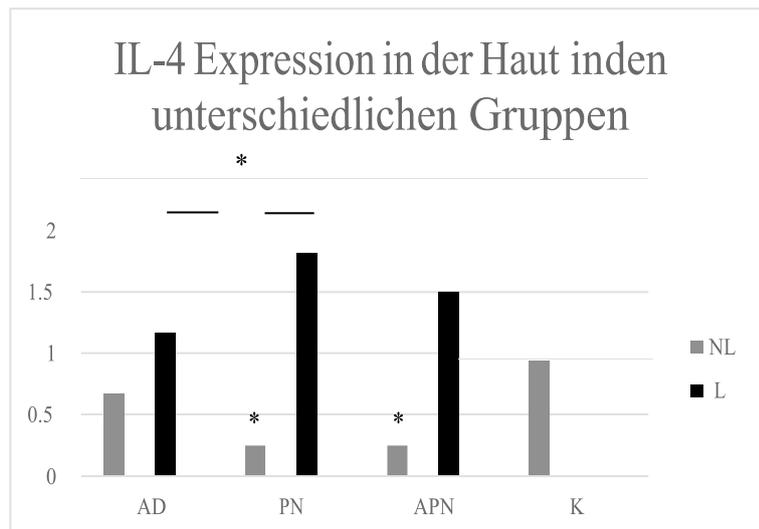


Abbildung 19: Mittelwert der IL-4 Expression in Nicht-Läsionaler (NL)- und Läsionaler (L)-Haut, Immunhistochemie, semiquantitative Bestimmung, dimensionslos. Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, $n = 9$; PN = Prurigo Nodularis, $n = 9$; APN = Atopische PN, $n = 7$; K = hautgesunde Kontrollen, $n = 10$, mit * = P -Wert < 0.05

In Abbildung 20 sind exemplarische immunhistochemische IL-4 Färbungen von Hautschnitten von Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD), Atopischer Prurigo Nodularis (APN) und Prurigo Nodularis (PN) und hautgesunden Kontrollen dargestellt. Zu sehen sind die in Abbildung 19 graphisch dargestellten Ergebnisse.

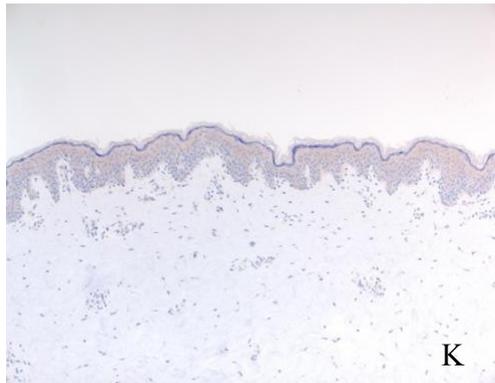
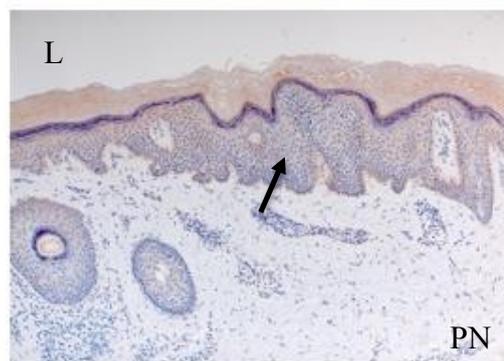
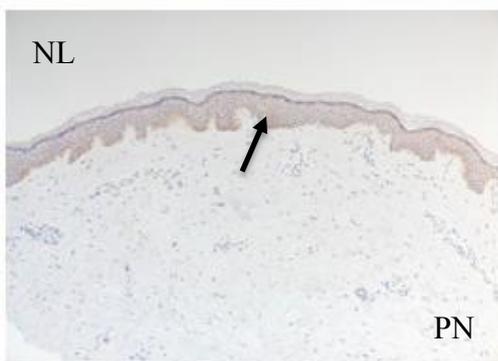
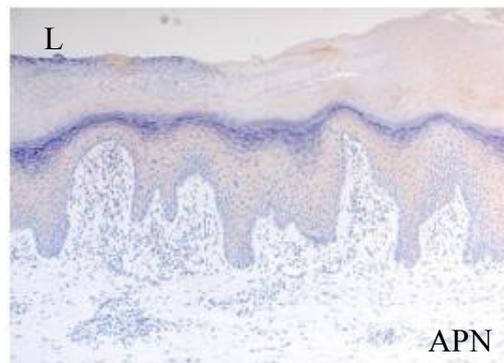
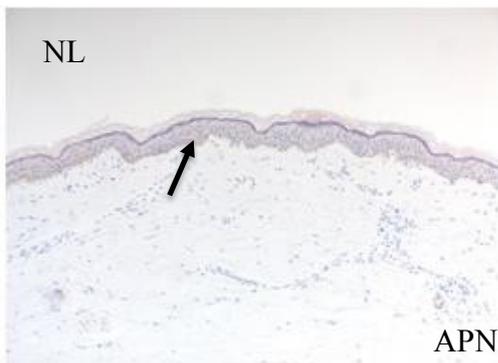
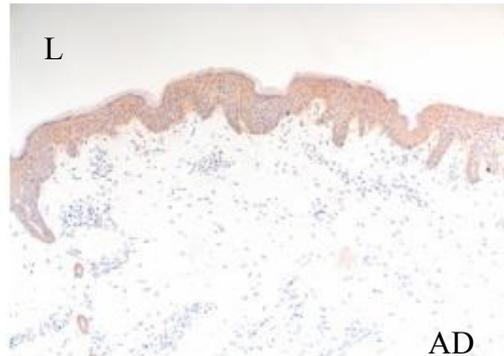
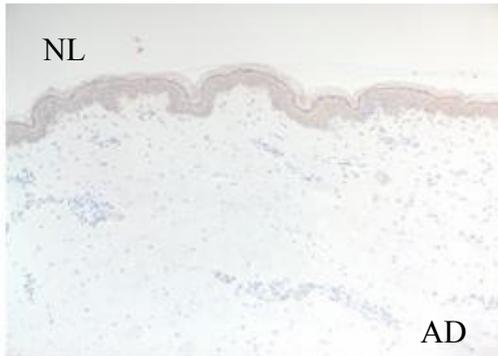


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von IL-4 in Nicht-Läsionaler (NL)- Haut und Läsionaler (L)-Haut von Patienten, AD = Atopische Dermatitis; PN = Prurigo Nodularis; APN = Atopische PN, K = hautgesunde Kontrolle. Die schwarzen Pfeile zeigen exemplarisch auf ein stärkeres Farbsignal der IL-4-Färbung.



In Abbildung 21 ist die IL-4 Expression im Blut dargestellt. Sie ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

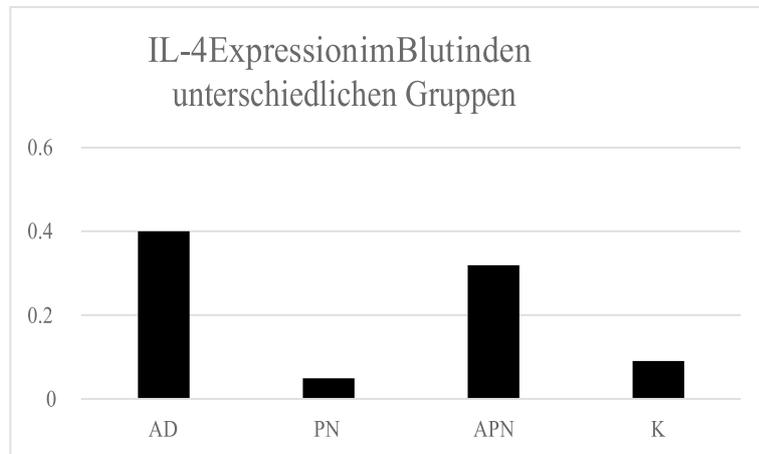


Abbildung 21: Mittelwert der optischen Dichte (OD) der IL-4 Expression im Blut. Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n = 10, mit * = P-Wert < 0.05

3.5.2 IL-5 Expression

Die IL-5 Expression wurde im Blut gemessen und ist graphisch in Abbildung 22 dargestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt.

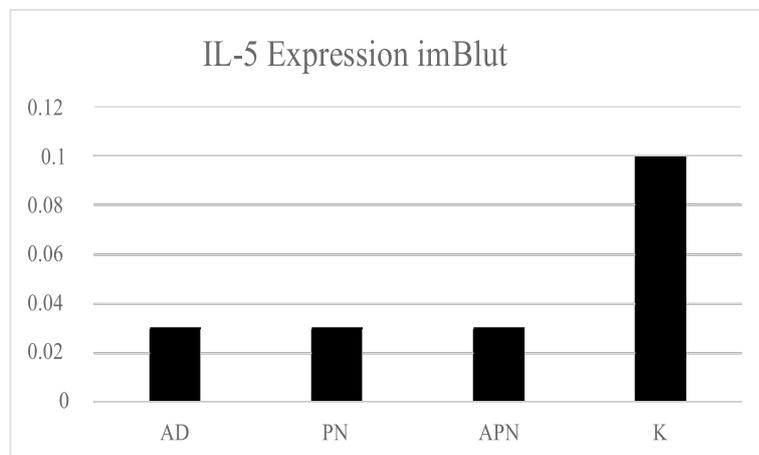
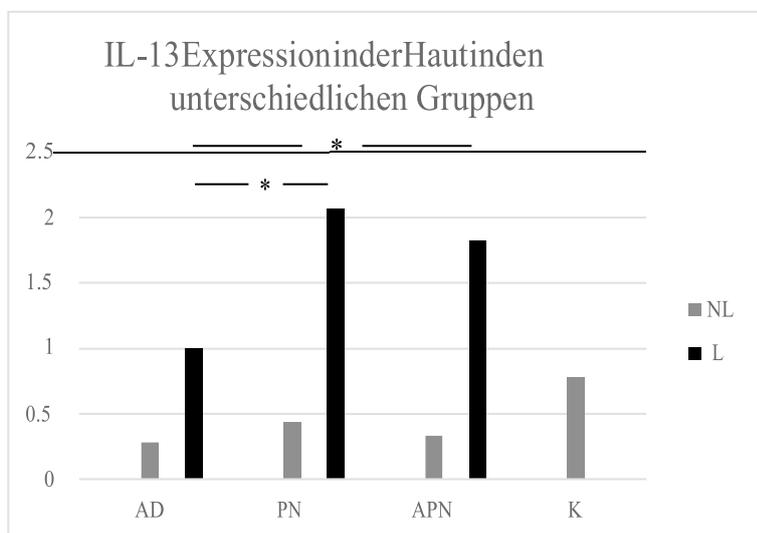


Abbildung 22: Mittelwert der optischen Dichte (OD) der IL-5 Expression im Blut verglichen zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, n = 9; PN = Prurigo Nodularis, n = 9; APN = Atopische PN, n = 7; K = hautgesunde Kontrollen, n = 10, mit * = P-Wert < 0.05

3.5.3 IL-13 Expression

Die IL-13 Expression wurde in der Nicht-Läsionalen (NL)- und Läsionalen (L)-Haut mittels Immunhistochemie semiquantitativ bestimmt und ist in Abbildung 23 graphisch dargestellt. In der Nicht-Läsionaler (NL)-Haut konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Messung der IL-13 Expression von Läsionaler (L)-Haut zeigte sowohl bei der Prurigo Nodularis (PN) ($p =$

0,008) als auch der Atopischen PN (APN) ($p = 0,007$) eine signifikant erhöhte IL-13 Expression im Vergleich zur hautgesunden Kontrolle. Zwischen den Patientengruppen im Vergleich wurde in der L-Haut der PN eine signifikant höhere Expression von IL-13 im Vergleich zu der Läsionalen (L)-Haut der Atopischen Dermatitis (AD)-Gruppe ($p = 0,024$) gemessen. Der Vergleich zwischen der Expression von IL-13 in Läsionaler (L)- und Nicht-Läsionaler (NL)-Haut innerhalb einer Gruppe ergab sowohl bei der AD ($p = 0,010$), der PN ($p = 0,017$) als auch der APN ($p = 0,027$) signifikante Unterschiede mit jeweils erhöhter IL-13 Expression im läsionalen Hautareal.



*Abbildung 23: Mittelwert der IL-13 Expression in Läsionaler (L)- und Nicht-Läsionaler (NL)-Haut, semiquantitative immunhistochemische Bestimmung, dimensionslos. Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, $n = 9$; PN = Prurigo Nodularis, $n = 9$; APN = Atopische PN, $n = 7$; K = hautgesunde Kontrollen, $n = 10$, mit * = P -Wert < 0.05*

In Abbildung 24 sind exemplarische immunhistochemische IL-13 Färbungen von Hautschnitten von Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD), Atopischer Prurigo Nodularis (APN) und Prurigo Nodularis (PN) und hautgesunden Kontrollen dargestellt. Zu sehen sind die in Abbildung 23 graphisch dargestellten Ergebnisse.

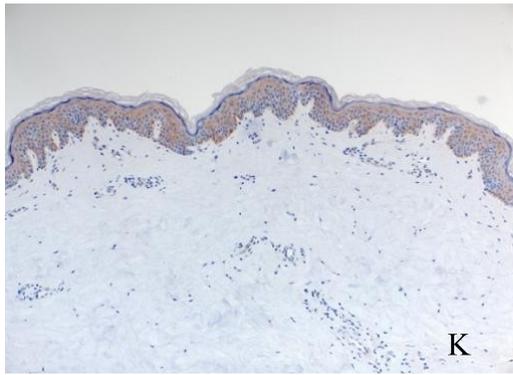
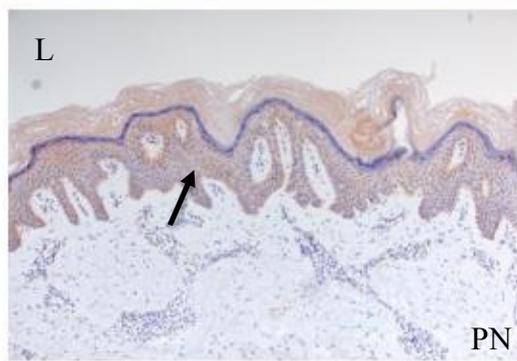
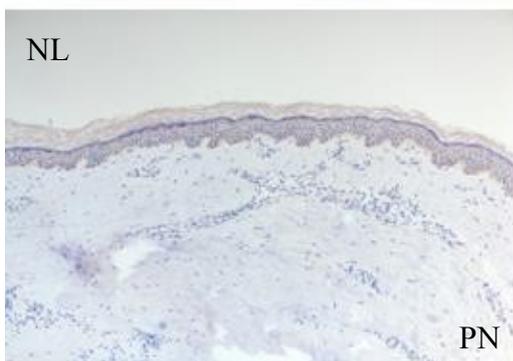
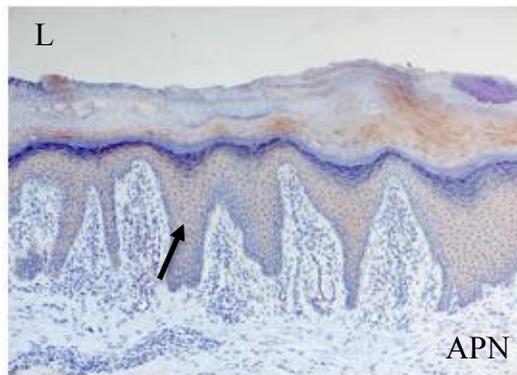
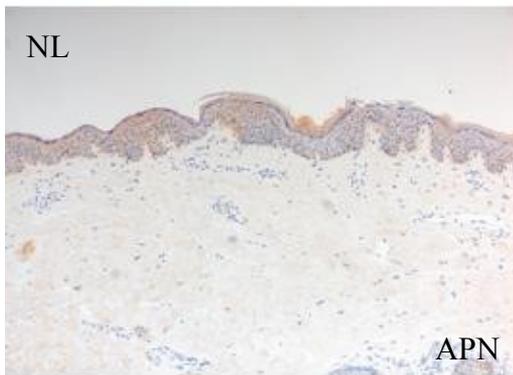
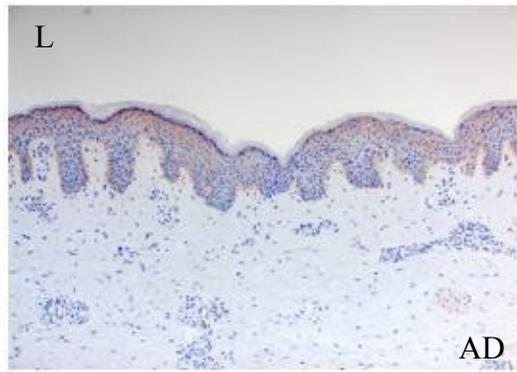
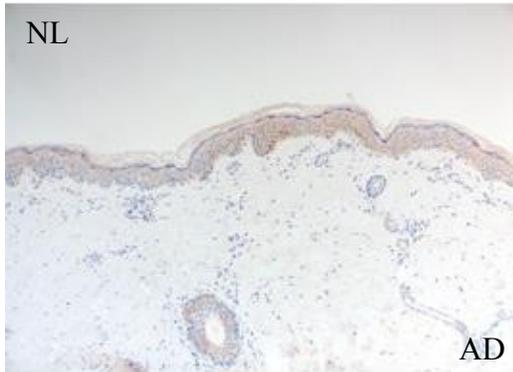


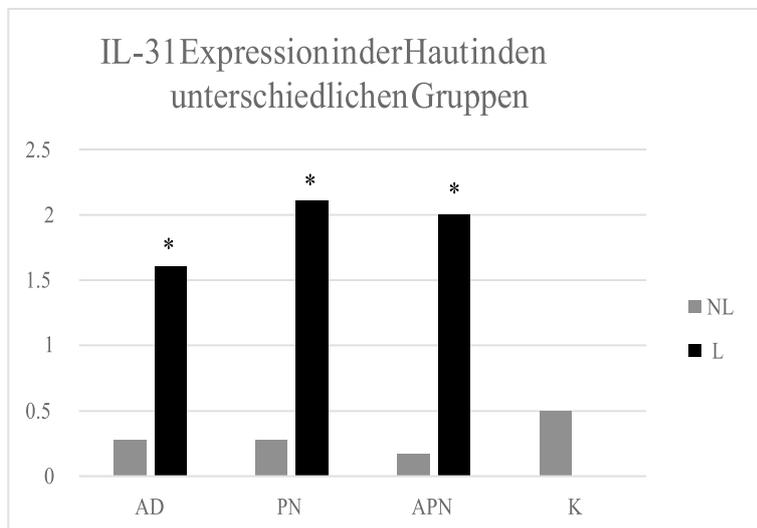
Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung von IL-13 Nicht-Läsionaler (NL)-Haut und Läsionaler (L)-Haut von Patienten, AD = Atopische Dermatitis; PN = Prurigo Nodularis; APN = Atopische PN, K = hautgesunde Kontrolle. Die schwarzen Pfeile zeigen exemplarisch auf ein stärkeres Farbsignal der IL-13-Färbungen.



3.5.4 IL-31 Expression

Die IL-31 Expression wurde mittels Immunhistochemie semiquantitativ in der Nicht-Läsionalen (NL)- und Läsionalen (L)-Haut bestimmt und ist graphisch in Abbildung 25

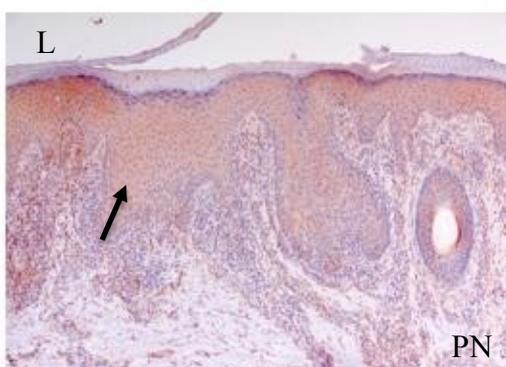
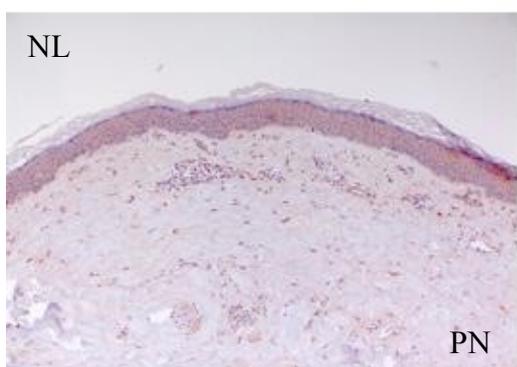
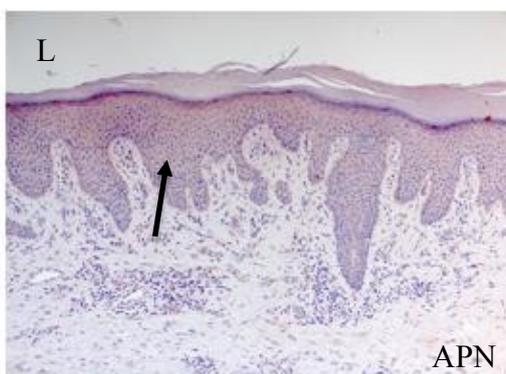
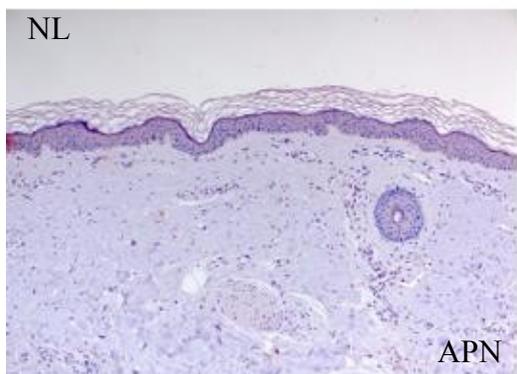
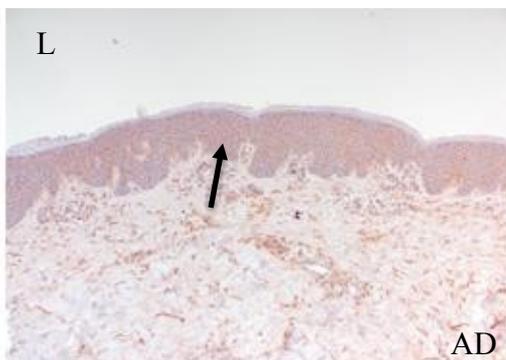
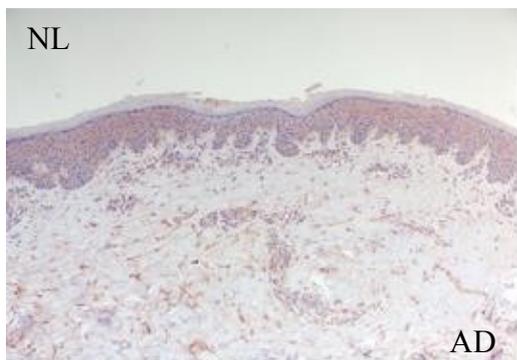
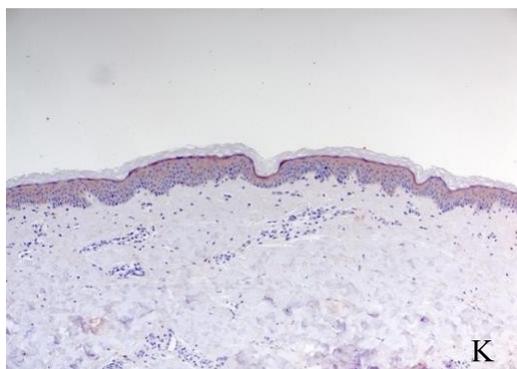
dargestellt. Bei Messungen in der Nicht-Läsionaler (NL)-Haut zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der IL-31 Expression zwischen den Gruppen. In der L-Haut konnten signifikant erhöhte Werte bei der Atopischen Dermatitis (AD) ($p = 0,005$), Prurigo Nodularis (PN) ($p = 0,005$) und Atopischen PN (APN) ($p = 0,007$) im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen gemessen werden. Zwischen den Patientengruppen im Vergleich wurden keine signifikanten Werte gemessen. Der Vergleich zwischen der Expression von IL-31 in Läsionaler (L)- und Nicht-Läsionaler (NL)-Haut innerhalb einer Gruppe ergab sowohl bei der AD ($p = 0,011$), der PN ($p = 0,017$) als auch der APN ($p = 0,027$) signifikante Unterschiede mit einer jeweils erhöhten IL-31 Expression im läsionalen Hautareal.



*Abbildung 25: Mittelwert der IL-31 Expression in Läsionaler (L)- und Nicht-Läsionaler (NL)-Haut, semiquantitative Immunhistochemische Bestimmung, dimensionslos. Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, $n = 9$; PN = Prurigo Nodularis, $n = 9$; APN = Atopische PN, $n = 7$; K = hautgesunde Kontrollen, $n = 10$, mit * = P -Wert < 0.05*

In Abbildung 26 sind exemplarische immunhistochemische IL-31 Färbungen von Hautschnitten von Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD), Atopischer Prurigo Nodularis (APN) und Prurigo Nodularis (PN) und hautgesunden Kontrollen dargestellt. Zu sehen sind die in Abbildung 25 graphisch dargestellten Ergebnisse.

Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung von IL-31 in Nicht-Läsionaler (NL)-Haut und Läsionaler (L)-Haut von Patienten, AD = Atopische Dermatitis; PN = Prurigo Nodularis; APN = Atopische PN, K = hautgesunde Kontrolle. Die schwarzen Pfeile zeigen exemplarisch auf ein stärkeres Farbsignal durch IL-31 im Vergleich zu den Kontrollen.



In Abbildung 27 ist die IL-31 Expression im Blut dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

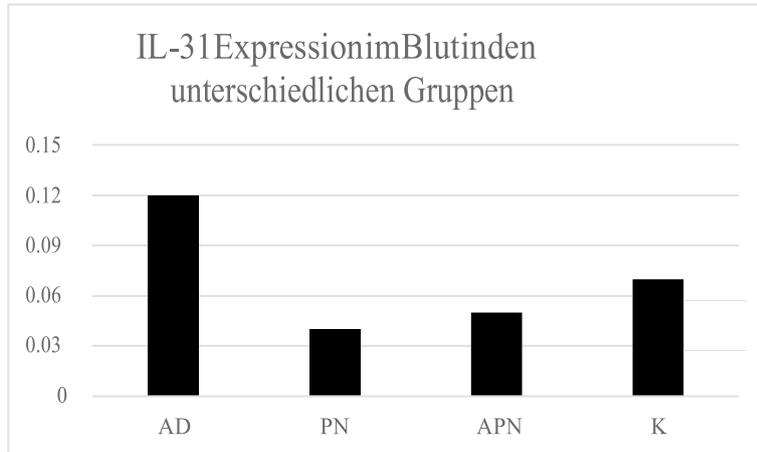


Abbildung 27: Mittelwert der optischen Dichte (OD) der IL-31 Expression im Blut. Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, $n = 9$; PN = Prurigo Nodularis, $n = 9$; APN = Atopische PN, $n = 7$; K = hautgesunde Kontrollen, $n = 10$, mit * = P -Wert < 0.05

3.5.5 TNF- α Expression

Die TNF- α Expression wurde im Blut von Patienten gemessen (Abbildung 28). Im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen wurde bei Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD) (* $p = 0,034$) eine erniedrigte TNF- α Konzentration festgestellt.

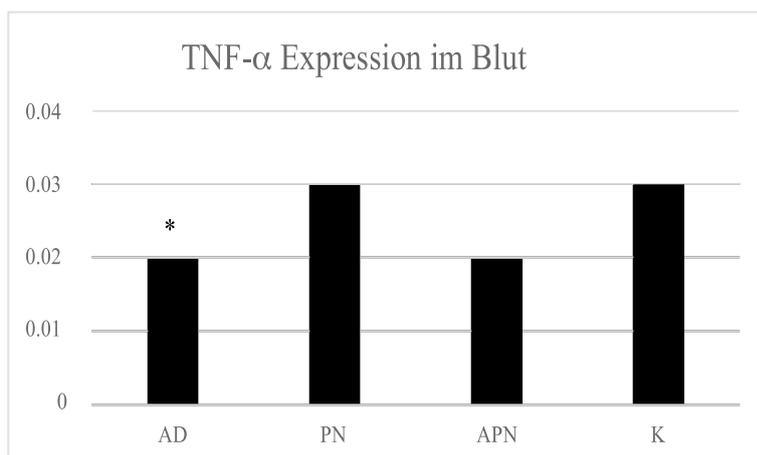


Abbildung 28: Mittelwert der optischen Dichte (OD) der TNF- α Expression im Blut. Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, $n = 9$; PN = Prurigo Nodularis, $n = 9$; APN = Atopische PN, $n = 7$; K = hautgesunde Kontrollen, $n = 10$, mit * = P -Wert < 0.05

3.5.6 Thymic Stromal Lymphopoietin Expression

Die Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)-Expression wurde in Nicht-Läsionaler (NL)- und Läsionaler (L)-Haut mittels Immunhistochemie bestimmt und ist graphisch

in Abbildung 29 dargestellt. Messungen der Nicht-Läsionaler (NL)-Haut ergaben keinen signifikanten Unterschied der TSLP Expression zwischen den Gruppen. In der Läsionaler (L)-Haut lag im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen bei der Atopischen Dermatitis (AD) ($p = 0,002$), Prurigo Nodularis (PN) ($p = 0,001$) und Atopischen PN (APN) ($p = 0,002$) eine signifikant erhöhte Expression von TSLP vor. Der Vergleich zwischen der Expression von TSLP in Läsionaler (L)- und Nicht-Läsionaler (NL)-Haut innerhalb einer Gruppe ergab sowohl bei der AD ($p = 0,011$), der PN ($p = 0,011$) als auch der APN ($p = 0,027$) signifikante erhöhte Werte in der läSIONalen Haut.

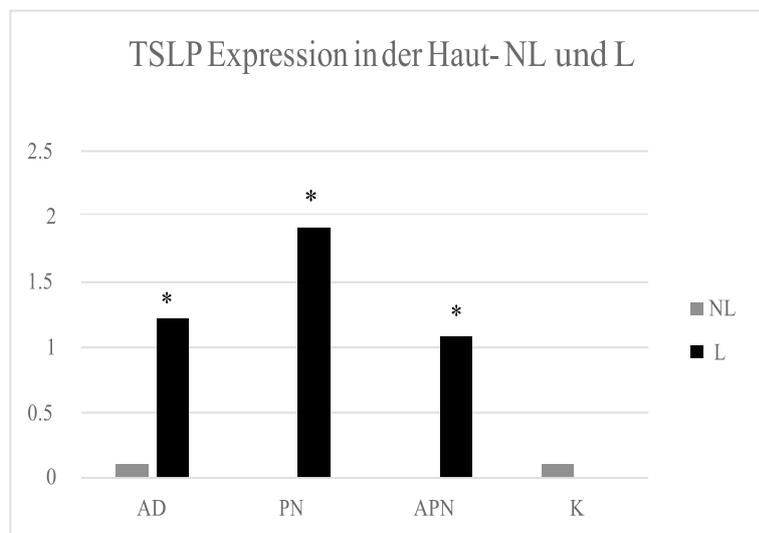


Abbildung 29: Mittelwert der Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)-Expression in Läsionaler (L)- und Nicht-Läsionaler (NL)- Haut, semiquantitative immunhistochemische Bestimmung, dimensionslos. Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, $n = 9$; PN = Prurigo Nodularis, $n = 9$; APN = Atopische PN, $n = 7$; K = hautgesunde Kontrollen, $n = 10$, mit * = P-Wert < 0.05

In Abbildung 30 sind exemplarische immunhistochemische TSLP Färbungen von Hautschnitten von Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD), Atopischer Prurigo Nodularis (APN) und Prurigo Nodularis (PN) und hautgesunden Kontrollen dargestellt. Zu sehen sind die in Abbildung 29 graphisch dargestellten Ergebnisse.

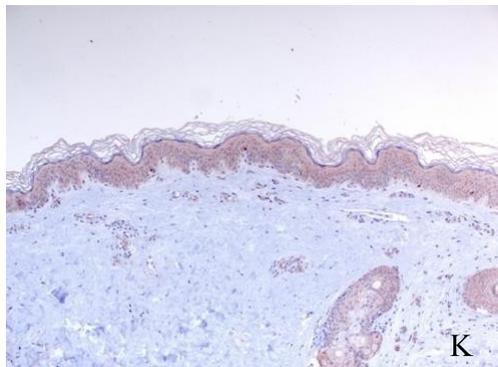
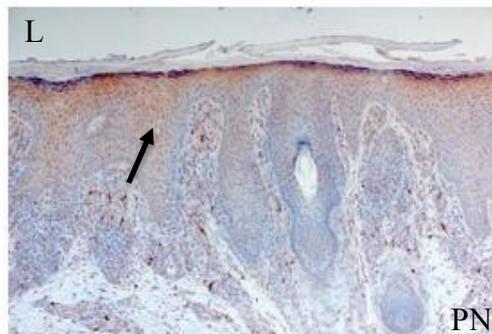
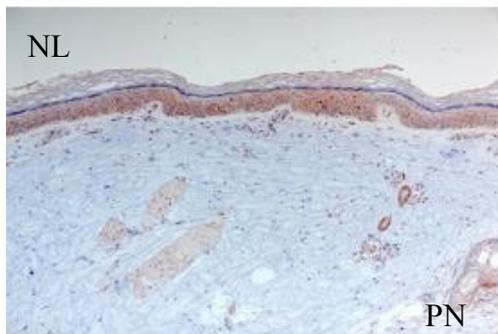
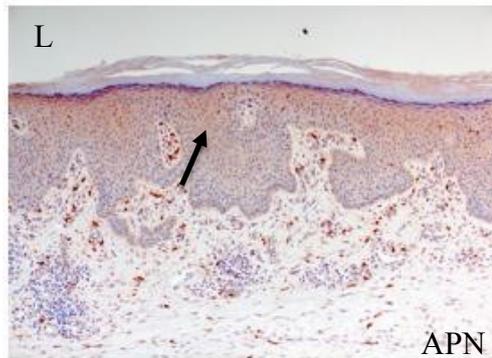
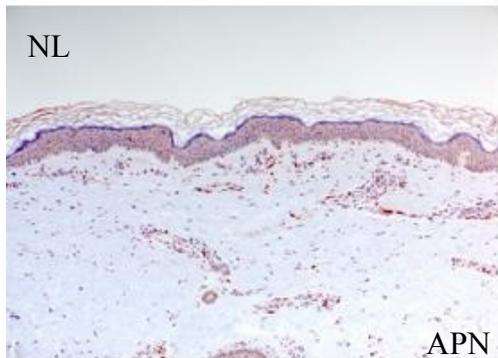
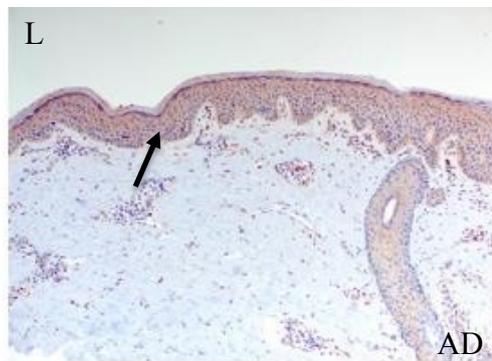
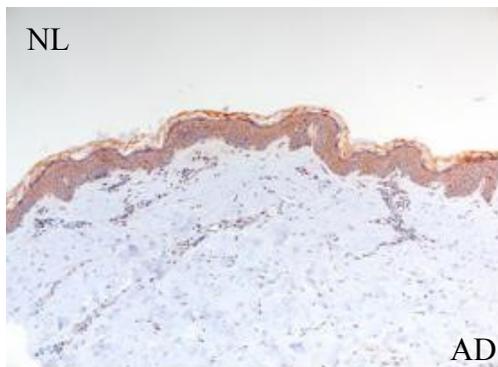


Abbildung 30: Immunhistochemische Färbung von Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) in Nicht-Läsionaler (NL)-Haut und Läsionaler (L)-Haut von Patienten, AD = Atopische Dermatitis; PN = Prurigo Nodularis; APN = Atopische PN, K = hautgesunde Kontrolle. Die schwarzen Pfeile zeigen exemplarisch auf ein stärkeres Farbsignal der TSLP-Färbungen.



3.5.7 Mast Cell Tryptase Expression

Die Mast Cell Tryptase (MCT)-Expression wurde in Nicht Nicht-Läsionaler (NL)- und

Läsionaler (L)-Haut mittels Immunhistochemie bestimmt und ist graphisch in Abbildung 31 dargestellt. Die Expression von MCT war im Vergleich zu hautgesunden Patienten sowohl in der Nicht-Läsionaler (NL)-Haut bei der Atopischen Dermatitis (AD) ($p = 0,029$), Prurigo Nodularis (PN) ($p = 0,002$) und Atopischen PN (APN) ($p = 0,006$) als auch in der L-Haut der AD ($p = 0,000$), PN ($p = 0,000$) und APN ($p = 0,000$) signifikant erhöht. Der Vergleich zwischen der Expression von MCT in Läsionaler (L)- und Nicht-Läsionaler (NL)-Haut innerhalb einer Gruppe ergab sowohl bei der AD ($p = 0,027$), der PN ($p = 0,027$) als auch der APN ($p = 0,020$) signifikante Unterschiede mit jeweils erhöhter Expression von MCT in läSIONALEN Hautarealen.

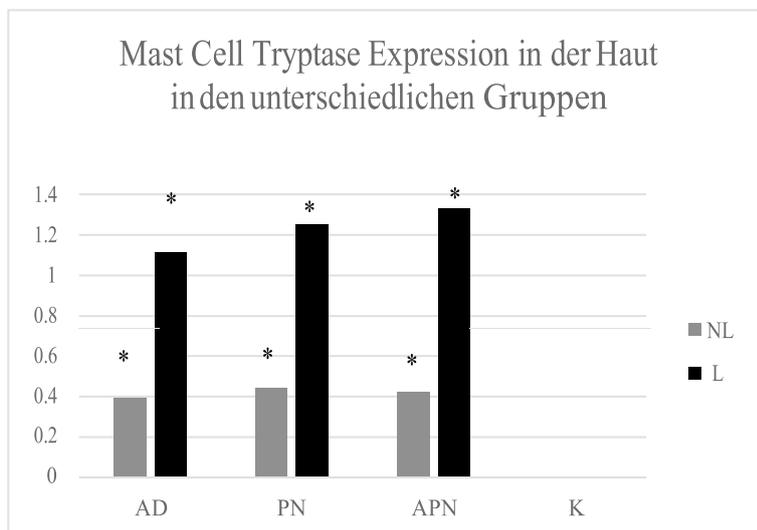


Abbildung 31: Mittelwert der Mast Cell Tryptase (MCT)-Expression in Läsionaler (L)- und Nicht-Läsionaler (NL)-Haut, semiquantitative immunhistochemische Bestimmung, dimensionslos. Vergleich zwischen den Gruppen, AD = Atopische Dermatitis, $n = 9$; PN = Prurigo Nodularis, $n = 9$; APN = Atopische PN, $n = 7$; K = hautgesunde Kontrollen, $n = 10$, mit * = P-Wert < 0.05

In Abbildung 32 sind exemplarische immunhistochemische MCT Färbungen von Hautschnitten von Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD), Atopischer Prurigo Nodularis (APN) und Prurigo Nodularis (PN) und hautgesunden Kontrollen dargestellt. Zu sehen sind die in Abbildung 31 graphisch dargestellten Ergebnisse.

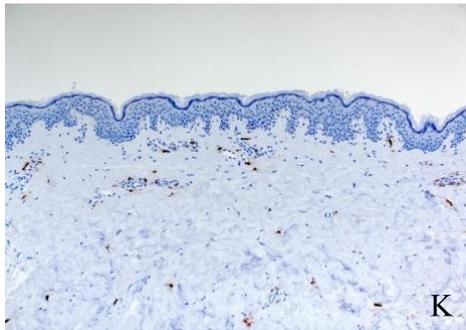
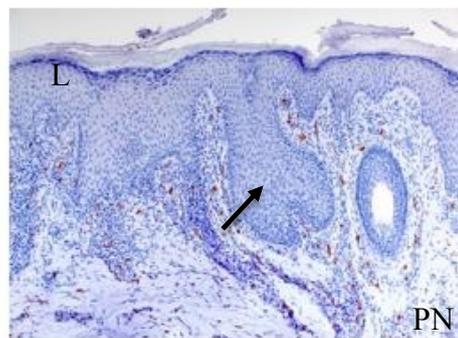
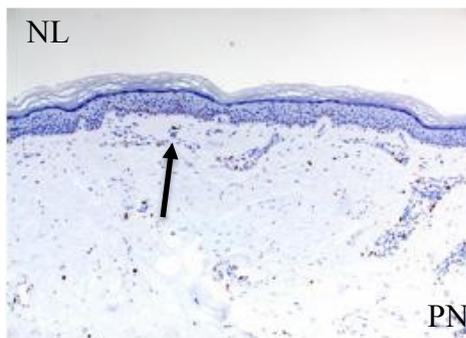
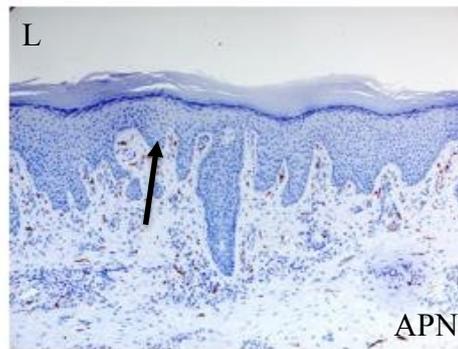
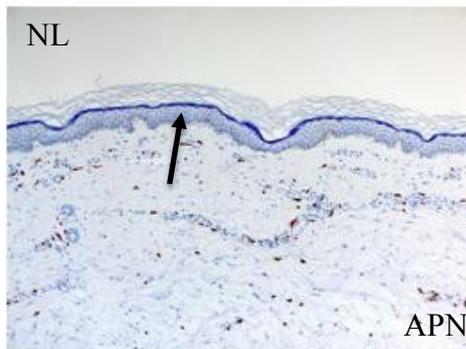
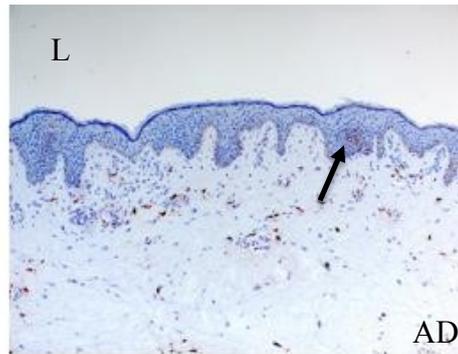
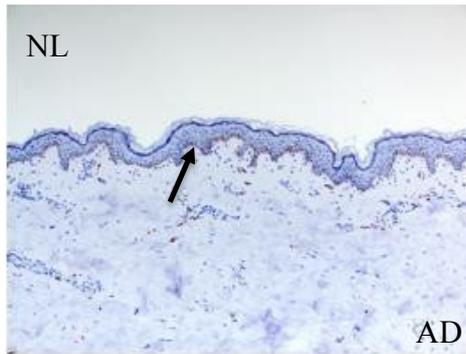


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung von Mast Cell Tryptase (MCT) in Nicht-Läsionaler (NL)-Haut und Läsionaler (L)-Haut von Patienten, AD = Atopische Dermatitis; PN = Prurigo Nodularis; APN = Atopische PN, K = hautgesunde Kontrolle. Die schwarzen Pfeile zeigen exemplarisch auf ein stärkeres Farbsignal der MCT-Färbung.



3.6 Mikrobiomsequenzanalyse

Die Ernährung hat Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms. In dieser Studie waren der Großteil der Studienteilnehmer Omnivore, d.h. es wurden sowohl tierische und pflanzliche Lebensmittel verzehrt. Innerhalb der Gruppe mit Atopischer Dermatitis (AD) ernährten sich 22 % vegetarisch. Bei der Kontrollgruppe gaben 30 %

eine vegetarische (kein Verzehr von Fleisch und Fisch) und 10 % eine vegane, rein pflanzliche Ernährungsform an. 22 % der AD-, 11 % der Prurigo Nodularis (PN)-Patienten nahmen regelmäßig Probiotika ein.

Die Analyse des Stuhlmikrobioms zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Diversität des Mikrobioms.

Die Analyse der Hautabstriche waren nicht auswertbar, da die Negativproben als Referenzwert zu hohe Reads anzeigten und auf eine Verunreinigung hinwies.

IV. Diskussion

Als Ziel dieser Pilotstudie galt es die Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Prurigo Nodularis (PN) im Vergleich zur klassischen Atopischen Dermatitis (AD) und Atopischen PN (APN) herauszuarbeiten, um ein tieferes Verständnis der Entstehung der PN zu erlangen. Aus den Erkenntnissen könnten neue Therapieansätze der PN entstehen. Auch die immunologischen Prozesse der AD sollten näher beleuchtet werden, um eventuell spezifische Therapien daraus abzuleiten. Auf die Erkenntnisse und Folgerungen dieser Arbeit wird im Folgenden detailliert eingegangen.

4.1. Klinische Beurteilung

In dieser Arbeit wurden die Studienteilnehmer der vier Gruppen mit Atopischer Dermatitis (AD), Prurigo Nodularis (PN), Atopische PN (APN) und hautgesunden Kontrollen umfangreich klinisch und anamnestisch untersucht.

PN-Hautläsionen der Patienten waren vor allem am Unterschenkel lokalisiert, wohingegen AD-Läsionen an der unteren Extremität vor allem im Bereich der Kniekehle lokalisiert waren. Die Läsionen der APN waren meist diffus am Unterschenkel verteilt.

Patienten mit beiden Formen der AD und mit PN leiden häufig sehr unter starkem Juckreiz, der meist zu Schlafstörungen führt. Die PN-Patienten gaben den höchsten subjektiven Juckreiz im Vergleich zu den anderen Gruppen an.

Der Pruritus bei der Kontrollgruppe war signifikant niedriger als bei den Patientengruppen, aber mit 0,2 Punkten wurde auch hier Juckreiz angegeben. Die Ursache des angegebenen Juckreizes ist unbekannt. Neben dem Juckreiz führt auch die Stigmatisierung der Patienten mit den genannten Hauterkrankungen zu einer deutlichen Minderung der Lebensqualität, welche durch einen Fragebogen bei allen drei Patientengruppen im Vergleich zur Kontrolle bestätigt wurde.

Um die Unterschiede und die Gemeinsamkeiten zwischen der AD und der PN genauer zu untersuchen, wurden die Patienten auf atopische Komorbiditäten untersucht. In der Gruppe der AD und APN lag, wie zu erwarten, der höchste prozentuale Anteil an Asthma bronchiale und Rhinokonjunktivitis vor. Hierbei war v.a. das mit 71 % der APN-Patienten begleitende Asthma auffällig. Allerdings war bei genauer Befragung der Studienteilnehmer in allen Patienten- und Kontrollgruppen ein Anteil von atopischen Erkrankungen innerhalb der Verwandtschaft ersten Grades

zu erkennen (78 % der AD, 22 % der PN, 86 % der APN, 50 % der K).

Um diese Befunde weiter zu untersuchen, wurden die Allergien der Patienten erfragt und im experimentellen Teil, auf dem im Abschnitt 4.4 noch eingegangen wird, Gesamt-IgE und spezifisches IgE gemessen. Studien zufolge kommt es bei 67 % der Kinder mit AD unter zwei Jahren zu einer Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene und in ca. 10 % zu einer klinischen Allergie (Fölster-Holst, 2011). Bei mittelschwerer und schwerer AD liegt der Anteil an Nahrungsmittelallergien sogar bei 33 % (Fölster-Holst, 2011). Die Allergene richten sich vor allem gegen Kuhmilch, Hühnereiweiß, Fisch, Soja, Nüsse, Erdnüsse und Weizen (Fölster-Holst, 2011, Eller et al., 2009, Weidinger and Novak, 2016). Wie erwartet zeigte sich bei der Untersuchung der Studienteilnehmer ein gehäuftes Vorkommen von Allergien in der Gruppe der AD und APN, mit einer deutlichen Ausprägung von Pollenallergien, was mit dem beschriebenen gehäuften Vorkommen von Rhinokonjunktivitis korreliert. Auch Tierhaar-, Hausstaubmilben und Nahrungsmittelallergien kamen gehäuft vor. Bei Patienten mit PN bestanden die genannten Allergien nicht. Im Gegensatz zu den Sofort-Typ-Allergien, die v.a. in der Gruppe der AD und APN vorkommen, gehören Kontaktallergien zu den sogenannten Typ IV Reaktionen, die T-Zell-abhängig sind und bei denen IgE keine Rolle spielt. Sie traten bei Patienten mit AD, APN und PN auf.

In diversen Studien über Risikofaktoren für die Entstehung von AD werden angegeben: Rauchen und fehlendes Stillen in der frühen Kindheit (Schafer et al., 1997, Fölster-Holst, 2011). Hierbei zeigen unsere Ergebnisse, dass sowohl bei beiden Formen der AD als auch bei der PN beide Risikofaktoren vermehrt von den Patienten dokumentiert wurden.

Da sich die Rekrutierung von PN- und APN-Patienten schwierig erwies, wurden auch Patienten mit systemischer Therapie und topischer Glukokortikoidtherapie mit in die Studie aufgenommen. Die Therapien haben Einfluss auf die epidermale Barriere und auf das Immunsystem, welches im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Möglich wäre auch ein Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms. Zudem gaben 36 % der Studienteilnehmer an, sich nicht an die Vorgaben gehalten zu haben, 24 Stunden vor der Untersuchung nicht zu duschen und keine Hautpflege aufzutragen. Dies beeinflusst u.a. die Untersuchungen der epidermalen Barriere.

4.2 Die Rolle der epidermalen Barriere

Eine gestörte Barrierefunktion spielt eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung der AD (Fölster-Holst, 2011, Foelster-Holst R, 2012), hingegen ist die Bedeutung der epidermalen Barriere bei der PN nicht hinreichend untersucht. Messungen der Hydratation und des Transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) erlauben Rückschlüsse auf den Wasserhaushalt und die Barrierefunktion der Haut (Fluhr et al., 2006). Ein erhöhter transepidermaler Wasserverlust und damit einhergehend die erniedrigte Hydratation lassen sich bei der AD nicht nur in läsionaler, sondern bereits in nicht-läsionaler Haut zeigen (Proksch et al., 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Befunde mit signifikant niedrigeren Werten für die Hydratation und höheren Werten des TEWL im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen. Das ließ sich sowohl in Nicht-Läsionaler (NL)- als auch Läsionaler (L)-Haut aufzeigen. Ein verminderter Wassergehalt in der Haut äußert sich klinisch als trockene, schuppige Haut, was dem Hauptsymptom der AD, der Xerosis, entspricht. Bei der APN zeigte sich eine geringere Hydratation der läsionalen Haut, wobei die Nicht-Läsionaler (NL)-Haut keinen signifikanten Unterschied zu gesunden Kontrollen aufwies. Bei der PN waren sowohl in Nicht-Läsionaler (NL)- als auch Läsionaler (L)-Haut die Hydratation signifikant geringer als bei hautgesunden Kontrollen. Der TEWL in der läsionalen Haut war bei der PN und APN signifikant höher im Vergleich zu Kontrollen. Diese Erkenntnisse zeigen eine Störung der Barriere auch bei der PN und APN, wobei es zu einem geringeren Wassergehalt in der Haut kommt und der Wasserverlust erhöht ist.

Die Messung des TEWLs kann auch durch die Schweißdrüsenaktivität beeinflusst werden (Rogiers and Group, 2001). Deshalb ist es während der Messung wichtig, Schwankungen der Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit möglichst zu vermeiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden konstante Raumbedingungen eingehalten.

Ein weiterer Einflussfaktor ist das Auftragen von Pflegelotionen. Die Patienten wurden aufgeklärt, diese für mindestens 24 Stunden zu meiden, wobei 22 % der AD- und PN-Patienten und 14 % der APN-Patienten angaben, sich in den letzten 24 h eingecremt zu haben. Auch Therapien mit topischen Glukokortikoiden und systemische Immunsuppression haben einen Einfluss auf die epidermale Barriere, indem sie z.B. die Entzündungen in der Haut reduzieren (E. Proksch, 2016). Zum Zeitpunkt der Untersuchung war eine systemische immunsuppressive Therapie bei

22 % der PN-Patienten und 14 % der APN-Patienten vermerkt. Eine topische Glukokortikoid-Therapie wurde von 67 % der AD-, 44 % der PN- und 57 % der APN-Gruppe innerhalb der letzten 4 Wochen angewandt. Somit können die Werte der Hydratation und des TEWLs durch die Einnahme bzw. das Auftragen der genannten Medikamente beeinflusst worden sein, wobei eine vermehrte Hydratation und eine Verminderung des TEWLs im Vergleich der Hautmessung ohne Therapie zu erwarten wäre. Bei der Therapie mit Glukokortikoiden ist hierbei der verminderte TEWL auch auf eine Abnahme der Hautdurchblutung zurückzuführen (E. Proksch, 2016). Die möglichen Ursachen einer verminderten Hydratation und eines erhöhten TEWLs sind vielfältig. Eine veränderte Konzentration und Zusammensetzung der Lipide der Haut oder ein verminderter intrazellulärer Wassergehalt der Korneozyten sind bekannte Einflussfaktoren. Letzterer steht im Zusammenhang mit einem Filaggrin-Mangel, da Abbauprodukte des Filaggrins Wasser binden (Harding et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass bei der PN eine Barrierestörung vorliegt. Wie bei der klassischen AD wäre somit die regelmäßige Feuchtigkeitspflege der Haut bei der PN eine wichtige Säule der Therapie. Eine weitergehende Untersuchung mit einer größeren Anzahl an Studienteilnehmern wäre sinnvoll, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu verifizieren und um weitere Untersuchungen der epidermalen Barriere bei Patienten mit PN durchzuführen.

4.3 Die Rolle von *Filaggrin*-Mutationen

In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass *Filaggrin*-Mutationen häufig mit einem schweren Verlauf der Atopischen Dermatitis (AD) einhergehen und in 50 % der Fälle bei schwerer AD vorkommen (Rodriguez et al., 2009, Weidinger et al., 2006). Abhängig davon ob die *Filaggrin*-Mutationen hetero- oder homozygot vererbt werden, kommt es zu einer reduzierten Filaggrin-Expression oder gar zu einem kompletten Funktionsverlust. Gezeigt werden konnte auch der Zusammenhang einer *Filaggrin*-Mutation im Rahmen einer AD mit dem assoziierten Auftreten von Asthma bronchiale als Teil des atopischen Marsches (Palmer et al., 2006). Hierbei führt der Mangel an intaktem Filaggrin zur Störung der epidermalen Barriere. Hierdurch können Noxen und Allergene der Umwelt vermehrt in die Haut penetrieren, was die Entzündung der Haut begünstigt (Weidinger et al., 2007).

In dieser Arbeit wurden bei den Patienten und hautgesunden Kontrollen die vier häufigsten *Filaggrin*-Mutationen untersucht. Die *Filaggrin*-Mutation S2282del4 kam bei 22 % der AD-Patienten, bei 11 % der PN-Patienten und bei 10 % der Kontrollen vor. In keiner Gruppe wurde eine R2447-, S3247- oder R501 *Filaggrin*-Mutation vorgefunden. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, lag bei der AD, APN und PN eine verminderte Hydratation und ein erhöhter Transepidermaler Wasserverlust (TEWL) vor, was auf eine Störung der epidermalen Barriere hinweist. Dies zeigt, dass die *Filaggrin*-Mutation allein die Pathogenese der AD nicht ausreichend beschreibt (Fölster-Holst, 2011). Vielmehr impliziert es, dass auch andere Faktoren bei der Störung der Barriere eine Rolle spielen. Zudem kann Filaggrin auch sekundär über beispielsweise die Expression bestimmter Zytokine herunterreguliert werden (Howell et al., 2009). Auch mechanische Schäden und niedrige Luftfeuchtigkeit führen zur verminderten Expression von Filaggrin (Weidinger and Novak, 2016). Es sind mittlerweile eine Vielzahl an Mutationen des *Filaggrin*-Gens bekannt. Möglich wäre auch, dass bei Patienten und Kontrollen dieser Studie eine nicht analysierte, seltenere *Filaggrin*-Mutation vorlag. Ebenso Messfehler bei der Analyse der *Filaggrin*-Mutationen sind nicht auszuschließen.

Ob die *Filaggrin*-Mutationen bei der Entstehung der PN eine Rolle spielen, kann aus diesen Daten nicht abgeleitet werden. Zur Klärung dieser Fragestellung müsste eine Studie mit einem größeren PN-Patienten-Kollektiv, die wiederum solche mit und ohne Atopie differenziert, durchgeführt werden.

4.4 Die Rolle des Immunsystems

4.4.1 IgE

Bei 80-90 % der Patienten mit Atopischer Dermatitis (AD) liegt der extrinsische „allergische“ Typ der AD vor, der mit einem erhöhten Gesamt-IgE Spiegel und Nachweis spezifischer IgE-Spiegel einhergeht. Auch die Expression von IL-5 und IL-13 ist bei diesem Typ erhöht, wobei IL-13 zu einer erhöhten Expression von IgE in B-Zellen führt (Akdis et al., 1999). Erhöhtes IgE gegen Inhalationsallergene steht mit der Entwicklung von Rhinokonjunktivitis und Asthma bronchiale allergicum in Verbindung.

Im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen wurde im Blut von AD-Patienten im Rahmen dieser Arbeit ein signifikant erhöhter Gesamt-IgE Spiegel gemessen. Die

Daten der Messung des spezifischen IgEs ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede. Ebenso bestehen keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Prurigo Nodularis (PN) und Atopischen PN (APN) zur Kontrolle oder der Patientengruppen untereinander.

Die Daten können durch verschiedene Faktoren beeinflusst sein. Wie bei allen Messungen sind Messfehler möglich. Auch können immunsuppressive Therapien wie bei 22 % der PN-Patienten und 14 % der APN-Patienten durch Suppression der B-Zellen zu einer verminderten IgE-Expression führen.

4.4.2 Zytokine

Zytokine sind Botenstoffe des Immunsystems und spielen bei der Pathogenese der Atopischen Dermatitis (AD) eine bedeutende Rolle. Der Einfluss bei der Entstehung der Prurigo Nodularis (PN) ist bis heute noch nicht ausreichend geklärt.

IL-4 wird von TH-2-Zellen und Mastzellen sezerniert und bewirkt einen IgE-Isotopenwechsel in B-Zellen, stimuliert die T- und B-Zellen und führt zu einer TH-2-Prädominanz, die für die AD charakteristisch ist (Fölster-Holst, 2011). Ein weiterer Effekt von IL-4 ist die Reduktion der *Filaggrin*-Expression (Howell et al., 2009). Eine signifikant erhöhte IL-4 Expression im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen konnte bei der AD im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Im Vergleich zu nicht-läsionaler Hautarealen innerhalb der Gruppen war die IL-4 Expression sowohl bei der AD, APN und PN in den läsionalen Hautarealen signifikant erhöht. Dies könnte für einen lokalen Prozess mit möglicher Reduktion der *Filaggrin*-Expression und Aktivierung der TH-2-Zellen sprechen.

Bei der PN lag läsional eine erhöhte Expression vor, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch zur AD. Da IL-4 sowohl die T- als auch die B-Zellen stimuliert, könnte dies eine Erklärung für die massive Entzündungsreaktion bei der PN sein. Zugleich hat IL-4 auch ebenfalls eine antiinflammatorische Funktion, indem es die Makrophagen hemmt. Somit könnte der erhöhte IL-4 Spiegel bei der PN auch eine sekundäre Reaktion des Immunsystems auf die Entzündungsreaktion sein, um diese zu mindern.

Im Blut wurde kein signifikant erhöhtes IL-4 gemessen. Dieses Ergebnis könnte ebenso für eine lokale Hautreaktion sprechen.

IL-5 wird vor allem in TH-2-Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten gebildet und spielt eine Rolle bei der Reifung und Aktivierung der Letzteren (Fölster-

Holst, 2011). Im Blut wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen. Die Daten könnten darauf hinweisen, dass IL-5 keine maßgebliche Rolle in der Pathogenese der AD und PN spielt. Allerdings ist eine umfangreichere Studie nötig, um diese Hypothese zu untersuchen. Die Untersuchung der Haut auf eine IL-5 Expression konnte im Rahmen dieser Arbeit auf Grund von nicht ausreichend vorhandenen Biopsiematerial nicht durchgeführt werden. Weitere Studien dazu stehen noch aus. Wobei die Wirksamkeit der Therapie mit IL-5-Antikörpern wie Mepolizumab bei der Behandlung der AD nur geringe Wirksamkeit zeigte (Oldhoff et al., 2005).

IL-13 wird von TH-Zellen, eosinophilen Granulozyten und Monozyten gebildet und ist ein wichtiger Faktor für die IgE-Expression der B-Zellen. Zudem fördert es wie IL-4 die TH-2-Prädominanz (Folster-Holst et al., 2016, Weidinger and Novak, 2016). Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine signifikant erhöhte Expression von IL-13 bei PN- und Atopischen PN (APN)-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Zudem lag in der läsionalen Haut (L) bei der PN eine signifikant erhöhte Expression von IL-13 im Vergleich zu der AD vor. Bei allen drei Patientengruppen (AD, PN, APN) lag läsional (L) im Vergleich zu nicht-läsionalen (NL) Hautarealen eine signifikant erhöhte IL-13 Expression vor. Als Stimulator für die Differenzierung der T-Zellen zu TH-2-Zellen könnte dies bedeuten, dass eine TH-2-Prädominanz nicht nur bei der Pathogenese der AD, sondern auch maßgeblich bei der PN eine Rolle spielt.

Diese Daten unterstützen aktuelle Studien mit Therapieansätze zur Behandlung von PN mit IL-4-Rezeptor Antikörpern wie Dupilumab (Calugareanu A, 2019). Studien über neue Therapieansätze zur Behandlung der AD zeigten Erfolge mit IL-13-Antikörpern wie z.B. *Lebrikizumab* und *Tralokinumab* (Calugareanu A, 2019, Nguyen et al., 2019, Simpson et al., 2018). Diese Antikörper wären laut der Ergebnisse dieser Daten auch eine mögliche Therapieoption für die Behandlung der PN und APN und sollten in weiteren Studien untersucht werden.

Sowohl die AD als auch die PN sind Hauterkrankungen, die durch einen massiven Juckreiz charakterisiert sind. Ein wichtiger Faktor für die Entstehung von Juckreiz ist das IL-31, was vor allem von TH-2-Zellen ausgeschüttet wird (Neis et al., 2006). Zudem führt die Expression von IL-31 zur weiteren Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren und fördert somit Entzündungen (Raap et al., 2011). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen signifikant erhöhte Werte der IL-31

Expression in der läSIONalen Haut der Gruppen mit AD, APN und PN im Vergleich zu hautgesunden Probanden. Vor allem die Expression der beiden PN-Formen waren deutlich erhöht. Dies unterstützt die Forschungsdaten, bei denen die PN höhere Werte von IL-31 aufweisen als die AD (Sonkoly et al., 2006). Zudem lag sowohl bei der AD, also auch bei der APN und PN die IL-31 Expression in den läSIONalen (L) Hautarealen jeweils signifikant erhöht zu den nicht-läSIONalen (NL) Arealen vor. Im Blut waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen. Auch in diesem Fall könnte das für die kutane, lokale Expression von IL-31 sprechen, die nicht im Blut nachzuweisen ist. Ein möglicher Therapieansatz für die AD, APN und PN ist demnach die Blockade von IL-31 durch spezifische Antikörper, beispielsweise durch den Antikörper Nemozumab. Die positive Wirkung des IL-31-R-Antikörpers bei der Therapie der AD wurde mehrfach beschrieben (Ruzicka T, 2017, Nguyen et al., 2019) und sollte in weiteren Studien als Therapieoption für die PN untersucht werden.

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α wird vor allem von Mastzellen gebildet und führt über die Reduktion von freien Fettsäuren und Ceramiden und durch die Induktion von Apoptose der Keratinozyten zur Störung der epidermalen Barriere (Danso et al., 2014). Es wurde im Rahmen dieser Arbeit im Blut gemessen und zeigte eine signifikant niedrigere Konzentration bei AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Diese Daten widersprechen den Ergebnissen anderer Publikationen (Danso et al., 2014). Aufgrund der Störung der epidermalen Barriere würde eher ein erhöhter TNF- α Spiegel im Blut zu erwarten sein. Um Messfehler und Zufallsbefunde bei kleiner Kohorte auszuschließen, wäre eine entsprechende Nachuntersuchung bei einer größeren Kohorte sinnvoll. Bei dieser müsste dann die Compliance der Patienten, vor der Untersuchung keine aufgeführten Medikamente einzunehmen, gewährleistet sein.

Neben dem IL-4 ist Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) ein weiterer Einflussfaktor der Reifung der TH-2- und B-Zellen. Zudem stimuliert TSLP dendritische Zellen und fördert darüber eine TH-2-Prädominanz, die wiederum mit einer erhöhten Freisetzung von IL-31 einhergeht. TSLP wird in HautläSIONen von AD verstärkt exprimiert (Tatsuno et al., 2015), was von den Ergebnissen dieser Arbeit unterstützt wird. Sie zeigen eine signifikant gesteigerte Expression von TSLP bei AD, APN und PN im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen. Zudem liegt eine signifikant erhöhte Expression bei der läSIONalen (L) Haut der AD, APN und PN im Vergleich zu der

nicht-läsionalen (NL) Haut vor. Die Ergebnisse weisen somit ebenfalls auf einen Einfluss von TH-2- und B-Zellen bei der Pathogenese sowohl der AD als auch der PN hin.

Eine erhöhte Mastzellendichte bei Patienten mit AD wurde in verschiedenen Studien beschrieben (Guerra Junior et al., 1995, Barata et al., 1998). Um dies zu untersuchen und die Ergebnisse mit der PN zu vergleichen, wurde die Mast Cell Tryptase (MCT) in der Haut von Patienten mit AD, APN und PN untersucht. Hierbei zeigten sich signifikant erhöhte Werte bei allen drei Patientengruppen im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen. Zudem lag die MCT jeweils in der läsionalen (L) Haut bei Patienten mit AD, APN und PN im Vergleich zur nicht-läsionalen (NL) Haut vor. Somit kommt den Mastzellen sowohl bei der AD als auch bei den beiden Formen der PN eine Rolle in der Pathogenese zu, da die MCT die Mastzellendichte widerspiegelt. Allerdings können die Einnahme, das Auftragen von Medikamenten und das Nicht-Einhalten von Vorlagen im Rahmen dieser Arbeit zu Fehlern führen. Es wäre eine Folgestudie mit einer größeren Kohortenzahl notwendig, um die genannten Ergebnisse zu überprüfen.

4.5 Die Rolle des Mikrobioms

Das Mikrobiom hat vielfältige Einflüsse auf den menschlichen Organismus (Oyama N, 2001, Geoghegan et al., 2018). Ein gesundes Mikrobiom ist durch eine große Diversität charakterisiert (Powers et al., 2015).

Im Rahmen dieser Studie konnten keine signifikanten Unterschiede der Diversität des Stuhl-Mikrobioms zwischen den Gruppen gezeigt werden, allerdings ist die Aussagekraft zum Mikrobiom bei niedriger Patienten-/Probandenanzahl eingeschränkt. Eine Studie mit größerer Probenanzahl wäre erforderlich.

Das Mikrobiom ist von vielen verschiedenen Faktoren beeinflussbar. Die Einnahme von Antibiotika führt beispielsweise zu einer Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung. 11 % der AD-, 22 % der PN-, 14 % der Atopischen PN (APN)-Patienten und 10 % der Kontrollen gaben an, innerhalb der letzten 6 Monate antibiotisch behandelt worden zu sein, was eine Abnahme der Diversität erklären könnte. Verändert wird die bakterielle Zusammensetzung auch durch die Einnahme von Probiotika, die von 22 % der AD- und 11 % der PN-Patienten regelmäßig eingenommen wurden. Auch die Ernährungsform ist ein Einflussfaktor, wobei der

Großteil der Studienteilnehmer sich omnivor ernährte. Einfluss auf das Mikrobiom des Darms haben auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen, die bei 11 % in der PN-Gruppe und 29 % in der APN-Gruppe bekannt waren. Bei den Kontrollen und AD-Patienten waren keine chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bekannt.

Die Hautabstriche konnten nicht ausgewertet werden. Grund hierfür waren Kontaminationen der Negativproben als Referenzwert. Hierfür gibt es mehrere mögliche Ursachen. Eventuell ist der Fehler bei der Durchführung des Hautabstrichs mittels Skin Swab entstanden. Hierfür wurde jeweils ein Skin Swab als Negativkontrolle für 10 sek mit sterilen Handschuhen der Raumluft ausgesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass nicht direkt in Richtung Swab geatmet wurde. Möglicherweise kam es trotz Einhalten der Vorschriften zur Kontamination. Eine weitere Ursache könnte ein Pipettierfehler oder unsteriles Arbeiten bei der Aufreinigung und Isolation der DNA sein. Da es bei dem Messverfahren nicht um quantitative Werte geht und die DNA normalisiert ist, führen schon geringe Mengen an DNA in den Negativproben zu vielen Signalen bei der Analyse, wodurch die Daten nicht auswertbar sind. Letztendlich wäre eine Wiederholung der Messung und Analyse sinnvoll, um mögliche Fehler zu erkennen und zu beheben.

4.6 Zusammenfassung

Die Erkrankungen Atopische Dermatitis und Prurigo Nodularis, in der atopischen und nicht-atopischen Form, sind aufgrund der Stigmatisierung und des quälenden Juckreizes mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität verbunden. Während die Pathogenese und mögliche Ansatzpunkte einer spezifischen Therapie bei der AD bereits gut bekannt sind, sind die Erkenntnisse bei der PN eher lückenhaft.

Um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Atopischen Dermatitis und Prurigo Nodularis herauszuarbeiten, wurden im Rahmen dieser Dissertation umfangreiche klinische Untersuchungen und Analysen der epidermalen Barriere, des Immunsystems, des Mikrobioms und der Molekulargenetik durchgeführt.

Unsere Daten zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Erkrankungen. Erwartungsgemäß war ein signifikant erhöhtes Gesamt-IgE im Serum der Atopischen Dermatitis-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen auffällig, was die atopische Genese unterstreicht. Die beiden T-Helferzell-2-Leitzytokine Interleukin-4 und

Interleukin-13 ließen sich in allen drei Patientengruppen signifikant erhöht in läsionalen Hautarealen im Vergleich zu nicht-läsionalen nachweisen. Eine Signifikanz im Vergleich zu hautgesunden Kontrollen wurde bei der Interleukin-4 Expression bei der Prurigo nodularis erreicht. Die IL-13 Expression war in der Gruppe der Prurigo nodularis (atopisch und nicht-atopisch) ebenfalls im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht. Von den T-Helferzell-2-Interleukinen ist eine suppressive Wirkung auf die *Filaggrin*-Expression bekannt, die mit einer Störung der epidermalen Hautbarriere einhergeht (Howell et al., 2009).

Unsere Ergebnisse zeigen auch Gemeinsamkeiten zwischen der Atopischen Dermatitis und Prurigo Nodularis. Die Hydratation und der Transepidermale Wasserverlust der Haut waren nicht nur bei der Atopischen Dermatitis, sondern auch bei beiden Formen der Prurigo Nodularis erhöht. Es liegen in allen drei Erkrankungen Störungen der epidermalen Barriere vor. Ebenso zeigten alle drei Patientengruppen eine signifikant erhöhte Interleukin-31 Expression in der Haut, was vor allem bei den Prurigoformen auffällig war und auch die subjektive Einschätzung des starken Juckreizes über die Visual Analog Scale in diesen Gruppen widerspiegelt. Eine weitere Gemeinsamkeit der untersuchten Hauterkrankungen ist die signifikant erhöhte Thymic Stromal Lymphopoietin-Expression in allen drei Gruppen, welche die T-Helferzell-2-Zellreifung und Reifung der B-Zellen fördert. Auch die Mast Cell Tryptase als Zeichen der Mastzellichte war bei allen drei Patientengruppen signifikant erhöht und trägt zum Juckreiz bei.

Ein gehäuftes Vorkommen von *Filaggrin*-Mutationen als mögliche Ursache der Barriestörung konnte im Rahmen dieser Studie in keiner Gruppe gezeigt werden. Aufgrund der bei allen Patientengruppen nachweisbaren erhöhten T-Helferzell-2-Interleukine von Interleukin-4, Interleukin-13 und Interleukin-31, die supprimierend auf die Expression des Filaggrin-Proteins wirken, lässt sich die Schädigung der epidermalen Barriere erklären. Zu dieser Schädigung trägt auch das in allen Patientengruppen erhöht gemessene Thymic Stromal Lymphopoietin bei, das von den Keratinozyten freigesetzt wird und die T-Helferzell-2-Prädominanz fördert. Eine verminderte Diversität im Stuhl, wie sie typischerweise bei Patienten mit atopischer Dermatitis gesehen wird, wurde in keiner Patientengruppe festgestellt. Hierfür könnte die niedrige Patientenanzahl der einzelnen Gruppen verantwortlich sein. Die Daten des Haut-Mikrobioms waren auf Grund von verunreinigter Negativproben nicht auswertbar.

Zusammengefasst zeigt unser Pilotprojekt neue Einblicke in die Pathophysiologie der Prurigo Nodularis, die therapeutisch zu nutzen sind. Wie bei den Patienten mit Atopischer Dermatitis sollten auch die Prurigo Nodularis-Patienten regelmäßige Pflegemaßnahmen durchführen. Von der Prädominanz der T-Helferzell-2-Interleukine abgeleitet, ist zudem ein Ansprechen auf spezifische Antikörper gegen die Interleukine oder deren Rezeptoren zu erwarten. So zeigen die ersten Studienergebnisse, dass Interleukin-4-Rezeptor-Antikörper wie z.B. Dupilumab gute therapeutische Ansprechraten.

Als Limitierung dieser Pilotstudie ist die niedrige Patientenzahl in den drei Gruppen zu nennen, die eine multizentrische Studie mit einer höheren Patientenzahlen nach sich ziehen sollte.

V. Literatur

- ACCIOLY-FILHO, L. W., NOGUEIRA, A. & RAMOS-E-SILVA, M. 2000. Prurigo nodularis of Hyde: an update. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 14, 75-82.
- AKDIS, C. A., AKDIS, M., SIMON, D., DIBBERT, B., WEBER, M., GRATZL, S., KREYDEN, O., DISCH, R., WUTHRICH, B., BLASER, K. & SIMON, H. U. 1999. T cells and T cell-derived cytokines as pathogenic factors in the nonallergic form of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 113, 628-34.
- AMON, U., MENZ, U. & WOLFF, H. H. 1994. Investigations on plasma levels of mast cell mediators in acute atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 7, 63-7.
- ASHER, M. I., MONTEFORT, S., BJORKSTEN, B., LAI, C. K., STRACHAN, D. P., WEILAND, S. K., WILLIAMS, H. & GROUP, I. P. T. S. 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, 733-43.
- BARATA, L. T., YING, S., MENG, Q., BARKANS, J., RAJAKULASINGAM, K., DURHAM, S. R. & KAY, A. B. 1998. IL-4- and IL-5-positive T lymphocytes, eosinophils, and mast cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 101, 222-30.
- BELTRANI, V. S. 1999a. Atopic dermatitis: An update. *J Allergy Clin Immunol*, 104, S85-6. BELTRANI, V. S. 1999b. The clinical spectrum of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 104, S87-98.
- BERGER, T. G., HOFFMAN, C. & THIEBERG, M. D. 1995. Prurigo nodularis and photosensitivity in AIDS: treatment with thalidomide. *J Am Acad Dermatol*, 33, 837-8.
- BURRELL-MORRIS, C. W. H. 2000. Atopic dermatitis in migrant populations. *Cambridge University Press*, ed. Atopic Dermatitis, 169-82.
- BUSTIN, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-93.
- CALUGAREANU, A. J. M., LEPELLETIER, C., DE MASSON, A., RYBOJAD, M., BAGOT, M., BOUAZIZ, J. D. 2019. Dramatic improvement of generalized prurigo nodularis with dupilumab. *J Eur Acad Dermatol Venereol*.
- DAMSGAARD, T. E., OLESEN, A. B., SORENSEN, F. B., THESTRUP-PEDERSEN, K. & SCHIOTZ, P. O. 1997. Mast cells and atopic dermatitis. Stereological quantification of mast cells in atopic dermatitis and normal human skin. *Arch Dermatol Res*, 289, 256-60.
- DANSO, M. O., VANDRONGELEN, V., MULDER, A., VANESCH, J., SCOTT, H., VANSMEDEN, J., EL GHALBZOURI, A. & BOUWSTRA, J. A. 2014. TNF-alpha and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents. *J Invest Dermatol*, 134, 1941-1950.
- DERELI, T., KARACA, N., INANIR, I. & OZTURK, G. 2008. Gabapentin for the treatment of recalcitrant chronic prurigo nodularis. *Eur J Dermatol*, 18, 85-6.
- DIEPGENTL, F. M., HORNSTEIN, O. & DIEPGE, 1991. Kriterien zur Beurteilung der atopischen Hautdiathese. *Dermatosen*. *Dermatosen*, 39, 79-83.
- DOMINGUEZ-BELLO, M. G., COSTELLO, E. K., CONTRERAS, M., MAGRIS, M., HIDALGO, G., FIERER, N. & KNIGHT, R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 11971-5.

- E. PROKSCH, D. D., S. DÄHNHARDT-PFEIFFER, R. FÖLSTER-HOLST 2016. Epidermale Barrierestörung bei Dermatosen. *Der Hautarzt*, 11.
- EIGELSHOVEN, S., HOMEY B., STÄNDER S, WEISSHAAR E. 2009. Prurigo nodularis. *CME Dermatologie*, 03/2009.
- EIGENMANN, P. A. 2001. Clinical features and diagnostic criteria of atopic dermatitis in relation to age. *Pediatr Allergy Immunol*, 12 Suppl 14, 69-74.
- EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S., ASCHAUER, H., SCHMOOK, F. P., JENSEN, J. M., MEINGASSNER, J. G. & PROKSCH, E. 1998. Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *J Invest Dermatol*, 111, 517-23.
- ELIAS, P. M. & FEINGOLD, K. R. 2001. Does the tail wag the dog? Role of the barrier in the pathogenesis of inflammatory dermatoses and therapeutic implications. *Arch Dermatol*, 137, 1079-81.
- ELLER, E., KJAER, H. F., HOST, A., ANDERSEN, K. E. & BINDSLEV-JENSEN, C. 2009. Food allergy and food sensitization in early childhood: results from the DARC cohort. *Allergy*, 64, 1023-9.
- FINA, L., GRIMALT, R., BERTI, E. & CAPUTO, R. 1991. Nodular prurigo associated with Hodgkin's disease. *Dermatologica*, 182, 243-6.
- FISCHER, T. W., WIGGER-ALBERTI, W. & ELSNER, P. 2001. Assessment of 'dry skin': current bioengineering methods and test designs. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14, 183-95.
- FLUHR, J. W., FEINGOLD, K. R. & ELIAS, P. M. 2006. Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. *Exp Dermatol*, 15, 483-92.
- FOELSTER-HOLST, D. D., DÄHNHARDT-PFEIFFER, S., PROKSCH, E. 2012. The role of skin barrier function in atopic dermatitis: an update. *Expert Rev Dermatol*, 7, 247- 258.
- FÖLSTER-HOLST, R., GALECKA, J., WEISSMANTEL, S., DICKSCHAT, U., RIPPKE, F., BOHNSACK, K., WERFEL, T., WICHMANN, K., BUCHNER, M., SCHWARZ, T., VOGT, A., LADEMANN, J. & MEINKE, M. C. 2015. Birch pollen influence the severity of atopic eczema - prospective clinical cohort pilot study and ex vivo penetration study. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 8, 539-48.
- FÖLSTER-HOLST, R., PAPA-KONSTANTINOPOULOS, E., RUDRICH, U., BUCHNER, M., PITE, H., GEHRING, M., KAPP, A., WEIDINGER, S. & RAAP, U. 2016. Childhood atopic dermatitis-Brain-derived neurotrophic factor correlates with serum eosinophil cationic protein and disease severity. *Allergy*, 71, 1062-5.
- FÖLSTER-HOLST, R., PAPA-KONSTANTINOPOULOS, E., RUDRICH, U., BUCHNER, M., PITE, H., GEHRING, M., KAPP, A., WEIDINGER, S. & RAAP, U. 2016. Childhood atopic dermatitis-Brain-derived neurotrophic factor correlates with serum eosinophil cationic protein and disease severity. *Allergy*, 71, 1062-5.
- FÖLSTER-HOLST, R., PAPE, M., BUSS, Y. L., CHRISTOPHERS, E. & WEICHENTHAL, M. 2006. Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients. *Allergy*, 61, 629-32.
- FÖLSTER-HOLST, R. S., T., PROKSCH, E.; WEISSMANTEL, S. 2011. *Atopisches Ekzem-Grundlagen und Updates*, UNI-MED.
- FUKUSHI, S., YAMASAKI, K. & AIBA, S. 2011. Nuclear localization of activated STAT6 and STAT3 in epidermis of prurigo nodularis. *Br J Dermatol*, 165, 990-6.

- GENCOGLAN, G., INANIR, I. & GUNDUZ, K. 2010. Therapeutic hotline: Treatment of prurigonodularis and lichensimplex chronicus with gabapentin. *Dermatol Ther*, 23, 194-8.
- GEOGHEGAN, J. A., IRVINE, A. D. & FOSTER, T. J. 2018. Staphylococcus aureus and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. *Trends Microbiol*, 26, 484-497.
- GOEBELER W, W. 2011. *Augenheilkunde Dermatologie HNO*, Springer.
- GONG, J. Q., LIN, L., LIN, T., HAO, F., ZENG, F. Q., BI, Z. G., YI, D. & ZHAO, B. 2006. Skin colonization by Staphylococcus aureus in patients with eczema and atopic dermatitis and relevant combined topical therapy: a double-blind multicentre randomized controlled trial. *Br J Dermatol*, 155, 680-7.
- GUERRAJUNIOR, G., DELUCA, I. M., LEONARDO, M. B. & VILELA, M. M. 1995. Mast cell quantification in the skin of children with atopic dermatitis: its value in diagnosis and in assessing the effectiveness of therapy. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 23, 160-3.
- HARDING, C. R., WATKINSON, A., RAWLINGS, A. V. & SCOTT, I. R. 2000. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci*, 22, 21-52.
- HARRIS, B., HARRIS, K. & PENNEYS, N. S. 1992. Demonstration by S-100 protein staining of increased numbers of nerves in the papillary dermis of patients with prurigo nodularis. *J Am Acad Dermatol*, 26, 56-8.
- HOHMUTH, A. 2012. *Rolle der Keratinozyten beim intraepidermalen Axonwachstum*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- HORSMANHEIMO, L., HARVIMA, I. T., JARVIKALLIO, A., HARVIMA, R. J., NAUKKARINEN, A. & HORSMANHEIMO, M. 1994. Mast cells are one major source of interleukin-4 in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 131, 348-53.
- HOWELL, M. D., KIM, B. E., GAO, P., GRANT, A. V., BOGUNIEWICZ, M., DEBENEDETTO, A., SCHNEIDER, L., BECK, L. A., BARNES, K. C. & LEUNG, D. Y. 2009. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol*, 124, R7-R12.
- HUANG, Y. J., MARSLAND, B. J., BUNYAVANICH, S., O'MAHONY, L., LEUNG, D. Y., MURARO, A. & FLEISHER, T. A. 2017. The microbiome in allergic disease: Current understanding and future opportunities-2017 PRACTALL document of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *J Allergy Clin Immunol*, 139, 1099- 1110.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT, C. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207-14.
- IJIMA, S. 1951. Prurigo nodularis. *Tohoku J Exp Med*, 54, 73-80.
- ILLI, S., VONMUTIUS, E., LAU, S., NICKEL, R., GRUBER, C., NIGGEMANN, B., WAHN, U. & MULTICENTER ALLERGY STUDY, G. 2004. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 925-31.
- JOHANSSON, S. G., BIEBER, T., DAHL, R., FRIEDMANN, P. S., LANIER, B. Q., LOCKEY, R. F., MOTALA, C., ORTEGA MARTELL, J. A., PLATTS-MILLS, T. A., RING, J., THIEN, F., VANCAUWENBERGE, P. & WILLIAMS, H. C. 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 832-6.
- JORIZZO, J. L., GATTI, S. & SMITH, E. B. 1981. Prurigo: a clinical review. *J Am Acad Dermatol*, 4, 723-8.

- JUHLIN, L., MAGNOLDO, T. & DARMON, M. 1992. Expression of floricrin in skin disorders. *Acta Derm Venereol*, 72, 407-9.
- LANGAN, S. M., SILCOCKS, P. & WILLIAMS, H. C. 2009. What causes flares of eczema in children? *Br J Dermatol*, 161, 640-6.
- LANGAN, S. M. & WILLIAMS, H. C. 2006. What causes worsening of eczema? A systematic review. *Br J Dermatol*, 155, 504-14.
- LARSEN, F. S., HOLM, N. V. & HENNINGSEN, K. 1986. Atopic dermatitis. A genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample. *J Am Acad Dermatol*, 15, 487-94.
- LEE, S. H., JEONG, S. K. & AHN, S. K. 2006. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J*, 47, 293-306.
- LEUNG, D. Y. & BIEBER, T. 2003. Atopic dermatitis. *Lancet*, 361, 151-60.
- LOTTS, T. & STANDER, S. 2014. Research in practice: substance P antagonism in chronic pruritus. *J Dtsch Dermatol Ges*, 12, 557-9.
- LÜLLMANN □ RAUCH 2006. *Histologie*, Thieme.
- MCKENZIE, A. W., STUBBING, D. G. & ELVY, B. L. 1976. Pruriginodularis and gluten enteropathy. *Br J Dermatol*, 95, 89-92.
- MENG, L., WANG, L., TANG, H., TANG, X., JIANG, X., ZHAO, J., GAO, J., LI, B., FU, X., CHEN, Y., YAO, W., ZHAN, W., WU, B., DUAN, D., SHEN, C., CHENG, H., ZUO, X., YANG, S., SUN, L. & ZHANG, X. 2014. Filaggrin gene mutation c.3321delA is associated with various clinical features of atopic dermatitis in the Chinese Han population. *PLoS One*, 9, e98235.
- MILGROM, H. 2002. Attainments in atop: special aspects of allergy and IgE. *Adv Pediatr*, 49, 273-97.
- NEIS, M. M., PETERS, B., DREUW, A., WENZEL, J., BIEBER, T., MAUCH, C., KRIEG, T., STANZEL, S., HEINRICH, P. C., MERK, H. F., BOSIO, A., BARON, J. M. & HERMANN, H. M. 2006. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 118, 930-7.
- NGUYEN, H. L., ANDERSON, K. R. & TOLLEFSON, M. M. 2019. New and Emerging Therapies for Pediatric Atopic Dermatitis. *Paediatr Drugs*, 21, 239-260.
- OLDHOFF, J. M., DARSOW, U., WERFEL, T., KATZER, K., WULF, A., LAIFA OUI, J., HIJNEN, D. J., PLOTZ, S., KNOL, E. F., KAPP, A., BRUIJNZEEL-KOOMEN, C. A., RING, J. & DE BRUIN-WELLER, M. S. 2005. Anti-IL-5 recombinant humanized monoclonal antibody (mepolizumab) for the treatment of atopic dermatitis. *Allergy*, 60, 693-6.
- OYAMA, N., SOGAWA, H., KUBO, C. 2001. Antibiotic use during infancy promotes a shift in the T(H)1/T(H)2 balance toward T(H)2-dominant immunity in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 107, 153-159.
- PALMER, C. N., IRVINE, A. D., TERRON-KWIATKOWSKI, A., ZHAO, Y., LIAO, H., LEE, S. P., GOUDIE, D. R., SANDILANDS, A., CAMPBELL, L. E., SMITH, F. J., O'REGAN, G. M., WATSON, R. M., CECIL, J. E., BALE, S. J., COMPTON, J. G., DIGIOVANNA, J. J., FLECKMAN, P., LEWIS-JONES, S., ARSECULERATNE, G., SERGEANT, A., MUNRO, C. S., EL HOATE, B., MCELREAVEY, K., HALKJAER, L. B., BISGAARD, H., MUKHOPADHYAY, S. & MCLEAN, W. H. 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet*, 38, 441-6.
- PAYNE, E. R., WILKINSON, J. D., MCKEE, P. H., JURECKA, W. & BLACK, M. M. 1985a. Nodular prurigo—a clinicopathological study of 46 patients. *Br J Dermatol*, 431-439.

- PAYNE, E. R., WILKINSON, J. D., MCKEE, P. H., JURECKA, W. & BLACK, M. M. 1985b. Nodular prurigo—a clinicopathological study of 46 patients. *British Journal of Dermatology*, 431-439.
- PAYNE, V. & KAM, P. C. 2004. Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia*, 59, 695-703.
- POWERS, C. E., MCSHANE, D. B., GILLIGAN, P. H., BURKHART, C. N. & MORRELL, D. S. 2015. Microbiome and pediatric atopic dermatitis. *J Dermatol*, 42, 1137-42.
- PROKSCH, E., BRANDNER, J. M. & JENSEN, J. M. 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 17, 1063-72.
- PROKSCH, E., FOLSTER-HOLST, R., BRAUTIGAM, M., SEPEHRMANESH, M., PFEIFFER, S. & JENSEN, J. M. 2009. Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis. *J Dtsch Dermatol Ges*, 7, 899-910.
- PROKSCH, E., FOLSTER-HOLST, R. & JENSEN, J. M. 2006. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci*, 43, 159-69.
- PUCCI, S. & INCORVAIA, C. 2008. Allergy as an organ and a systemic disease. *Clin Exp Immunol*, 153 Suppl 1, 1-2.
- RAAP, U., STANDER, S. & METZ, M. 2011. Pathophysiology of itch and new treatments. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 11, 420-7.
- RAAP, U., WEISSMANTEL, S., GEHRING, M., EISENBERG, A. M., KAPP, A. & FOLSTER-HOLST, R. 2012. IL-31 significantly correlates with disease activity and Th2 cytokine levels in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol*, 23, 285-8.
- RAAP, U., WICHMANN, K., BRUDER, M., STANDER, S., WEDI, B., KAPP, A. & WERFEL, T. 2008. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 122, 421-3.
- RAGGI, C. C., VERDERIO, P., PAZZAGLI, M., MARUBINI, E., SIMI, L., PINZANI, P., PARADISO, A. & ORLANDO, C. 2005. An Italian program of external quality control for quantitative assays based on real-time PCR with Taq-Man probes. *Clin Chem Lab Med*, 43, 542-8.
- RODRIGUEZ, E., BAURECHT, H., HERBERICH, E., WAGENPFEIL, S., BROWN, S. J., CORDELL, H. J., IRVINE, A. D. & WEIDINGER, S. 2009. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 123, 1361-70 e7.
- RODRIGUEZ, E. & WEIDINGER, S. 2015. [Genetics of atopic eczema. An update]. *Hautarzt*, 66, 84-9.
- ROGIERS, V. & GROUP, E. 2001. EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14, 117-28.
- RUZICKAT, H. J., FURUEM, PULKAG, MLYNARCZYKI, WOLLENBERGA, GALUSR, ETOH T, MIHARAR, YOSHIDA H, ET AL. 2017. Anti-interleukin-31 receptor A antibody for atopic dermatitis. *Engl J Med*, 826-835.
- SAMOCHOCKI, Z., OWCZAREK, W., RUJNA, P. & RACZKA, A. 2007. Hypersensitivity to aeroallergens in adult patients with atopic dermatitis develops due to the different immunological mechanisms. *Eur J Dermatol*, 17, 520-4.
- SANDILANDS, A., TERRON-KWIATKOWSKI, A., HULL, P. R., O'REGAN, G. M., CLAYTON, T. H., WATSON, R. M., CARRICK, T., EVANS, A. T., LIAO, H., ZHAO, Y., CAMPBELL, L. E., SCHMUTH, M., GRUBER, R., JANECKE, A. R., ELIAS, P. M., VANSTEENSEL, M. A., NAGTZAAM, I., VANGEEL, M., STEIJLEN, P. M., MUNRO, C. S., BRADLEY, D. G., PALMER, C. N., SMITH, F. J., MCLEAN, W. H. & IRVINE, A. D. 2007. Comprehensive

- analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat Genet*, 39, 650-4.
- SCHAFFER, T., BAUER, C. P., BEYER, K., BUFE, A., FRIEDRICH, F., GIELER, U., GRONKE, G., HAMELMANN, E., HELLERMANN, M., KLEINHEINZ, A., KLIMEK, L., KOLETZKO, S., KOPP, M., LAU, S., MUSKEN, H., REESE, I., SCHMIDT, S., SCHNADT, S., SITTE, H., STROMER, K., VAGTS, J., VOGELBERG, C., WAHN, U., WERFEL, T., WORM, M. & MUCHE-BOROWSKI, C. 2014. S3-Guideline on allergy prevention: 2014 update: Guideline of the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI) and the German Society for Pediatric and Adolescent Medicine (DGKJ). *Allergo J Int*, 23, 186-199.
- SCHAFFER, T., DIRSCHIEDL, P., KUNZ, B., RING, J. & UBERLA, K. 1997. Maternal smoking during pregnancy and lactation increases the risk for atopic eczema in the offspring. *J Am Acad Dermatol*, 36, 550-6.
- SCHNEIDER, S. C., METZED, STÄNDERS 2014. Prurigo. Klinische Definition und Klassifikation. *Hautarzt*, 65, 684-690.
- 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.
- SCHLEINITZ, D., DISTEFANO, J. K. & KOVACS, P. 2011. Targeted SNP genotyping using the TaqMan(R) assay. *Methods Mol Biol*, 700, 77-87.
- SCHNEIDER, G., HOCKMANN, J., STANDER, S., LUGER, T. A. & HEUFT, G. 2006. Psychological factors in prurigo nodularis in comparison with psoriasis vulgaris: results of a case-control study. *Br J Dermatol*, 154, 61-6.
- SCHUHNECHT, B., MARZINIAK, M., WISSEL, A., PHAN, N. Q., PAPPALÀ, D., DANGELMAIER, J., METZE, D. & STANDER, S. 2011. Reduced intraepidermal nerve fibre density in lesional and nonlesional prurigo nodularis skin as a potential sign of subclinical cutaneous neuropathy. *Br J Dermatol*, 165, 85-91.
- SIMPSON, E. L., FLOHR, C., EICHENFIELD, L. F., BIEBER, T., SOFEN, H., TAIEB, A., OWEN, R., PUTNAM, W., CASTRO, M., DEBUSK, K., LIN, C. Y., VOUGLARI, A., YEN, K. & OMACHI, T. A. 2018. Efficacy and safety of lebrikizumab (an anti-IL-13 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by topical corticosteroids: A randomized, placebo-controlled phase II trial (TREBLE). *J Am Acad Dermatol*, 78, 863-871 e11.
- SONKOLY, E., MULLER, A., LAUERMA, A. I., PIVARCSI, A., SOTO, H., KEMENY, L., ALENIUS, H., DIEU-NOSJEAN, M. C., MELLER, S., RIEKER, J., STEINHOFF, M., HOFFMANN, T. K., RUZICKA, T., ZLOTNIK, A. & HOMEY, B. 2006. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 117, 411-7.
- STRACHAN, D. P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299, 1259-60. SUAREZ, C., PEREDA, J. M., MORENO, L. M., GARCIA-GONZALEZ, F. & GOMEZ-ORBANEJA, J. 1984. Prurigo nodularis associated with malabsorption. *Dermatologica*, 169, 211-4.
- TANAKA, M., AIBA, S., MATSUMURA, N., AOYAMA, H. & TAGAMI, H. 1995. Prurigo nodularis consists of two distinct forms: early-onset atopic and late-onset non-atopic. *Dermatology*, 190, 269-76.
- TANIS, R., FERENCZI, K. & PAYETTE, M. 2019. Dupilumab Treatment for Prurigo Nodularis and Pruritis. *J Drugs Dermatol*, 18, 940-942.

- TATSUNO, K., FUJIYAMA, T., YAMAGUCHI, H., WAKI, M. & TOKURA, Y. 2015. TSLP Directly Interacts with Skin-Homing Th2 Cells Highly Expressing its Receptor to Enhance IL-4 Production in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*, 135, 3017-24.
- THOMSEN, S. F., ULRİK, C. S., KYVIK, K. O., HJELMBORG, J., SKADHAUGE, L. R., STEFFENSEN, I. & BACKER, V. 2007. Importance of genetic factors in the etiology of atopic dermatitis: a twin study. *Allergy Asthma Proc*, 28, 535-9.
- VAALASTI, A., SUOMALAINEN, H. & RECHARDT, L. 1989. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in prurigo nodularis: a comparative study with neurodermatitis circumscripta. *Br J Dermatol*, 120, 619-23.
- VAIDYA, D. C. & SCHWARTZ, R. A. 2008. Prurigo nodularis: a benign dermatosis derived from a persistent pruritus. *Acta Dermatovenerol Croat*, 16, 38-44.
- WEIDINGER, S., ILLIG, T., BAURECHT, H., IRVINE, A. D., RODRIGUEZ, E., DIAZ-LACAVA, A., KLOPP, N., WAGENPFEIL, S., ZHAO, Y., LIAO, H., LEE, S. P., PALMER, C. N., JENNECK, C., MAINTZ, L., HAGEMANN, T., BEHRENDT, H., RING, J., NOTHEN, M. M., MCLEAN, W. H. & NOVAK, N. 2006. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol*, 118, 214-9.
- WEIDINGER, S. & NOVAK, N. 2016. Atopic dermatitis. *Lancet*, 387, 1109-1122. WEIDINGER, S., O'SULLIVAN, M., ILLIG, T., BAURECHT, H., DEPNER, M., RODRIGUEZ, E., RUEETHER, A., KLOPP, N., VOGELBERG, C., WEILAND, S. K., MCLEAN, W. H., VON MUTIUS, E., IRVINE, A. D. & KABESCH, M. 2008. Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 1203- 1209 e1.
- WEIDINGER, S., RODRIGUEZ, E., STAHL, C., WAGENPFEIL, S., KLOPP, N., ILLIG, T. & NOVAK, N. 2007. Filaggrin mutations strongly predispose to early-onset and extrinsic atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 127, 724-6.
- WEIGELT, N., METZE, D. & STANDER, S. 2010. Prurigo nodularis: systematic analysis of 58 histological criteria in 136 patients. *J Cutan Pathol*, 37, 578-86.
- WERNER, S., BUSER, K., KAPP, A. & WERFEL, T. 2002. The incidence of atopic dermatitis in school entrants is associated with individual life-style factors but not with local environmental factors in Hannover, Germany. *Br J Dermatol*, 147, 95-104.
- WONG, E. & MACDONALD, D. M. 1982. Localized subepidermal fibrin deposition--a histopathological feature of friction induced cutaneous lesions. *Clin Exp Dermatol*, 7, 499-503.
- WORM, M., FORSCHNER, K., LEE, H. H., ROEHR, C. C., EDENHARTER, G., NIGGEMANN, B. & ZUBERBIER, T. 2006. Frequency of atopic dermatitis and relevance of food allergy in adults in Germany. *Acta Derm Venereol*, 86, 119-22.
- ZEIDLER, C., TSIANAKAS, A., PEREIRA, M., STANDER, H., YOSIPOVITCH, G. & STANDER, S. 2018. Chronic Prurigo of Nodular Type: A Review. *Acta Derm Venereol*, 98, 173- 179.
- ZOLLNER TM, B. W.-H., KAUFMANN R 2002. Atopische Dermatitis. *Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin Wien*.

VI. Anhang

7.1. Abkürzungen

Folgende Abkürzungen wurden in dieser Arbeit verwendet:

°C	Grad Celsius
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AD	Atopische Dermatitis
APN	Atopische Prurigo Nodularis
AK	Antikörper
AKK	Antigen-Antikörper-Komplex
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
cm ³	Kubikcentimeter
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Deoxyribonucleotide Triphosphates
DPI3	Dihydrocyclopyrroloindoletripeptide
dsDNA	doppelsträngige DNA
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
F	Fluoreszenzfärbung
Fa.	Firma
FP	Forward Primer
FLG	Filaggrin
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin

HRP	Horseradish-Peroxidase
Ig	Immunoglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
INF	Interferon
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
IL	Interleukin
IL31R	IL-31 Rezeptor
L	Liter
LSAB	Labelled-Strept-Avidin-Biotin
M	Molar
MCT	Mast Cell Tryptase
mg	Milligramm
MGB	Minor Groove Binder
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
N	Newton
ng	Nanogramm (10^{-9} g)
OD	Optische Dichte (Extinktion)
OSCORAD	objective component of SCORAD
p	p-Wert (Signifikanzniveau)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm (10^{-12} g)
pH	potentia Hydrogenii (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PN	Prurigo nodularis
Q	Quencher
qRT-PCR	quantitative real-time PCR (s. PCR)
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
RP	Reverse Primer
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR
SCORAD	Severity Scoring of Atopic Dermatitis
sek	Sekunde
SEM	standard error of the mean
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
ssDNA	einzelsträngige DNA
TH-1	T-Helfer-1
TH-2	T-Helfer-2
TMB	Tetramethyl-Benzidine
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin
USA	United States of America
VAS	Visual Analog Scale
v.a.	vor allem
x	mal
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µl	Mikroliter

7.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

7.2.1 Einschlusskriterien

- Erwachsene über 18 Jahren
- Klinisch diagnostizierte AD oder PN in Patientengruppen
- Zum Zeitpunkt der Untersuchung frische Hautläsionen, vorzüglich am Bein, alternativ am Arm oder Rücken
- Aufklärung und schriftliches Einverständnis

7.2.2 Ausschlusskriterien

- Schwangerschaft und Stillzeit
- Akuter Schub einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung
- Immunsupprimierte Patienten mit AIDS, Lymphome etc.
- Patienten mit akuten viralen oder bakteriellen Infektionen
- Patienten mit begleitenden Hauterkrankungen, die im Bereich der untersuchten Läsionen liegen und die Untersuchung beeinflussen könnten
- Zeitgleiche Teilnahme an einer anderen Studie
- Patienten mit eingeschränkter Compliance
- Patienten mit bekannter Drogenabhängigkeit

7.3 Anhang Methodik

7.3.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Die verwendeten Kits, Primer und Antikörper sind in separaten Punkten aufgelistet.

Chemikalie	Firma, Hauptsitz
Alkohol, 100 %	Th. Geyer GmbH & Co, Berlin, Deutschland
Aqua destillata, Ampuwa®	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
DAB (3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid)	Vector Lab., Burlingame, USA
DNase freies Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eukitt, Eindeckmedium	O.Kindler, Bobingen, Deutschland
Formalin, 4 %	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Glycergel Mounting Medium	DAKO, Santa Clara, USA

Kochsalzlösung, 0,9 %, isoton	Braun, Melsungen, Deutschland
Mayer's Hämalaun-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhypochloritlösung, 12 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Octenisept® Desinfektion	Schülke, Norderstedt, Deutschland
Paraffin (Paraplast®Plus™)	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Salzsäure, 37 %, rauchend	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Shandon Gill III Hematoxylin	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
TE-Puffer, Tris-EDTA Buffer solution	Sigma Aldrich, Missouri, USA
Tris-Puffer (Tris-hydroxymethyl-amino-methan)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vectastain ABC Standard Kit	Vector Lab., Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 3%ig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co, Berlin, Deutschland
Xylonest®, 1 % mit Adrenalin	AstraZeneca, Wedel, Deutschland
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

7.3.2 Puffer und Lösungen

Citratpuffer	
Stammlösung A	9 ml
Stammlösung B	41 ml
Ad 450 ml H ₂ O mit pH-Wert 6,0	

Mit: Stammlösung A: 0,1M Citronensäure-Monohydrat-Lösung (21,01g ad 1000 ml H₂O)

Stammlösung B: 0,1M Natriumcitrat-Monohydrat-Lösung (29,41g ad 1000 ml H₂O)

TBS-Puffer	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	6 g
Natriumchlorid	5 g
Ad 1000 ml H ₂ O mit pH-Wert 7,6	

DAB-Lösung	
H ₂ O	2250 µl
TBS-Puffer	250 µl
DAB	2 Tropfen
Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂	1 Tropfen

7.3.3 Details zum Verfahren der Filaggrin-Mutationsmessung

7.3.3.1 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde der Roboter ChemagicStar® (Fa. Hamilton, Reno, USA) mit dem Chemagic DNA Blood100 Kit (Fa. PerkinElmer, Waltham, USA) verwendet. Die Methode des ChemagicStar® basiert auf DNA-bindenden Magnetkügelchen. Im ersten Schritt wurden die Zellen aufgebrochen. Hierfür wurden 100 µl des EDTA-Bluts in einem 1,5 ml Eppendorf Röhrchen mit 125 µl Lyse-Puffer gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 360 µl des Bindungspuffers und 14 µl der magnetischen Kügelchen zugesetzt und alles gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kügelchen sind mit Polyvinylalkohol, einem stark wirksamen DNA-bindenden Kunststoff beschichtet. Das Gemisch wurde dann für 2 min in ein Magnetfeld des Roboters ChemagicStar® eingebracht. Die Kügelchen mitsamt der daran gebundenen DNA wurden hierdurch an dafür vorgesehenen Magnetstäben fixiert. Der Überstand wurde verworfen. In vier Waschdurchgängen mit Waschpuffer wurden alle nicht gebundenen Zellbestandteile wie Proteine, Zellreste etc. aus dem Gemisch gewaschen. Hierfür wurde zuerst 600 µl des Waschpuffers 3 zugefügt, gemischt, für 1 min inkubiert und dann der

Überstand verworfen. Der gleiche Waschschrift erfolgte nochmals mit 600 µl des Waschpuffers 4 und anschließend erneut mit 1 ml des Waschpuffers 5 bei einer Inkubationsdauer von jeweils 90 sek. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Beendet wurde die DNA-Extraktion durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer und Inkubation von 7 min bei 55°C. Die DNA wurde dadurch wieder von den Kügelchen gelöst und die Kügelchen über den Roboter ChemagicStar® aus dem Gemisch entfernt. Die aufgereinigte DNA mit einem Volumen von ca. 100 µl wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen mit entsprechendem Barcode übertragen.

Um die Konzentration der DNA in der Probe zu überprüfen, erfolgt im Anschluss eine photometrische DNA-Quantifizierung mittels Freedom EVO® (Fa. Tecan, Männedorf, Schweiz). Es wurden 2 µl des DNA-Gemisches verwendet, um die optische Dichte zu bestimmen. Die Messung erfolgte bei einer UV-Wellenlänge von 260 nm. Das Messverfahren basiert auf der Lichtabsorption, welche abhängig von der DNA-Konzentration ist. Je höher die Konzentration in der Probe ist, desto mehr Licht wird absorbiert. Als Leerwert wurde DNA-freies-Wasser verwendet.

7.3.3.2 DNA-Verdünnung und Beladung der PCR-Platten

Die aufgereinigte DNA wurde mit TE-Puffer auf 0,625 ng/µl verdünnt und die PCR-Platten für die Genotypisierung beladen. Hierfür wurden je 5 µl DNA-Lösung pro Mulde auf je vier der 384er-PCR-Platte mithilfe der Pipettierhilfe Bravo (Fa. Agilent Technologies, Santa Clara, USA) aufgebracht. Es wurden vier Platten, je eine Platte pro zu analysierende *Filaggrin*-Mutationen beladen.

Damit sich die DNA auf dem Boden der Platte absetzte, wurden die Platten nach der Bestückung mit spezieller Folie, der sogenannten Thermowell sealing tape for 96 well plates, abgedeckt und mithilfe der Zentrifuge Rotana 460 (Fa. Hettich, Bäch, Schweiz) zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten im Trockenschrank Heraeus UT6200 (Fa. Thermo Fisher scientific, Waltham, USA) bei 60°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Platten dann bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

7.3.3.3 Das Prinzip der Genotypisierung mit TaqMan®

Die PCR dient der Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen und verläuft in folgenden Schritten.

- | | |
|--|-----------|
| 1. Aktivierung der DNA-Polymerase (95°C, 10 min): | 1 Zyklus |
| 2. Denaturierung (95°C, 15 sek): | 45 Zyklen |
| 3. Primer-Hybridisierung und Elongation
(60°C bzw. 62°C für 2282del4, 1 min): | 45 Zyklen |
| 4. Abkühlen (20°C, 10 min) | 1 Zyklus |

Der erste Schritt ist die Aktivierung der hitzestabilen DNA-Polymerase und die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs zu zwei DNA-Einzelsträngen, welche als Matrix für das Ablesen des Enzyms DNA-Polymerase dienen. Es entsteht eine Kettenreaktion, da die abgelesenen Sequenzen in darauffolgenden Schritten als Ausgangssequenzen dienen und somit in kurzer Zeit exponentielle Vervielfältigungen möglich sind.

Zuerst erfolgt die Aktivierung der hitzestabilen DNA-Polymerase durch Erhitzung auf 95°C für 10 min. Der Schritt der Denaturierung wird bei 95°C für 15 sek durchgeführt, wodurch es zum Lösen der Wasserstoffverbindungen kommt, welche die doppelsträngige DNA und Primer zusammenhalten. Um die Rückbildung der Doppelstränge zu verhindern, kommt es danach zu einer raschen Abkühlung auf 60°C und zum nächsten Schritt, nämlich der Primer-Hybridisierung für 1 min (bzw. 62° bei der 2282del4 Mutation). Hier kommt es zu einer spezifischen Anlagerung der komplementären Primer an die DNA. Im nächsten Schritt, der Elongation, liest die DNA-Polymerase die DNA-Matrix ab und synthetisiert komplementäre Einzelstränge durch spezifisches Aneinanderreihen von Nukleotiden. Der Startpunkt des Ablesens ist hierbei das 3'-Ende der angelagerten Primers. Die Schritte zwei und drei werden je 45x wiederholt, so dass es zu exponentieller Vervielfältigung der spezifischen Abschnitte kommt. Am Ende der PCR folgt das Abkühlen auf 20°C für eine Minute.

Die Genotypisierung über das TaqMan® Verfahren ist ein quantitatives PCR (qPCR) Verfahren, das auf PCR-Amplifikationen einer spezifischen DNA-Sequenz basiert. Im Vergleich zur Standard-PCR weist es einige Besonderheiten auf. Schematisch ist das Verfahren in Abbildung 4 dargestellt (Schleinitz et al., 2011).

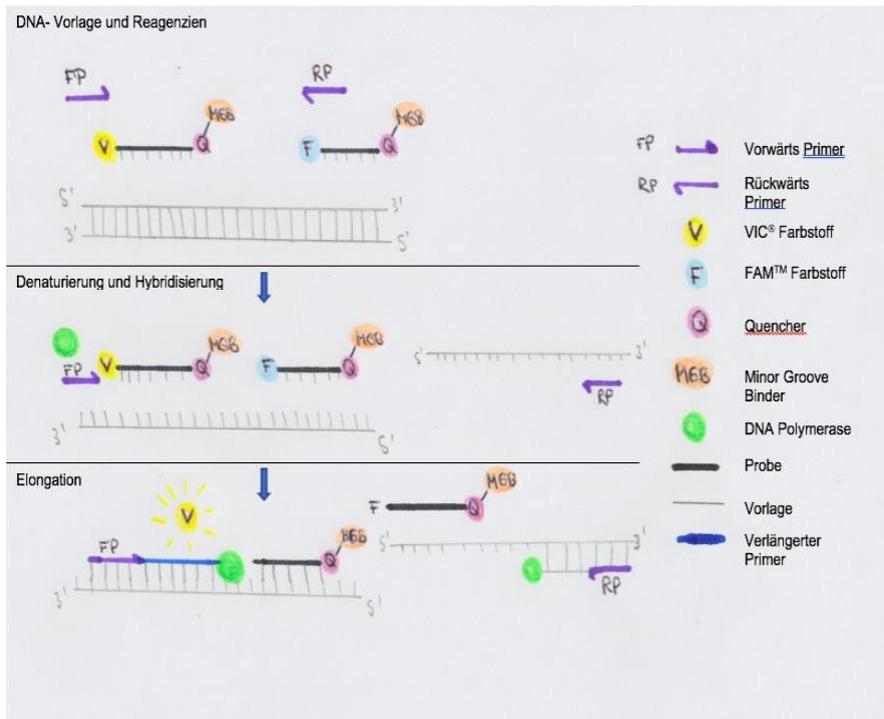


Abbildung 33:
Schematische Darstellung
des TaqMan® Verfahrens
zur Genotypisierung,
modifiziert nach
(Schleinitz et al., 2011).

Für die TaqMan® basierende qPCR werden ein Vorwärts- (FP) und ein Rückwärts-Primer (RP) und zwei mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Sonden eingesetzt. Hierbei trägt eine Sonde zur Detektion der *Filaggrin*-Mutation (Allel X) am 5'-Ende einen VIC®-Farbstoff. Die andere Sonde trägt den FAM™-Farbstoff um das Wildtyp-*Filaggrin*-Allel (Allel Y) zu detektieren. Beide Sonden tragen an ihren 3'-Enden einen nicht-fluoreszierenden Quencher (Q), eine sogenannte Löschesubstanz, der die Fluoreszenz der beiden Farbstoffe VIC® und FAM™ solange unterdrückt, solange beide an der Sonde gebunden sind.

Die qPCR erlaubt über eine Echtzeit-Fluoreszenzmessung die relative Quantifizierung der Genexpression im Vergleich zu ausgewählten Kontroll- bzw. Kalibratorproben (Bustin, 2000). Das Prinzip beruht auf den gebundenen Farbstoffen am 5'-Ende, deren Farbsignal durch den gebundenen Quencher (Q) am 3'-Ende unterdrückt wird. Kommt es während der Hybridisierung der Sonden zur spezifischen, komplementären Anlagerung an die DNA und zum Ablesen der spezifischen Sequenz durch die DNA-Polymerase mit einer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, so wird der Quencher (Q) enzymatisch abgeschnitten. Es kommt dann zu einem Farbsignal, welches mithilfe eines Lasers als Fluoreszenzsignal detektierbar ist. Anhand der unterschiedlichen Wellenlängen können die Farbstoffe VIC® als *Filaggrin*-Mutations-Signal und FAM™ als Wildtyp-Allel-Signal unterschieden

werden. Hierbei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der vervielfältigten RNA-Abschnitte zu (Raggi et al., 2005).

Um die Spezifität der qPCR zu erhöhen, ist am 3'-Ende ein sogenannter Minor Groove Binder (MGB)-Molekül wie z.B. Dihydrocyclopyrroloindoletripeptide (DPI3) gebunden. Er ermöglicht den Einsatz von kurzen Gensonden, indem er beispielsweise den Gensonden-DNA-Komplex stabilisiert. Eine weitere Erhöhung der Spezifität wird durch den Einsatz zusätzlicher Primer erreicht. Bei der Genotypisierung von 2282del4 wurde deshalb ein weiterer Vorwärts-Primer verwendet, welcher komplementär zu einer mittigen Sequenz zwischen den beiden endständigen 3'- und 5'-Primern ist.

7.3.3.4 Durchführung des TaqMan® Verfahren

Für die Durchführung des TaqMan® Verfahrens wurden die vorbereiteten 384er Platten aus Kapitel 2.2.5.2 mit je 5 µl DNA-Lösung pro Mulde (mit 3,125 ng DNA/5µl) aufgetaut und in der Heraeus Megafuge 40R (Fa. Thermo Fisher scientific, Waltham, USA) zentrifugiert. Das Pipettierschema sowie Details der Primer und Gensonden sind im Anhang zu finden. Die Gensonden der R501X und S2282del4 *Filaggrin*-Mutationen wurden von der Arbeitsgruppe selbst designt (Palmer et al., 2006, Sandilands et al., 2007) und der Reaktionsansatz jeweils einzeln zusammengefügt. Der Genotyping Mastermix (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA) beinhaltet hierbei eine AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase, Deoxyribonucleotide Triphosphates (dNTP)s, Puffer und ROX™ als passiver interner Referenzfarbstoff um die Daten zu normalisieren. Die Platten wurden mit je 5µl Reaktionsvolumen pro Mulde bestückt.

Die Gensonden für die *Filaggrin*-Mutationen R2447X und S3247X wurden von der Firma Applied Biosystems, Foster City, USA als fertige Assays verwendet. Es wurde hierfür ein 40-fach konzentrierter Genotyping Assay gewählt, welcher die Primer und Minor Groove Binder (MGB)-Gensonden beinhaltet. Die Platten wurden mit den entsprechenden Reaktionsvolumina des im Anhang dargestellten Pipettierschemas bestückt und erneut zentrifugiert. Der in Kapitel 2.2.5.3 beschriebene PCR-Ablauf wurde mit dem Thermocycler GeneAmp® PCR System 9700 (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Anschließend wurden die Platten erneut zentrifugiert und mit dem 7900HT Fast Real-Time PCR System (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA) gemessen.

7.3.4 Re- und Dehydrierungsprotokolle

7.3.4.1 Dehydrierungsprotokoll

Folgende Schritte wurden zur Dehydrierung durchgeführt. Die verschiedenen Alkohol-Konzentrationen wurden aus 100 %igem Alkohol hergestellt.

1. Formalin 10 %:	2 min
2. Alkohol 50 %:	1 h
3. Alkohol 60 %:	1 h
4. Alkohol 70 %:	1 h
5. Alkohol 96 %:	30 min
6. Alkohol 96 %:	1 h
7. Isopropanol 100 %:	90 min
8. Isopropanol 100 %:	2 h
9. Xylol:	90 min
10. Xylol:	90 min
11. Xylol:	30 min
12. Paraffin:	30 min
13. Paraffin:	1h
14. Paraffin:	1h

7.3.4.2 Entparaffinierungs- und Rehydrierungsprotokoll

Für die Entwässerung wurden die Schnitte zuerst für 40 min bei 68°C im Wärmeschrank (Thermo Fisher scientific, Waltham, USA) erwärmt und folgende Schritte angewandt:

1. Xylol:	2x 5 min
2. Alkohol, 100 %:	2x 1 min
3. Alkohol, 96 %:	2x 1 min
4. Alkohol, 70 %:	2x 1 min
5. Aqua dest.:	2x 1 min

7.3.5 Inhalte der Kits

7.3.5.1 Kits, Reagenzien und Pipettierschema für die TaqMan® Genotypisierung

Zur DNA-Extraktion aus Blut wurde das DNA-Extraktions-Kit *Chemagic DNA Blood100* Kit der Firma PerkinElmer, Waltham, USA mit folgenden Reagenzien verwendet:

Reagenzien des DNA-Extraktionskits ChemagicStar® (Fa. PerkinElmer, Krakau, Polen)
Bindungspuffer
Elusionspuffer
Lysepuffer
Waschpuffer 3
Waschpuffer 4
Waschpuffer 5

Für die TaqMan® Genotypisierung der *Filaggrin*-Mutation wurden neben der Protease der Firma PerkinElmer, Waltham, USA folgende Reagenzien der Firma Applied Biosystems, Foster City, USA verwendet:

Reagenzien für die Genotypisierung (Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA)
FAM-MGB-Gensonde, TaqMan® MGB-Gensonde
Genotyping Assay
Genotyping Master Mix, AmpliTaq Gold® TaqMan® Genotyping Master Mix
Rückwärtsprimer 1, RP, Reverse-Primer 1
Vorwärtsprimer 1, FP 1, Forward-Primer 1
Vorwärtsprimer 2, FP 2, Forward-Primer 2
VIC-MGB-Gensonde, TaqMan® MGB-Gensonde

Für den PCR-Ansatz zur Analyse der R501X und 282del4 *Filaggrin*-Mutationen wurde unter Verwendung der Reagenzien der Firma Applied Biosystems, Foster City,

USA folgendes Pipettierschema angewandt:

Reagenz	Menge (in µl) für PCR-Ansatz der R501X <i>Filaggrin</i>-Mutation	Menge (in µl) für PCR-Ansatz der S2282del4 <i>Filaggrin</i>-Mutation
Genotyping Master Mix	2,5	2,5
FAM-MGB-Gensonde	0,1	0,1
VIC-MGB-Gensonde	0,1	0,1
Vorwärts-Primer 1 (FP1)	0,5	0,23
Vorwärts-Primer 2 (FP2)	-	0,23
Rückwärts-Primer (RP)	0,5	0,23
Aqua dest.	1,3	1,63

Für den PCR-Ansatz zur Analyse der R2447X und S3247X *Filaggrin*-Mutationen wurde folgendes Pipettierschema angewandt:

Reagenz	Menge (in µl) des PCR-Ansatz der R2447X und S3247X <i>Filaggrin</i>-Mutation
Genotyping Master Mix	2,5
Genotyping Assay, 40-fach konzentriert (enthält die Primer und MGB-Gensonden)	0,06
Aqua dest.	2,44

7.3.5.2 Kit für die Zytokinmessung

Für die Zytokinmessungen im Blut wurden folgende Reagenzien der Firma Affymetrix, Santa Clara, USA verwendet.

Reagenzien für Zytokinmessung (Firma Affymetrix, Santa Clara, USA)
Human-Standard-IL-4 als Positivkontrolle
Human-Standard-IL-5 als Positivkontrolle
Human-Standard-IL-31 als Positivkontrolle
Human-Standard-TNF- α als Positivkontrolle
Kalibratorpuffer, Calibrator-Diluent
Probenverdünner, Sample-Diluent
Stopp-Lösung (1M Phosphorsäure), Stop Solution
Streptavidin-HRP
Substrat-Lösung (Tetramethyl-Benzidine), Substrate Solution
Testpuffer Konzentrat (PBS mit 1 % Tween 20 und 10 % BSA), Assay buffer
Waschpuffer Konzentrat (PBS mit 1 % Tween 20), Wash buffer

7.3.5.3 Kit für die IgE-Messung

Folgende ImmunoCAPs und Reagenzien der Firma Thermo Fisher scientific, Waltham, USA wurden für die Messung des Gesamt-IgEs und des spezifischen IgEs verwendet:

Reagenzien zur Messung des Gesamt-IgEs	Produktname (Fa. Thermo Fisher scientific, Waltham, USA)
Aqua dest.	Aqua dest.
Entwicklungslösung	Development solution
Stopplösung	Stop solution
Verdünnungslösung	ImmunoCAP sample diluent
Waschlösung	Washing solution with additive+concentrate
ImmunoCAPs zur Messung des Gesamt-IgEs	
ImmunoCAP Total Anti-IgE (monoklonale Mäuse-Antikörper)	ImmunoCAP Total IgE Anti-IgE (a-IgE)

Konjugat für Gesamt-IgE (monoklonale Mäuse-Antikörper)	ImmunoCAP Total Anti-IgE, β -Galaktosidase-Anti-IgE, 2 μ g/ml
Kalibrator für Gesamt-IgE (humanes IgE in Puffer)	ImmunoCAP Total IgE calibrator strip
Kurvenkontrolle für Gesamt-IgE (humanes IgE in Puffer), Natriumazid 0,05 %, Konservierungsmittel 0,003 %,)	ImmunoCAP Total IgE curve control strip (CC-1+CC-2
Qualitätskontrolle für Gesamt-IgE	ImmunoCAP Total IgE control
ImmunoCaps zur Messung von spezifischem IgE	
Nahrungsmittelscreen	ImmunoCAP Allergen fx5
Inhalationsscreen	ImmunoCAP Allergen sx1
Lieschgras	ImmunoCAP Allergen g6
Roggen	ImmunoCAP Allergen g12
Birke	ImmunoCAP Allergen t3
Beifuß	ImmunoCAP Allergen w6
Dermatophagoides pteronyssinus (Hausstaubmilbe)	ImmunoCAP Allergen d1
Katzenschuppen	ImmunoCAP Allergen e1
Hundeschuppen	ImmunoCAP Allergen e5
Clasdosporium herbarum (Schimmelpilz)	ImmunoCAP Allergen m2
Hühnereiweiß	ImmunoCAP Allergen f1
Milcheiweiß	ImmunoCAP Allergen f2
Kabeljau (Dorsch)	ImmunoCAP Allergen f3
Weizenmehl	ImmunoCAP Allergen f4
Erdnuss	ImmunoCAP Allergen f13
Sojabohne	ImmunoCAP Allergen f14
Konjugat für spezifisches IgE (monoklonale Mäuse-Antikörper), β -	ImmunoCAP specific IgE conjugate 400

Galaktosidase-Anti-IgE, 1µg/ml	
Qualitätskontrolle für spezifisches IgE	ImmunoCAP specific IgE control L
Qualitätskontrolle für spezifisches IgE	ImmunoCAP specific IgE control M
Qualitätskontrolle für spezifisches IgE	ImmunoCAP specific IgE control H
Qualitätskontrolle für spezifisches IgE	ImmunoCAP specific IgE neative control
Kalibrator für spezifisches IgE (humanes IgE in Puffer)	ImmunoCAP specific IgE calibrator strip 0-100
Kurvenkontrolle für spezifisches IgE (humanes IgE in Puffer), Natriumazid 0,05 %, Konservierungsmittel 0,003 %	ImmunoCAP specific IgE curve control strip (CC-1+CC-2)

7.3.5.4 Kits für die Isolation der mikrobiellen DNA und Mikrobiomsequenzierung mit Pipettierschema

Für die Isolation der DNA aus dem Stuhl wurde der *QIAamp DNA Stool Mini Kit* der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland mit folgenden Reagenzien verwendet:

Inhalt des QIAamp DNA Stool Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland)
Spin Column, QIAamp Mini Spin Columns
Sammelröhrchen, Collection Tubes, 2ml
InhibitEX® Tabletten
Puffer ASL
Puffer AL
Puffer AW1
Puffer AW2
Puffer AE

Für die Isolation der DNA aus Hautabstrichen wurden der *Complete 5 MolYsis™ Kit* der Firma Molzym, Bremen, Deutschland mit folgenden Reagenzien verwendet:

Reagenzien des Complete 5 MolYsis™ Kits (Fa. Molzym, Bremen, Deutschland)
β-Mercaptoethanol, Lösung
BugLysis Lösung
Bindungs-Puffer AB, Binding buffer AB
Extraktions-Puffer CM, Extraction buffer CM
Extraktions-Puffer CS, Extraction buffer CS
Extraktions-Puffer DB1, Extraction buffer DB1
Extraktions-Puffer RL, Extraction buffer RL
Extraktions-Puffer RP, Extraction buffer RP
Extraktions-Puffer RS, Extraction buffer RS
Extraktions-Puffer SU, Extraction buffer SU
Extraktions-Puffer WB, Extraction buffer WB
MolDnase B
Proteinase K

Folgende Bakterien sind durch das *Complete 5 MoLYsis™ Kit* der Firma Molzym, Bremen, Deutschland analysierbar:

Durch MoLYsis™ Complete5 Technik detektierbaren Bakterien
Gram-negative bacteria: Acinetobacter, Aeromonas, Bacteroides, Bartonella, Bordetella, Borrelia, Bradyrhizobium, Brevibacterium, Candidatus Neoehrlichia, Citrobacter, Cloacibacterium, Coxiella, Dialister, Edwardsiella, Enterobacter, Escherichia, Fusobacterium, Haemophilus, Klebsiella, Leptotrichia, Methylobacterium, Moraxella, Morganella, Neisseria, Parabacteroides, Paracoccus, Petrobacter, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Ralstonia, Raoultella, Serratia, Sphingomonas, Stenotrophomonas, Veillonella, Weeksella, Zoogloea.
Gram-positive bacteria: Actinomyces, Anaerococcus, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Facklamia, Finegoldia, Gemella, Granulicatella, Lactobacillus, Lactococcus, Leifsonia, Listeria, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Parvimonas, Peptostreptococcus, Propionibacterium, Rothia, Ruminococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Tropheryma, Vagococcus.

Folgendes Pipettierschema für den PCR-Ansatz wurde zur Mikrobiomsequenzierung angewandt:

Reagenz	Menge in µl	Firma
Aqua dest.	4,6	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Puffer aus QIAamp DNA Stool Mini Kit	2,5	Qiagen, Hilden, Deutschland
dNTP Mix, 10 mM, peqGold dNTP Set	0,25	PeqLab, Erlangen, Deutschland
DNA-Polymerase, Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase	0,15	Thermo Fisher, Waltham, USA

Zur Mikrobiomsequenzierung mit *SequalPrep™ Normalization Plate Kit* der Firma Invitrogen, Carlsbad, USA wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenzien des SequalPrep™ Normalization Plate Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)
Bindungspuffer
Waschpuffer
Elutionspuffer

7.3.6 Primer und Gensonden

Tabelle 4: Für die Genotypisierung über das TaqMan® Verfahren der *Filaggrin*-Mutationen R2447, S3247, R501 und S2282del4 wurden folgende FP (Vorwärtsprimer), RP (Rückwärtsprimer) und Gensonden verwendet.

Primer und Gensonden der TaqMan® Genotypisierung der <i>Filaggrin</i> -Mutationen				
Primer und Sonden	Sequenz für R2447X	Sequenz für S3247	Sequenz für R501	Sequenz für S2282del4
VP1	GAAGACAAGG ATCCCACCACAA	AGAAACCATCG TGGATCTGTTCAG	CACTGGAGGAA GACAAGGATCG	T C C C G C C A C C A G C T C C
VP2	-	-	-	CCACTGACAG TGAGGGACATTCA
RP	CCCTCTTGGG ACGTTGAGT	CCGGCTCTGT CTTCGTGATG	CCCTCTTGG GACGCTGAA	GGTGGCTCTG CTGATGGTGA
FAM-Gensonde	FAM-CTGTCTCA TGCCTGC-MGB/BHQ	FAM-CCGTGCCT TACTG-MGB/BHQ	FAM-CACGAGAC AGCTC-MGB/BHQ	FAM-CACAGTC AGTGTCAGGCCA TGGACA-MGB/BHQ
VIC-Gensonde	VIC-CTGTC T C G T G C C TGC-MGB/BHQ	V I C - C C G T G C C T T G A C TG-MGB/BHQ	V I C - C A T G A G A C A G C TCC-MGB/BHQ	V I C - A G A C A CACAGTGCAGG C C A T G GACA-MGB/BHQ

Tabelle 5: Primer für Mikrobiomsequenzierung

Für die Mikrobiom-Sequenzierung wurden FP (Vorwärtsprimer) und RP (Rückwärtsprimer) der Firma Metabion, Planegg, Deutschland verwendet.

Name	Vorwärts-Primer Sequenz
27F-MID-1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAACCGCATT TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGGCCTTTA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGAGTGTGTA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCACAAGTCTA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGTTCCTATA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGGATTA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-7	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCAACACTA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-8	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCACTGATA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-9	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTCGTCATA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-10	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTTGGTACGTA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-11	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGTTGGATTA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-12	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCGTTAAGCTA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-13	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACAGCTCATA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
27F-MID-14	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGACAAGTGTA TGGTAATTGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG

27F-MID-15	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCATTAGCTA TGGTAATTGTAGAGTTTGTATCCTGGCTCAG
27F-MID-16	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGTGGACTTA TGGTAATTGTAGAGTTTGTATCCTGGCTCAG
Name	Rückwärtsprimer-Sequenz
3 38R-MID-A	CAAGCAGAAGACGGCATAACCGGAAAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-B	CAAGCAGAAGACGGCATAAGAGTGACAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-C	CAAGCAGAAGACGGCATACTGACTGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-D	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-E	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTACAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-F	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTGAAAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-G	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-H	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-I	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-J	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-K	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-L	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-M	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-N	CAAGCAGAAGACGGCATACTGTTGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

	CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-O	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTGAAGTCAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-P	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGATCGTAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-Q	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATATGGCCAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTCGATGGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-S	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACGTACGAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-T	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGATCACGTAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-U	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGTGACAGAAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-V	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGAGTGTTCAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-W	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGAGAAGAGAGTCAG TCAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
338R-MID-X	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTGGACAAGTCAGT CAGCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

7.3.7 Antikörper

7.3.7.1 Antikörper für die Immunhistochemie

Folgende Primär-Antikörper mit jeweiligen Verdünnungen wurden im Rahmen der immunhistochemische Färbungen verwendet, TSLP = Thymic Stromal Lymphopoietin, FLG = Filaggrin, AK = Antikörper

Primär-Antikörper	Antikörper-Typ	Spezies	Reagiert mit	Verdünnung mit TSB	Hersteller
Anti-FLG-	polyklonal	Hase	Maus	1:500	Abcam

AK					
Anti-IL4- AK	polyklonal	Hase	Mensch	1:300	Abcam
Anti-IL13- AK	polyklonal	Hase	Mensch	1:100	Abcam
Anti-IL31R- AK	polyklonal	Hase	Mensch	1:200	Abcam
Anti-TSLP- AK	polyklonal	Hase	Mensch	1:400	LifeSpan BioSciences
Anti-Mast Cell Tryptase (AA1)-AK	monoklonal	Maus	Mensch	1:300	Santa Cruz Biotechnology

Folgende Sekundär-Antikörper mit den jeweiligen Verdünnungen wurden im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen verwendet:

Sekundär-Antikörper	Antikörper-Typ	Spezies	Reagiert mit	Verdünnung mit TSB	Hersteller
Hasen-anti-Maus-Antikörper, biotinyllated	polyklonal	Hase	Maus	1:250	DAKO
swine anti-rabbit immunglobulins, biotinyllated	polyklonal	Schwein	Hase	1:600	DAKO

7.3.7.2 Antikörper der Zytokinmessung

Für die Zytokinmessung wurden folgende Antikörper der Firma Affymetrix, Santa Clara, USA verwendet, AK = Antikörper

Antikörper für die Zytokinmessung (Fa. Affymetrix, Santa Clara, USA)

Anti-human-TNF- α -AK, Biotin-konjugiert, monoclonal
Anti-human-IL-4-AK, Biotin-konjugiert, monoklonal
Anti-human-IL-5-AK, Biotin-konjugiert, monoklonal
Anti-human-IL-31-AK, Biotin-konjugiert, monoklonal

Folgendes Pipettierschema wurde zur Zytokinmessung angewendet:

	Negativkontrolle	Standard- Verdünnungsreihe zur Kalibrierung	Patientenprobe
TNF- α	100 μ l Probenverdünner	100 μ l jeweilige Verdünnung von Human-Standard-TNF- α mit Probenverdünner	50 μ l Probenverdünner + 50 μ l Patientenprobe
IL-4	100 μ l Testpuffer	100 μ l jeweilige Verdünnung von Human-Standard-IL-4 mit Testpuffer	50 μ l Testpuffer + 50 μ l Patientenprobe
IL-5	100 μ l Testpuffer	100 μ l jeweilige Verdünnung von Human-Standard-IL-5 mit Probenverdünner	50 μ l Testpuffer + 50 μ l Patientenprobe
IL-31	50 μ l Probenverdünner + 50 μ l Kalibratorpuffer	50 μ l Probenverdünner + 50 μ l jeweilige Verdünnung von Human-Standard-IL-31 mit Kalibrierpuffer	50 μ l Probenverdünner + 50 μ l Patientenprobe

7.4 Verwendete Materialien

Material	Firma, Firmensitz
-----------------	--------------------------

Abdeckung, Adhesive PCR Seal	4titude, Berlin, Deutschland
Abdeckung der PCR Platten, Thermowell sealing tape for 96 well plates	Corning, Amsterdam, Niederlande
Einweg-Hautstanze, Biopsy Punch, 5 mm	Stiefel, Offenbach, Deutschland
Ethicon®-Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Handschuhe, steril, Latex	Ansell, Brüssel, Belgien
Klebevlies, 10 cm x 20 m	BSNmedical, Hamburg, Deutschland
Krankenunterlage, 40 x 60 cm	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Leukomed ®Verband steril 7,2 cm x 5cm	BSN, Hamburg, Deutschland
Leukoplast®	BSN, Hamburg, Deutschland
Lochtuch , 45 x 75 cm	Sengewald, Rohrdorf- Thansau, Deutschland
Magnetkügelchen, Magnetic beads	PerkinElmer, Krakau, Polen
Microwell Plate coated	Affymetrix, Santa Clara, USA
Messplatte, 2µl, DropPlate 96-S	Trinean, Woburn, USA
Monovetten	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mullkompressen, 10 x 10 cm, steril	Beese medical, Petershagen, Deutschland
Mulltupfer, 20 x 20 cm, steril	Beese medical, Petershagen, Deutschland
Objektträger SuperFrost® Plus	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
PCR-Platte, 384 well plate full skirt	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Platte, 96 PCR plate half skirt flat	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipette, Reference® fixed volume pipette 1-10/ 10-100/ 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette, Research® pro Multichannel 5- 100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, 5ml CoRe Tips without	Hamilton, Reno, USA

Filters	
Pipettenspitzen, 1000µl CoRe Tips with and without Filters	Hamilton, Reno, USA
Pipettenspitzen, Biosphere® Filter Tips 0,1-20µl/ 2-100µl/ 100-1000µl	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, Reference® fixed volume pipette 1-10/ 10-100/ 100-1000 µl	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen für Roboter, Robotic Pipet Tips 70µl	Corning, Amsterdam, Niederlande
Röhrchen mit Barcode, 1,4 ml	Micronic, Lelystad, Niederlande
Röhrchen, Eppendorf Tube, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Röhrchen, 1,5 ml, Elusion tubes,	Molzym, Bremen, Deutschland
Röhrchen, 1,5 ml Micro tubes, Biosphere®, DNA-frei	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen, 2,0 ml Micro tubes, Biosphere®	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen, 2,0 ml, Spin column	Molzym, Bremen, Deutschland
Röhrchen, 13 ml Elutions Tubes	Micronic, Lelystad, Niederlande
Röhrchen, 50 ml	Micronic, Lelystad, Niederlande
Röhrchen, 50 ml, Greiner CELLSTAR®, steril	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sammelröhrchen, 2,0 ml, Collection tubes	Molzym, Bremen, Deutschland
Stuhlröhrchen ohne Stabilisator	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
Stuhlröhrchen mit Stabilisator	Startec, Berlin, Deutschland
Stuhlröhrchen, Versandröhrchen mit Schraubverschluß	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly® 21G 200mmlang	Starstedt, Nümbrecht, Deutschland
Staugurt	Prämeta, Troisdorf, Deutschland

Syringe, 5 ml	BD Discardit, Haryana, India
Swab, Catch-all Sample Collection	Epicentre, Madison, USA
Verdünnungsplatte (96er-Mikrotiterplatte), dilution plate	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA

VII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vor allem danke ich Frau Prof. Dr. Fölster-Holst für die Idee, die Motivation, die Anleitung, die Inspiration und Betreuung dieser Arbeit. Danken möchte ich auch Herrn Prof. Franke und Herrn Prof. Proksch für die Unterstützung und Betreuung.

Des Weiteren möchte ich dem RTG 1743 mit all seinen Mitwirkenden danken, dem ich mein Promotionsstipendium verdankt habe und worüber ich viel Inspiration, Unterstützung und Wissen erfahren habe. An dieser Stelle ein Dank an Frau Zell für all ihre Hilfe.

Dank auch an das Institut für Medizinische Informatik und Statistik des UKSH Kiel, insbesondere an Frau Dr. Freitag-Wolf für die hilfreiche und großzügige Unterstützung.

Danke auch an die Arbeitsgruppen von Frau Prof. Fölster-Holst, Prof. Proksch, Dr. Schwarz und Prof. Weidinger für die freundliche und motivierende Unterstützung und Hilfe, insbesondere Herrn Dr. Baurecht, Frau Harder, Frau Neumann, Frau Dr. Rodriguez und Herrn Voss.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch beim Team des Instituts für Klinische Molekularbiologie (IKMB) des UKSH Kiel für die tolle Unterstützung, besonders Herrn Hauptmann, Frau Dr. Heinsen-Groth, Herrn Rühlemann, Frau Urbach und Frau Wulf.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Reimer, Frau Hüppop und Frau König für unsere Zusammenarbeit bei diesem Projekt und Frau Dr. Rosenthal und Frau Dr. Thielking für deren große Unterstützung bei der Generierung der Patientengruppen und Probeentnahmen.

Mein tiefer Dank geht auch an die Patienten für deren Mitarbeit und Bereitstellung von Gewebeproben und deren Zeit, die sie für das Gelingen des Projekts zur Verfügung gestellt haben.

Meiner Familie und meinen Freunden gilt mein Dank für den Beistand, die Motivation und Unterstützung, vor allem meinem Vater, der mir all die Jahre den Rücken freigehalten hat, um meine beruflichen Ziele zu verfolgen. Große Dankbarkeit fühle ich auch für meine Tochter, die mir die Zeit und den Raum gibt, meiner Berufung zu folgen und mich stets an das Wesentliche des Lebens erinnert.