

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein

(Direktor: Prof. Dr. med. Tilo Biedermann)

Untersuchung zur Hautbarriere bei Atopischem Ekzem und Filaggrinmutation

Helene Sophie Scheer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Martin Mempel
2. Prof. Dr. Tilo Biedermann

Die Dissertation wurde am 28.11.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.08.2017 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen	4
1. Einleitung	7
1.1 Definition und Klinik des Atopischen Ekzems	7
1.2 Epidemiologie des Atopischen Ekzems	11
1.3 Immunologische Besonderheiten des Atopischen Ekzems	11
1.4.1 Aufbau der Haut- „Brick and mortar“ Modell	15
1.4.2 Stratum corneum Hydrierung beim Atopischen Ekzem	17
1.4.3 Verschiebungen des Haut-pH-Wertes beim Atopischen Ekzem	19
1.4.4 Störungen des epidermalen Lipidstoffwechsels beim Atopischen Ekzem	20
1.4.5 Filaggrin – Von der Translation zur Prozessierung	24
2. Problemstellung	28
3. Material und Methodik	29
3.1. Studiendesign und Untersuchungskollektiv	29
3.2. Klinische Untersuchungen	30
3.3.1 Messprinzip des TEWAMETER TM 210	30
3.3.2 Messmethode des TEWAMETER TM 210	31
3.4.1 Messprinzip des Haut-pH-Meters	32
3.4.2 Die pH-Messmethode	32
3.5.1 Messprinzip des Corneometers	33
3.5.2 Messmethode des Corneometers	33
3.6 Gewinnung der Stratum Corneum Lipide	34
3.7 Trennung der Stratum Corneum Lipide mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC)	34
3.8 Prinzip des NLS Irritationstests	34
3.9 Statistik	35
3.10 Pilotversuch zur Bestimmung der Penetration von Allergenen	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Ergebnisse der SCORAD Messungen im Gruppenvergleich	36
4.2 Ergebnisse der TEWL Messungen im Gruppenvergleich	37
4.3 Ergebnisse der Capacitancebestimmungen	37
4.4 Ergebnisse der Haut-pH-Messungen	38
4.5 Ergebnisse der Lipidmessungen	40
4.6 Ergebnisse des NLS-Tests	43
4.7 Ergebnisse der Allergen-Penetrationsversuche	43

5.	Diskussion	45
5.1	Einfluss von Filaggrinmutationen auf klinische Charakteristika des Atopischen Ekzems	45
5.2	Einfluss von Filaggrinmutationen auf biophysikalische Parameter der Hautbarriere	46
5.3	Einfluss von Filaggrinmutationen auf das epidermale Lipidprofil	55
5.4	Etablierung eines Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Penetration von Allergenen	65
5.5	Dermato-allergologische Relevanz der Befunde	70
6.	Zusammenfassung	73
	Literaturverzeichnis	74
	Danksagungen	95

Verzeichnis der Abkürzungen

A	α -hydroxy Fettsäure
ABCA12	ATP-binding cassette sub-family A member 12
AE	Atopisches Ekzem
Ag	Argentum lat. (= Silber deut.)
AU	Arbitrary Units
Ca ²⁺	Calciumionen
CD36	Cluster of Differentiation 36
CE	Cornified Envelope
Cer	Ceramid
CerS	Ceramid Synthase
CHILD	Akronym für Congenital Hemidysplasia with Ichthyosiform erythroderma and Limb Defects engl. (= Kongenitale Hemihyperplasie mit ichthyosiformer Erythrodermie und Gliederdefekten deut.)
Chol	Cholesterol
CLE	Cornified Lipid Envelope
CS	Cholesterol Sulfat
cm	Centimeter
CMC	Critical Micelle Concentration engl. (kritische Mizellkonzentration)
DC	Dendritic Cell engl. (= dendritische Zelle deut.)
DES	Dihydroceramide Desaturase
DNCB	2,4-Dinitrochloro-Benzene
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DS	Dihydrosphingosine
DSG	Desmoglein
EAACI	European Academy of Allergology and Immunology
EO	Esterified ω -hydroxy fatty acid = veresterte ω -hydroxy Fettsäure
Fa.	Firma
FATP	Fatty Acid Transport Protein engl. (= Fettsäure-Transportprotein deut.)
FFA	Free Fatty Acid engl. (= Freie Fettsäuren deut.)
FLG	Filaggrin
FLGmut	Genotyp mit Filaggrinmutation
FLGwt	Genotyp ohne Filaggrinmutation (=Wildtyp)
ft	flaky tail
g	Gramm
GlcCer	Glucosyceramide

GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor engl. (= Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor deut.)
h	hora lat. (= Stunde deut.)
H	6-hydroxy sphingosine
H ⁺	Hydroniumionen
hBD2	humanes Beta-Defensin-2
HPTLC	high-performance thin-layer chromatography engl. (= Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie deut.)
HOPE	HEPES-Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect
IDEC	Inflammatory dendritic epidermal Cell engl. (= inflammatorische dendritischen epidermalen Zellen deut.)
Ig	Immunglobulin
ISAAC	The International Study of Asthma and Allergies in Childhood
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KIF	Keratin Intermediat Filament
Kont	Klinisch gesunde Probanden = Kontrollen
LB	Lamellar Bodies engl. (= Lamellarkörperchen deut.)
LDL	Low Density Lipoprotein engl. (= Lipoprotein niederer Dichte deut.)
LEKTI	Lympho-Epithelial Kazal Type Inhibitor
LEP	Leptin Protein
LL-37	humanes Cathelicidin
m ²	Quadratmeter
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
µm	Mikrometer
mRNS	messenger RNS
MS	Massenspektrometer
N	Non-hydroxy Fettsäure
N	Newton
Na ⁺	Natriumion
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NLS	Natriumlaurylsulfat
NMF	Natural Moisturizing Factors
NSDHL	NAD Dependent Steroid Dehydrogenase-Like Enzyme engl. (= NAD abhängige Steroid Dehydrogenase ähnliches Enzym deut.)
oSCORAD	objektiver SCORAD Score

OVA	Ovalbumin
P	Phytosphingosine
PAD	Peptidylarginin Deiminasen
PAR2	Proteinase-activated receptors-2 engl. (= Proteinase aktivierte Rezeptoren-2 deut.)
PCA	Pyrrolidon Carboxylsäure
PCR	Polymerase Chain Reaction engl. (= Polymerase-Kettenreaktion deut.)
pH	potentia hydrogenii
PLA2	Phospholipase A2
RNS	Ribonukleinsäure
S	Sphingosine
SB	Stratum basale
SC	Stratum corneum
SG	Stratum granulosum
SCORAD	Severity Scoring of Atopic Dermatitis Score
SM	Sphingomyelin
SPC	Sphingosylphosphorylcholine
sPLA2	sekretorische Phospholipase A2
SR-B1	Scavenger-Rezeptor B1 (HDL Rezeptor)
STD	Standart
TEWL	Transepidermal Water Loss engl (= Transepidermaler Wasserverlust deut.)
TGM	Transglutaminasen
TLC	Thin Layer Chromatography engl. (= Dünnschichtchromatographie deut.)
TOF	Time of Flight engl. (= Flugzeitanalyse deut.)
TU	Technische Universität
®	Registered engl. registrierte Marke
Th	Subgruppe der T-Helfer-Zellen
TM	Trade Mark
Treg	regulatorischen T-Zellen
UCA	Urocanic Acid engl. (= Urocaninsäure deut.)
U.K.	United Kingdom
UV	Ultraviolett
WAO	World Allergy Organization
wt	Wildtyp
w/v	Weight/Volume Percentage Concentration engl. (= Gewicht/Volumen prozentuale Konzentration deut.)
XP5	Eigenname für Protein, das an den CE bindet

1. Einleitung

1.1 Definition und Klinik des Atopischen Ekzems

Der Begriff Atopie leitet sich von dem griechischen Wort *atopos* ab und bedeutet „nicht am richtigen Platz“ oder „seltsam“. Er wurde 1923 eigens für die Beobachtungen von Coca und Cooke kreiert, die damit eine abnorme Hypersensitivitätsreaktion gegen ursprünglich harmlose Umweltsubstanzen beschreiben wollten. Wichtig war ihnen dabei die Abgrenzung zur Anaphylaxie und Allergie im Sinne einer Serumkrankheit (Coca & Cooke, 1923). Seitdem variierte die Begriffsdefinition stark und ist Gegenstand andauernder Kontroversen. 2004 schlug eine Arbeitsgruppe der EAACI eine Definition vor, die von der World Allergy Organization (WAO) überarbeitet und wie folgt veröffentlicht wurde (Johansson *et al.*, 2004):

„Atopie bezeichnet eine individuelle und/oder familiär bedingte Tendenz, sich zu sensibilisieren und schon auf geringe Dosen von Allergenen, meist Proteine, IgE-Antikörper zu produzieren. Als Konsequenz können solche Individuen dadurch typische Symptome wie Asthma, Rhinokonjunktivitis oder Ekzeme entwickeln. Die Begriffe „Atopie“ und „atopisch“ sind reserviert für die Beschreibung der genetischen Prädisposition, eine IgE-vermittelte Sensibilisierung zu entwickeln, die bereits durch eine normale Exposition erfolgt, bei der man sonst keine anhaltende IgE Antwort bildet. Folglich ist die Atopie die klinische Manifestation einer hohen IgE-Antikörper Antwort. Allergische Symptome, die bei einem atopischen Individuum auftreten, können als „atopisch“ bezeichnet werden, z.B. „atopisches Asthma“. Trotzdem sollte IgE-mediertes Asthma nicht generell atopisches Asthma genannt werden. Weder ein positiver Haut-Pricktest noch das Vorhandensein von IgE-Antikörpern per se sollten als Indikatoren einer atopischen Konstitution angesehen werden.“

Ähnlich kompliziert verhält es sich mit der Begriffsdefinition des Ekzems. Ursprünglich abgeleitet von dem griechischen Wort „*ekzein*“, welches „auskochen“ oder „ausbrühen“ bedeutet, beschrieb Aetius von Amida im 6 Jhdt. n.Chr. Hautveränderungen mit primär pustulärem Aspekt. Seit Willan im 19 Jhdt. den Begriff Ekzem zur Beschreibung von bläschenartigen Läsionen erneut verwendete, sorgt er mangels einer konkreten Definition bis heute für Unklarheiten insbesondere bei der Unterscheidung zur Dermatitis. Aus diesem Grund wurde sogar zu dessen Streichung aus dem dermatologischen Vokabular aufgerufen (Ackerman & Ragaz, 1982). Zur Differenzierung dieser beiden Begriffe finden sich mehrere Stellungnahmen in den gängigen Lehrbüchern der Dermatologie, aus denen sich folgendes herauslesen lässt:

Unter einer Dermatitis versteht man eine akut bis chronische Hauterkrankung, die sich in der Epidermis und im Korium abspielt. Sie geht mit Rötung, Schwellung, Bläschenformationen, Nässe sowie Krustenbildung einher und kann schnell heilen. Ein Ekzem hingegen ist in der Epidermis bis Dermis lokalisiert, lässt sich auf chronische Auslöser zurückführen, geht mit Rötung, Akanthose, Schuppung sowie Lichenifikation einher und hat eine geringe Tendenz zur Regression (Altmeyer & Paech, 2010; Braun-Falco, Plewig, Wolff, Burgdorf, & Landthaler, 2005). Die Definition ist weit gefasst, sodass man oft an Hebras Feststellung von 1892 denkt (Altekrueger & Ackerman, 1994):

“Eczema is that which looks like eczema”

Die aktuellste Definition fußt auf der Veröffentlichung von Johansson *et al.* (Johansson *et al.*, 2004) und wird von der WAO wie folgt empfohlen:

„Der Oberbegriff für eine lokale entzündliche Reaktion der Haut sollte Dermatitis sein. Der Kontakt mit Haptenen kann eine sog. Th1 vermittelte allergische Kontaktdermatitis verursachen. Die nicht-allergische Variante wird als irritative oder toxische Kontaktdermatitis bezeichnet. Darüber hinaus gibt es noch andere Formen von Dermatitis wie z.B. die Stase-Dermatitis oder die seborrhoische Dermatitis. Was gewöhnlich als „Atopisches Ekzem/Dermatitis“ bekannt ist, ist nicht eine einzige Krankheit, sondern eine Aggregation verschiedener Krankheiten mit bestimmten gemeinsamen Charakteristika. Ein besser passender Ausdruck dafür wäre Ekzem. Die Form, die bei einer Person mit atopischer Konstitution, d.h. mit bekannter Sensibilisierung und/oder mit allergischem Asthma und/oder Rhinokonjunktivitis einhergeht, sollte atopisches Ekzem oder atopische Dermatitis genannt werden.“

Da es keine pathognomonischen Laborwerte/Biomarker oder hochspezifischen Hautveränderungen gibt, die eine eindeutige Diagnose erlauben würden, wird diese nach wie vor klinisch-phänomenologisch gestellt. Grundlegend ist die ausführliche dermatologische Untersuchung (Boguniewicz & V.S., 2002). Das klinische Bild setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Maßgebend sind die typische Morphologie der Hautveränderungen, deren alterstypische Verteilung und ein starker Juckreiz, wie laut der Definition von Ring *et al.* 1982 unter anderem gefordert wird (Tab. 1). Sind mindestens vier von den sechs genannten Kriterien erfüllt, kann die Diagnose gestellt werden.

Tabelle 1

Diagnosekriterien für das Atopische Ekzem nach Ring (Ring, 1982)

- Ekzematöse Hautveränderungen
- Pruritus
- Typische Lokalisation (altersentsprechend)
- Atopie Stigmata
- Positive Eigen- und Familienanamnese für Erkrankungen des atopischen Formenkreises
- IgE vermittelte allergische Sensibilisierungen

Zur Abklärung allergischer Sensibilisierungen werden Haut-Prick-Testungen sowie Messungen der gesamten und der allergenspezifischen IgE-Werte durchgeführt.

Für epidemiologische Studien, bei denen die dermatologische Untersuchung als Goldstandard aus logistischen Gründen nicht durchführbar ist, wurden in den letzten Jahrzehnten mehrere detailreiche Diagnosekriterien entwickelt (Hanifin & Rajka, 1980; Ring, 1982; H. C. Williams *et al.*, 1994), von denen die Hanifin und Rajka Kriterien (Tab. 3) (Hanifin & Rajka, 1980) sowie die Kriterien der U.K. Working Party (H. C. Williams *et al.*, 1994) (Tab. 2) am weitesten verbreitet - insbesondere bei Studien - eingesetzt werden.

Tabelle 2

Diagnostische Kriterien für das Atopische Ekzem der U.K. Working Party (H. C. Williams *et al.*, 1994)

Hauptkriterium: Juckreiz der Haut in den letzten 12 Monaten
Nebenkriterien (mindestens drei):
I Beginn vor dem zweiten Lebensjahr*
II Beteiligung der Beugeseiten in der Vorgeschichte
III Generell trockene Haut in der Vorgeschichte
IV Andere atopische Erkrankungen in der persönlichen Vorgeschichte**
V Sichtbare Dermatitis der Beugeseite, fotografisch dokumentiert.
* nicht zur Verwendung bei Kindern unter vier Jahren.
** bei Kindern unter vier Jahren, kann man die Frage nach einer atopischen Erkrankung eines Verwandten ersten Grades stellen.

Tabelle 3

Die Kriterien nach Hanifin und Rajka für die Diagnose des Atopischen Ekzems (Hanifin & Rajka, 1980)

Mindestens drei Hauptkriterien	
- Pruritus	
- Typische Morphologie und Verteilung	
- chronisch oder chronisch rezidivierend	
- Atopie in Eigen- oder Familienanamnese	
Mind. 3 Nebenkriterien	
- Xerosis cutis	- Anteriorer subcapsulärer
- Ichthiosis/ palmare	- Katarakt
- Hyperlinearität/ Keratosis pilaris	- Orbitale Hyperpigmentierung
- erhöhter IgE Spiegel	- Gesichtsbilasse, Gesichtserthem
- früher Krankheitsbeginn	- Pityriasis alba
- Tendenz zu Hautinfektionen	- Anteriore Nackenfalte
- Tendenz zu unspezifischer Hand/Fußdermatitis	- Pruritus beim Schwitzen
- Mamillenekzem	- Intoleranz von Wolle
- Cheilitis	- Perifollikuläre Akzenturierung
- rezidivierende Konjunktivitis	- Nahrungsmittelunverträglichkeit
- Dennie-Morgan Falte	- Kausaler Zusammenhang mit emotionaler Belastungs- situation
- Weißer Dermographismus	
- Keratoconus	

Die Vereinfachung und Standardisierung der Diagnosestellung geht allerdings mit einem gewissen Verlust an Spezifität und Reliabilität einher. Zur Erfassung des differenzierten Schweregrades wurde ergänzend der SCORAD (Severity Scoring of Atopic Dermatitis) (European Task Force on Atopic Dermatitis, 1993) (Abb.1) entwickelt, mit dem man sowohl subjektiv als auch objektiv die aktuelle Ausprägung der Erkrankung erfassen kann. Semiquantitativ wird er aus drei Informationen (A,B,C) berechnet. Die flächenhafte Ausdehnung (A) wird mit Hilfe der „Neuner Regel“ von Wallace (Abb.1) prozentual erfasst (Wallace, 1951).

Die vorhandenen Symptome werden in sechs Kategorien differenziert (B): Erythem, Ödem/ Papelbildung, Nässen/ Krustenbildung, Exkoration, Lichenifikation und Trockenheit. Die Intensität wird jeweils von 0-3 bewertet und anschließend addiert. (0=keine Symptome; 1=mild; 2=moderat; 3=stark) Als Index für die Lebensqualität werden der Juckreiz und der Schlafverlust jeweils auf einer Skala von 1-10 erfasst und deren beide Werte addiert (C).

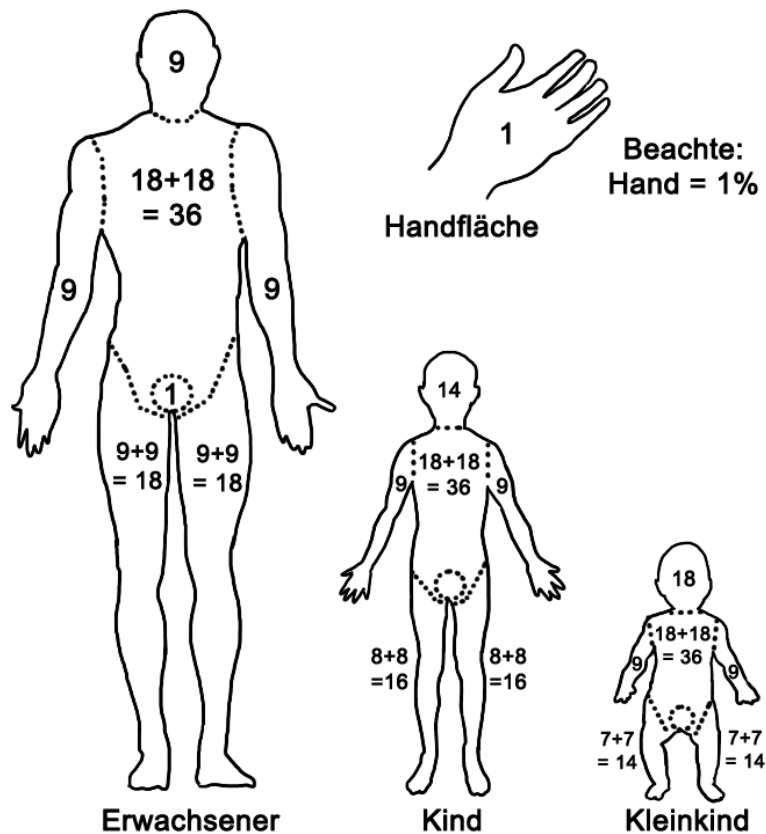


Abbildung 1

Die Neuner-Regel zur Berechnung der flächenhaften Ausdehnung von Hautläsionen (Wallace, 1951)

Mit folgender Formel lässt sich der SCORAD berechnen (European_Task_Force_on_Atopic_Dermatitis, 1993):

$$\text{Total SCORAD} = A/5 + 7B/2 + C$$

Anhand der SCORAD-Werte werden Patienten oft in drei Gruppen unterteilt. Mit 1-25 Punkten leiden die Patienten unter einem leichten Ekzem, mit 25-50 Punkten unter einem mittelschweren und mit >50 Punkten unter einem sehr schweren Ekzem.

1.2 Epidemiologie des Atopischen Ekzems

Das Atopische Ekzem (AE) ist eine sehr häufige chronisch-entzündliche Hauterkrankung multifaktorieller Genese. Die Prävalenz im Kindesalter ist 15-30% und im Erwachsenenalter bis zu 10% weltweit und mit deutlichem Schwerpunkt in den Industrienationen (Bieber, 2008). Für diese Angaben bestehen Unterschiede zwischen den einzelnen Ländern und innerhalb eines Landes, wie die hierzu bisher größte internationale Studie namens ISAAC (= The International Study of Asthma and Allergies in Childhood) 1999 belegen konnte (H. Williams *et al.*, 1999).

Im Vergleich mehrerer Studien zum Leben auf dem Land und in der Stadt gibt es Hinweise darauf, dass für die Bevölkerung mit Wohnsitz in der Stadt ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung am AE besteht (Schram *et al.*, 2010). Bei diesen wurden Faktoren wie Familiengröße, Kontakt zu Tieren, Alter der Mütter bei Geburt, Ernährungs- und Trinkwasserqualität, sozioökonomischer Status, verbrachte Zeit im Haus und die Schadstoffbelastung als ursächlich untersucht. Beispielsweise konnte innerhalb Deutschlands eine Korrelation zwischen erhöhter Prävalenz des AE und einer vermehrten Schadstoffbelastung nachgewiesen werden (Schafer, Vieluf, Behrendt, Kramer, & Ring, 1996).

Kinder stellen hierbei die am besten untersuchte Altersgruppe dar. Zumeist konnten die Kinder im Rahmen der Schuluntersuchungen rekrutiert werden (Williams, 2000). 20% aller Kinder in der nordeuropäischen Zivilisation leiden innerhalb der ersten zwei Lebensjahre unter dem AE, jedoch heilt es bei 40% rezidivfrei wieder aus. Häufig wird eine Korrelation zu allergischen Sensibilisierungen und einer verminderten Lungenfunktion beobachtet (Illi *et al.*, 2004).

Innerhalb der letzten 40 Jahre wurde ein starker Anstieg der Prävalenz des AE beschrieben (Holgate, 1999; Thestrup-Pedersen, 2003). Welchen Anteil die Umwelt an der Genese trägt und welchen die Art und Weise, wie die epidemiologischen Daten erfasst wurden, ist noch nicht eindeutig geklärt. Aus diesem Punkt geht zumindest hervor, dass zu Beginn einer Studie bezüglich des AE klar festgelegt sein muss, wie das AE definiert ist (T. Diepgen, 2000)

1.3 Immunologische Besonderheiten des AE

Die im Jahre 2006 von der WAO veröffentlichte Definition der Atopie basiert auf einer nachweisbar erhöhten IgE-Antikörperproduktion als Antwort auf geringe Dosen von Allergenen (<http://www.worldallergy.org>). Entsprechend dieser Definition kann man zwischen einem atopischen und einem nicht atopischen Ekzem unterscheiden (Novak & Bieber, 2003).

Neben einer atopischen Genese kann das IgE auch bei durch Helminthen bedingten Parasitosen (Johansson, Mellbin, & Vahlquist, 1968), nach Infektionskrankheiten wie Masern oder Pertussis und bei Immundefekten ansteigen (Altmeyer & Paech, 2010). Außerdem kommt dem IgE vermutlich eine Rolle bei der Tumorabwehr zu (Jensen-Jarolim *et al.*, 2008; Turner, Chen, Krewski, & Ghadirian, 2006; Wang & Diepgen, 2005).

Erhöhte IgE-Werte werden zumeist im Zusammenhang mit Erkrankungen des atopischen Formenkreises beobachtet und mit deren Schweregrad assoziiert (Joshi *et al.*, 2009). Wurmerkrankungen treten aufgrund der verbesserten Hygienebedingungen nur noch sehr selten in den Industrienationen auf (<http://www.who.int>); Zaccane, Fehervari, Phillips, Dunne, & Cooke, 2006).

Die seit 1989 populäre Hygienehypothese postuliert, dass der Verlust mikrobieller Stimulation des Immunsystems durch verbesserte Lebensbedingungen, verringerte Familiengröße und den frühen Einsatz von Antibiotika die Entwicklung von Allergien begünstigt (Strachan, 2000; von Mutius *et al.*, 2000). Ursächlich dafür waren zwei Beobachtungen: der protektive Effekt der Geschwisteranzahl/Geburtsreihenfolge für die Allergieentstehung und die Einteilung der T-Zellpopulation in Th1- und Th2-Zellen (Cookson & Moffatt, 1997; Strachan, 1989). Th1-Zellen produzieren inflammatorische Zytokine wie IL-2, Interferon-gamma und TNF-alpha, die für die zellvermittelte Immunität notwendig sind. Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 und fördern mit diesen die IgE-Produktion der B-Zelle (Abb. 2) (Geha, Jabara, & Brodeur, 2003).

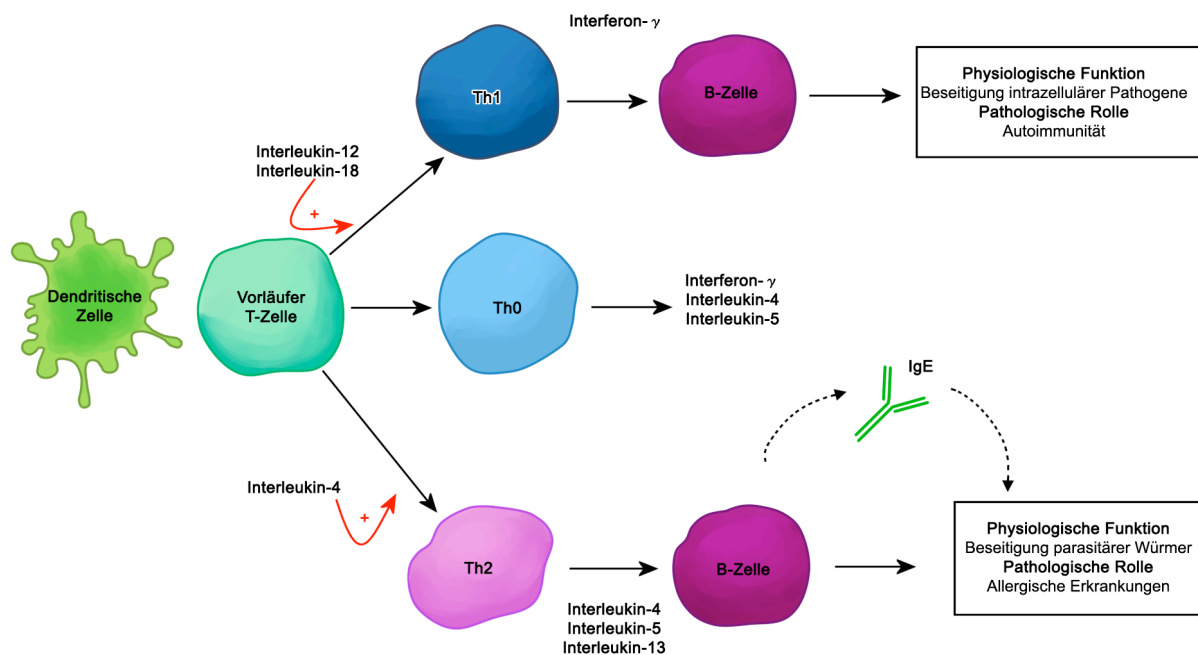


Abbildung 2
Differenzierung der Vorläufer T-Zelle zur Th1, Th0 und Th2 Zelle nach Bieber *et al.* (Bieber, 2008)

Manche Quellen begründen die Verlagerung des Gleichgewichts der Th-Zellen zu den pro-allergischen Th2-Zellen mit dem Mangel an mikrobiellen Belastungen in der Kindheit (Okada, Kuhn, Feillet, & Bach, 2010) und dem beobachteten protektiven Effekt von Helminthen-Infektionen (Yazdanbakhsh, van den Biggelaar, & Maizels, 2001). Neuere Daten belegen die Bedeutung von regulatorischen T-Zellen (Treg) und T17-Zellen, die bei der Entstehung einer Th1- oder Th2-lastigen Immunantwort mitwirken (Akdis, Blaser, & Akdis, 2004; Eisenbarth *et al.*, 2002), und deuten darauf hin, dass diese Hypothese möglicherweise eine zu starke Vereinfachung der

komplexen Zusammenhänge darstellt (Flohr, Pascoe, & Williams, 2005; Okada *et al.*, 2010).

Beim AE wird ein biphasischer Verlauf der Immunantwort beschrieben. Es gibt eine Akutphase und eine chronische Phase. In der Akutphase dominieren Th2-Zellen und erhöhte IL-4, IL-5 und IL-13 Spiegel in läsionaler wie nicht läsionaler Haut. In der chronischen Phase steigen IFN-gamma, IL-12 und die GM-CSF Spiegel, und es finden sich vorwiegend Th1-Zellen. Es gibt Studien, die belegen, dass eine Differenzierung der naiven Th0-Zelle zur Th2-Zelle sowohl von den lokalen Keratinozyten (Soumelis *et al.*, 2002) als auch von Allergenen an sich gefördert werden kann (Traidl-Hoffmann *et al.*, 2005).

Neben diesem biphasischen Verlauf wurde anhand epidemiologischer Studien (Rhodes, Sporik, Thomas, Holgate, & Cogswell, 2001; Rhodes, Thomas, Sporik, Holgate, & Cogswell, 2002) die Hypothese des sogenannten „Atopic March“ (Spergel & Paller, 2003) postuliert. Hier wird das AE als Ausgangspunkt für die Entwicklung weiterer Erkrankungen des atopischen Formenkreises betrachtet. Mit dem Heranwachsen der Betroffenen klingt das AE ab, und Asthma sowie allergische Rhinitis entwickeln sich (Abb.3).

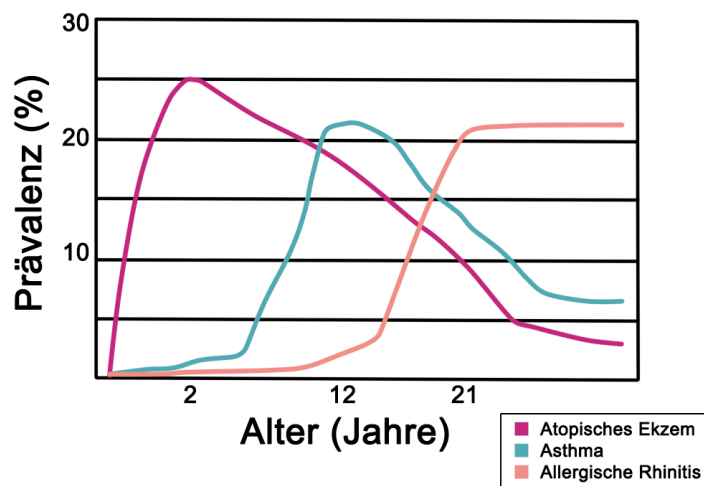


Abbildung 3

Inzidenz der unterschiedlichen Atopietypen nach Spergel *et al.* 2003 (Spergel & Paller, 2003)

Das AE steigt stark in den ersten Lebensjahren an und verringert sich mit der Zeit. Asthma und allergische Rhinitis steigen mit zunehmendem Alter an, und eine Sensibilisierung wird beobachtet.

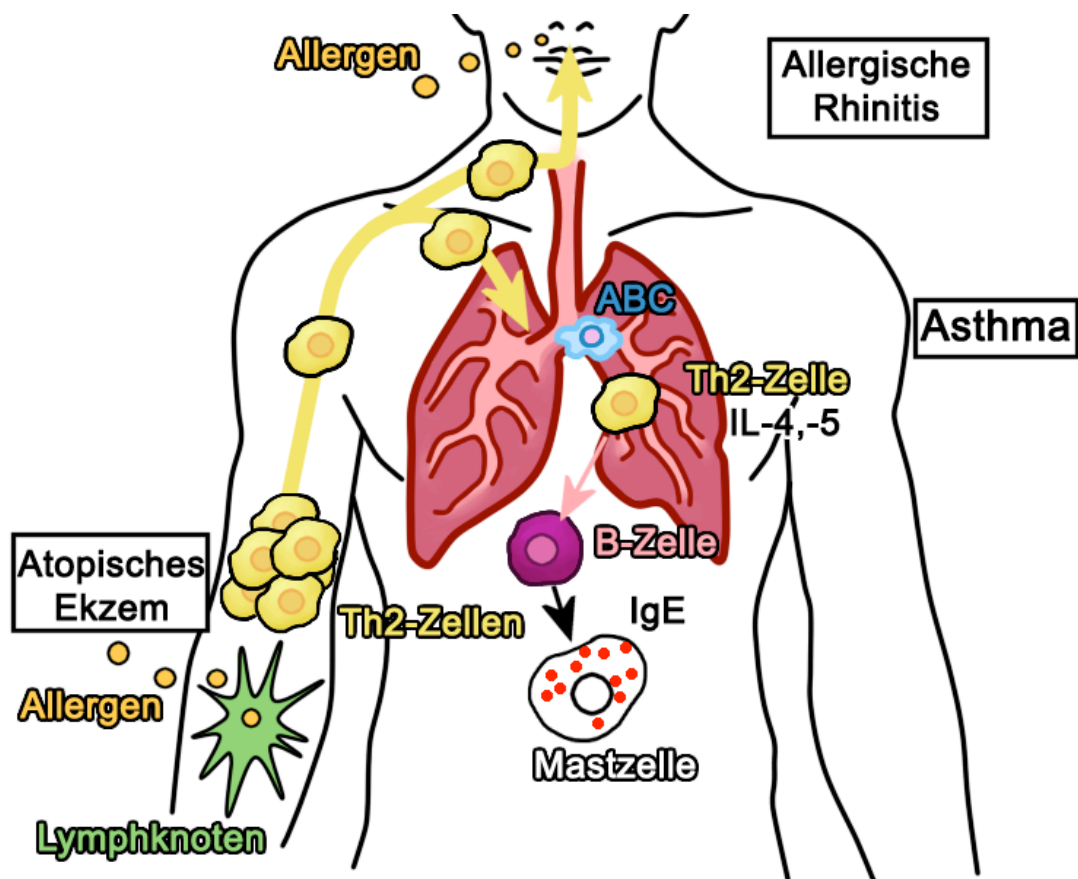


Abbildung 4
Der Atopic March
 Darstellung nach Spergel *et al.* 2003 (Spergel & Paller, 2003)

Grundlage für diese These ist die Annahme, dass durch die Sensibilisierung über die Haut eine systemische Immunantwort induziert wird und das Bronchialsystem somit auch auf Allergene hyperreagibel mit vermehrter IgE-Produktion reagieren kann (Abb. 4) (Spergel & Paller, 2003).

Die resultierenden systemisch und lokal erhöhten IgE-Spiegel führen zur vermehrten Mastzelldegranulation, zur Histaminfreisetzung und zum Pruritus.

Juckreiz ist in dieser Kaskade nicht nur resultierendes Symptom, sondern unterhält das immunologische Geschehen. Neben Histamin (T. L. Diepgen, 2002) wurden IL-31 (Sonkoly, Muller, & Lauerma, 2006) und PAR2 (Steinhoff *et al.*, 2003) als Juckreiz-vermittelnde Mediatoren bzw. Rezeptoren identifiziert.

Kratzen als Reaktion auf Pruritus erleichtert die Adhäsion von *Staphylococcus aureus*, der bei 90% der Betroffenen auf der Haut isoliert werden kann (Bieber, 2008). Dieses Bakterium verstärkt die Ekzemausprägung durch die Freisetzung von Enterotoxin, welches wiederum zur Bildung von enterotoxin-spezifischem IgE führt und eine Entzündung weiter unterhält.

Daneben nehmen manche Autoren an, dass Kratzen intrazelluläre Proteine aus den Keratinozyten freisetzt, die die Bildung von IgE-Autoantikörper induzieren (Schmid-

Grendelmeier, Flückiger, & Disch, 2005). Autoantikörper gegen Proteine von Keratinozyten und Endothelzellen (Aichberger, Mittermann, & Reininger, 2005) werden in sehr schweren und lange bestehenden Fällen von AE zunehmend beobachtet und können bereits ab dem ersten Lebensjahr bestehen (Mothes, Niggemann, & Jenneck, 2005). Das AE kann auf diese Weise auch ohne Umweltallergene oder Toxine als Auslöser bestehen.

Diese Erkenntnisse der immunologischen Forschung zum AE prägten als lange vorherrschendes Bild die „Inside-Outside-View“ (Bos, Kapsenberg, & Smitt, 1994), die die immunologischen Fehlreaktionen zusammenfasst und als ursächlich mit dem AE in Verbindung setzt. Neuere Befunde, insbesondere die Korrelation zwischen der Filaggrindefizienz und der Entstehung von AE und Asthma schreiben der Hautbarriere eine zentrale Rolle zu (Palmer *et al.*, 2006).

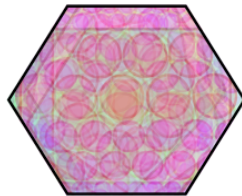


Abbildung 5
Schematische Darstellung des Blicks durch ein Kaleidoskop

1.4.1 Aufbau der Haut – „Brick and mortar“ Modell

Im Jahr 1983 verglich PM Elias das Wissen zur Struktur und Funktion des Stratum corneum (SC) als ein sich seit Jahrzehnten wechselndes Kaleidoskop (Elias, 1983) (Abb. 5 und 6). Diese Beschreibung begründet er mit den historisch unterschiedlich vorherrschenden Ansichten:

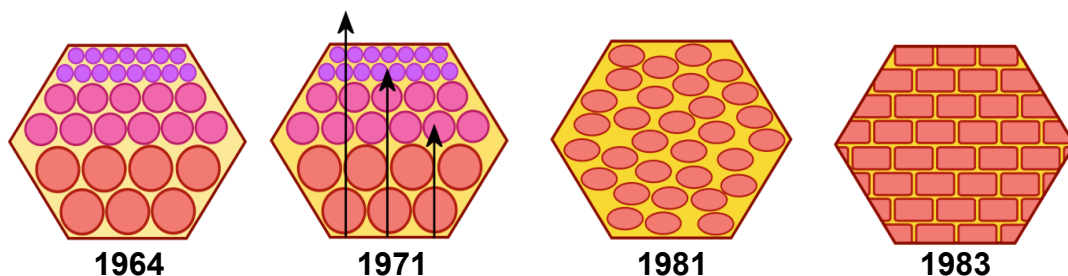


Abbildung 6
Das Stratum corneum (SC) im Wandel der Zeit unterschiedlich betrachtet. Skizziert nach den Theorien von Elias *et al.* (Elias, 1983)

(Beginn Zitat) „1964 war das SC als mehrere lose Schichten von Zellen in unterschiedlichen Stadien der Desquamation bekannt, die eine gewisse Widerstandsfähigkeit aufweisen (Kligman, 1964). 1971 wurde die selektive Permeabilität von Scheuplein *et al.* vorgestellt (Scheuplein & Blank, 1971), und 1981 stellte PM Elias selbst das SC als ein System aus 2 Komponenten vor: Die mit

Proteinen beladenen Keratinozyten und das sie umgebende lipidreiche Milieu bilden.“(Elias, 1981a, 1981b) (Abb. 6) (Zitat Ende) Anschaulicher wird dieser Aufbau von ihm mit einer Wand aus „Ziegelstein und Mörtel“ (Abb. 6) verglichen und als gleichnamiges „Brick and Mortar“ Modell vorgeschlagen (Elias, 1983). Das von Elias definierte Ziel dieser Wand ist es, eine kohesive und relativ undurchdringliche äußere Hülle darzustellen. Die Keratinozyten, werden durch drei Entwicklungsschritte zu den Bausteinen geformt:

Der erste Schritt (1) ist die Synthese der fibrösen Proteine der Keratinozyten, heute bekannt als Keratin Intermediate Filaments (KIF), bestehend aus Keratin 5 und Keratin 14. Danach folgt die Keratinisierung (2), bei der die Keratohyalin granula mit Pro-Filaggrin (1.4.5) als Inhalt gebildet werden, welches in FLG umgewandelt wird. FLG bündelt die Keratinfilamente und bedingt auf diese Weise die abgeflachte Form der Keratinozyten. Zuletzt bilden die abgeflachten Keratinozyten u.a. zusammen mit Involucrin den unlöslichen Mantel des oberen SC (3) (Elias, 1983).

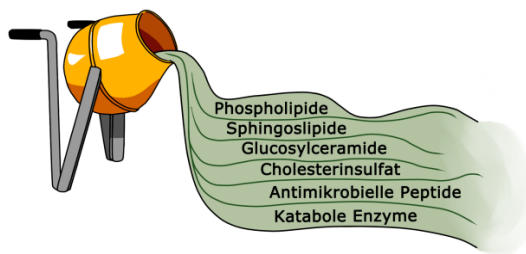


Abbildung 7
Das Lamellarkörperchen/Cementosom. Dargestellt als Zementmischer

Für eine Mauer braucht man Zement und einen entsprechenden „Zementmischer“. (Abb. 7) Die Lamellarkörperchen (LB) kann man sich vereinfacht als solche vorstellen. Treffenderweise wurden diese in der Literatur auch als Cementosomen beschrieben (Hashimoto, 1971). Hierbei handelt es sich um einzigartige in der Epidermis von Säugetieren vorkommende Organellen, die im Stratum spinosum von den Keratinozyten produziert werden (Fartasch, 2004). Im Laufe der letzten zwei Dekaden wurden diese mit einer Vielzahl von Namen betitelt: Membrane coating granule, Keratinosom, Cementosom, Lamellar body/granule (Fartasch, 2004).

Auf ein unbekanntes Signal hin setzen sie ihren Inhalt in den Interzellulärraum frei. Dies geschieht in der obersten Zellschicht des Stratum granulosum (SG), in der man eine tiefe Invagination des Zelläußeren beobachten kann (Elias *et al.*, 1998).

Die Sekretionen bestehen aus Lipidvorstufen, den sie weiter prozessierenden Enzymen und Proteasen: Phospholipiden, Sphingomyelin und Glucosylceramiden, Cholesterinsulfat, katabolen Enzymen, antimikrobiellen Peptiden (Fartasch, 2004; Menon, Feingold, & Elias, 1992) (Abb. 6). Aus diesem Grund wurden die LBs bis 2004 als eine Mischung aus Sekretionsvesikel und Lysosom betrachtet (Fartasch, 2004; Madison, 2003; Wolff & Holubar, 1967). Als parallel bestehendes Bild existiert die Ansicht, dass es unterschiedlich beladene LBs mit einem zeitlich versetzten Auftreten gibt (Ishida-Yamamoto *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen begründen die Vermutung, dass es sich bei der obersten Zelle des SG um eine sekretorische Zelle handelt (Elias *et al.*, 1998).

Der von den LBs produzierte „Mörtel“ wird im SG/SC Interface zu freien Fettsäuren, Sphingosinen, Ceramiden, Cholesterol, Proteasen und ihren Inhibitoren, hBD2, LL-37 umgewandelt (Elias, 2007). Die einzelnen Schritte von der Produktion bis zur Exkretion können jeweils gestört sein und als morphologische Marker für Erkrankungen genutzt werden (Elias *et al.*, 2000; Fartasch, Bassukas, & Diepgen, 1992; Menon, Ghadially, Williams, & Elias, 1992).

Die Fracht der Cementosomen/LB ist wichtig für die Formierung des Cornified Envelopes (CE) und des Cornified Lipid Envelopes (CLE) (Candi, Schmidt, & Melino, 2005). Der CE ersetzt die Cytoplasmamembran. Er ist hochgradig unlöslich und besteht aus Proteinen (Involucrin, Loricrin, Envoplakin, small proline rich proteins, XP5/LEP) sowie den Transglutaminasen. Der CE bietet mit Involucrin eine Struktur, mit der sich die ω -Hydroxyceramide des Lipid Envelopes vernetzen können (Goldstein & Abramovits, 2003; Ponec, Weerheim, Lankhorst, & Wertz, 2003). Gemeinsam wird dies als CLE bezeichnet (Candi *et al.*, 2005). Nach dieser Zone füllen Lipid Lamellae den Interzellulärraum aus: Ceramide, Cholesterol Ester, Cholesterol und Freien Fettsäuren (Bouwstra, Honeywell-Nguyen, Gooris, & Ponec, 2003; Madison, 2003), die dort vor Ort aus ihren Vorläuferformen mittels Hydrolasen entstehen (Grayson *et al.*, 1985; Menon, Feingold, *et al.*, 1992).

Corneodesmosomen werden als weitere Komponente in dem „Brick-and-mortar-Modell“ beschrieben, die als zusätzliches Bindeglied zwischen den einzelnen Keratinozyten fungieren. Cork *et al.* 2006 beschrieben diese Strukturen als die Eisenstäbe, die die Ziegelsteine durch Löcher miteinander verbinden und eine Widerstandskraft gegenüber Scherkräften bedingen (Cork *et al.*, 2006). Ihr Charakteristikum ist, dass sie zu Gunsten eines gleichmässigen „Sheddings“ (engl. Schuppung der obersten Hautschicht) (1.4.4) von Proteasen des LB abgebaut werden (Caubet *et al.*, 2004).

Corneodesmosomen sind eine spezialisierte Form von Desmosomen, die sich durch die Aufnahme von Corneodesmosin und die Vernetzung von Keratinozyten auszeichnen (Serre *et al.*, 1991). Hierfür sind sie im CE des Keratinozyten integriert. Zudem weisen sie zwei weitere extrazelluläre Anteile bestehend aus Transmembran Glykoproteinen auf: Desmoglein (DSG) und Desmocollin. Diese sind in den corneodesmosomalen Plaque Proteinen (Plakoglobin, Desmoplakin, Plakophilin) verankert (Caubet *et al.*, 2004; Rawlings, 2003).

Drei Jahrzehnte später ist dieses Modell noch gültig und hat seit der Entdeckung der zentralen Bedeutung von Filaggrin in der Genese vom AE zunehmend an Beachtung gewonnen (Elias, 2010). Wie im initialen Vergleich mit einem Kaleidoskop (Abb.6) sind mehr und intermittierend immer wieder andere Komponenten in den Vordergrund getreten, sodass man im Rahmen dieses stetigen Wandel inzwischen von einer „lebendigen“ Struktur anstelle von einer leblosen Mauer spricht (Kligman, 2006).

1.4.2 Stratum corneum Hydrierung beim Atopischen Ekzem

Als Ursache für „trockene Haut“ wurde bereits 1952 ein geringer Wassergehalt des SC nachgewiesen (I. H. Blank, 1952). Eine Hydrierung der Haut kann nicht von der Umgebung gewährleistet werden. Aus diesem Grund ist der Wasserverlust des

Körpers durch die imperfekte Hautbarriere essentiell für die Hydrierung der Keratinozyten. Fehlt es in seiner Funktion als Weichmacher (I. H. Blank, 1952), verliert die Hautbarriere ihre Grundlage für diverse metabolische Prozesse und ihre Flexibilität gegenüber mechanischer Belastung (Rawlings, 2006). Die Wand bricht.

Anschaulich wird dies in den frühen Versuchen von Blank *et al.*, in denen Leichenhautproben okkludierendem Öl und reinem Wasser im Vergleich ausgesetzt wurden. Anders, als man es von *in vivo* Versuchen erwarten würde, wurde die Haut durch Wasser geschmeidiger und durch die Okklusion nicht. Denn die Hydrierung des SC hängt von drei Faktoren ab: 1) Dem Wasseranteil, der das SC vom darunterliegenden Gewebe erreicht, 2) der Fähigkeit des SC, Wasser zu binden und 3) dem Wasseranteil, der die Hautoberfläche über Evaporation verlässt (I. H. Blank, 1952; Rawlings, 2006).

Letztgenanntes wird Transepidermaler Wasserverlust (TEWL) genannt. Dieser erlaubt Rückschlüsse, inwiefern die Haut die insensible Wasserdiffusion (Evaporation) verhindern kann (Pinnagoda, Tupker, Agner, & Serup, 1990). Er ist ein häufig verwendeter Parameter, um eine verminderte Hautbarrierefunktion zu messen. Er wird in Gramm pro Quadratmeter pro Stunde ($\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$) angegeben (W. Wigger-Alberti & Elsner, 1997).

Einflussfaktoren auf den TEWL sind Umgebungsbedingungen, körperliche Aktivität und Emotionen, die jeweils zu vermehrtem Schwitzen führen können (Black, Del Pozo, Lagarde, & Gall, 2000; Rajka, 1974). Beispielsweise konnten Sato *et al.* nachweisen, dass ein abrupter Wechsel von einem feuchten Klima (80% Luftfeuchtigkeit) in ein trockenes Klima (<10% LF) einen sechsfachen TEWL auslöste (Sato, Denda, Chang, Elias, & Feingold, 2002). Aus diesem Grund wird bei Studien versucht, Messungen zur gleichen Jahreszeit mit gleichen Temperaturen durchzuführen (Black *et al.*, 2000). Der TEWL variiert zudem in den einzelnen Körperregionen (Holm, Wulf, Thomassen, & Jemec, 2006; Orsmark, Wilson, & Maibach, 1980), sodass man standardisiert am volaren Unterarm misst (Pinnagoda *et al.*, 1990).

Auf ekzematöser Haut kann ein erhöhter TEWL nachgewiesen werden (Rajka, 1974). Beispielsweise konnten Holm *et al.* bei Patienten auf ekzematöser Haut Werte von $33,64 \text{ g}/\text{m}^2/\text{h}$ und bei gesunden Kontrollen $13,14 \text{ g}/\text{m}^2/\text{h}$ nachweisen (Holm *et al.*, 2006). Daneben kann man auch auf unbetreffener Haut bei Patienten mit AE einen höheren TEWL im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen (Agner, 1991; E. Berardesca, Fideli, Borroni, Rabbiosi, & Maibach, 1990; Werner & Lindberg, 1985).

Ist das Ekzem überstanden, können auf allen Hautarealen TEWL-Werte gemessen werden, die mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar sind (Shahidullah, Raffle, Rimmer, & Frain-Bell, 1969).

Im umgekehrten Verhältnis zum TEWL steht die Fähigkeit des SC, Wasser zu binden. Dies wird Capacitance genannt und auch gelegentlich synonym mit „skin surface hydration“ (engl. Hydrierung der Hautoberfläche) verwendet (Holm *et al.*, 2006). Sie beschreibt, mit welcher Leichtigkeit der Gewebewiderstand der Epidermis durch elektrischen Strom überwunden werden kann (E. Berardesca *et al.*, 1990). In die Berechnung der Capacitance gehen die Stimulationsfrequenz des Corneometers und der Widerstand der Epidermis mit ein. Da Wasser die höchste dielektrische Konstante in der Haut ist, bedingt ein Anstieg des Flüssigkeitsgehalts einen Anstieg

der Capacitance (Holm *et al.*, 2006). Die Capacitance wird in Arbitrary Units (AU) (engl. willkürliche Einheiten) gemessen. Beispielsweise werden mit dem Gerät CM 825; Courage and Khazaka; Köln Germany Werte zwischen 0-130 AU gemessen (<http://www.courage-khazaka.de>). Mit einem Corneometer kann man bis zu einer Tiefe von 60-100 µm messen und somit den Flüssigkeitsgehalt der Epidermis gut erfassen (Tiefe der Epidermis bei Felderhaut 75-150 µm) (Welsch, 2003). Holm *et al.* konnten bei Patienten in der ekzematösen Haut Werte von 19,98 AU messen, die sich signifikant von denen auf unbetreffener Haut (32,04 AU) und von denen gesunder Patienten (33,72 AU) unterschieden (Holm *et al.*, 2006). Als Einflussfaktoren auf diese Größen sind die Rauheit der Haut und die Luftfeuchtigkeit bekannt (Jemec, Na, & Wulf, 2000).

1.4.3 Verschiebungen des Haut-pH-Wertes beim Atopischen Ekzem

Der pH-Wert ist ein Maß für die Azidität einer wässrigen Lösung und wird durch die Konzentration der Hydroniumionen bestimmt. Der Neutralwert ist 7, für den sauren und basischen Bereich sind 0 und 14 die Maximalwerte. Von jeder Lösung mit einem Wasseranteil, lässt sich ein pH-Wert bestimmen (H. Blank, 1939).

Heuss *et al.* beschrieben erstmals 1892, dass die oberste Hautschicht „sauer“ ist (Schmid-Wendtner & Korting, 2006). Von dem „Säureschutzmantel der Haut“ spricht man seit den 1920er Jahren (H. Schade, 1928). Innerhalb der letzten 20 Jahre hat man viele neue Erkenntnisse sammeln können. Man kennt heute drei Wege, über die sich der saure pH-Wert der Haut entwickelt. 1) Na⁺ /H⁺ Antiporter agieren abhängig vom Gradienten ihrer beiden Substrate. Als ihr effektivster Wirkort wird das Stratum granulosum/Stratum corneum (SG/SC) Interface angenommen (M. J. Behne *et al.*, 2003). 2) Über die Hydrolyse von Phospholipiden der Zellmembran werden ebenfalls Protonen in den Extrazellulärraum freigesetzt (J. W. Fluhr *et al.*, 2001). 3) Der dritte Weg geht vom Filaggrinprotein aus. Dieses wird zu Trans-Urokaninsäure abgebaut, deren Anstieg mit dem Fallen des pH-Wertes einhergeht (Krien & Kermici, 2000).

Ein saurer pH-Wert des SC (5,6 bis 6,4) erfüllt wichtige Funktionen für die Hautbarriere. Er bietet der normalen Mikroflora ein optimales Milieu und hemmt das Wachstum von pathogenen Keimen wie *Staphylococcus aureus* oder *Candida albicans*. Bei einem basischen pH-Wert (7,5) kehrt sich das Verhältnis um und die pathogenen Keime können sich hervorragend vermehren (Korting, Hubner, Greiner, Hamm, & Braun-Falco, 1990). Beispielsweise kann ein basischer pH-Wert durch okkludierende Windeln entstehen und eine Candida-Windeldermatitis begünstigen (Visscher, Chatterjee, Munson, Pickens, & Hoath, 2000). Ebenso kann die antimikrobielle Aktivität von Freien Fettsäuren (FFA) je nach pH Wert variieren. *Staphylococcus aureus* ist z.B. ab einem pH-Wert über 6,8 resistent gegen Ölsäure und wird sensibel, sobald der pH-Wert fällt (Ushijima, Takahashi, & Ozaki, 1984).

Die Enzyme für die postsekretorische Lipidprozessierung sind ebenfalls pH-sensitiv und können nur bei einem sauren pH-Wert die sekretierten Lipide in der funktionellen Doppelschicht zusammenfügen (Holleran *et al.*, 1992). Die Reparatur einer „bröckelnden“ Hautbarriere kann somit nur bei einem sauren pH-Wert stattfinden.

Als dritte Funktion ist die Kontrolle vom Corneodesmosom-Zellverbund bekannt. Die Aktivität der Serin-Protease ist für diesen zentral. Sie bewirkt dessen Auflösung

durch Abbau von Desmoglein 1 (Hachem *et al.*, 2003). Ein hoher pH-Wert kurbelt Ihre Aktivität an, und ein saurer Wert bremst sie (J. W. Fluhr *et al.*, 2004).

Beim AE ist dieses Gefüge nicht mehr intakt. Es wird ein erhöhter pH-Wert beobachtet (Rippke, Schreiner, & Schwanitz, 2002), der eine Steigerung der Serin-Protease bedingt. Diese agiert dadurch verfrüht und baut Corneodesmosomen sowie Desmoglein1 verfrüht ab. Der Zellverbund wird porös und die Permeabilitätsbarriere wird nicht mehr gewährleistet (Brattsand & Egelrud, 1999; Ekholm, Brattsand, & Egelrud, 2000; Hachem *et al.*, 2003).

Die Aktivität der Glucocerebrosidase ist hingegen verringert, sodass weniger Ceramide produziert werden (Mauro *et al.*, 1998).

1.4.4 Störungen des epidermalen Lipidstoffwechsels bei dem Atopischen Ekzem

Die interzellulären Lipide des Stratum corneum stellen im „Brick and mortar“ Modell den Mörtel für die Ziegelsteine dar (Elias, 1983). Diese liegen als membranähnliche Struktur im Interzellulärraum vor (Breathnach, Goodman, Stolinski, & Gross, 1973). Säugetiere haben untereinander ähnliche Hautlipide. Aus diesem Grund fußen viele Erkenntnisse auf Versuchen mit Schweine- und Rattenhaut (Gray & White, 1978). Doch unterscheidet sich die Lipidkomposition des menschlichen SC von anderen biologischen Membranen (Gray & Yardley, 1975).

Es gibt drei Hauptgruppen von Lipiden, die insgesamt 95% der interzellulären Gesamtlipidmasse ausmachen: Ceramide (Cer) (50%), Cholesterol (Chol) und Freie Fettsäuren (FFA) (zusammen ca. 45%) (Madison, 2003). Als sogenannte „Vorläufer Lipide“ liegen sie zuerst in den Lamellarkörperchen (LB) vor: Cholesterol Sulfat, Phospholipide, Glucosylceramide und Sphingomyelin. (Abb.8) Die LBs verschmelzen mit der apikalen Plasmamembran im SG/SC Interface und setzen die Vorläufer Lipide frei. (Abb. 9) Dort werden sie in folgende Lipide umgewandelt.

Ceramide stellen die grösste und heterogenste Gruppe der Lipide im SC dar (Gray & White, 1978). Im englischen Sprachraum werden sie auch Sphingolipide genannt, da sie eine Sphingoid Basenstruktur enthalten (Holleran, 2006). Ceramide werden aus Glucosylceramiden/Acylceramiden und Sphingomyelin gebildet. (Abb. 7) Die auf Glucosylceramiden basierenden ω -hydroxylierten Ceramide können an den CE binden und sind somit für die CLE Formierung wichtig (M. Behne *et al.*, 2000; P. W. Wertz, Madison, & Downing, 1989). Unter Abspaltung eines Glucoserestes entsteht der reife CLE. Es wird angenommen, dass, wenn dies nicht passiert, der Glucoserest die Organisation der kompakten Lamellarmembranen stört (Stewart & Downing, 2001). Heute kennt man neun unterschiedliche Ceramide im SC des Menschen (Ponec *et al.*, 2003; Robson, Stewart, Michelsen, Lazo, & Downing, 1994; Stewart & Downing, 1999; P. W. Wertz, Miethke, Long, Strauss, & Downing, 1985; P. W. Wertz, Swartzendruber, Madison, & Downing, 1987). Neben der Funktion für den CLE können sie auf einen zellulären Stimulus hin den noch kernhaltigen Keratinozyt in Bezug auf Zyklus und Differenzierung beeinflussen, sodass er sogar seine Funktion ändern kann (Uchida, Nardo, Collins, Elias, & Holleran, 2003).

Entstehung der Stratum corneum Lipide

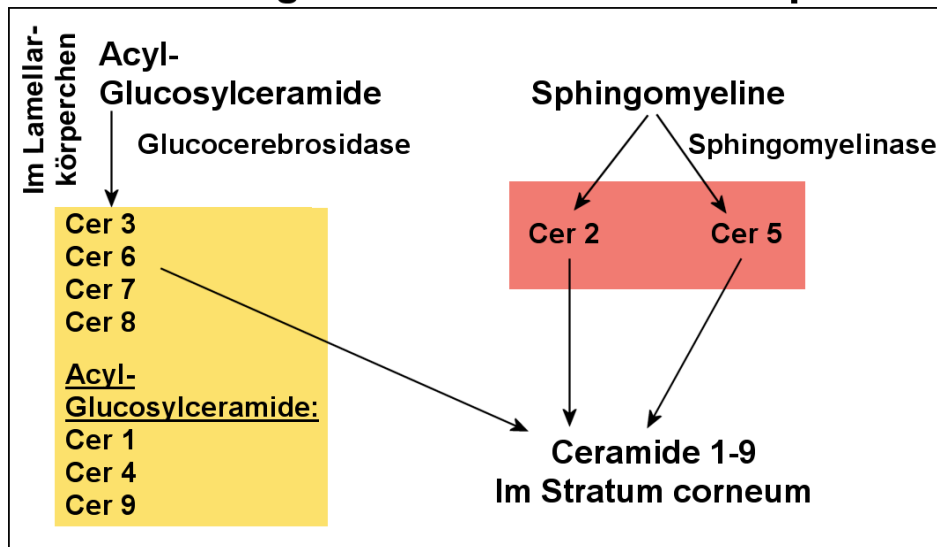


Abbildung 8
Vom Vorläufer Lipid zum SC Ceramid nach Holleran *et al.* 2006 (Holleran, Takagi, & Uchida, 2006)

FFA im SC sind gesättigte unverzweigte C14 bis C28 Verbindungen (P. Wertz & Norlen, 2003). Sie entstehen aus Phospholipiden oder Ceramiden (Holleran, 2006).

Cholesterol ist das einzige Hauptsterol im SC (Gray & Yardley, 1975). Im SG liegt es gebunden als Cholesterol Sulfat (CS), sein Vorläuferlipid, vor. CS gehört zu den Minor-Lipiden des SC. Die Hydrolyse von CS wird als zentral für das „Shedding“ betrachtet. Hierbei handelt es sich um das langsame kontinuierliche Abschilfern der obersten Hautschüppchen. Bei fehlender Sterolsulfatase läuft die Desquamation nicht normal ab, sodass sich die Pathologie der X-chromosomalen Ichthyose zeigt (Sato, Denda, Nakanishi, Nomura, & Koyama, 1998).

Sphingosine sind freie langkettige Basen, die ebenfalls eine kleinere Komponente der SC Lipide ausmachen. Man geht davon aus, dass sie durch den Abbau von Ceramiden entstehen (P. W. Wertz & Downing, 1990). Sie können sowohl als Hemmer der Proteinkinase C fungieren als auch antimikrobielle Eigenschaften aufweisen (Hannun, Loomis, Merrill, & Bell, 1986; Strauss, Pochi, & Downing, 1976).

Beim AE ist die Gesamtzahl der Lipide vermindert (Sator, Schmidt, & Honigsmann, 2003), ebenso die von Ceramiden, Cholesterol und FFA vermindert (Di Nardo, Wertz, Giannetti, & Seidenari, 1998; Imokawa *et al.*, 1991; B. Melnik, Hollmann, Hofmann, Yuh, & Plewig, 1990). Seit den 90er Jahren kennt man die globale Störung der Extrusion von LB bei AE Patienten, die von Fartasch *et al.* nachgewiesen werden konnte und sich ebenso in läsionsfreier Haut der Betroffenen zeigt (Fartasch *et al.*, 1992).

Besonderes Augenmerk liegt auf den Ceramiden, seit Yamamoto *et al.* belegen konnten, dass für zahlreiche andere Lipide (Squalene, Cholesterol-Ester, Triglyceride, FFA, Cholesterol, Cholesterol-Sulfat und Phospholipide) kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit AE und Kontrollpersonen gemessen werden konnte (Yamamoto, Serizawa, Ito, & Sato, 1991). Bei AE Patienten sind in läsionaler

Haut die Glycosylceramide, die freien und die kovalent gebundenen Ceramide vermindert (Macheleidt, Kaiser, & Sandhoff, 2002). In lässionaler Haut von AE Patienten sind Cer 1 und 3 reduziert sowie Cholesterol erhöht. Das ω -hydroxilierte Cer 1 ist bei AE Patienten sowohl in lässionaler als auch in intakter Haut signifikant reduziert (Di Nardo *et al.*, 1998). Neuere Studien beschrieben für AE Patienten eine inverse Korrelation zwischen Ceramiden und TEWL, und dass die Menge der kovalent gebundenen Ceramide mit dem TEWL direkt korreliert (Meguro, Arai, Masukawa, Uie, & Tokimitsu, 2000).

Der Mangel an Ceramiden wurde bislang auf die vermehrte Aktivität des Enzyms Sphingomyelin-Deacylase zurückgeföhrt, da dieses vermehrt bei AE gefunden wird (Murata *et al.*, 1996). Dieses Enzym produziert Glucosylsphingosine und Sphingosylphosphorylcholine (SPC) (Hara, Higuchi, Okamoto, Kawashima, & Imokawa, 2000; Imokawa, 2009; Ishibashi *et al.*, 2003). Auf diese Weise wird weniger Ceramid aus beiden Entstehungswegen gebildet, und folglich entstehen auch weniger Sphingosine (Abb. 9) (Holleran, 2006).

SPC vermindern die Ceramide. Darüber hinaus wird vermutet, dass dies multifaktorielle Einflüsse auf das AE hat: Eine erhöhte Proliferation der Keratinozyten, die veränderte Keratinisierung, eine verstärkte Entzündungsreaktion und eine verstärkte Tendenz zu bakteriellen Infekten (Arikawa *et al.*, 2002; Higuchi *et al.*, 2001; Imokawa, Takagi, Higuchi, Kondo, & Yada, 1999).

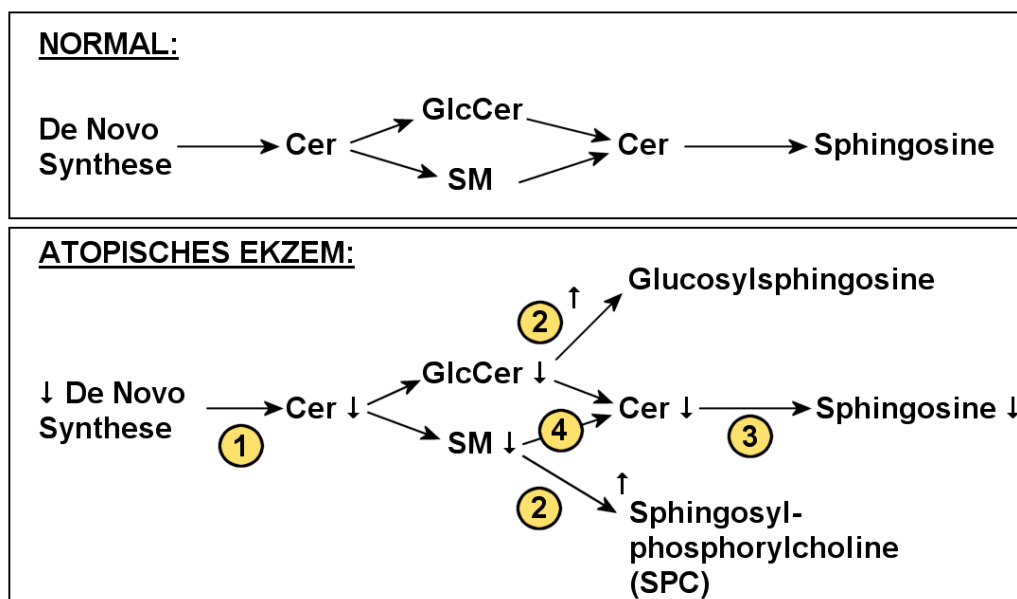


Abbildung 9

Die Genese von Ceramiden und Sphingosinen und die mögliche Abweichungen bei Patienten mit AE nach Holleran *et al.* 2006 (Holleran, 2006)
 Ceramide = Cer, Glucosylceramide = GlcCer, Sphingomyelin = SM

(1) Verringerung der de-novo Ceramidsynthese

(2) Lyase Aktivität zur Gewinnung von Glucosylsphingosinen und Sphingosylphosphorylcholinen

(3) Erhöhte Ceramidase Aktivität

(4) Verringerte Aktivität der Sphingomyelinase

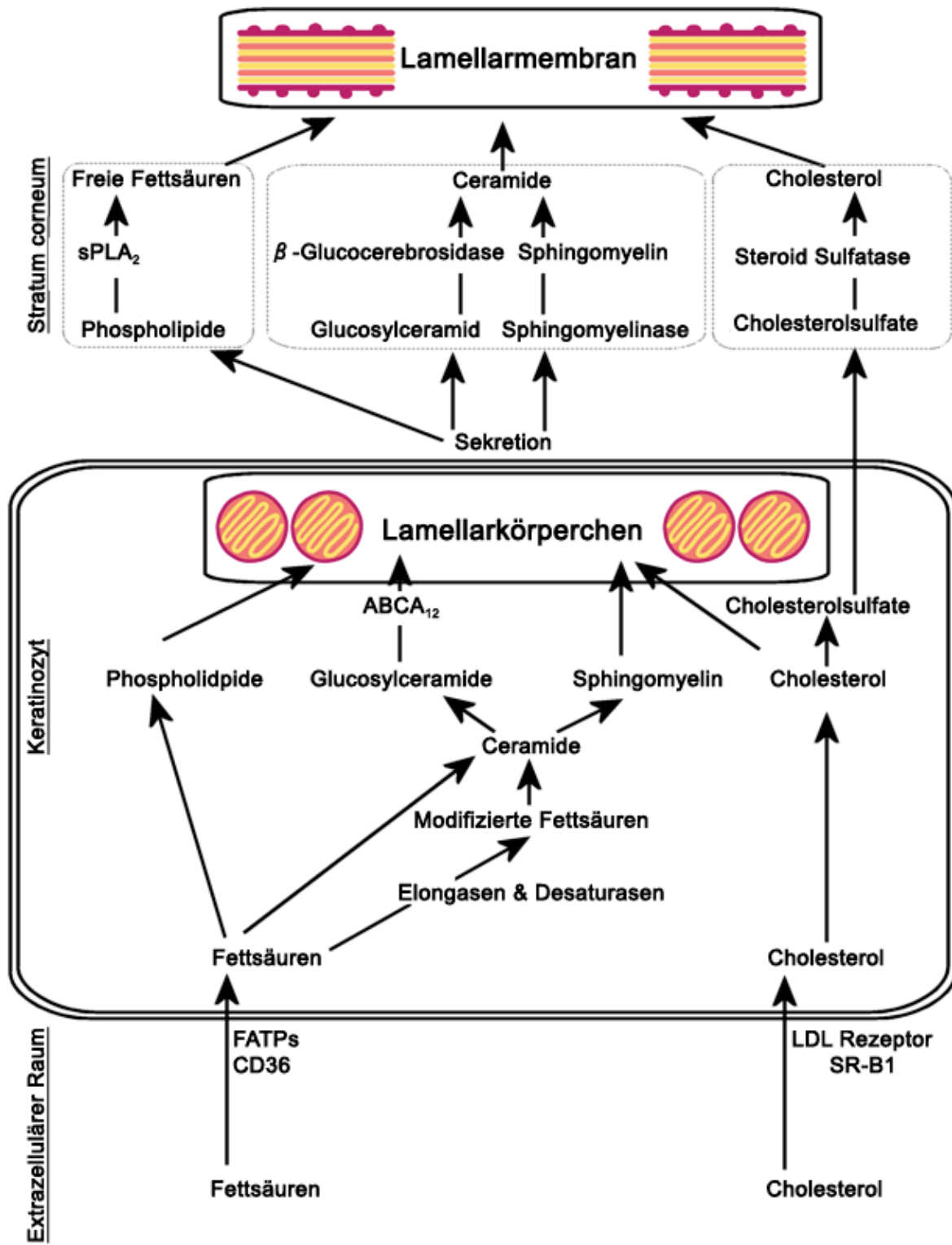


Abbildung 10
 Der Weg der Lipide über das Lamellarkörperchen zur Lamellarmembran nach Feingold *et al.* (Feingold, 2007)

1.4.5 Filaggrin – Von der Translation zur Prozessierung

Eine intakte Hautbarriere ist die Grundvoraussetzung für die Verhinderung von Wasserverlust sowie eine erfolgreiche Abgrenzung des menschlichen Körpers gegenüber potenziellen Eindringlingen wie Bakterien, Allergenen und Gefahren wie UV-Strahlen (O'Regan, Sandilands, McLean, & Irvine, 2009; Sandilands, Sutherland, Irvine, & McLean, 2009). Eine ausschlaggebende Rolle kommt dem „Filament aggregierenden Protein“ zu, das von Dale 1977 entdeckt wurde und von Steinert *et al.* 1981 den Namen Filaggrin erhielt (Steinert, Cantieri, Teller, Lonsdale-Eccles, & Dale, 1981). Damals wurde beobachtet, dass es im SG mit Intermediär Filamenten, insbesondere Keratin zu unlöslichen fibrösen Strukturen oder Makrofibrillen reagiert (Sandilands *et al.*, 2009).

Inzwischen sind mehr molekulargenetische Details und ein Großteil der einzelnen Schritte der Proteinbiosynthese bekannt, deren Kenntnis entscheidend für das Verständnis der pathogenetischen Rolle von Filaggrin ist. Das kodierende Gen für Filaggrin ist auf dem Chromosom 1q21 innerhalb des epidermalen Differenzierungskomplexes zu finden. Es besteht aus drei Exons und zwei Introns, von denen das erste Exon nicht kodierend ist. Die Translation beginnt beim zweiten Exon und entnimmt dem dritten Exon die Informationen für Pro-Filaggrin, welches das >400 kD schwere Vorläuferprotein ist. Pro-Filaggrin besteht aus zehn bis zwölf aufeinanderfolgenden Filaggrinkopien, einem N-terminalen Ende aus 293 Aminosäuren und einem C-terminalen Ende aus 157 Aminosäuren. Das N-terminale Ende lässt sich in einen A und B Bereich unterteilen (Presland, Bassuk, Kimball, & Dale, 1995; Presland, Haydock, Fleckman, Nirunsuksiri, & Dale, 1992) (Abb. 11). Sowohl dem N-terminalen Ende als auch dem C-terminalen Ende kommt eine andere Bedeutung als Filamentaggregation zu (Sandilands *et al.*, 2009). Untersuchungen mittels Antikörperfärbungen konnten die N-terminale Domäne in apoptotischen Nuklei von Keratinozyten zwischen SG und SC nachweisen (Ishida-Yamamoto, Takahashi, Presland, Dale, & Iizuka, 1998).

Diese Translokation in den Nukleus wird von einem Signal des B Bereichs unterstützt (Zhang, Karunaratne, Kessler, Mahony, & Rothnagel, 2002). Die A-Domäne ist Ca^{2+} bindend (Presland *et al.*, 1995). Mit dem Wissen, dass Pro-Filaggrin Ca^{2+} bindet und im Gegensatz zu Filaggrin seine Gestalt abhängig vom Ca^{2+} Spiegel ändert, wird angenommen, dass Ca^{2+} maßgeblich am Prozessierungsprozess von Filaggrin während der epidermalen Differenzierung beteiligt ist (Markova *et al.*, 1993; Presland *et al.*, 1995).

Über die Funktion des C-terminalen Bereichs ist bisher bekannt, dass sie für die proteolytische Prozessierung von Profilaggrin zu Filaggrin ist (Sandilands *et al.*, 2007). Pro-Filaggrin ist Hauptbestandteil der Keratohyalingranula im SG, (Gan, McBride, Idler, Markova, & Steinert, 1991) was durch die Tatsache verdeutlicht wird, dass bei Filaggrin-Nullmutationen keine Keratohyalingranula histologisch nachweisbar sind (F. J. Smith *et al.*, 2006). In der sogenannten Transitionszone findet die weitere Prozessierung von Filaggrin statt (Irvine, McLean, & Leung, 2011). Durch einen Ca^{2+} Anstieg wird Pro-Filaggrin aus den Keratohyalingranula freigesetzt und mittels proteolytischer Spaltung und Dephosphorylierung in die einzelnen Filaggrinproteine gespalten. Neuesten Entdeckungen zufolge findet die Spaltung der einzelnen Filaggrinkopien voneinander durch die Aspartatprotease statt, die spezifisch in dieser Zellschicht ist (Matsui *et al.*, 2011). Der Zeitpunkt für diesen

Prozess ist genau terminiert, da eine ektopische Expression von Filaggrin fatale Auswirkungen auf die epidermale Differenzierung hat (Sandilands *et al.*, 2009). Morasso *et al.* konnten dies bei einer Expression von Profilaggrin auf Basalzellebene beobachten (Morasso, Markova, & Sargent, 1996). Die suprabasalen Zellschichten fehlten, und das SC reduzierte sich auf eine einzelne Schicht.

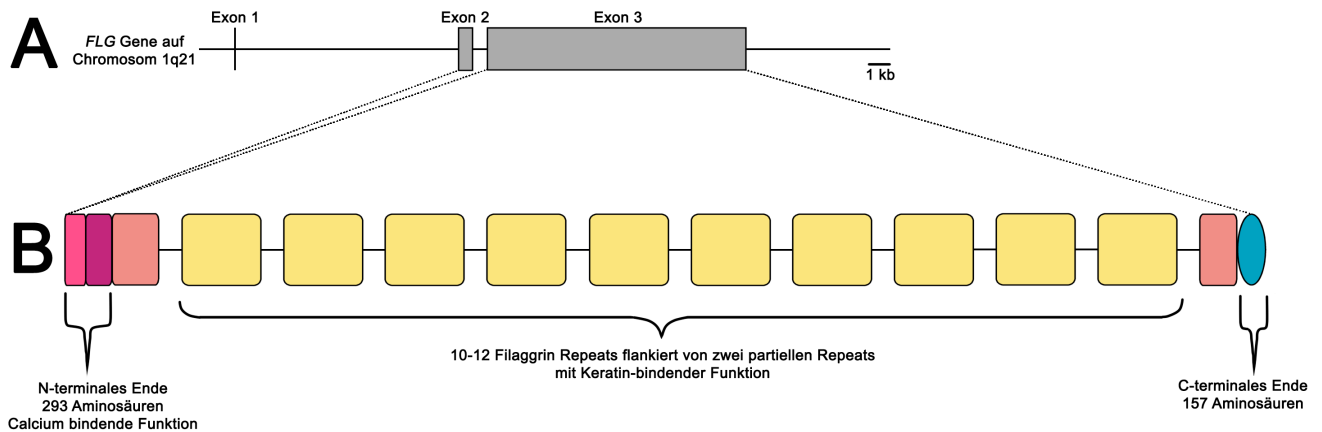


Abbildung 11

Vom Filaggrin-Gen zum Pro-Filaggrin

(A) Auf Exon 3 findet sich ein Großteil der genetischen Information von Pro-filaggrin.

(B) Schematische Darstellung von Profilaggrin mit N und C terminalem Ende. Nach Sandilands *et al.* 2009 (Sandilands *et al.*, 2009)

Wird Filaggrin regelrecht freigesetzt, erfüllt es seine Aufgabe als Bindesubstanz der Keratinfilamente im SC. Durch die Bindung der Keratinfilamente ändert sich die Form der Keratinozyten dramatisch, sodass sie abgeflacht erscheinen und in dieser Form das SC bilden (Candi *et al.*, 2005). Diese Funktion wird beibehalten, bis seine peripheren Aminosäuregruppen, katalysiert durch unterschiedliche Peptidylarginin Deiminasen (PAD), modifiziert werden. PAD 1 und PAD 3 treten in diesem Zusammenhang gemeinsam mit Filaggrin auf (Mechin *et al.*, 2005; Nachat *et al.*, 2005).

Filaggrin wird auf diese Weise aus dem Keratingerüst gelöst und für die proteolytische Spaltung zu freien Aminosäuren zugänglich gemacht (Ishida-Yamamoto *et al.*, 1998; Sandilands *et al.*, 2009). Caspase 14 und andere Peptidasen vollziehen gemeinsam mit Bleomycin (Kamata *et al.*, 2009) die weitere Zerlegung von Filaggrin in Pyrrolidon Carboxylsäure (PCA) und Urocaninsäure (UCA) (Scott, Harding, & Barrett, 1982), die gemeinsam mit Milchsäure, Harnstoff, Citraten und verschiedenen Zuckern zu den Natural Moisturizing Factors (NMF) zählen (Rawlings & Harding, 2004; Scott & Harding, 1986), die Wasser in den oberen Schichten des Stratum corneum absorbieren und dort für eine verbesserte Elastizität sorgen. Aktuelle Studien finden darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen der Urocaninsäure und dem UV-Schutz sowie der Immunmodulation (Jokura, Ishikawa, Tokuda, & Imokawa, 1995). Außerdem korrelieren Filaggrin-Nullmutationen mit der mittleren Anzahl von NMF (Abb. 12) (O'Regan *et al.*, 2010).

Bei fehlender Umwandlung von Pro-Filaggrin zu Filaggrin bei Caspase14-Nullmutationen wird dementsprechend bei Mäusen eine Xerosis cutis und eine UV-Sensitivität beobachtet (Denecker *et al.*, 2007; Mildner *et al.*, 2010). Fehlt das Ausgangsprotein Pro-Filaggrin komplett, findet eine unnatürliche Biogenese des SC statt (Presland *et al.*, 2000). Man weiß inzwischen, dass die Hautbarriere von filaggrindefizienten Patienten einen passiven Transport für Allergene theoretisch erlauben könnte (Mildner *et al.*, 2010).

Filaggrin steht in der Forschung zum AE im Zentrum des Interesses, seit es im Jahre 2006 als prädisponierender Faktor für das AE identifiziert werden konnte (Palmer *et al.*, 2006). Von Palmer *et al.* wurde festgestellt, dass eine der bekannten Mutationen R501X und 2282del4 bei 10% der Menschen europäischen Ursprungs auftritt, und dass mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Assoziation zum AE und zu Asthma besteht (Irvine & McLean, 2006). Bekannt ist, dass 42% aller Filaggrinmutationsträger unter einem AE leiden. Bei 60% aller vom AE betroffenen Europäer lässt sich eine Filaggrinmutation finden (Irvine *et al.*, 2011).

In der asiatischen Population ließen sich seitdem weitere Mutationen finden, die epidemiologisch untersucht wurden (Chen *et al.*, 2008; Nomura *et al.*, 2008). Insgesamt sind über 20 loss-of-function Mutationen von FLG bekannt (Elias, 2010).

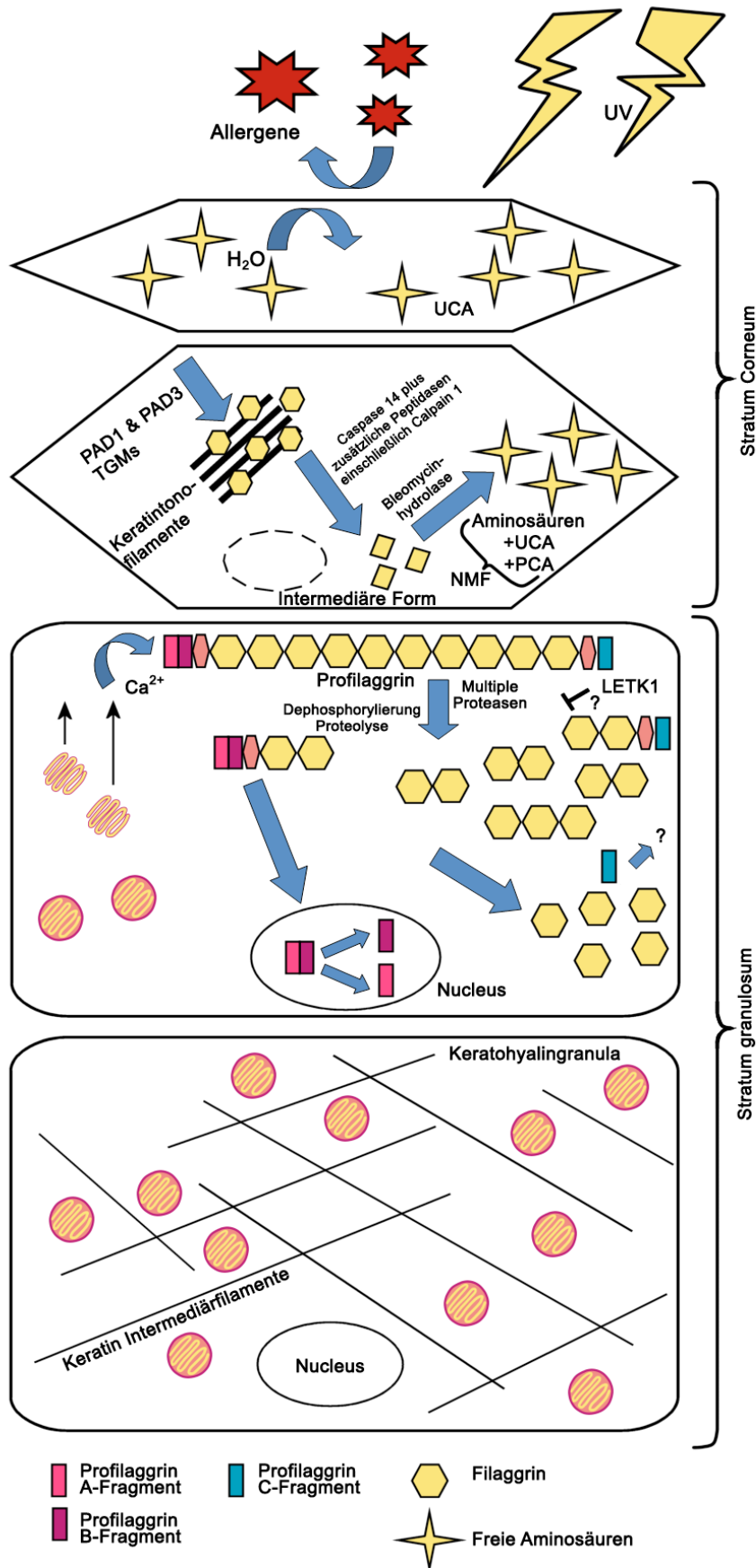


Abbildung 12
Die Prozessierung des Filaggrinproteins nach Sandilands et al. 2009
 (Sandilands et al., 2009)

2. Problemstellung

Beim AE kann man Parameter erheben, die dieses Krankheitsbild von gesunder Haut abgrenzen. Man misst erhöhte pH-Werte, einen erhöhten TEWL, eine verminderte Capacitance und eine veränderte Lipidkomposition. Diese Werte belegen eine verminderte Hautbarriere.

Epidemiologische Daten sprechen dafür, dass eine loss-of-function Mutation des Filaggrinproteins zur Entwicklung eines AE prädisponiert. Basierend auf diesen Daten wurden folgende Zielsetzungen dieser Arbeit definiert:

Inwiefern wirkt sich eine Filaggrinmutation auf die funktionellen epidermalen Parameter aus?

Wie wird der epidermale Lipidmetabolismus durch eine Filaggrindefizienz beeinflusst?

Wird die epidermale Permeabilität für Allergene durch die Filaggrindefizienz beeinflusst, und ist dadurch eine erleichterte Sensibilisierung bei Mutationsträgern zu erwarten?

3. Material und Methoden

3.1. Studiendesign und Untersuchungskollektiv

Diese Studie fand im Rahmen eines deutsch-dänischen Kooperationsprojekts zwischen der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der TU München und der Klinik für Dermatologie des Roskilde Hospitals der Universität Kopenhagen statt. Das Forschungsvorhaben wurde von der Ethikkommission der Bayrischen Landesärztekammer (No. 08124) genehmigt. Jeder Proband wurde ausführlich über die Studie aufgeklärt und hat mit seiner Unterschrift der Teilnahme zugestimmt. Einzelne Aspekte der Studie (insbesondere Reisekosten und Teile der Materialkosten) wurden durch die René-Touraine Stiftung, Paris gefördert.

In die Studie wurden 49 Probanden (32 Frauen, 17 Männer, mittleres Alter 49) aufgenommen. Dabei handelte es sich um Patienten, die in der Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein behandelt wurden sowie um freiwillige Probanden, die teilweise aus dem familiären Umfeld der Patienten stammten.

Anhand des Phänotyps und des Filaggringenotyps wurden die Studienteilnehmer folgenden vier Gruppen zugeordnet: (1) 12 Patienten mit AE und FLG Mutation (drei heterozygot compound, neun heterozygot AE FLG mut, acht ♀, vier ♂), (2) 19 Patienten mit AE ohne FLG Mutation (AE FLG wt, 12 ♀, sieben♂), (3) sechs gesunde Probanden ohne AE, aber mit FLG Mutation (Kontrolle FLGmut, sechs ♀, 0 ♂), (4) 12 gesunde Probanden ohne AE und ohne FLG Mutation (Kontrolle FLGwt, sieben♀, fünf ♂).

Tabelle 4
Aufteilung des Untersuchungskollektivs

	<i>FLGmut</i>	<i>FLGwt</i>
AE	12 (8 ♀, 4 ♂)	19 (12 ♀, 7 ♂)
Kontrolle	6 (6♀, 0 ♂)	12 (7 ♀, 5 ♂)

Die klinische Bestimmung des Probandenkollektivs erfolgte durch eine ausführliche Anamnese gemäß der *UK Working Party* Kriterien (H. C. Williams *et al.*, 1994) und unter Ausschluss anderer dermatologischer Erkrankungen der Haut mit Hilfe einer detaillierten dermatologischen Untersuchung. Als Testregion bestimmten wir die volare Seite des Unterarms, die keine pathologischen Läsionen aufweisen durfte und mindestens 24 Stunden vor der Untersuchung frei von topischer Behandlung sein musste (Schmid-Wendtner & Korting, 2006).

Für die Gewinnung der DNS entnahmen wir den Probanden Vollblutproben und verarbeiteten diese gemäß der Standardmethode nach Miller (Miller, Dykes, & Polesky, 1988). Die PCR erfolgte nach den von Weidinger *et al.* beschriebenen Methoden (Weidinger *et al.*, 2006). Die extrahierte DNS wurde für die FLG Mutationen R501X und 2282del4 mittels MALDI-TOF MS (Sequenom, Inc.) genotypisiert (Weidinger *et al.*, 2006).

3.2 Klinische Untersuchungen

Bei allen Probanden wurde ein standardisiertes Interview zur Erhebung einer allgemeinen und dermatologisch-allergologischen Anamnese durchgeführt. Danach wurde bei den Patienten mit AE der SCORAD bestimmt.

Bei allen Probanden wurden im Anschluss folgende messbare Parameter der Hautbarrierefunktion (Eberlein-König *et al.*, 2000; Holm *et al.*, 2006) für die Beurteilung des AE bestimmt:

- 1) TEWL
- 2) pH-Wert
- 3) Elektrische Kapazität (engl. Capacitance)

Bei 27 unserer 49 Probanden aus diesem Kollektiv wurde der NLS Irritationstest durchgeführt. Diese Patienten wurden nach 48 Stunden erneut beurteilt, indem die mit NLS vorbehandelten Areale erneut auf die drei Parameter untersucht wurden. Der hierfür erforderliche Zeitaufwand bedingte, dass nicht alle 49 Probanden bereit waren, diesen zusätzlichen Test durchzuführen.

Zudem haben wir bei allen Probanden SC Proben entnommen. Dies konnten wir mit der neuen Cyanoacrylatmethode von Jungersted *et al.* (Jungersted, Hellgren, Drachmann, Jemec, & Agner, 2010) tun. Hiermit war es schnell, narbenfrei und standardisiert möglich, die oberste Hautschicht, das SC, zur weiteren Untersuchung zu lösen und gleichzeitig sicher zu fixieren (siehe 3.6). Im gefrorenen Zustand wurden die Proben von Dr. Jungersted zum Roskilde Hospital überführt und dort mit Dünnschichtchromatographie (HPTLC) analysiert.

3.3.1 Messprinzip des TEWAMETER TM 210

Der Transepidermale Wasserverlust ist ein häufig verwendeter Parameter, um eine verminderte Funktion der Hautbarriere zu quantifizieren (s. 1.4.2) (W. E. Wigger-Alberti, P., 1997). Er wird in Gramm pro Quadratmeter pro Stunde angegeben. Wir führten unsere Untersuchungen mit dem TEWAMETER TM 210® durch. Eine Anwendung ist entsprechend den bereits 1990 definierten aktuellen Richtlinien von Pinnagoda *et al.* möglich (Barel & Clarys, 1995; Pinnagoda *et al.*, 1990), die Störfaktoren und die richtige Positionierung der Messsonde berücksichtigen (siehe 3.3.2).

Das Gerät besteht aus einem Messinstrument und einer Messsonde (Abb. 13). Den Sondenkopf bildet eine zu beiden Enden geöffnete zylindrische Polytetrafluorethylenkapsel, in der sich zwei Sensorenpaare in unterschiedlicher Höhe (3mm und 9mm) befinden. Für jeden Messpunkt wird der Partialwasserdampfdruck aus der lokalen Feuchtigkeit und Temperatur berechnet. Nahe der Hautoberfläche gilt, dass der Druckgradient annähernd proportional zur Differenz der Dampfdrücke zweier getrennt fixierter Punkte ist, die auf einer Linie zur Oberfläche und in der Diffusionszone liegen (Zienicke, 1990). Das Messinstrument kann mit den ermittelten Werten den TEWL berechnen, ohne dabei das sensible Mikroklima über dem Hautniveau (bis 10 mm) zu beeinträchtigen.

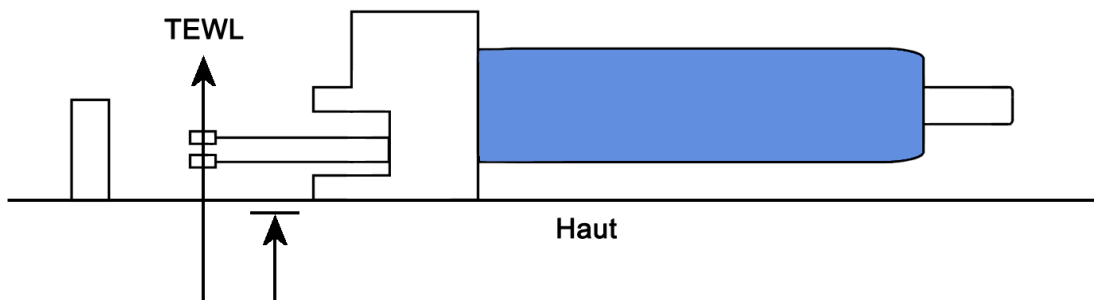


Abbildung 13
Schematische Darstellung des TEWAMETER nach Pinnagoda *et al.* (Pinnagoda *et al.*, 1990)

3.3.2 Messmethode des TEWAMETER TM 210

Entsprechend den internationalen Leitlinien zur Durchführung der TEWL Messung ließen wir den Probanden 15–20 min Zeit (Pinnagoda *et al.*, 1990), um sich in unserem normal temperierten Untersuchungsraum (20-22°C) zu akklimatisieren. Bei allen Probanden führten wir anschließend die Messung mit dem TEWAMETER TM 210® an einer standardisierten Region durch (C in Abb.14).

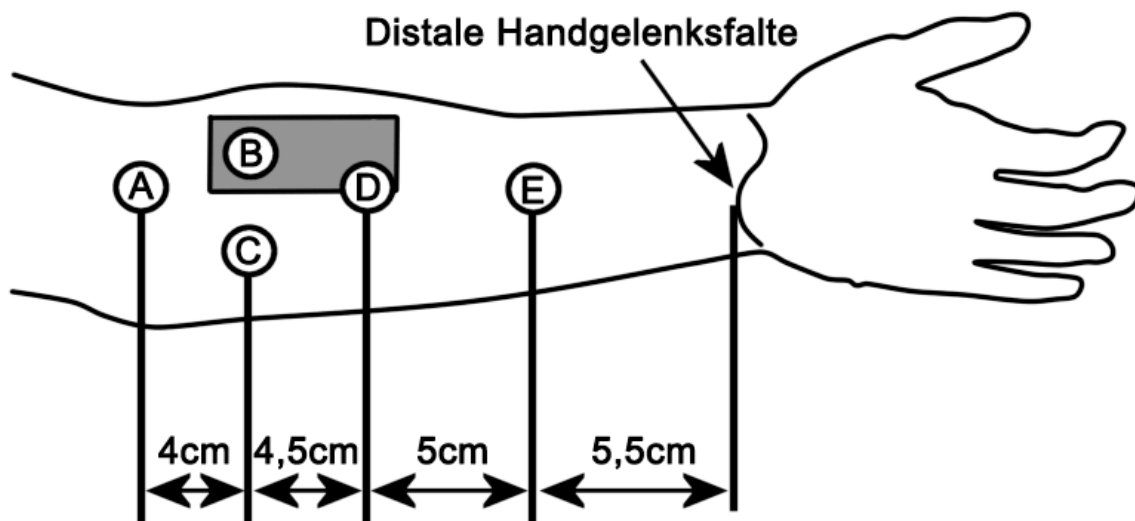


Abbildung 14
Standardisiertes Haut pH-Messareal nach Spruit *et al.* (Spruit & Malten, 1965)

Die Messsonde wurde mit leichtem Druck auf dem Punkt C (siehe Abb. 14) positioniert. Der nach 30-45 s angezeigte Wert wurde notiert.

3.4.1 Messprinzip des Haut-pH-Meters

Der pH-Wert ist ein Maß für die Azidität einer wässrigen Lösung und wird durch die Konzentration der Hydroniumionen bestimmt. Der Neutralwert ist 7, für den sauren und basischen Bereich sind 0 und 14 die Maximalwerte. Von jeder Lösung mit einem Wasseranteil lässt sich ein pH-Wert bestimmen. Das bevorzugte Instrument ist die Glaselektrode (Abb.15) (H. Blank, 1939). Als Einstabmesszelle ist sie aus einem Innenrohr und einer Ummantelung aufgebaut. Das Innenrohr ist eine Messelektrode, die aus Silberdraht (Ag), Elektrolytlösung (KCl), Pufferlösung (Phosphatpuffer) und einer dünnen Spezialglasrahmung besteht. An der apikalen Aufweitung wird der Kontakt zur Messlösung hergestellt, und es bildet sich in dieser Quellschicht eine Potentialdifferenz aus. Die Referenzelektrode ist die Ummantelung. Sie besteht ebenfalls aus einem Silberdraht und einer Elektrolytlösung. Ein Diaphragma stellt die elektrische Verbindung zur Messlösung her, dieser ist aber für Stoffaustausch undurchlässig. Mit der sich ausbildenden Potentialdifferenz zwischen der Mess- und der Referenzelektrode kann mit einer Genauigkeit von 0,1 pH-Einheiten die Hydroniumionenkonzentration der Messlösung ermittelt werden.

Beim „Säureschutzmantel“ der Haut handelt es sich um eine Komposition einzelner Flüssigkeiten mit wässriger Komponente. Darum ist mit dieser Methode die Messung des pH-Werts möglich (H. Blank, 1939).

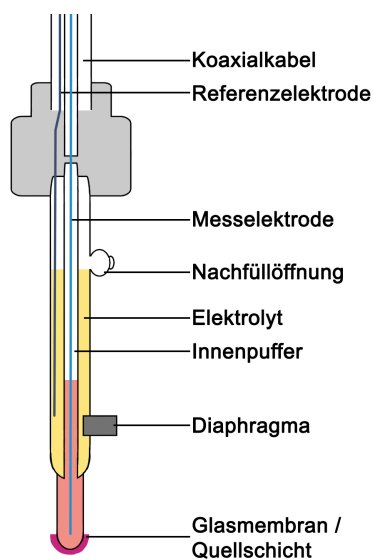


Abbildung 15

Schematische Darstellung der Glaselektrode zur Messung des pH-Wertes nach Khazaka courage (<http://www.courage-khazaka.de>)

3.4.2 Die pH-Messmethode

Zur Messung des Oberflächen-pH-Wertes der Haut wurde das Haut pH-Meter PH 900 der Fa. Courage and Khazaka (Köln, Deutschland) eingesetzt (<http://www.courage-khazaka.de>). Vor jeder Messung wurde die pH-Messsonde kurz in einem mit destilliertem Wasser gefüllten Fläschchen gespült und danach abgeschüttelt, so dass die Glassonde an der Spitze nur leicht angefeuchtet war und keine Tropfenbildung stattfand. Mit senkrecht gehaltener Sondenspitze erfolgte beim

Untersuchungstermin eine pH-Messung dreimalig an der gleichen definierten Stelle. Diese wurde auf der volaren Seite des Unterarms bestimmt und musste frei von Läsionen sein, um mögliche Störfaktoren so gering wie möglich zu halten (s. Tab. 5) (Schmid-Wendtner & Korting, 2006). Anschließend wurde der Mittelwert von den drei Armmessungen erfasst.

Tabelle 5

Einflussfaktoren auf den TEWL nach Schmid-Wendtner *et al.* (Schmid-Wendtner & Korting, 2006)

Endogene Faktoren Alter Anatomische Region Genetische Disposition Sebum Wassergehalt der Haut Schweiß
Exogene Faktoren Detergentien, Kosmetika, Seifen Okklusive Verbände Hautirritantien Topische Antibiotika

3.5.1 Messprinzip des Corneometers

Mit Hilfe eines Corneometers, (in unserem Versuch CM 825 von Fa. Courage and Khazaka, Köln) wurde die „Kapazität“ des SC bestimmt. Im Gegensatz zur elektrischen Kapazität wird hiermit die Hautoberflächenhydrierung beschrieben. (siehe 1.4.2). Als Messeinheiten sind Arbitrary Units (AU) definiert.

Zur Messung wird eine Sonde auf die Haut gesetzt. Diese Sonde enthält einen Kondensator, der aus zwei durch ein Dielektrikum getrennten Metallplatten besteht. Wenn man eine Spannungsquelle an den Kondensator anschließt, fließen die Elektronen von einer Platte zur anderen. Der Kondensator speichert die elektrische Ladung, die Größe der Ladung wird als Kapazität bezeichnet. Jeder Stoff hat eine unterschiedliche elektrische Durchlässigkeit, die mit der di-elektrischen Konstante (Vakuum <7, Wasser 81) beschrieben wird. Aus diesem Grund ändert sich mit dem Wassergehalt der Haut auch die gemessene Kapazität. Die notwendige Messzeit beträgt 20 ms. Die gemessenen Werte liegen zwischen 0 und 130 und werden in AU angegeben. Bis zu einer Tiefe von 60-100 µm lassen sich diese bestimmen (C. Berardesca, 1997). Einflussfaktoren wie eine raue Hautbeschaffenheit müssen beachtet werden (Joachim Fluhr & Gloor, 1999).

3.5.2. Messmethode des Corneometers

Die Messsonde wurde mit einem Druck von ca. 3,5 N auf die Hautoberfläche aufgesetzt. Nach dreimaliger Messungen der elektrischen Durchlässigkeit an einer Stelle des volaren Unterarms (Abb. 14 Punkt C) wurde der Mittelwert aus den drei

AU Werten berechnet (Holm *et al.*, 2006), der als die Kapazität des SC angenommen wurde.

3.6 Gewinnung der Stratum corneum Lipide

Die Stratum corneum Lipide wurden mit der Cyanoacrylat-Methode gewonnen (Jungersted, Hellgren, *et al.*, 2010). Hierbei wird ein Cyanoacrylat-haltiger Wundklebstoff (Liquiband) eingesetzt (www.liquiband.com). Vorbereitend wird eine Fläche von $5 \times 5 \text{ cm} = 25 \text{ cm}^2$ am mittleren volaren Unterarm jeweils zehnmal in beide Richtungen mit Aceton abgewischt, um mögliche Störfaktoren wie die Oberflächenlipide zu entfernen. Ein Tropfen des Wundklebstoffs wird auf einen Objektträger ($2 \times 6 \text{ cm} = 12 \text{ cm}^2$) aufgebracht und für zwei Minuten fest auf das Testareal gepresst. Dabei verteilt sich der Klebstoff im Durchschnitt auf eine Fläche von $2 \times 4 \text{ cm} = 8 \text{ cm}^2$. Die Probe wird danach am distalen schmalen Ende gegriffen und vorsichtig der Länge nach abgehoben. Die Probe wird in Einzelbehältern kurzzeitig bei -80°C aufbewahrt. Mit einer Lösung aus Hexanen und Ethanol werden schließlich die Lipide aus dem Cyanoacrylat gelöst, mit Stickstoff getrocknet und mit Chloroform (CHCl_3) erneut in Lösung gebracht und bei -20°C aufbewahrt, bis sie mit dem HPTLC Verfahren (siehe 3.7) analysiert werden (Jungersted, Hellgren, *et al.*, 2010).

3.7 Trennung der Stratum corneum Lipide mittels Dünnschichtchromatographie HPTLC

Um die einzelnen Lipide aus der SC Probe (siehe 3.6) aufschlüsseln zu können, haben wir die Dünnschichtchromatographie genutzt (HPTLC) (B. C. Melnik, Hollmann, Erler, Verhoeven, & Plewig, 1989).

Die HPTLC Platte wird mit dem für die Versuchsreihe bestimmten Lösungsmittel, einer Chloroformlösung ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{HAc}$, 190:9:1), vorgewaschen, um das Kieselgel ladungstechnisch zu sättigen. Um die Platte in dieser Hinsicht zu aktivieren, wurde sie bei 120°C für 20 min aufbewahrt und bis zum Kontakt mit der zu analysierenden Lösung in einem Desikkator verwahrt. Die Proben werden aufgebracht und erneut im Desikkator ausgetrocknet, bevor sie für weitere 20 min mit der Lösungsflüssigkeit auf der Platte durch Kapillarkräfte separiert werden. Die Auftrennung erfolgt in der CAMAG Horizontal Development Chamber (CAMAG, Muttenz, Schweiz), die eine gesättigte Atmosphäre bieten kann. Unter diesen Bedingungen war es möglich, die Ceramide und das Cholesterol zu separieren. Darauf wurden die HPTLC Platten wieder getrocknet und mit Primuline Fluoreszenz gefärbt. Mit dem Densitometer Desaga CD 60 TLC und dem Softwarepaket Desaga CD ProQuant (Version 0.3) wurde die Fluoreszenzintensität der einzelnen Lipidbanden quantifiziert. Anhand dieser Quantifizierung erfolgte die Analyse des jeweiligen Lipidgehaltes.

3.8 Prinzip des NLS Irritationstests

Natriumlaurylsulfat NLS (SLS; engl. Sodiumlaurylsulfat) ist ein anionisches Tensid, das häufige Verwendung als Detergens und als Hautirritans zur Untersuchung in der

Hautphysiologie findet. Für den letztgenannten Zweck wird NLS mit destilliertem Wasser in eine 1%ige Lösung gebracht (Tupker *et al.*, 1997).

Als Testregion diente der volare Unterarm mit Ausnahme des Handgelenks und der Ellenbeuge (Abb.14). In dem Testareal von 2 cm² wurde der TEWL gemessen. Anschließend wurde ähnlich wie beim Atopy Patch Tests ein mit der NLS Lösung getränktes Filterpapier okklusiv mit einem Finn Chambers® Pflaster (SmartPractice, Phoenix, Arizona) auf die Haut gebracht und von den Probanden eigenständig nach 24 Stunden entfernt (Darsow, Vieluf, & Ring, 1995; Ring, Kunz, Vieluf, & Przybilla, 1989). Nach weiteren 24 Stunden (48 Stunden nach initialer Applikation) wurde der TEWL erneut gemessen, um die Hautbarriere zu quantifizieren (Agner & Serup, 1989).

3.9 Statistik

Die Verteilung der quantitativen Parameter haben wir mit einem Kruskal-Wallis Test verglichen. Dieser wurde als Omnibus Test für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen miteinander eingesetzt. Bei Auftreten von signifikanten Werten haben wir einen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test (Wilcoxon two sample test) durchgeführt. P-Werte von < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

3.10 Pilotversuch zur Bestimmung der Penetration von Allergenen

Es ist bekannt, dass die epidermale Barriere bei Patienten mit einem AE sowohl in der betroffenen als auch in der unauffälligen Haut vermindert ist. Ebenfalls bekannt ist seit den 1990er Jahren, dass man mit dem „Atopy Patch Test“ bei Patienten mit AE und entsprechender Sensibilisierung ein Ekzem auslösen kann (Darsow *et al.*, 1995; Ring *et al.*, 1989). Hier werden z.B. Aeroallergene für 24 bis 48 Stunden auf die Haut okklusiv appliziert und die Haut direkt danach bzw. insgesamt 48 Stunden nach Applikation beurteilt. Mit diesem Wissen haben wir unseren Pilotversuch entwickelt, um die zweite Frage unserer Zielsetzung beantworten zu können: Ob Allergene bei filaggrindefizienten Patienten leichter die Hautbarriere passieren können. Hierfür wurden zwei Kontrollpersonen und eine homozygote filaggrindefiziente Patientin mit AE untersucht.

Als potentiell Allergen wurde lyophilisierter Lieschgraspollenextrakt (Phleum p6) 20µg mit 64µl aqua ad in Lösung gebracht und in 1g Vaseline vermischt. Die Paste wurde mit einem Finn Chambers® Pflaster (8mm Durchmesser) auf die Haut geklebt. Reine Vaseline wurde als Kontrolle eingesetzt. Als Testregion fungierte hier die Oberarminnenseite. Wie bei einer Okklusivprovokationstestung einer Typ IV Allergie/Atopy Patch Test haben wir die Finn Chambers® nach 24 Stunden entfernt (Agner & Serup, 1989) und jeweils Probeexzisionen (PE) standardgerecht entnommen. Für die Aufbewahrung der PEs kam ein neues Medium zum Einsatz: HEPES-Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect (HOPE), welches humanes Gewebe vor den negativen Einflüssen organischer Lösungsmittel (Aceton) schützt und somit den Erhalt von Makromolekülen unterstützt.

Direkt nach Entnahme wurden die PEs im HOPE-I Medium aufbewahrt, in HOPE-II Medium inkubiert und vor der Einbettung in Paraffin in Aceton entwässert

(<http://www.dcs-diagnostics.de>). Nach dem Zuschnitt erfolgte die immunhistochemische Anfärbung mit Phleum p6 Antikörpern. Auf diese Weise wurde Phleum p6 leuchtend rot epidermal bzw. dermal im histologischen Präparat dargestellt und konnte visuell quantifiziert werden.

Der polyklonale Antikörper gegen Phleum p6 sowie das hochgereinigte Phleum p6 wurden freundlicherweise von Prof. Arnd Petersen und Dr. Cornelia Blume (Forschungszentrum Borstel, bzw. ZAUM, München) zur Verfügung gestellt.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse, die unter 4.1 bis 4.7 genannt werden, wurden bereits im Journal *Allergy* 2010 publiziert (Jungersted, Scheer, *et al.*, 2010).

4.1 Ergebnisse der SCORAD Messungen im Gruppenvergleich

Der SCORAD wurde bei Patienten mit AE bestimmt (Gruppe 1 und 2) Im Durchschnitt wurden leicht höhere Werte für den SCORAD bei Gruppe 1 gemessen. (Abb.16) Ein signifikanter Unterschied der Durchschnittswerte ergab sich hingegen nicht.

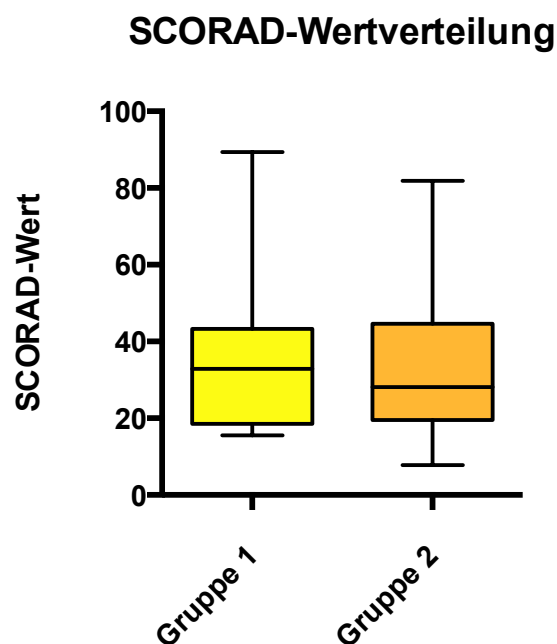


Abbildung 16
SCORAD-Wertverteilung

Darstellung der SCORAD Wertverteilung bei Gruppe 1 (AE FLGmut) und Gruppe 2 (AE FLGwt). Gruppe 1: Median 32,9, unteres Quartil: 19,5 und oberes Quartil 42,1 (Box), Minimalwert 15,5 (unterer Whisker), Maximalwert 89,4 (oberer Whisker).

Gruppe 2: Median 28,1, unteres Quartil: 19,7 und oberes Quartil: 43,1 (Box), Minimalwert 7,8 (unterer Whisker), Maximalwert 81,9 (oberer Whisker). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

4.2 Ergebnisse der TEWL Messungen im Gruppenvergleich

Für den Ausgangs-TEWL (TEWL basal) wurden signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4 (6,1 vs. 4,6 g/m²/h) gemessen (p=0,0042). Die TEWL-Werte bei beiden Gruppen mit FLGmut waren ebenfalls höher, jedoch nicht signifikant unterschiedlich. Die Gruppen mit AE: Gruppe 1 vs. Gruppe 3 (6,1 vs. 5,7 g/m²/h); und die Gruppen ohne AE: Gruppe 2 vs. Gruppe 4 (5,8 vs. 4,6 g/m²/h). (Abb. 17)

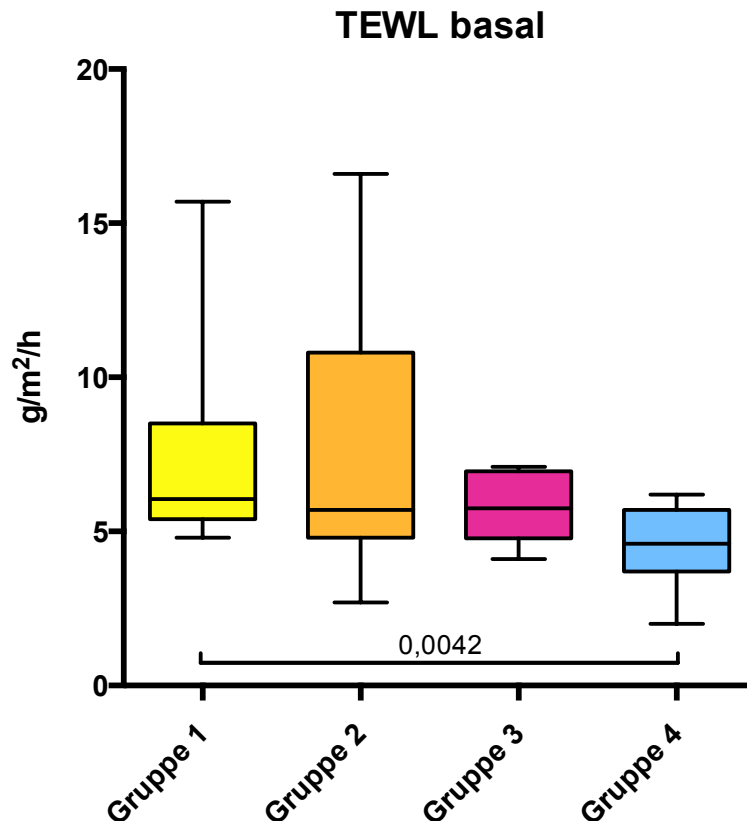


Abbildung 17

TEWL basal gemessen in g/m²/h für die Gruppen 1-4

Gruppe 1 (AE FLGmut): Median 6,1, unteres Quartil: 5,4 und oberes Quartil 8,1 (Box), Minimalwert 4,8 (unterer Whisker), Maximalwert 15,7 (oberer Whisker).

Gruppe 2 (AE FLGwt): Median 5,7, unteres Quartil: 4,9 und oberes Quartil: 10,5 (Box), Minimalwert 2,7 (unterer Whisker), Maximalwert 16,6 (oberer Whisker).

Gruppe 3 (Kont FLGmut): Median 5,8, unteres Quartil: 5,0 und oberes Quartil: 6,8 (Box), Minimalwert 4,1 (unterer Whisker), Maximalwert 7,1 (oberer Whisker).

Gruppe 4 (Kont FLGwt): Median 4,6, unteres Quartil: 3,8 und oberes Quartil: 5,4 (Box), Minimalwert 2 (unterer Whisker), Maximalwert 6,2 (oberer Whisker).

Signifikant unterscheiden sich Gruppe 1 und Gruppe 4 im TEWL basal (p=0,0042).

4.3 Ergebnisse der Capacitancebestimmungen

Mit dem Corneometer konnten wir die Werte der Capacitance bestimmen. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit Filaggrinmutation (Gruppe 1 und 3) und der Kontrollgruppe mit FLGwt waren jeweils signifikant. Gruppe 1 vs. Gruppe 4 (P=0,0047) und Gruppe 3 vs. Gruppe 4 (P=0,035). (Abb. 18)

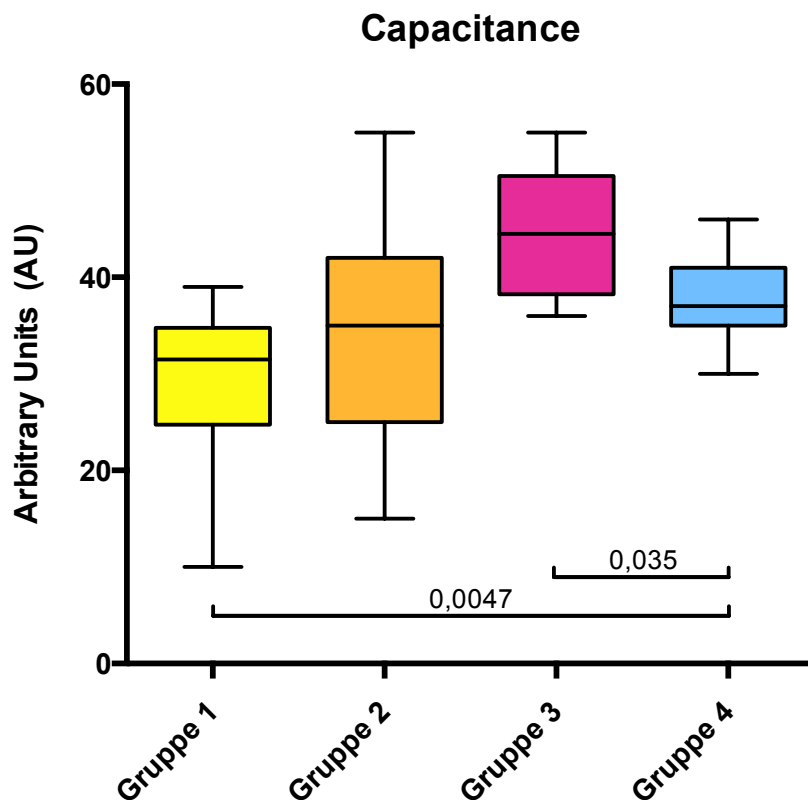


Abbildung 18

Capacitance gemessen in Arbitrary Units (AU) für die Gruppen 1-4

Gruppe 1 (AE FLGmut): Median 31,5, unteres Quartil: 26,3 und oberes Quartil 34,3 (Box), Minimalwert 10,0 (unterer Whisker), Maximalwert 39,0 (oberer Whisker).

Gruppe 2 (AE FLGwt): Median 35,0, unteres Quartil: 25,0 und oberes Quartil: 41,5 (Box), Minimalwert 15 (unterer Whisker), Maximalwert 55,0 (oberer Whisker).

Gruppe 3 (Kont FLGmut): Median 44,5, unteres Quartil: 40,0 und oberes Quartil: 48,3 (Box), Minimalwert 36 (unterer Whisker), Maximalwert 55,0 (oberer Whisker).

Gruppe 4 (Kont FLGwt): Median 37,0, unteres Quartil: 35,5 und oberes Quartil: 41,7 (Box), Minimalwert 30,0 (unterer Whisker), Maximalwert 46,0 (oberer Whisker).

Signifikant unterscheiden sich Gruppe 1 und Gruppe 4 ($p=0,0047$) sowie Gruppe 3 und 4 ($p=0,035$)

4.4 Ergebnisse der Haut-pH-Messungen

Es wurden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen ($p=0,0000026$). Gruppe 1 vs. Gruppe 2 ($p=0,000079$). Gruppe 1 vs. Gruppe 3 ($p=0,0292$); Gruppe 1 vs. Gruppe 4 ($P=0,0003$); Gruppe 3 vs. Gruppe 4 ($p=0,0014$), Gruppe 2 vs. Gruppe 3 ($p=0,0009$). Es besteht ein jeweils höherer pH-Wert für die Probanden mit Filaggrinmutation im Vergleich zu denen ohne Filaggrinmutation. (Abb. 19) Der höchste pH-Wert besteht bei der Gruppe 1 (AE FLGmut) (pH 5,81).

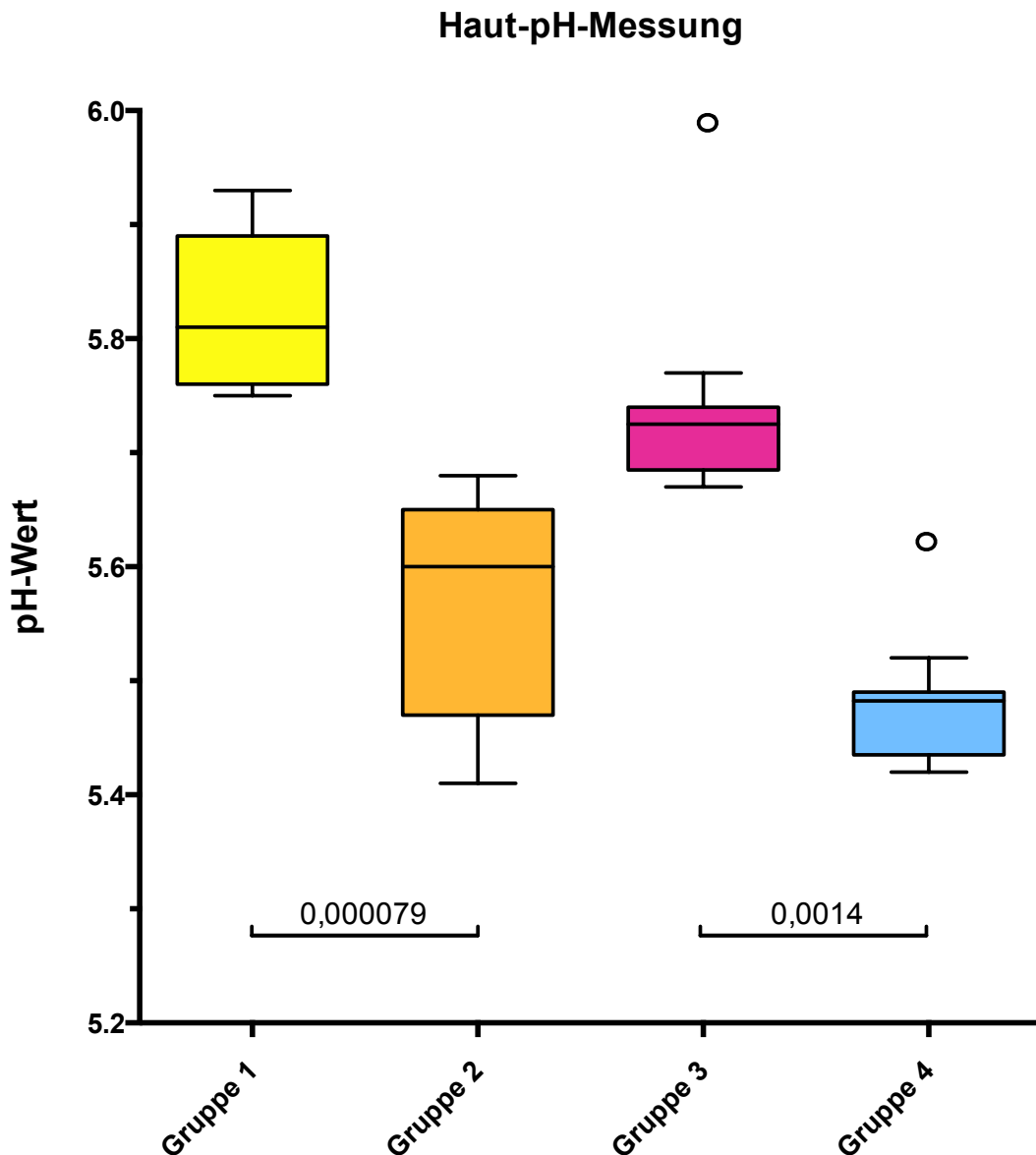


Abbildung 19

Haut-pH-Messung gemessen in pH-Werten für die Gruppen 1-4

Gruppe 1 (AE FLGmut): Median 5,81, unteres Quartil: 5,77 und oberes Quartil 5,89 (Box), Minimalwert 5,75 (unterer Whisker), Maximalwert 5,93 (oberer Whisker).

Gruppe 2 (AE FLGwt): Median 5,60, unteres Quartil: 5,47 und oberes Quartil: 5,65 (Box), Minimalwert 5,41 (unterer Whisker), Maximalwert 5,68 (oberer Whisker).

Gruppe 3 (Kont FLGmut): Median 5,73, unteres Quartil: 5,68 und oberes Quartil: 5,74 (Box), Minimalwert 5,67 (unterer Whisker), Maximalwert 5,77 (oberer Whisker).

Gruppe 4 (Kont FLGwt): Median 5,49, unteres Quartil: 5,43 und oberes Quartil: 5,50 (Box), Minimalwert 5,42 (unterer Whisker), Maximalwert 5,52 (oberer Whisker).

Zwei Ausreißer sind mit einem Kreis dargestellt (Bei Gruppe 4 Wert 5,62 und Gruppe 3 Wert 5,96). Signifikante Unterschiede bestehen zwischen Gruppe 1 und 2 sowie zwischen Gruppe 3 und 4 (Balken).

4.5 Ergebnisse der Lipidmessungen

In der Dünnschichtchromatographie (HPTLC) konnten die einzelnen Ceramide in ihrer mittleren prozentualen Verteilung bei den untersuchten Gruppen bestimmt werden (Abb. 21, Tab. 6). Abb. 20 zeigt, wie sich die Ergebnisse für Gruppe 1 und 4 darstellen.

Signifikante Unterschiede konnten mit dem Kruskal-Wallis Test für die Ceramide 1, 4 und 7 festgestellt werden ($p=0,043$; $p=0,030$; $p=0,008$), die noch weiter mittels *Wilcoxon-two-sample* Test differenziert wurden.

Ceramid 1 hatte einen signifikant geringeren Anteil an der Gesamtlipidmenge in Gruppe 2 (12,6%) als in Gruppe 4 (16,9%).

Ceramid 4 hatte in der Gruppe 1 signifikant niedrigere Werte (6,0%) im Vergleich zu Gruppe 3 und 4 (8,7% und 7,8%).

Ceramid 7 hatte signifikant höhere Werte in der Gruppe 1 (12,5%) im Vergleich zur Gruppe 4 (10,1% und 9,9%).

Zudem wurden die Gruppen mit FLGmut (Gruppe 1+2) und FLGwt (Gruppe 3+4) jeweils zusammengefasst und mit Ceramid 4 und 7 verglichen. Signifikante Unterschiede in den Verteilungsmustern konnten nicht gefunden werden.

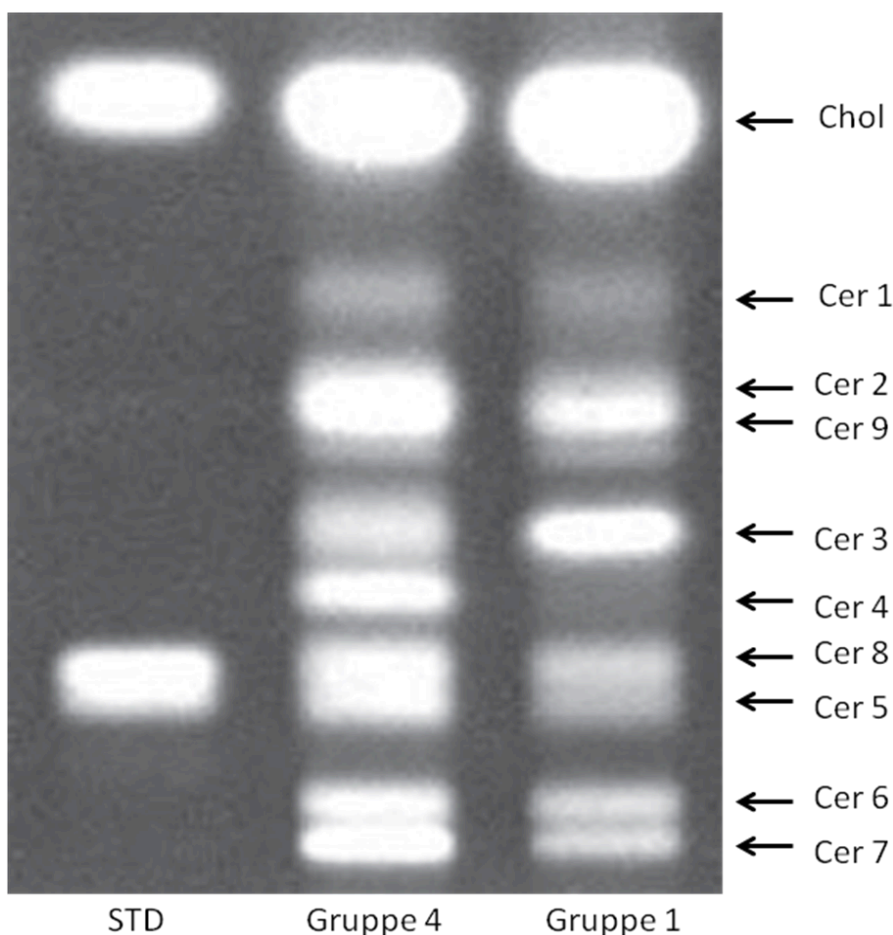


Abbildung 20

Dünnschichtchromatographie (HPTLC) zur Bestimmung der einzelnen Ceramide (Cer) sowie Cholesterol.

Zur Veranschaulichung nur Darstellung Gruppe 1 und 4 im Vergleich zum Standard (STD).

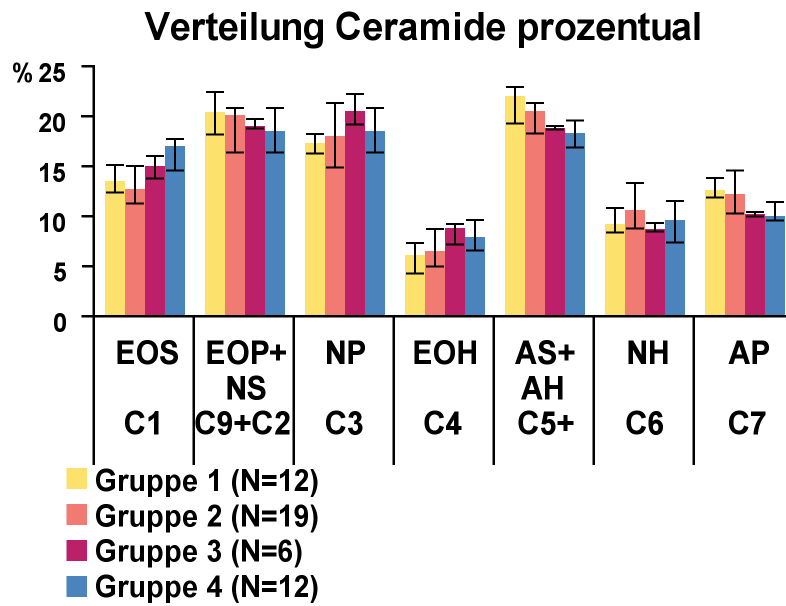


Abbildung 21

Verteilung der Ceramide prozentual

Zur Veranschaulichung sind die einzelnen Ceramidfraktionen mit ihrem auf der Dünnschichtchromatographie basierendem Namen und dem Kürzel nach Motta *et al.* angegeben (Motta *et al.*, 1993).

Tabelle 6
Resultate der prozentualen Verteilung der Ceramide 1-7 bei den untersuchten Gruppen 1-4

Ceramide	Messergebnis: Median vom 1. und 3. Quartil in Klammern für Gruppe 1-4	Probandenanzahl pro Gruppe, N	Signifikanz bestimmt durch Kruskal-Wallis Test	Signifikanz bestimmt durch Wilcoxon-two sample test
Ceramid 1	Gruppe 1: 13,4 (12,2-15,1) Gruppe 2: 12,6 (11,1-15,0) Gruppe 3: 14,9 (13,6-16,0) Gruppe 4: 16,9 (14,4-17,7)	12 19 6 12	p = 0,0043	Signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 2 und 4 (p = 0,012)
Ceramid 2+9	Gruppe 1: 20,3 (18,0-22,4) Gruppe 2: 20,0 (16,2-20,8) Gruppe 3: 18,9 (18,6-19,7) Gruppe 4: 18,4 (16,2-20,8)	12 19 6 12	p > 0,05	Nicht durchgeführt
Ceramid 3	Gruppe 1: 17,2 (16,1-18,2) Gruppe 2: 17,9 (14,7-21,3) Gruppe 3: 20,4 (19,0-22,2) Gruppe 4: 18,4 (16,2-20,8)	12 19 6 12	p > 0,05	Nicht durchgeführt
Ceramid 4	Gruppe 1: 6,0 (4,1 - 7,3) Gruppe 2: 6,4 (4,8 - 8,7) Gruppe 3: 8,7 (7,0 - 9,2) Gruppe 4: 7,8 (6,9 - 9,6)	12 19 6 12	p = 0,030	Signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 4 (p = 0,006) und Gruppe 1 und 3 (p= 0,032)
Ceramid 5+8	Gruppe 1: 21,9 (19,1-22,9) Gruppe 2: 20,4 (18,1-21,3) Gruppe 3: 18,7 (18,5-19,0) Gruppe 4: 18,2 (16,7-19,6)	12 19 6 12	p > 0,05	Nicht durchgeführt
Ceramid 6	Gruppe 1: 9,1 (8,2-10,8) Gruppe 2: 10,5 (8,6- 13,3) Gruppe 3: 8,6 (8,3- 9,3) Gruppe 4: 9,5 (7,2-11,5)	12 19 6 12	p > 0,05	Nicht durchgeführt
Ceramid 7	Gruppe 1: 12,5 (11,7-13,8) Gruppe 2: 12,1 (10,1-14,6) Gruppe 3: 10,1 (9,8 - 10,4) Gruppe 4: 9,9 (9,4 - 11,4)	12 19 6 12	p = 0,008	Signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 4 (p = 0,009) und Gruppe 1 und 3 (p= 0,015) und Gruppe 2 und 4 (p= 0,01)

Gruppe 1: AE FLGmut;
Gruppe 2: AE FLGwt;
Gruppe 3: Kontrolle FLGmut;
Gruppe 4: Kontrolle FLGwt

4.6 Ergebnisse des NLS-Tests

Es konnte bei 27 Probanden der NLS-Test mit vorangehender und anschließender TEWL Messung durchgeführt werden. Die δ -TEWL Werte vor und nach 24 Stunden NLS-Irritationstest waren erhöht bei den Probanden beider Gruppen mit Filaggrinmutation (Gruppe 1 und 3) im Vergleich zu den genotypisch unauffälligen Gruppen mit dem Genotyp FLGwt (Gruppe 2 und 4). Eine statistische Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 22).

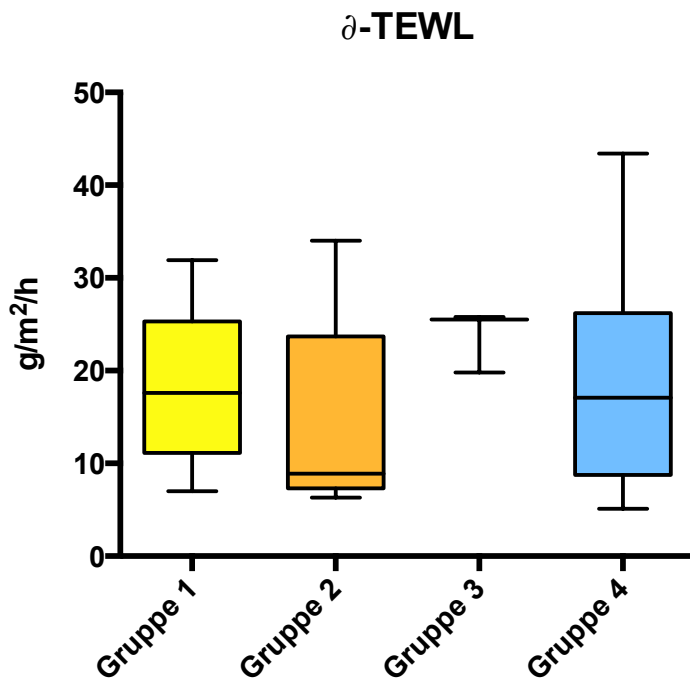


Abbildung 22

δ -TEWL gemessen in $\text{g/m}^2/\text{h}$ für die Gruppen 1-4

Gruppe 1 (AE FLGmut): Median 17,6, unteres Quartil: 11,13 und oberes Quartil 25,30 (Box), Minimalwert 7,0 (unterer Whisker), Maximalwert 31,9 (oberer Whisker).

Gruppe 2 (AE FLGwt): Median 8,9, unteres Quartil: 7,3 und oberes Quartil: 23,7 (Box), Minimalwert 6,3 (unterer Whisker), Maximalwert 34,0 (oberer Whisker).

Gruppe 3 (Kont FLGmut): Median 25,5, unteres Quartil: 19,8 und oberes Quartil: 25,8 (Box), Minimalwert 19,8 (unterer Whisker), Maximalwert 25,8 (oberer Whisker).

Gruppe 4 (Kont FLGwt): Median 17,1, unteres Quartil: 8,75 und oberes Quartil: 26,2 (Box), Minimalwert 5,1 (unterer Whisker), Maximalwert 43,3 (oberer Whisker).

Insgesamt fanden sich keine signifikanten Unterschiede in diesem Teilversuch.

4.7 Ergebnisse der Allergen-Penetrationsversuche

Nachdem das potentielle Allergen Phleum p6 mit einer Finn Chamber® für 24 Stunden auf der Haut der Oberarminnenseite fixiert worden war, fand gleichenorts die Entnahme einer Probeexzision statt. Das HOPE Medium wurde zur Aufbewahrung eingesetzt, um eine „Auswaschung“ der penetrierten Allergene zu verhindern. Nach dem entsprechenden Zuschnitt für die histologische Beurteilung wurde das Präparat immunhistochemisch mit Antikörpern für Phleum p6 angefärbt.

So wurde das Allergen, sofern in den Hautschichten vorhanden, leuchtend rot dargestellt.

Es konnte bei einer Patientin der Gruppe 1 (AE FLGmut) eine deutlich positive Rotfärbung mittels Immunhistochemie nachgewiesen und somit Phleum p6 im SC bestätigt werden (Abb. 23). Bei der Kontrollprobe der Patientin aus Gruppe 1 (AE FLGmut) sowie bei den Kontrollprobanden (Kont FLGwt) in jeweils beiden Proben konnten keine Rotpartikel und somit kein Phleum p6 im SC in den Histoschnitten nachgewiesen werden. (Abb. 24)

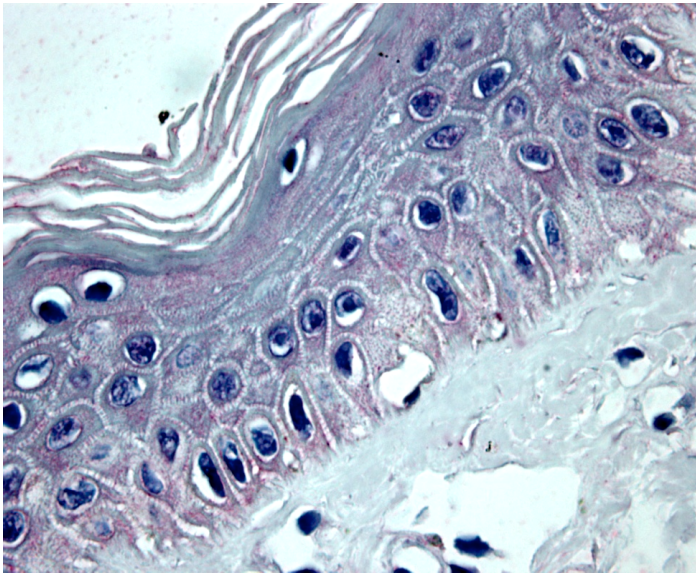


Abbildung 23
Immunhistochemische Markierung von Phleum p6 in der Hautprobe der Patientin der Gruppe 1 (AE FLGmut)

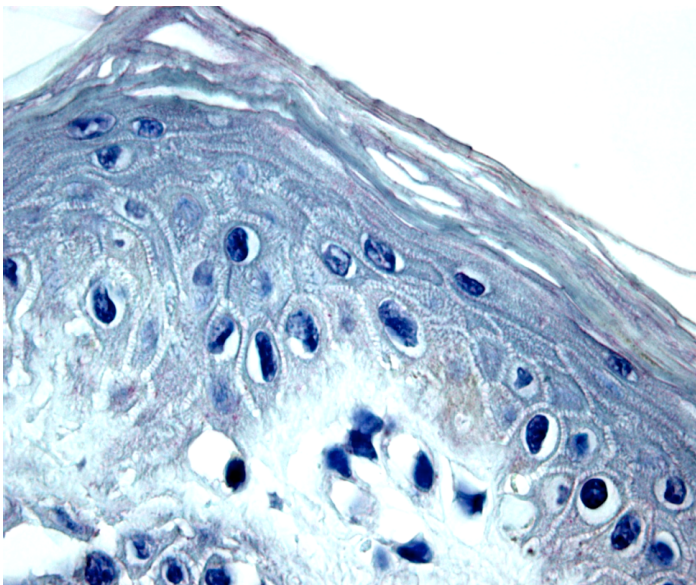


Abbildung 24
Fehlende immunhistochemische Markierung von Phleum p6 in der Hautprobe des Patienten der Gruppe 4 (Kont FLGwt)

5. Diskussion

5.1 Einfluss von Filaggrinmutationen auf klinische Charakteristika des Atopischen Ekzems

Mit dem SCORAD wurde die klinische Ausprägung des AE bei unseren Patienten bestimmt. Diese Untersuchung betraf nur die 12 Patienten der Gruppe 1 (FLGmut AE) und die 19 Patienten der Gruppe 2 (FLGwt AE). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Im Median wiesen Gruppe 1 mit 32,9 und Gruppe 2 mit 28,1 SCORAD Werten jeweils ein moderat ausgeprägtes AE (SCORAD 25-50) auf. Insgesamt wurden in Gruppe 2 geringere SCORAD Werte bestimmt. Dies war insbesondere für den Maximal-, Minimal- und Medianwert der Fall. Die einzelnen Werte zur SCORAD Berechnung wurden nicht aufgeschlüsselt.

Anhand unserer Resultate stellt sich folgende Frage: Haben Patienten mit AE und einer Filaggrinmutation generell einen höheren SCORAD?

Der SCORAD wird anhand von drei Informationen berechnet (1.1). Durch den Untersucher werden die Körperoberflächenbeteiligung und die Ekzemausprägung klassifiziert durch Trockenheit und Lichenifikation beurteilt. Subjektiv durch den Patienten werden der Juckreiz und der Schlafverlust als Parameter für die Lebensqualität erfasst.

Der SCORAD ist als Messinstrument nicht objektiv, da er sowohl vom Untersucher als auch von der subjektiven Einschätzung des Patienten abhängt. Darum hatten wir, nachdem wir den Filaggrinmutationsträgerstatus mit dem SCORAD korreliert haben, als nächstes eine Korrelation zu den biophysiologicalen Parametern der Hautbarriere durchgeführt (5.2). Darunter sind die Capacitance und der TEWL objektive Parameter, die Rückschlüsse auf die Ausprägung der Trockenheit der Haut zulassen (Tomita, Akiyama, & Shimizu, 2005) und aus diesem Grund ebenfalls hier diskutiert werden.

Die Capacitance beschreibt die Dicke der Haut (4.3). Sie kann einen hohen Wert angeben, wenn eine Vermehrung der Schichten des SC oder ein erhöhter Wassergehalt des SC vorliegen. Klinisch handelt es sich hierbei um gegensätzliche Befunde. Ein erhöhter Wassergehalt des SC liegt vor, wenn die Haut gut hydriert und gesund ist, hingegen findet sich eine Vermehrung der SC Schichten bei chronisch trockener Haut mit Desquamationsstörung (Nemoto-Hasebe *et al.*, 2009; Tomita *et al.*, 2005). Bei einem erhöhten TEWL (4.2) verliert das SC vermehrt Wasser. Dabei kann die Haut klinisch intakt sein oder ein erhebliches Ekzem bestehen (Nemoto-Hasebe *et al.*, 2009). Zusammenfassend gibt es bisher keine optimale rein objektive Untersuchungsmethode zur Bestimmung des Hautstatus, sodass dem erfahrenen Untersucher weiterhin eine wichtige Rolle zu teil wird, um die einzelnen Befunde sinnvoll in Beziehung zu setzen.

Nemoto-Hasebe *et al.* haben diese Bedingungen ebenfalls miteinbezogen und in ihrer Studie einen objektiven SCORAD (oSCORAD) eingesetzt, der zumindest die subjektiven Faktoren wie Schlafverlust und Juckreiz nicht verwendet (Holm *et al.*, 2006; Nemoto-Hasebe *et al.*, 2009). Die Patientenzahl hatte eine vergleichbare

Größe und genotypische Gruppenverteilung zu unserer (12 Patienten FLGmut und 12 Patienten FLGwt).

Wie wir fanden sie keine signifikanten Unterschiede, aber im Gegensatz zu unseren Ergebnissen einen tendenziell erhöhten oSCORAD in Gruppe 2 (AE FLGwt). Da auch bei dieser Studie die einzelnen Faktoren zur SCORAD Berechnung nicht aufgeschlüsselt sind, läßt sich nicht erschließen, ob dies an dem fehlenden Einbezug der Lebensqualitätsfaktoren oder an dem beurteilenden Untersucher liegt. Zwar war das Ergebnis das Gegenteil von dem, was sich die Studienleitung erwartete, aber sie erklärten sich dies durch die von der Studie geforderte Pause der kompletten topischen Therapie für 24 Stunden vor der Studienvsiste, die sich bei Patienten ohne Filaggrinmutation (Gruppe 2 FLGwt) gravierender auswirken könnte als bei Patienten mit Filaggrinmutation (Gruppe 1 FLGmut). In unserer Studie forderten wir ebenfalls eine Pause der topischen Therapie, aber nur an der Unterarminnenseite, sodass die Gesamtkörperoberfläche für den SCORAD nicht von den Studienanforderungen beeinflusst wurde.

Möglich ist auch, dass die Filaggrinmutationen, die bei dem japanischen Patientenkollektiv vorlagen (p.Ser 2554X, c.3321del, p.Ser2889X, p.Ser3296X) (Nemoto-Hasebe *et al.*, 2009), sich klinisch anders als die in unserem europäischen Patientenkollektiv mit den Mutationen p.R501X und c.2282del4 präsentieren. Ebenso sind neben den Filaggrinmutationen andere Faktoren wie das epidermale Lipidprofil für die Ausbildung des AE wichtig. Diese können bereits bei gesunden Probanden erhebliche ethnische Unterschiede aufweisen (5.3) (Jungersted, Hogh, Hellgren, Jemec, & Agner, 2010). Inwiefern sich diese Unterschiede bei vom AE betroffenen Patienten niederschlagen, ist bisher nicht untersucht worden. Denkbar ist, dass dies ebenfalls einen Effekt auf die Ekzemausprägung und somit die SCORAD Werte haben kann, wenn man japanische und europäische Patientenkollektive vergleicht.

Deutlich wird anhand dieser Befunde, dass es noch viele offene Fragen in Bezug auf den Zusammenhang zwischen der Ausprägung des AE und dem Genotyp sowie der Ethnie gibt, die sich zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht sicher beantworten lassen. Klar wird auch, dass man mit einer Gruppengröße von 12-19 Patienten nicht genügend Daten erhalten kann, um diese Fragen suffizient beantworten zu können. Aus diesem Grund bedürfte es einer größer angelegten Studie zu diesem Thema.

5.2 Einfluss von Filaggrinmutationen auf biophysikalische Parameter der Hautbarriere

Abhängig vom Filaggrinmutationsträgerstatus und vom Hautstatus wurden die Patienten in die Gruppen 1-4 eingeteilt (3.1). Zuerst haben wir den Filaggrinmutationsträgerstatus mit dem SCORAD korreliert (5.1) und dann mit den biophysikalischen Parametern der Hautbarriere. Für jede Gruppe wurden jeweils folgende biophysikalische Parameter bestimmt: pH-Wert, TEWL und Capacitance.

Der pH-Wert war signifikant am höchsten bei den Patienten mit dem Status AE FLGmut (Gruppe 1). Bei den Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut) wurden die zweithöchsten pH-Werte gemessen. Diese waren signifikant höher, als die der Patienten mit dem Status AE FLGwt (Gruppe 2) (4.5).

Es ist bekannt, dass der pH-Wert bei Patienten mit AE auch in nicht ekzematöser Haut höher ist als der von gesunden Kontrollprobanden (Seidenari & Giusti, 1995). Aufgrund der erhöhten SCORAD Werte für Gruppe 1 (4.2), die für eine ausgeprägte Klinik des AE stehen, und der vorhandenen Filaggrinmutation steht das Resultat für Gruppe 1 mit den Beobachtungen anderer Autoren im Einklang (Palmer *et al.*, 2006).

Hingegen wurde vor unseren Versuchen im Jahre 2009 noch nicht beschrieben, dass klinisch gesunde Probanden mit Filaggrinmutation (Gruppe 3 = Kont FLGmut) einen höheren pH-Wert als Patienten mit AE ohne Filaggrinmutation (Gruppe 2: AE FLGwt) haben. Somit kann ein hoher pH-Wert des SC vorliegen, ohne dass der Patient zwangsläufig unter einem Ekzem leidet.

Stets galt, dass ein niedriger pH-Wert essentiell für eine intakte Hautbarriere sei (Schmid-Wendtner & Korting, 2006), da sonst Enzymkaskaden wie zum Beispiel die Aktivität der Serinprotease angestoßen werden würden. Diese wurden als Auslöser für das AE beschrieben (Elias, 2010, 2014), und spielen eine entscheidende Rolle für die Pathogenese des schweren AE des Netherton Syndroms (Elias, 2014).

Darum stellt sich hier die Frage, wie groß der Einfluss der Filaggrinmutation auf den pH-Wert der Haut ist.

Theoretisch weiß man, dass durch die Spaltung des Filaggrinproteins während seiner Prozessierung die NMF entstehen (1.4.5). Unter anderem wird Trans-Urokaninsäure gebildet, die den pH-Wert im SC senkt (Krien & Kermici, 2000). Kezic *et al.* fanden bei filaggrindefizienten Patienten mit und ohne das AE weniger NMF im SC (Kezic *et al.*, 2008). Demzufolge wäre möglich, dass Patienten mit Filaggrinmutation weniger NMF wegen des geringeren Filaggrins haben. Werden die NMF vermindert gebildet, kann der pH-Wert nicht durch diese gesenkt werden. Das könnte die erhöhten pH-Werte der Patienten mit Filaggrinmutation der Gruppe 1 (AE FLGmut) und der Gruppe 3 (Kont FLGmut) erklären.

Neben dem Filaggrinprotein an sich spielen die Enzyme, die es zu den NMF prozessieren, eine Rolle für den pH-Wert des SC. Deren Aktivität ist vom Hydrierungsgrad des SC abhängig (Kezic *et al.*, 2008). Die Luftfeuchtigkeit der Umgebung kann dies als exogener Faktor beeinflussen, jedoch war diese bei all unseren Probanden gleich. Hingegen sind die Fähigkeiten des SC in Bezug auf die Hydrierung ausschlaggebend. Hier kann man zwischen der Funktion der Wasserbindung und der Wasserbarriere unterscheiden (Tagami & Yoshikuni, 1985). Letztere wird mit dem TEWL (3.3.1) gemessen. Der TEWL ist individuell und variiert je nach Körperregion (Holm *et al.*, 2006; Pinnagoda *et al.*, 1990). Aus diesem Grund sollte der TEWL stets in der gleichen Körperregion gemessen werden, um Studienergebnisse gut miteinander vergleichen zu können. Wir haben den TEWL für alle Studienteilnehmer jeweils am volaren Unterarm bestimmt.

Für den TEWL konnten wir auf nicht läsionaler Haut signifikant erhöhte Werte (6,1 vs. 4,6 g/m²/h) bei Patienten mit AE FLGmut (Gruppe 1) im Vergleich zu denen von gesunden Kontrollen Kont FLGwt (Gruppe 4) finden (4.2). Dies bestätigt die bereits von anderen Autoren berichteten TEWL Unterschiede zwischen Patienten mit AE und Probanden ohne AE (Agner, 1991; E. Berardesca *et al.*, 1990; Holm *et al.*, 2006; Werner & Lindberg, 1985), und weist auf einen Barrieredefekt in nicht läsionaler Haut bei Patienten der Gruppe 1 (AE FLGmut) hin. Dies wurde bereits von anderen

Autoren beobachtet (Di Nardo *et al.*, 1998). Wie sich der TEWL bei abgeheiltem Ekzem entwickelt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Shahidullah *et al.* beschreiben 1969, dass sich der TEWL wieder normalisiert, sobald das AE regredient ist (Shahidullah *et al.*, 1969). Hingegen wird sowohl von Elias *et al.* 2010 als auch von Seidenari *et al.* 1995 berichtet, dass Patienten mit AE selbst bis zu fünf Jahre nach einem aktiven Ekzem einen erhöhten TEWL im Vergleich zu gesunden Kontrollen aufweisen können (Elias, 2010; Seidenari & Giusti, 1995). Zu beachten ist, dass alle drei Autoren die Studien mit Patienten durchführten, für die der Filaggrinmutationsstatus nicht bekannt war.

Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass in unseren Versuchen die gesunden Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut) im Median einen nahezu gleich hohen TEWL wie die kranken Patienten der Gruppe 2 (AE FLGwt) (5,8 vs. 5,7 g/m²/h) aufwiesen und somit trotz ihrer Beschwerdefreiheit der Haut einen im Median so hohen TEWL wie am AE leidende Patienten hatten, ohne dass sie ein Ekzem in der Vorgeschichte gehabt hatten.

Da die Ätiologie des Ekzems multifaktoriell bedingt ist (1.1, 1.2, 1.3), ist denkbar, dass die Probanden mit dem persistierend erhöhten TEWL bei Seidenari *et al.* und Elias *et al.* Filaggrinmutationsträger waren, bei denen das Ekzem vollständig regredient war und der TEWL wie bei Gruppe 3 (Kont FLGmut) erhöht blieb. Bei der älteren Studie von Shahidullah *et al.* hingegen ist möglich (Shahidullah *et al.*, 1969), dass keine Filaggrinmutationsträger unter den Studienteilnehmern waren und der TEWL sich so wieder normalisieren konnte.

Der erhöhte TEWL für die Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut) ist auf den ersten Blick logisch, da aufgrund der Filaggrinmutation theoretisch 50% weniger Filaggrin gebildet werden sollte (Irvine *et al.*, 2011) und bei den Patienten der Gruppe 3 (Kont FLGmut) somit von einem Barrieredefekt auszugehen ist. Da bei der Prozessierung von Filaggrin entscheidende Produkte für die Reduktion des TEWL, die sogenannten Natural moisturizing factors (NMF) sowie Ceramide gebildet werden, könnte man davon ausgehen, dass diese Probanden weniger bis keine dieser Produkte bilden (1.4.5). In diesem Fall müssten diese Probanden neben einem hohen TEWL auch eine geringe Capacitance, d.h. Hydrierung des SC aufweisen.

Denn gemäß der aktuellen Erkenntnisse binden die NMF in den oberen Schichten des SC das Wasser, das über den insensiblen Wasserverlust intrinsisch vom Körper und über die Luftfeuchtigkeit von extern in das SC gelangt (1.4.5). Wasser, das das SC in Richtung Umwelt verlässt, wird als TEWL messbar (3.3.1). Ist der TEWL hoch, hat man die Information, dass viel Wasser das SC verlässt. Wieviel Wasser tatsächlich im SC ist, wird durch den Hydrierungsgrad beschrieben. Dieser lässt sich mit der Capacitance (3.5.1) bestimmen.

Mit der Capacitance existiert der entsprechende Parameter, der Rückschlüsse auf die Hydrierung des SC erlaubt. Mit ihr wird die elektrische Durchlässigkeit des SC beurteilt, die bei einer guten Hydrierung hoch ausfallen würde (3.5.1). Gemäß dieser Beschreibung wäre bei Patienten ohne AE eine höhere Capacitance zu erwarten. In unseren Untersuchungen waren die Werte im Median für die beiden Gruppen ohne AE, Gruppe 3 (Kont FLGmut) und 4 (Kont FLGwt), mit 44,5 AU und 37,0 AU am höchsten.

Im Gruppenvergleich zeigte sich eine signifikant höhere Capacitance bei der Gruppe 4 (Kont FLGwt) im Vergleich zur Gruppe 1 (AE FLGmut) mit $p=0,0047$. Das ist ein Ergebnis, das man nach den obigen Ausführungen im Vergleich zwischen klinisch sowie genotypisch Gesunden (Gruppe 4 Kont FLGwt) und klinisch sowie genotypisch Kranken (Gruppe 1, AE FLGmut) erwarten würde (4.3).

Zudem unterschieden sich Gruppe 3 (Kont FLGmut) und Gruppe 4 (Kont FLGwt) in ihrer Capacitance ($p=0,035$) signifikant voneinander. Die Gruppe 3 (Kont FLGmut) hat die größte Capacitance im Gruppenvergleich. Interessant ist hierbei, dass für Gruppe 3 (Kont FLGmut) sich dieses Resultat trotz des Filaggrinmutationsstatus zeigte. Nemoto-Hasebe *et al.* fanden ebenfalls für ihre Probanden mit Filaggrinmutationsstatus eine erhöhte Capacitance und konnten histopathologisch eine Hyperkeratose nachweisen, die sie auf eine gestörte Desquamation zurückführten (Nemoto-Hasebe *et al.*, 2009). Jedoch hatten deren Probanden ein AE und waren nicht hautgesund wie unsere Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut).

Aus diesem Grund erscheint es für unsere Ergebnisse wahrscheinlicher, dass eine bessere Hydrierung für die hohen Capacitancewerte verantwortlich ist. Zwar haben wir keine histologischen Schnitte angefertigt, dennoch hatten die Patienten der Gruppe 3 (Kont FLGmut) klinisch keine Hyperkeratose, sondern einen blanden Hautstatus. Dieser Befund kann auch die zuvor als hoch beschriebenen TEWL-Werte für Gruppe 3 (Kont FLGmut) erklären. Schon Rietschel *et al.* beschrieben 1978, dass sich eine überdurchschnittlich hohe Hydrierung des SC in einem hohen TEWL ausdrücken kann (Rietschel, 1978). Hier bleibt lediglich die Frage offen, warum die Probanden mit dem Filaggrinmutationsstatus eine bessere Hydrierung des SC als die genotypisch und klinisch gesunden Kontrollprobanden der Gruppe 4 (Kont FLGwt) aufwiesen. Denkbar sind eine epigenetische Modifikation mit Bildung von Filaggrin und NMF trotz Mutation (s.u.). Oder es gibt alternative Kompensationsmechanismen für eine intakte Hautbarriere mit hoher Capacitance und klinisch gesunder Haut wie beispielsweise andere Ceramidfraktionen, die potenter in der Wasserbindung sind (5.3) (Imokawa *et al.*, 1991; Imokawa, Akasaki, Minematsu, & Kawai, 1989). So gesehen verhalten sich Capacitance und Wasserpermeabilität der Haut (TEWL) nicht immer gleich zueinander (Tagami & Yoshikuni, 1985).

Die Dynamik dieser Beziehung haben wir mit einem vierten Versuch, dem Natriumlaurylsulfat- (NLS-) Test, untersucht. Hierbei wird die Hautbarriere vor und nach Exposition mit dem Reizstoff NLS beurteilt (3.8).

NLS (engl. Sodiumlaurylsulfat SLS/Sodiumdodecylsulfat SDS) ist ein anionisches Tensid, das Öl-in-Wasser Emulsionen unter Mizellbildung generiert. Dies geschieht ab der kritischen Mizellkonzentration (engl. Critical Micelle Concentration=CMC) von 0,23% w/v bei 25°C (Tupker *et al.*, 1997). Es wird in diversen Artikeln des Haushalts und zur Körperhygiene eingesetzt (Maibach, 2004; Wagner, 2010). Beispielsweise befinden sich in Vollwaschmitteln bis zu 40% (Wagner, 2010) und in Handpülmitteln bis zu 15% anionische Tenside (Ecover, 2015). Hingegen wird in Zahnpasta eine NLS-Konzentration von nur bis zu 2% als unbedenklich eingestuft (Platzer, 1993). Die Wirkung – auch auf die Haut - ist konzentrations- und anwendungsabhängig (Aramaki *et al.*, 2001).

Die Konzentrationen und Anwendungszeiträume in den bisher publizierten Studien zu NLS sind sehr unterschiedlich. Aus den Untersuchungen von Aramaki *et al.* geht

hervor, dass die Konzentration relevanter als die Anwendungsdauer ist, wenn man die Hautreaktion anhand des TEWL beurteilt (Aramaki *et al.*, 2001). Aus diesem Grund ist ein besonderes Augenmerk auf die Methoden der Studien zu legen, die in den Diskussionen zu Versuchen mit NLS häufiger auftauchen (Aramaki *et al.*, 2001; Imokawa *et al.*, 1989).

5% NLS-Lösung wurde 1989 von Imokawa *et al.* eingesetzt. Sie verwendeten 3 cm durchmessende Zylinder, füllten diese mit 10ml der 5% NLS Lösung und fixierten diese auf der Haut des Unterarms ihrer hautgesunden Probanden über unterschiedliche Zeitspannen (1, 10, 30 min). Sie veranlassten die Probanden, sich normal zu bewegen, sodass die Flüssigkeit repetitiv geschüttelt wurde und mit der Haut in Kontakt kam. So ließ sich eine Exposition simulieren, wie sie beispielsweise beim Geschirrspülen entsteht. Anschließend nahmen sie jeweils Hautproben und maßen die Capacitance des getesteten Hautareals. Elektronenmikroskopisch konnten leere interzelluläre Räume ohne die Lipidlamellen im Sinne einer „Auswaschung“ gefunden werden. Passend dazu war die Capacitance deutlich geringer als vor der Applikation von NLS. Diese Beobachtungen konnten bereits nach einer einminütigen Anwendung von NLS 5% gemacht werden. Interessanterweise normalisierte sich die Capacitance signifikant rascher als bei den Kontrollgruppen, nachdem man die zuvor extrahierte Lipidkomposition des SC reappliziert hatte. Zu keinem der Beobachtungszeitpunkte bis vier Tage nach Applikation konnte eine Entzündungsreaktion festgestellt werden (Imokawa *et al.*, 1989).

4% NLS-Lösung wurde 1986 von Fulmer *et al.* verwendet. Sie wählten nur gesunde weibliche Probanden zwischen 25 und 35 Jahren und behandelten die Streckseite eines Unterschenkels dreimal täglich für zwei Wochen hinweg. Dafür ließen sie die 4% NLS-Lösung jeweils 30 Sekunden einwirken und anschließend abwaschen. Die nach der Anwendungszeit gemessene Capacitance war signifikant erniedrigt im Vergleich zur unbehandelten Gegenseite. Zudem entnahmen sie nach der zweiwöchigen Testphase Shave-Biopsien und untersuchten diese mittels TLC auf ihre Lipidzusammensetzung. Hier zeigte sich, dass sich die Gesamtmenge der Lipide bei der mit NLS behandelten Haut quantitativ nicht von derjenigen der Kontrollgruppen unterschied. Jedoch war die qualitative Zusammensetzung eine andere. Die behandelte Haut wies Cer 2 sowie 4 erhöht auf und enthielt Cer 3 vermindert (Fulmer & Kramer, 1986).

0,1-3% NLS-Lösung wird seit den 1990er Jahren vermehrt okklusiv über 24 Stunden eingesetzt, um mittels TEWL Messung vor und nach jeweiliger Applikation die SC Sensibilität zu bestimmen (Tupker *et al.*, 1997). Der TEWL gilt als die sensitivste Methode, um Veränderungen der Hautbarriere zu beurteilen (Agner & Serup, 1990). Zudem konnten Pinnagoda *et al.* 1989 nachweisen, dass eine signifikante lineare Korrelation (0,63) zwischen zweimal täglicher repetitiver Anwendung von 0,5% NLS-Lösung und deren 24stündiger okklusiver Applikation in Bezug auf die gemessenen TEWL-Werte besteht (Pinnagoda, Tupker, Coenraads, & Nater, 1989).

Von Tupker *et al.* wurde 1997 eine Leitlinie zur NLS-Testung verfasst, die für jeweils unterschiedliche Anwendungsformen (repetitives Auftragen, okklusive Anwendung etc.) eine Empfehlung gibt (Tupker *et al.*, 1997). Obwohl die Autoren mehrfach auf den fehlenden Realitätsbezug hinwiesen, wurde die okklusive Anwendung über 24 bis 48 Stunden als die anwenderfreundlichste beschrieben (Tupker *et al.*, 1997). Die

Effekte (Penetrations- und Durchblutungssteigerung), die ein reiner Okklusivverband ohne Wirkstoffe mit sich bringt (Braham, Pugashetti, Koo, & Maibach, 2010; Kannon & Garrett, 1995), wurden in den folgenden Publikationen zu diesem Thema nicht weiter diskutiert (Bandier, Carlsen, Rasmussen, Petersen, & Johansen, 2015; Törmä & Berne, 2009; Tupker *et al.*, 1997). Die okklusive Applikation von NLS-Lösung über mindestens 24 Stunden hat sich seitdem zur häufigsten Form des NLS-Tests entwickelt (Bandier *et al.*, 2015; Törmä & Berne, 2009). Zumeist wird eine 1% Lösung von NLS verwendet (Bandier *et al.*, 2015; Törmä & Berne, 2009; Tupker *et al.*, 1997). Das liegt vermutlich an den Versuchsergebnissen von 2001 für Konzentrationen von 2% über 48 Stunden, die exzessive Reaktionen hervorriefen (Aramaki *et al.*, 2001), und an den Befunde von Agner *et al.*, die erst ab einer NLS-Konzentration von 0,5% über 24 Stunden erste klinische Reaktionen fanden (Agner & Serup, 1990).

Auch wir applizierten 1% NLS-Lösung mittels Finn Chambers® Pflaster über 24 Stunden okklusiv auf den volaren Vorderarm unserer Probanden. Der darauf folgende TEWL Anstieg ist ein etablierter Parameter zur Erfassung der Störung der Hautbarriere (Fartasch, 1997). Aus diesem Grund erfassten wir den Baseline-TEWL vor und 24 Stunden nach der Applikation, um den Δ -TEWL-Wert (=TEWL – Baseline-TEWL) zu errechnen (3.8).

Mit einem Δ -TEWL von 25,5 g/m²/h waren die Ergebnisse für die Gruppe 3 (Kont FLGmut) knapp dreimal so hoch wie für die Patienten der Gruppe 2 (AE FLGwt), die mit einem Δ -TEWL von 8,9 g/m²/h die niedrigsten Werte aufwiesen. Im Median waren die Werte für die Gruppen 1 (AE FLGmut) und 4 (Kont FLGwt) (17,7 vs. 17,1 g/m²/h) ähnlich hoch. Trotz fehlender Signifikanz fällt auf, dass die Gruppe 3 (Kont FLGmut) im Median die höchsten Δ -TEWL-Werte im Gruppenvergleich hat. Die Gruppe 3 (Kont FLGmut) fiel bereits in den Teilversuchen zum basalen TEWL und der Capacitance mit diskussionswürdigen Ergebnissen auf. Aus diesem Grund möchten wir besonderes Augenmerk auf diese Versuchsgruppe legen, um ihre hohen Δ -TEWL-Werte zu diskutieren und die aktuelle epigenetische Forschungslage miteinzubeziehen (s.u.). Die fehlende Signifikanz lässt sich vermutlich durch die geringe Teilnehmerzahl erklären, da deutlich weniger Probanden bereit waren, sich 48 Stunden nach der ersten Studienvsiste erneut für die Bestimmung des Δ -TEWL-Wertes vorzustellen.

Wie oben bereits ausgeführt, kann ein hoher basaler TEWL aufgrund eines Barrieredefekts oder einer sehr guten Hydrierung des SC bestehen (Rietschel, 1978). Im Zusammenhang mit den hohen Capacitance-Werten hatten wir die gute Hydrierung als ursächlich interpretiert. Für einen erhöhten Δ -TEWL-Wert ist diese Erklärung eher unwahrscheinlich, da der NLS-Test die Hautbarriere schwächt (Tupker *et al.*, 1997). Die Ergebnisse für die Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut) sprechen für einen ausgeprägten Barrieredefekt nach NLS-Applikation, der wegen der deutlich höheren Δ -TEWL-Werte größer als bei den anderen Versuchsgruppen sein könnte.

Inwiefern dies von der Filaggrinmutation in dieser Gruppe 3 (Kont FLGmut) beeinflusst ist, kann man anhand dieser Ergebnisse nicht erkennen. Hingegen sieht man, dass die Gruppe 3 (Kont FLGmut) trotz der Filaggrinmutation eine bessere Hydrierung des SC erreicht als die Kontrollgruppe (Kont FLGwt). Bei unserer

geringen Probandenanzahl lohnt sich ein Vergleich mit ähnlichen Publikationen, um diese Überlegungen weiter fortzuführen.

Bandier *et al.* wiederholten 2015 unser Versuchsmodell mit den vier Gruppen (AE FLGmut, AE FLGwt, Kont FLGmut und Kont FLGwt) (Bandier *et al.*, 2015). Zudem ergänzten sie es um weitere Teilversuche einschließlich der additiven Anwendung von 0,25% und 0,5% NLS-Lösungen. Wie wir führten sie eine TEWL-Messung am ersten Tag nach Applikationsende durch. Additiv führten sie die TEWL-Messung zu weiteren Zeitpunkten durch, nämlich eine Stunde und sieben Tage nach Applikationsende, um die Regenerationsfähigkeit des SC besser beurteilen zu können. Einen Tag nach Applikationsende fanden sie ebenfalls keine signifikanten Unterschiede beim ∂ -TEWL-Wert zwischen den beiden Gruppen. Jedoch gelang ihnen der Nachweis eines signifikant höheren ∂ -TEWL-Wertes für die beiden Gruppen 1 und 2 mit AE (AE FLGmut und AE FLGwt) im Vergleich zu den Kontrollen eine Stunde nach Applikationsende. Ob wir die gleichen Ergebnisse erhalten hätten, wenn wir ebenfalls schon zu diesem Zeitpunkt einen ∂ -TEWL bestimmt hätten, bleibt offen.

Auch bei Bandier *et al.* fielen hohe ∂ -TEWL-Werte für die Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut) auf. Diese waren nahezu ebenso hoch wie die Werte der Patienten mit AE. Wie bei uns ließ sich hier ebenfalls keine Signifikanz feststellen, und die geringe Zahl von nur zehn Probanden in der Gruppe 3 (Kont FLGmut) wurde als ursächlich vermutet. Dennoch besteht für diese Probandengruppe ein feiner Unterschied zu unseren Ergebnissen.

Unsere Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut) waren stets hautgesunde Individuen, bei denen wir die Filaggrinmutation identifizierten, weil wir ihre dermatologisch kranken Verwandten untersuchten. Die Probanden in der Studie von Bandier *et al.* stammten bis auf die genotypisch und klinisch gesunden Kontrollen alle aus der dermatologischen Sprechstunde und hatten zum Zeitpunkt der Untersuchung gemäß den U.K. Working Party Kriterien kein Ekzem. Jedoch mussten sie mindestens einmal unter einem Ekzem gelitten haben, um überhaupt in der Patientenkartei der Klinik vorhanden zu sein (Bandier *et al.*, 2015).

Bezieht man die neuesten Erkenntnisse der Epigenetik in diese Überlegungen mit ein (Jones, 2012), stellt sich folgende Frage: Gibt es bei Probanden mit dem Genotyp FLGmut und blanden Hautstatus abhängig von ihrer dermatologischen Vorgeschichte (mit oder ohne AE in der Vergangenheit) Unterschiede in der Hautbarriere?

Rodriguez *et al.* definieren Epigenetik wie folgt (Rodriguez *et al.*, 2014): „Die Epigenetik untersucht funktionell relevante Veränderungen in einem Chromosom, die maßgeblich zu einer Plastizität des Phänotyps beitragen, ohne dass die DNS-Sequenz verändert wird.“ Beispielsweise werden spezielle Abschnitte des Genoms durch Methylierung „stillgelegt“, indem sie nicht mehr abgelesen werden. Hierbei handelt es sich um Deaktivierungsmuster. Diese Deaktivierungsmuster unterscheiden sich gewebeabhängig (Haut und Blutzellen) innerhalb eines Menschen (Varley *et al.*, 2013). Zwar handelt es sich bei der Filaggrinmutation um eine Loss-of-function Mutation, die ein fehlerhaftes Protein produziert, dennoch ist denkbar, dass epigenetische Modifikationen eine Filaggrinproduktion ermöglichen.

Zum Beispiel könnte bei einem heterozygoten Genotyp nur das Genom ohne Filaggrinmutation abgelesen werden.

Denkbar wäre, dass die hautgesunden Probanden mit dem Genotyp FLGmut in der Vorgeschichte, entsprechend unserer Gruppe 3 (Kont FLGmut), eine „Deaktivierung“ mittels Methylierung des mutierten Gens in der Haut haben und somit hautgesund bleiben. Hingegen wäre für die hautgesunden Probanden von Bandier *et al.* mit dem Genotyp FLGmut denkbar, dass bei ihnen epigenetische Faktoren einwirkten, die ein Ekzem bedingten und die Filaggrinmutation aktiviert ließen. Studien, die dieses Thema aufgreifen, gibt es bereits. Rodriguez *et al.* untersuchten die Methylierungsmuster diverser AE assoziierter Gene, darunter auch des Filaggrin-Gens (Rodriguez *et al.*, 2014). Sie verglichen die Methylierungsmuster von erkrankter und gesunder Haut sowie von einzelnen Blutzellgruppierungen bei Patienten mit AE und gesunden Kontrollprobanden. Signifikante Unterschiede für die Methylierungsmuster von Trägern und Nicht-Trägern der Filaggrinmutation sowie zwischen den einzeln untersuchten Geweben konnten sie nicht finden. Wieviele Träger der Filaggrinmutation jeweils unter den Probanden mit AE und ohne AE waren, wurde nicht genannt. Auch fehlte die Information, ob die Patienten homozygot oder heterozygot eine Filaggrinmutation vorliegen hatten. Zudem wurden nur 28 Patienten mit AE und 29 gesunde Kontrolle in die Studie eingeschlossen, wodurch sich die fehlende Signifikanz erklären könnte. Ebenso wird betont, dass ihre Ergebnisse auf weitere unerforschte epigenetische Mechanismen hinweisen, die auf Unterschiede zwischen abgelesenen Gencode und dem tatsächlichen Transkript schließen lassen (Rodriguez *et al.*, 2014). Das lässt Raum für weitere Studien, die zu diesem Thema in der Zukunft folgen könnten. Beispielsweise könnte man ausgehend von genetisch und klinisch komplexer differenzierteren Patientengruppen die Methylierungsmuster wie Rodriguez *et al.* untersuchen. Genetisch ließen sich Probanden mit heterozygotem und homozygotem Mutationsträger unterscheiden. Klinisch könnte man die hautgesunden Träger einer Filaggrinmutation in die mit und ohne Ekzem in der Vorgeschichte unterscheiden, sodass folgende Gruppen zu vergleichen wären:

1. AE FLGmut homozygot
2. AE FLGmut heterozygot
3. AE FLGwt
4. Kont FLGmut homozygot mit AE in der Vorgeschichte
5. Kont FLGmut homozygot ohne AE in der Vorgeschichte
6. Kont FLGmut heterozygot mit AE in der Vorgeschichte
7. Kont FLGmut heterozygot ohne AE in der Vorgeschichte
8. Kont FLGwt mit AE in der Vorgeschichte
9. Kont FLGwt ohne AE in der Vorgeschichte

Jedoch könnte es unserer Erfahrung nach eine größere Screening-Herausforderung sein, hautgesunde Probanden mit Filaggrinmutationen zu finden. Ebenso müsste man diskutieren, ob konsequenterweise neben den beiden häufigsten Filaggrinmutationen (R501X und 2282del4) die weiteren 30 inzwischen gefundenen Genoloci (Weidinger & Novak, 2015) in diese Untersuchung miteinbezogen werden sollen, und definieren, ab wann jemand als homozygot compound gilt. Homozygot compound bedeutet in diesem Fall, dass an unterschiedlichen Genloci für das Filaggrinprotein Mutationen vorliegen, die die Produktion des Proteins soweit wie bei einem homozygoten Genotyp für die Filaggrinmutation senken würden.

Mit der Untersuchung des Filaggrinproteins und dessen Epigenetik ist man jedoch weitestgehend auf nur einen Teil der Mauer der Hautbarriere („Brick and Mortar“-Modell) (1.4.1) fokussiert – die „Ziegelsteine“. Dabei spielt der „Mörtel“ der Mauer des SC in der Erforschung der Hautbarriere und ihrer biophysikalischen Funktionsparameter eine mindestens ebenso wichtige Rolle.

Ließe sich diesbezüglich die Funktion der Hautbarriere auf das Vorhandensein einer Filaggrinmutation reduzieren, wären im Falle einer Deaktivierung der Mutation bei den Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut) die Capacitance und der TEWL höchstens so hoch wie von den Kontrollpatienten in der Gruppe 4 (Kont FLGwt) zu erwarten. Hingegen waren beide Werte höher.

In Bezug auf die oben genannte Frage nach Unterschieden in der Hautbarriere von Probanden mit Filaggrinmutation und bledem Hautstatus anhand ihrer klinischen Vorgeschichte könnte die Lipidforschung Antworten geben.

Darum ist denkbar, dass es einen weiteren Faktor in der Hautbarriere gibt, der die Hautbarriere vor den negativen Einflüssen der Filaggrinmutation schützt und sie sogar darüber hinaus verbessern kann. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine spezifische Lipidkomposition, die durch die NLS-Exposition gestört wird, wie es Törmä *et al.* sahen. Ebenso ist denkbar, dass NLS diesen unbekanntem Faktor „auswäscht“, wie es Imokawa *et al.* für die gesamte Lipidmenge nach Anwendung einer 5% Lösung beobachteten (Imokawa *et al.*, 1989; Törmä & Berne, 2009). Spannend ist hierbei, dass sich die Hautbarriere messbar anhand der Capacitance besserte, nachdem man die aus der NLS-Lösung isolierten Lipide wieder aufgetragen hatte (Imokawa *et al.*, 1989). Fulmer *et al.* zeigten bereits 1986, dass die längerfristig repetitive kurze Anwendung von NLS-Lösung die Lipidzusammensetzung der Haut verändert. Dabei wiesen sie nach, dass sich nur qualitative Unterschiede in der Komposition und nicht quantitative Veränderungen zeigten (Fulmer & Kramer, 1986). Widmer *et al.* führten 1994 den Versuch von Fulmer *et al.* über drei statt zwei Wochen mit 0,5% NLS Lösung in okklusiver statt offener Applikation über eine Stunde durch (Widmer, Elsner, & Burg, 1994). Mit dem Ziel, das chronisch irritative Handekzem zu untersuchen, wurden nach der Applikationsphase zu definierten Zeitpunkten Reexpositionen mit NLS sowie TEWL-Messungen durchgeführt. Diese konnten zeigen, dass die Probanden einen geringeren TEWL als die zuvor nicht exponierten Kontrollpatienten aufwiesen. Das wurde als „Skin Hardening“ („Abhärtung“ der Haut) bezeichnet, dessen Mechanismus bis dato noch nicht verstanden ist (Heinemann *et al.*, 2005). Die Ergebnisse liefern Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem „Skin Hardening“ und den Lipiduntersuchungen. Denn sie konnten einen signifikanten Anstieg von Ceramid 1 nach drei Wochen Behandlungsstopp und einen geringeren TEWL nach erneuter NLS-Exposition okklusiv über 23 Stunden messen (Heinemann *et al.*, 2005). Dies sind Hinweise für eine dynamische Reaktion auf eine chronische Exposition mit NLS-Lösung.

Wie Kligman treffend im Jahre 2006 feststellte, ist das SC alles andere als eine „tote“ Struktur (Kligman, 2006). Es reagiert aktiv auf chronische, aber auch auf akute Reize sehr differenziert.

Nach geringsten Einwirkungen eines exogenen Stressors wie im Tesafilm-Abriss-Test (kurz: tape strip) werden aus dem LB präformierte Lipide freigesetzt, und die

epidermalen mRNA Level zur Lipidsynthese steigen (Törmä & Berne, 2009). Bereits submizelläre Konzentrationen von NLS reichen aus, um die 3D-Struktur von Proteinen *in vitro* zu verändern (Bhuyan, 2010). Es ist anzunehmen, dass die penetrations- und durchblutungssteigernde Wirkung von Okklusivverbänden (Braham *et al.*, 2010; Kannon & Garrett, 1995) diese Effekte verstärken.

Törmä *et al.* führten die gleiche Applikation von 1% NLS-Lösung wie bei uns bei hautgesunden Probanden ohne bekannten Filaggrinmutationsstatus durch. Sie fanden eine Desorganisation der Lipide, die bis zu zwei Tage nach Applikationsende persistierte und sich dann spontan reversibel zeigte. Zudem konnten sie ein verändertes Expressionsmuster der mRNA für lipidsynthetisierende Enzyme nachweisen (Törmä & Berne, 2009). Bandier *et al.* hatten ebenfalls 1% NLS Lösung in der gleichen Applikationsweise bei Kontrollpatienten durchgeführt, sodass man ihre Ergebnisse gut zueinander in Beziehung setzen kann (Bandier *et al.*, 2015). Im Zeitraum von bis zu drei Tagen nach der Applikation von NLS konnte eine Desorganisation der Lipide von Törmä *et al.* und ein erhöhter TEWL bei den Probanden von Bandier *et al.* festgestellt werden. Während der TEWL darauf wieder sank, reorganisierten sich in dem gleichen Zeitfenster die Lipide und erreichten schließlich ihre ursächliche Komposition, ohne dass erneute NLS-Applikationen in der Zwischenzeit erfolgten (Bandier *et al.*, 2015; Törmä & Berne, 2009). Zu erwähnen ist, dass dieser Versuch nur an hautgesunden Probanden durchgeführt wurde. Interessant wäre eine Wiederholung des Versuchs an unseren vier Probandengruppen. Hier könnte man nach Unterschieden in der Reorganisationsphase in Bezug auf das Expressionsmuster der mRNA für lipidsynthetisierende Enzyme sowie die Lipidstrukturen und den dafür benötigten Zeitablauf suchen.

Anhand dieser Befunde wird deutlich, dass bereits kleinste Einwirkungen durch exogene Stressoren ausreichen, um die differenzierte Orchestrierung der Lipide im SC aus dem Takt zu bringen. Aus diesem Grund haben wir uns dem Lipidprofil in einem weiteren Teilversuch gewidmet.

5.3 Einfluss von Filaggrinmutationen auf das epidermale Lipidprofil

Das epidermale Lipidprofil ist komplex strukturiert. Zur groben Orientierung kann man zwischen freien Fettsäuren, Cholesterol und Ceramiden unterscheiden. Wir haben in unserer Arbeit die Ceramide genauer untersucht. Diese kann man nach ihrem Entstehungsweg in Glucosylceramide, Acyl-Glucosylceramide und Sphingomyeline unterteilen (1.4.4). Funktionell zeichnet sich die Gruppe der Glucosylceramide dadurch aus, dass diese Ceramide an Involucrin binden können und so den CE des Keratinozyten bilden. In der Gruppe der Glucosylceramide sind die Ceramide 3, 6, 7, 8 und in der Gruppe der Acyl-Glucosylceramide sind die Ceramide 1, 4 und 9. Ceramid 2 und 5 zählen zu den Sphingomyelinen (Holleran *et al.*, 2006).

Seit man 1983 erstmals sechs Ceramide mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC) nachwies und ihre Struktur aufschlüsselte, unterschied man sie zumeist durch ihre Reihenfolge in der Darstellung der HPTLC in Ceramid 1 bis 6 (P. W. Wertz & Downing, 1983). Die danach gefundenen Ceramide wurden vorwiegend basierend auf ihrer chemischen Struktur gekennzeichnet (Motta *et al.*, 1993). Bis 2010 konnte man bis zu neun Ceramide in der Dünnschichtchromatographie darstellen. Wir

führten unsere Versuche im Jahre 2009 durch und unterschieden ebenfalls neun Ceramide. Hingegen ließen sich die Ceramide 9 und 2 sowie die Ceramide 5 und 8 nur gemeinsam in der prozentualen Analyse aufschlüsseln (Jungersted, Scheer, *et al.*, 2010).

Signifikante Unterschiede konnten wir nur für die Acyl-Glucosylceramide Ceramide 1 und 4 und für die Glucosylceramide mit Ceramid 7 zwischen den einzelnen Versuchsgruppen finden.

Für Ceramid 1 konnten wir signifikant niedrigere Werte in der Gruppe 2 (AE FLGwt) im Vergleich zur Gruppe 4 (Kont FLGwt) finden. Es ist bekannt, dass es bei Patienten mit AE vermindert ist (Imokawa *et al.*, 1991; B. Melnik, Hollmann, & Plewig, 1988) und auch bei ansonsten gesunden Probanden in den Wintermonaten sinken kann (Conti, Rogers, Verdejo, Harding, & Rawlings, 1996). Die relativ niedrigen Werte für Patienten mit AE (Gruppe 1 und 2) im Vergleich zu gesunden Probanden (Gruppe 3 und 4) konnten wir mit 13,4% für die Gruppe 1 (AE FLGmut) und mit 12,6% für die Gruppe 2 (AE FLGwt) bestätigen. Signifikant niedrig ist der Wert bei Gruppe 2 (AE FLGwt) im Vergleich zur Gruppe 4 (Kont FLGwt) (12,6% zu 16,9%). Deswegen kann man auf den ersten Blick annehmen, dass das Vorhandensein einer Filaggrinmutation keinen signifikanten Einfluss auf die Menge von Ceramid 1 im SC hat.

Ceramid 4 ist für die Gruppe 1 (AE FLGmut) mit 6% jeweils im Vergleich zu den Kontrollpatienten in Gruppe 3 (Kont FLGmut) (8,7%) und 4 (Kont FLGwt) (7,8%) signifikant erniedrigt ($p=0,032$ und $p=0,006$).

Ceramid 7 war bei den Patienten der Gruppe 1 (AE FLGmut) im Vergleich zu den beiden Gruppen 3 und 4 der klinisch Gesunden (Kont FLGmut und Kont FLGwt) signifikant erhöht (12,5 %). Bei den Probanden der Gruppe 2 (AE FLGwt) konnten wir auch einen signifikant höheren Wert im Vergleich zur korrespondierenden gesunden Kontrollgruppe (Kont FLGwt) feststellen ($p=0,015$ und $p=0,009$). Über Ceramid 7 wurde bisher kaum berichtet, da die technischen Methoden für dessen Nachweis erst im Jahre 2005 etabliert wurden. Farwanah *et al.* fanden ebenfalls ein tendenziell erhöhtes Ceramid 7 bei Patienten mit AE und Psoriasis in nicht-läsionaler Haut. Eine Differenzierung der Probanden in Abhängigkeit vom Filaggrinmutationsstatus erfolgte in dieser Studie nicht (Farwanah, Raith, Neubert, & Wohlrab, 2005). Anhand dieser Befunde lässt sich vermuten, dass Ceramid 7 bei Patienten mit AE erhöht ist. Ob eine Filaggrinmutation zusätzlich einen Anstieg von Ceramid 7 bedingen kann, lässt sich mit den vorhandenen Daten nicht sicher beurteilen.

Die Ergebnisse für die Ceramide 4 und 7 wurden vor unserer Studie noch nicht publiziert (Jungersted, Scheer, *et al.*, 2010). Insgesamt waren Ceramid 1 und 4 bei Patienten mit AE (Gruppe 1 und 2) im Vergleich zu Patienten ohne AE (Gruppe 3 und 4) vermindert.

Das Ceramid 1 spielt auch beim „Skin Hardening“ eine Rolle. Es steigt nach der repetitiven Exposition gegenüber NLS-Lösung bei den Probanden an, bei denen sich dieses „Hardening“ entwickelt und kein TEWL-Anstieg nach NLS-Exposition mehr zu beobachten ist. Bei den Probanden, die keinen Anstieg von Ceramid 1 haben, ist weiterhin ein erhöhter TEWL auf NLS-Exposition auslösbar. Die Höhe des

Ausgangswertes für Ceramid 1 konnte dafür nicht als prädiktiv beurteilt werden (Heinemann *et al.*, 2005).

Vor dem Hintergrund, dass Ceramid 1 eine wichtige Rolle bei der Organisation der SC Lipide innehat (Bouwstra *et al.*, 1998), wäre es interessant, das Phänomen des „Skin Hardenings“ bei unseren vier Probandengruppen zu untersuchen. Zwar scheint das Vorliegen einer Filaggrinmutation keinen Einfluss auf die Ausgangswerte von Ceramid 1 zu haben, möglicherweise beeinflusst es aber den Prozess des „Skin Hardenings“.

Zudem ist bekannt, dass die Ceramide 1 und 4 zur Gruppe der Acyl-Glucosylceramide gehören, die kurz Acyl-Ceramide genannt werden. Für deren Produktion hat das Enzym Glucosylceramid-Deacylase eine Schrittmacherfunktion inne (Imokawa, 2009). Dieses Enzym hat ein Funktionsoptimum bei einem pH-Wert nahe 5 (Higuchi, Hara, Okamoto, Kawashima, & Imokawa, 2000). Wir konnten in unseren Versuchen nachweisen, dass deutlich höhere Werte bei allen Probanden mit FLGmut (Gruppe 1 und 3) bestanden. Jedoch spiegelte sich dies nicht im Ceramidprofil wider. Der höchste Ceramid 4 Anteil (8,7%) und der zweithöchste Ceramid 1 Anteil (14,9%) ließen sich bei der Gruppe 3 (Kont FLGmut) nachweisen, die zugleich den zweithöchsten pH-Wert nach der Gruppe 1 (AE FLGmut) aufweist.

Der „Säureschutzmantel der Haut“ wie er in der englischsprachigen Literatur als „Acid Mantle“ beschrieben wird, entsteht nach heutigen Erkenntnissen über drei Wege (1.4.3). Unter anderem ist das Filaggrinprotein daran beteiligt (Ohman & Vahlquist, 1998). Anders als es Fluhr *et al.* im Jahre 2010 postulierten (J. W. Fluhr *et al.*, 2010), konnten Vavrova *et al.* zeigen, dass die Produktion von Filaggrin nicht notwendig ist, um den „sauren“ pH-Wert des SC zu schaffen (Vavrova *et al.*, 2014). Sie konnten in einem Knockdown-Modell für das Filaggrinprotein zeigen, dass trotz des fehlenden Filaggrinproteins ein suffizienter pH-Wert aufrechterhalten werden konnte. Hierfür rekonstruierten sie Haut aus menschlichen Keratinozytenproben. Sie fanden, dass der pH-Wert über das Enzym sPLA2 gesenkt wurde. sPLA2 produziert FFA durch Hydrolyse von Phospholipiden und senkt dadurch zugleich den pH-Wert des SC (J. Fluhr & Elias, 2002). In dem so produzierten sauren Milieu konnte auch die Glucosylceramid-Deacylase für die Generierung der Acyl-Ceramide wirken und die Ceramide, wie bei gesunden Kontrollprobanden produzieren. Dennoch stellten sie fest, dass der vermehrte Anfall an FFA zu Einbußen bei der Hautbarriere führte. Man konnte eine Desorganisation der Lipid-Lamellarstruktur feststellen (Vavrova *et al.*, 2014).

Zwar kann man sich vorstellen, dass ein niedriger pH-Wert für die Acyl-Ceramidproduktion auf diese Weise erzielt werden kann. Die Probanden unserer Gruppe 3 (Kont FLGmut) hatten auch eine intakte Acyl-Ceramidproduktion (Ceramide 1 und 4) jedoch einen erhöhten pH-Wert. Darum kann man unsere Ergebnisse anhand dieser Informationen nicht direkt mit den Beobachtungen von Vavrova *et al.* erklären und muss nach anderen Ursachen suchen.

Der pH-Wert des SC ist keine Konstante über alle Schichten der Haut hinweg. Die zur pH-Wert-Bestimmung zur Verfügung stehenden Methoden kann man nur an der Oberfläche anwenden (3.4.1). Ohman *et al.* konnten 1998 zeigen, dass es einen Gradienten des pH-Wertes innerhalb des SC gibt, indem sie im tape strip Verfahren das SC Schicht für Schicht lösten (Ohman & Vahlquist, 1998). So konnten sie trotz

der limitierten Messmethode in anderen SC Schichten einen pH-Wert bestimmen. Auf diese Weise konnten sie zeigen, dass die pH-Werte vom SG bis zur Oberfläche des SC sinken, und dass sich Variationen dieses Verlaufs in Abhängigkeit von dermatologischen Erkrankungen finden lassen. So wiesen Patienten mit X chromosomal rezessiver Ichthyosis einen „sauen“ pH-Wert von 5,9-7,2 im SG und an der Oberfläche des SC (pH 4,3) auf, der mit der mutationsbedingt vermehrten Akkumulation von Cholesterolsulfat erklärbar ist. Hingegen fanden sie bei Patienten mit Ichthyosis vulgaris und Filaggrinmutation einen erhöhten pH-Wert sowohl im SG (pH 6,8-7,3) als auch an der Oberfläche des SC (pH 5,3), den sie mit den mutationsbedingt fehlenden Substraten für die Senkung des pH-Wertes erklärten. Interessanterweise sank der pH-Wert bei den Patienten mit IV nach den ersten zehn tape strips und näherte sich den niedrigen pH-Werten der gesunden Kontrollpersonen an, bevor er an der Oberfläche des SC wieder basischer wurde. Auf diese Weise liegt laut deren Ergebnissen der „sauerste“ pH-Wert von Patienten mit Ichthyosis vulgaris nicht an der Hautoberfläche, sondern einige Schichten darunter (Ohman & Vahlquist, 1998).

Inwiefern das Trauma des repetitiven tape strips auf die Entwicklung des pH-Werts wirkt, wurde von den Autoren nicht diskutiert. Dennoch ist anhand dieser dynamischen Verläufe des pH-Wertes denkbar, dass sich pH-Wert abhängige Prozesse auf die Schichten verlagern könnten, die die notwendigen Werte bieten. Es gibt keine Vergleichsstudien zu dem pH-Gradienten in gezüchteter Haut und in direkten Hautproben von Probanden. Vavrova *et al.* haben nur direkt an der Oberfläche des SC den pH-Wert bestimmt. Man kann sich vorstellen, dass dieser kurz vor der Oberfläche des SC seinen Tiefstwert erreicht und an der Oberfläche wieder ansteigt, wie es Ohman *et al.* beobachteten (Ohman & Vahlquist, 1998). So wäre möglich, dass die pH-Wert abhängigen Prozesse für die Ceramidgenese trotz oberflächlich „basisch“ gemessener Werte im SC stattfinden könnten, aber nur in einer etwas tieferen Schicht. Das könnte die intakte Acyl-Ceramidproduktion trotz oberflächlich erhöht gemessenen pH-Wertes in unserer Gruppe 3 (Kont FLGmut) erklären.

Die Ceramide, die durch diese Prozesse entstehen, wurden zum Zeitpunkt unserer Versuche im Jahre 2009 in neun Gruppierungen unterschieden. Inzwischen wurden weitere Ceramide im menschlichen SC entdeckt, die sich in 12 Ceramidklassen und 342 unterschiedliche Spezies einordnen lassen. Die hohe Zahl einzelner Spezies ist bedingt durch die seit 2008 mögliche Unterscheidung der Anzahl der einzelnen Kohlenstoffatome innerhalb der Ceramidklassen. Hier können zwischen 32 und 56 sowie bei den Acyl-Ceramiden 62 und 78 Kohlenstoffatome vorhanden sein (Masukawa *et al.*, 2008; van Smeden *et al.*, 2014).

Daraus ergibt sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Lipidkompositionen, die das Feld der Lipidforschung deutlich komplexer gestalten und die Frage nach einem AE begünstigenden Lipidprofil aufwerfen. Initial erfolgte die Benennung der Ceramide nach ihrer Reihenfolge der Darstellung in der HPTLC (P. W. Wertz & Downing, 1983). Wertz, auf den diese Benennung zurückgeht, erläuterte 20 Jahre später, dass diese Benennung Nachteile birgt: 1. Zwei menschliche Ceramide werden nicht zwangsläufig in der HPTLC voneinander getrennt dargestellt. 2. Nicht alle Labore haben weltweit die gleichen Untersuchungstechniken, sodass es zu einer unterschiedlichen Reihenfolge der Ceramide in der HPTLC kommen kann und Missverständnisse entstehen (P. Wertz, 2006). Aus diesem Grund begann sich seit

2006 die Benennung nach Motta *et al.* durchzusetzen (Masukawa *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 1993; van Smeden *et al.*, 2011) (Tabelle 7). Diese basiert auf der chemischen Strukturformel der Ceramide. Neben den oben genannten Vorteilen kann man zudem auf einen Blick erkennen, welcher Klasse das Ceramid angehört (Sphingosine (S), Phyto-sphingosine (P), Hydroxysphingosine (H), Acyl-Ceramide (E)). Die Kommunikation ist unmissverständlich. In der Zeit, in der beide Benennungen simultan verwendet wurden, konnte man im Studienvergleich insbesondere für die Ceramide 5 bis 7 sehen, dass diese unterschiedlich zugeordnet werden (Mizutani, Mitsutake, Tsuji, Kihara, & Igarashi, 2009; Uchida, 2006). Unsere Studie und Publikation fanden ebenfalls in dieser Umstellungsphase statt, sodass wir beide Benennungen verwendeten (Jungersted, Scheer, *et al.*, 2010).

Masukawa *et al.* vermuteten bereits im Jahre 2008, dass je länger die Ceramidkette ist, desto besser deren Wasser bindende Fähigkeiten und deren Schutzfunktion gegenüber exogenen Chemikalien sind (Masukawa *et al.*, 2008). Eckl *et al.* konnten im Jahre 2013 nachweisen, dass die langkettigen Ceramide im SC entscheidend für die Etablierung einer intakten Hautbarriere sind, und dass diese bei Patienten mit kongenitalen Barriere-defekten wie einer autosomal rezessiv vererbten Ichthyosis vulgaris reduziert zu finden sind. Insbesondere trifft dies auf die Acyl-Ceramide zu, die die längsten Ketten aufweisen und als an den CE gebundene Ceramide an der Formierung des CLE beteiligt sind (Candi *et al.*, 2005; Eckl *et al.*, 2013). Die Autoren heben hierbei EOS hervor, welches Ceramid 1 entspricht (Eckl *et al.*, 2013).

Ausgangspunkt der Studie von Eckl *et al.* war das Enzym CerS3, welches zu der Familie der Ceramid Synthasen (CerS) gehört, von der bis heute sechs Mitglieder (CerS 1-6) gefunden wurden. CerS sind in einem sehr frühen Schritt der Ceramid De-Novo-Synthese beteiligt. Jedes CerS ist für eine andere Kettenlänge. CerS 3 verarbeitet besonders die langkettigen Kohlenwasserstoffketten und weist ein breites Aktionsspektrum auf. Außerdem sticht es mit seiner Aktivität in differenzierten Keratinozyten besonders hervor (Mizutani *et al.*, 2009). Eckl *et al.* gelang für diese Studie erstmals ein CerS-Knockdown-Modell (Eckl *et al.*, 2013).

Theoretisch könnte für jedes einzelne Enzym, das an dieser Reaktionskette beteiligt ist, mindestens eine Mutation bestehen, die das fein austangierte System aus dem Gleichgewicht bringt. Mizutani *et al.* berichteten bereits im Jahre 2009 in ihrem Review von einer möglichen fehlenden Aktivität der Enzyme, die Dihydro-Ceramide verarbeiten. Hierbei handelt es sich um DES1 und DES2 sowie einer Überaktivität des neu entdeckten Enzyms Glucosyl-CER-SM-Deacylase (Higuchi *et al.*, 2000; Mizutani *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang steht die CerS noch weiter oben in der Synthetisierungskaskade, da sie Dihydro-Ceramide, die Substrate für DES1 und DES2, generiert. Als Enzym für die langkettigen Verbindungen ist CerS3 maßgebend für die Synthese von Acyl-Ceramiden verantwortlich (Eckl *et al.*, 2013).

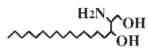
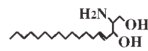
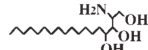
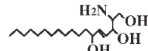
Es wird deutlich, dass es genetisch vielfältige Gründe für die Ausbildung eines AE begünstigenden Lipidprofils geben kann. Die Filaggrinmutation lässt sich in diesem Zusammenhang als endogen einstufen. Sie beeinflusst maßgeblich jedoch nicht nur den pH-Wert und die Hydrierung des SC. Die Bedingungen für die Bildung von Ceramiden und das daraus resultierende Lipidprofil werden durch sie zu einem großen Anteil geprägt. Eine einzelne Ceramidfraktion lässt sich dabei nicht als defekt und substitutionsbedürftig eingrenzen. Ebenso ist kein konkreter Weg in der Ceramidgenese als betroffen benennbar, wie es bei der autosomal rezessiven

Ichthyosis durch CerS3 Mutation der Fall ist (Eckl *et al.*, 2013). Zudem finden sich neben diesen endogenen Ursachen auch exogene. Bei Patienten mit AE wurden beispielsweise vermehrt Ceramidase produzierende Bakterien gefunden (Ohnishi, Okino, Ito, & Imayama, 1999).

Tabelle 7

Struktur und Nomenklatur der Ceramide im menschlichen Stratum corneum SC.

Mit Erlaubnis der Arbeit von Masukawa *et al.* entnommen (Masukawa *et al.*, 2008).
(Fatty acid= Fettsäure, esterified= verestert, CER= Ceramid)

Fatty acid Sphingoid	Non-hydroxy fatty acid [N]	α -hydroxy fatty acid [A]	Esterified ω -hydroxy fatty acid [EO]
Dihydrosphingosine [DS] 	CER[NDS]	CER[ADS]	CER[EODS]
Sphingosine [S] 	CER[NS]	CER[AS]	CER[EOS]
Phytosphingosine [P] 	CER[NP]	CER[AP]	CER[EOP]
6-hydroxy sphingosine [H] 	CER[NH]	CER[AH]	CER[EOH]

Es ist wichtig, diese vielfältigen Einflussfaktoren für das Lipidprofil zu kennen, um innovative Therapieansätze korrekt bewerten zu können. In den letzten Jahren wurden neue Ansätze in der topischen Therapie entwickelt, mit denen man Erkrankungen behandeln konnte, für die es bislang nur theoretisch systemische Therapieoptionen gab. Hierzu zählt das CHILD-Syndrom (Congenital Hemidysplasia with Ichthyosiform erythroderma and Limb Defects = Kongenitale Hemihyperplasie mit ichthyosiformer Erythrodermie und Gliederdefekten), das sich auf einen Defekt des NSDHL Enzyms zurückführen lässt, welches die Cholesterinbiosynthese steuert. Der Defekt bedingt eine mangelhafte Produktion von Cholesterin, welches neben FFA und Ceramiden die dritte Lipidfraktion im SC darstellt. Die fehlerhafte Produktion bedingt das klinische Bild der ichthyosiformen Erythrodermie, die dem AE ähnelt. Da bei dem Enzymdefekt nicht nur das Endprodukt der Cholesterinsynthese fehlt, sondern die von NSDHL nicht umgesetzten pathogenen Vorstufen akkumulieren, war eine alleinige Cholesterinsubstitution bisher nicht wirksam. Aus diesem Grund setzten Paller *et al.* auf eine kombinierte topische Therapie, die einerseits in einem früheren Schritt die Bildung der pathogenen Vorstufen hemmt und das Endprodukt Cholesterin substituiert. Hiermit konnten sie eine signifikante Verbesserung der Ichthyosis erzielen (Paller *et al.*, 2011). Es ist gut vorstellbar, dass man ähnlich bei Patienten mit Cer3 Mutation in der Behandlung ansetzen kann. Auch für Patienten

mit Filaggrinmutation gibt es ähnliche Ideen. Lai-Cheong *et al.* schlagen vor, dass man in Zukunft eine Substitution von Filaggrin oder eine gezielte Hochregulation der Filaggrinproduktion bei residueller Expression für Patienten therapeutisch einsetzen könnte (Lai-Cheong, Elias, & Paller, 2013). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Mildner *et al.*, die zeigten, dass Lipide auch ohne Filaggrin gebildet werden konnten (Mildner *et al.*, 2010). Bevor man die Ergebnisse von Mildner *et al.* kategorisch zum Ausschluss des von Lai-Cheong vorgeschlagenen Ansatzes heranzieht, lohnt sich eine genauere Betrachtung der Methoden und Resultate von Mildner *et al.* Ihre Ergebnisse basierten auf einem organotypischen Modell, das Keratinozyten von Hautexzisaten nach Zirkumzision bei Kindern gewinnt und diese in boviner Matrix anzüchtet. Angaben zu dem Mutationsstatus von Filaggrin und anderen hautbarrierebeeinflussenden Faktoren werden bei Mildner *et al.* nicht genauer aufgeführt oder diskutiert. Das sind aber wichtige Faktoren, wenn man die Epigenetik in die Untersuchung der Hautbarriere miteinbezieht. Zudem konnten Mildner *et al.* keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Ceramidfraktionen bei filaggrinproduzierenden und Knockdown-Filaggrin Hautproben finden. Dennoch bildeten sich nicht identische Lipidprofile für die unterschiedlichen Gruppen ab, sodass man sich überlegen sollte, inwiefern man Unterschiede von Lipidprofilen bewertet. Außerdem wurde von Mildner *et al.* nicht genannt, wie viele Proben sie in den zu vergleichenden Gruppen zur Verfügung hatten, sodass man die Nicht-Signifikanz schlecht nachvollziehen kann.

Auch wenn die Ergebnisse von Mildner *et al.* nicht eindeutig gegen die Überlegungen von Lai-Cheong *et al.* sprechen, ist deren Umsetzung aktuell eigentlich nicht erfolversprechend. Das Filaggrinprotein durchläuft viele Verarbeitungsprozesse. Zudem hat es vielfältigen, jedoch nicht alleinigen Einfluss auf entscheidende Faktoren der Hautbarriere (pH-Wert, TEWL UV-Schutz) (1.4.2 und 1.4.3). Aus diesem Grund ist schwer vorstellbar, dass die Substitution von Filaggrin oder die Hochregulierung der Expression allein einen deutlichen Nutzen bringen. Hinzu kommt, dass die Hochregulation der Genexpression für einzelne Patienten zum aktuellen Forschungszeitpunkt noch Zukunftsmusik ist.

Zwar wurde im Jahre 2011 bei filaggrindefizienten Patienten nachgewiesen, dass bei ihnen weniger Inhalt in den LBs und eine abnorme lamelläre bilayer Struktur vorhanden ist, jedoch wurden keine Angaben zu den Anteilen der einzelnen Lipidfraktionen gemacht (Gruber *et al.*, 2011). Ebenso ist auch noch nicht klar, inwiefern epigenetische Einflüsse im Vergleich zu vorhandenen Mutationen wie der Filaggrinmutation für die Entstehung des AE zu gewichten sind.

Unsere Ergebnisse für das epidermale Lipidprofil der Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut) regen zu Überlegungen zur Epigenetik an. Diese Probandengruppe weist trotz Filaggrinmutation und deutlich erhöhtem pH-Wert an der Hautoberfläche einen blanden dermatologischen Status auf. Die einzelnen Ceramidfraktionen weisen keine signifikanten Größenunterschiede im Vergleich zu den anderen Gruppen auf. Dennoch zeigt sich, dass das Ceramidprofil ähnlich dem von der Kontrollgruppe 4 (Kont FLGwt) ist, aber mit der Ausnahme, dass die Ceramide 3 und 4 die größten Fraktionen bei Gruppe 3 (Kont FLGmt) sind. In Anbetracht der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der Ceramidfraktionen für das Lipidprofil sowie der möglichen beteiligten Mutationen von beeinflussenden Faktoren (FLG, CerS3, DES1, Sphingomyelinase) erschließen sich nahezu unendlich viele Ansatzpunkte für eine genmodulatorische Therapie.

Hier stellt sich die Frage, ob man mit dem wachsenden Wissen, insbesondere in der Lipidforschung, nicht ebenso pragmatisch wie Paller *et al.* verfahren sollte und eine substituierende Creme für die jeweiligen Lipidmängel entwirft (Paller *et al.*, 2011). Dieser Gedanke ist naheliegend, jedoch ist die Umsetzung bisher noch nicht geglückt.

Die historisch wohl bekannteste Rezeptur einer Creme, die die Trockenheit der Haut lindern sollte, wurde von Galen im 2. Jahrhundert nach Christus festgehalten (Kerscher, 2009). Diese wurde in den letzten Jahrhunderten unter dem englischen Namen Cold Cream (= Kühsalbe) bekannt (Bennett, 2015; Mann, 1929). Die Inhaltsstoffe sind Bienenwachs, Olivenöl und Wasser (Bennett, 2015).

Die einzelnen Bestandteile wurden im Laufe der Jahre durch mineralische Öle ersetzt, die dieselbe Wirkung von Okklusion und Rehydrierung entfalten. Unter anderem wurde dafür Vaseline (engl. Petrolatum) eingesetzt (Bennett, 2015), die vermehrt in den auf dem Markt erhältlichen Hautpflegeprodukten auftaucht. Mao-Qiang *et al.* konnten im Jahre 1995 zeigen, dass der TEWL bereits kurz nach Vaselineapplikation reduziert wird. Sie erklärten dies über deren okkludierenden Effekt. Doch dieser hat auch den Nachteil, dass er die Reparaturmechanismen der Haut hemmt (Mao-Qiang, Brown, Wu-Pong, Feingold, & Elias, 1995). Hingegen konnte die Applikation von physiologischen Lipiden eine Wiederherstellung der Hautbarriere bewirken, der sich aber erst nach zwei Stunden manifestierte (Mao-Qiang *et al.*, 1995).

Physiologische Lipide einzusetzen ist ein Ansatz, der erstmals nach den Ergebnissen von Imokawa *et al.* 1986 bekannt wurde (Imokawa, Akasaki, Hattori, & Yoshizuka, 1986). Sie waren die Ersten, die hauteigene Ceramide für die Wiederherstellung der Hautbarriere verwendeten und zugleich Hinweise für deren Wirksamkeit erfassen konnten. Zuerst extrahierten sie die dem SC eigenen Ceramide mit Aceton und schlüsselten diese in der HPTLC auf. Anschließend reapplizierten sie diese in einer Mischung mit Squalenen. Im Vergleich zu den Hautarealen, die mit Squalenen und anderen Lipiden gepflegt wurden, konnten eine signifikante Verbesserung der SC Hydrierung und eine Reduktion der Schuppung erreicht werden (Imokawa *et al.*, 1986). Aus diesem Grund wurde von demselben Forscherteam die Frage nach einem spezifischen Ceramiddefizit bei Patienten mit AE formuliert (Imokawa *et al.*, 1991). Die Forschung in den Jahren danach versuchte mit synthetisch hergestellten Lipiden die gleichen positiven Effekte auf die Hautbarriere zu erzielen. Dabei konnten die Ceramide 2, 3, 5 und 6 jeweils einzeln in der Anwendung getestet werden. Hierbei zeigte sich, dass die positive Beeinflussung der komplexen Orchestrierung der SC Lipide schwierig ist. Der Einsatz nur einzelner Komponenten der Lipidfraktionen (Ceramide, FFA, Cholesterol) verlangsamt sogar den Wiederaufbau (Mao-Qiang, Feingold, & Elias, 1993). Bis dato weiß man über das Ceramid 1 am meisten. Insbesondere kennt man dessen für die Hautbarriere fördernden Eigenschaften (s.o.). Dennoch gelang es bisher nicht, das Ceramid 1 zu synthetisieren. Von manchen Autoren werden als Ursache hierfür hohe Kosten angegeben (Uchida, 2006). Möglicherweise hat sich aus diesem Grund die Forschung mehr auf die leichter synthetisierbaren Pseudoceramide und Stimulantien der endogenen Ceramidproduktion, zu denen Galaktosylceramid zählt, verlagert (Uchida, 2006).

Aktuell wird eine an das epidermale Lipidprofil angelehnte Mischung auf Ceramiden, FFA und Cholesterol in einem Verhältnis von 3:1:1 erforscht. Hier konnte festgestellt werden, dass sich die Hautbarriere bei deren Anwendung besser wieder aufbaut, als wenn man nur Cortison topisch einsetzen würde (Mao-Qiang *et al.*, 1995). Ebenso ließ sich in einem weiteren Versuch die Hautbarriere durch dieses Lokalthapeutikum nach mehrwöchiger Anwendung als widerstandsfähiger in Form eines reduzierten TEWL bei einem gesunkenen SCORAD messen (Chamlin *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu konnten Imokawa *et al.* im Jahre 1986 innerhalb weniger Tage mit den hauteigenen Ceramiden eine deutliche Verbesserung der Hautbarriere feststellen. Der entscheidende Unterschied ist bei diesem Vergleich, dass Mao-Qiang *et al.* keine grob dem Lipidprofil nachempfundene Mischung applizierten (Mao-Qiang *et al.*, 1995) und nicht wie Imokawa *et al.* exakt die fehlenden Ceramide ersetzten (Imokawa *et al.*, 1986).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Zukunft der topischen Therapie von AE in der Lipidforschung zu finden ist. Anstatt sich nur wie Vaseline in den interzellulären Räumen einzulagern, werden applizierte Ceramide in den Keratinozyten verstoffwechselt (Mao-Qiang *et al.*, 1995). Sofern es eines Tages möglich sein sollte, mit den einzelnen Ceramidfraktionen ein Lokalthapeutikum herzustellen, wäre es interessant, das ideale Lipidprofil zu kennen. Handelt es sich hierbei um eine allgemein für jeden gültige Idealkomposition (I) bzw. ein anforderungsspezifisches Ideal (II), oder sollte man für jedes Individuum von einer eigenen Lipidkomposition ausgehen, die Mängel auszugleichen vermag (III)? In Anbetracht der aktuellen Studienlage gibt es für jede dieser Optionen unterstützende Ergebnisse.

Für ein ausgleichendes Lipidprofil (III) sprechen unsere Ergebnisse für die Probanden der Gruppe 3. Diese sind ohne AE und weisen ein ähnliches Lipidprofil wie die Probanden der Gruppe (Kont FLGwt) auf, die ebenfalls ohne AE sind. Zudem fallen die Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut) durch eine deutlich erhöhte Capacitance und erhöhte Werte für den pH, den ∂ -TEWL und TEWL auf. Einerseits finden sich auf diese Weise Merkmale für eine gestörte und andererseits für eine suffiziente Hautbarriere, die in ihrem Zusammenspiel für ein soweit ausgewogenes Hautbild sorgen, dass klinisch keine Hinweise für ein AE bestehen.

Geht man von einem anforderungsspezifisches Ideal (II) aus, kann man die Ergebnisse zu dem „Skin Hardening“ (s.o) heranziehen. Bei dem „Skin Hardening“ wurde bei Probanden ein Anstieg von Ceramid 1 im Rahmen vermehrter Exposition gegenüber Reizstoffen beobachtet, das zu einer verbesserten Widerstandskraft der Haut führte. In diesem Sinne ist das ideale Lipidprofil plastisch zu betrachten, da es auf die Umgebungsbedingungen reagieren kann. Im Rahmen der dazugehörigen Studie entwickelten einige Probanden keinen Anstieg von Ceramid 1 und zugleich keine Widerstandskraft (Heinemann *et al.*, 2005). Der Ausgangswert von Ceramid 1 spielte hierbei keine Rolle, sodass man von einem spezifischen Ideal des Lipidprofils ausgehen kann, dass nicht von allen Probanden erreicht wurde.

Genauso ist eine generell für jeden ideale widerstandsfähige Lipidkomposition denkbar (I). Im Jahre 1919 beschäftigte man sich militärisch motiviert mit der Resistenz der Haut gegenüber Kampfgasen. So verglichen Smith *et al.* sensitive gegenüber resistenten Probanden in Bezug auf die kutane Reaktion auf Senfgas und führten eine Vielzahl an Kombinationen für eine Untersuchung durch. Unter anderem wurden Reibeversuche von Haut auf Haut durchgeführt, bei denen sensitive

Probanden ihre Haut auf der von resistenten Probanden rieben. Danach reagierten die sensitiven Probanden klinisch deutlich weniger auf die Senfgasapplikation (H. W. Smith, Clowes, & Marshall, 1919). Da man im Jahre 1919 weder den „Säureschutzmantel“ der Haut (1.4.3) noch das „Brick and Mortar Modell“ (1.4.1) kannte, fand diesbezüglich keine dezidierte Diskussion statt. Man sprach von einem „Element“, das auf der Haut sei und das das Ausmaß der Adsorptionskraft der Haut für Senfgas bedinge (H. W. Smith *et al.*, 1919). Vereinzelt tauchte dieser Versuch in der Literatur in allgemeinen historischen Rückblicken zur Hautbarriere auf, ohne dass dieser Versuchsansatz für die heutigen Fragestellungen in der Lipidforschung erneut beleuchtet wurde (Scheuplein & Blank, 1971). Jedoch könnte sich eine „Reinterpretation“ der Ergebnisse in Bezug auf die Thematik der idealen Lipidkomposition lohnen.

Vermutlich wurde in dem Versuch von Smith *et al.* ein entscheidender Anteil der Lipidkomposition von den resistenten auf die sensitiven Probanden übertragen, der sich schützend auswirkte. Es ist bekannt, dass Senfgas stark lipophil ist (Namazi, Niknahad, & Razmkhah, 2009). Im selben Versuch demonstrierten Smith *et al.* ebenfalls, dass die Applikation von Petrol (engl. Kerosene) einen schützenden Effekt auf die Senfgasapplikation hat (H. W. Smith *et al.*, 1919). Man kann sich anhand dieser Kenntnisse auch gut vorstellen, dass die Ceramide des SC eine ähnliche Funktion innehaben und dem im Jahre 1919 beschriebenen „Element“ entsprechen, das die Autoren damals in der Haut als adsorptive Kraft vermuteten. In der heutigen Zeit mit dem aktuellen Wissen über die Ceramide lässt sich kein Versuch finden, der dem von 1919 ähnelt. Darum wäre es interessant, Versuche in Anlehnung an diese Grundidee durchzuführen.

Für den menschlichen Körper physiologisch wichtige Zellen und Bakterien, die sich bislang nicht synthetisieren lassen, werden heutzutage von Spendern an bedürftige Patienten weitergegeben. Dies geschieht in Form von Bluttransfusionen bei Anämie aber in neuester Zeit auch in Form von Stuhltransplantationen bei geringer Diversität der Darmflora bei Clostridium difficile Infektionen. Obwohl man die bakterielle Flora des Darms noch nicht vollständig entschlüsselt hat, wagte man die Stuhltransplantation nach vorherigem Ausschluss von Infektionskrankheiten. Als Spender wurden zumeist Personen ausgewählt, die unter den gleichen Alltagsbedingungen leben und gastroenterologisch gesund waren (van Nood *et al.*, 2013). Man kann hier Parallelen zu der Problematik mit dem individuellen Lipidprofil und dessen Insuffizienzen beim AE erkennen. Dieses ist ebenfalls noch nicht vollständig entschlüsselt und aktuell noch zu komplex, um es synthetisch zu imitieren. Warum sollte man dann nicht auch das Lipidprofil von gesunden Spendern transplantieren können, wenn man dies bereits bei Stuhlproben durchführt?

Wie bei Imokawa *et al.* 1986 könnte man die Ceramide von gesunden Spendern in einer zumutbaren Menge extrahieren, aufschlüsseln und bei den Probanden mit AE applizieren (Imokawa *et al.*, 1986). Realistisch betrachtet kann man bei einem derartigen Versuch nicht von einer großen Lipidmenge ausgehen, da man nicht das gesamte epidermale Lipidprofil eines Menschen auf einmal abtragen kann, weil man vermutlich auf diese Weise beim Spender ein generalisiertes Ekzem auslösen würde. Darum müsste man initial von einer kleinen Extraktions- beziehungsweise Behandlungsfläche (z.B. 10 cm²) ausgehen. Die Ceramide müssten einzeln aufgeschlüsselt werden. Orientiert an einem idealen Lipidprofil und mit der Kenntnis des Lipidprofils des Empfängers könnte man die einzelnen Ceramide jeweils fein

dosiert applizieren. Zuvor und danach könnte man mit den biophysikalischen Messmethoden der Hautbarriere die Auswirkungen messen.

Mit diesen Versuchen ließe sich zumindest die Frage beantworten, inwiefern eine Balancierung der Ceramide des SC sich positiv auf die Hautbarriere von unter dem AE leidenden Patienten auswirkt. Sollte sich bestätigen, dass eine Substitution der Ceramide in Form spezifischer Lipidkompositionen die Regredienz des AE bewirkt, ist man nicht mehr weit von der maßgeschneiderten Creme entfernt. Die wirtschaftliche Motivation für die Forschung zur Synthetisierung der einzelnen Ceramidgruppen ist aktuell noch gering. Mit belegbaren Erfolgsaussichten würde die Motivation zur Synthetisierungsforschung gesteigert werden können, sodass man eventuell eine künstliche Herstellung menschlicher epidermaler Lipide erzielen könnte. Sofern die Synthetisierung gelänge, könnte man auch für individuelle Ansprüche (Kälte, Nässe) nach vorangehender Analyse des Lipidprofils eine für den einzelnen Patienten komponierte Creme herstellen.

5.4 Etablierung eines Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Penetration von Allergenen

In unserem Pilotversuch verglichen wir einen Kontrollprobanden ohne Filaggrinmutation mit einer Patientin, die unter einem AE litt sowie homozygot für die Filaggrinmutation war. Bei der Patientin konnten wir mit der immunhistochemischen Färbemethode nachweisen, dass das Allergen Phleum p6 bis in die tieferen Schichten des SC vordringen kann. Bei dem Kontrollpatienten ließ sich das Allergen im SC nicht nachweisen.

Wie unter 5.3 bereits beschrieben ging man schon lange vor der Entdeckung der Filaggrinmutation und ihren Zusammenhängen mit dem AE in medizinischen Versuchen der Frage nach, ob man zwischen sensitiven und robusten Menschen in Bezug auf die Hautbarriere unterscheiden kann. Vor 97 Jahren führte man diese Unterscheidung zwischen Probanden in Bezug auf die Reaktion auf Senfgasapplikation durch (5.3) (H. W. Smith *et al.*, 1919). Vermutlich geprägt durch die damals aktuellen gesellschaftlichen Gegebenheiten basierten die Versuche auf einer militärischen Motivation, sodass man Senfgas als Reizstoff einsetzte.

Im weiteren historischen Verlauf rückten Themen wie trockene Haut und Ekzembildung in der Forschung mehr in den Vordergrund (1.1). Man fragte sich, ob die läsionsfreie Haut von Patienten mit AE grundsätzlich leichter für Moleküle durchdringbar ist als die von Probanden ohne AE. Jakasa *et al.* untersuchten dies mit Polyethylenglykol und verwendeten unterschiedliche Molekulargewichtsstufen, die sie jeweils für sechs Stunden in wässriger Lösung mit Finn Chambers® auf die läsionsfreie Haut applizierten (Jakasa, Verberk, Esposito, Bos, & Kezic, 2007). Mit dem tape strip Verfahren wurde das SC Schicht für Schicht entfernt. In jeder Schicht wurde die Polyethylenglykol Konzentration bestimmt, die zeigte, dass Patienten mit AE im Median doppelt so viele Moleküle durchlassen wie die gesunden Kontrollprobanden. Dies war jeweils unabhängig von der Molekülgröße (Jakasa *et al.*, 2007). Das sind Ergebnisse, die vom Versuchsaufbau und der Studienidee unserem Pilotversuch sehr ähnlich sind. Jedoch wurden ihre Versuche durchgeführt, bevor die Ergebnisse von Palmer *et al.* die Mutation des Filaggrinproteins in den Fokus der Hautbarriereforschung rückten (Kapitel 1.4.5). Aus diesem Grund kann

man die Ergebnisse zur Penetration von Polyethylenglykol nur begrenzt mit unseren vergleichen, da eine Differenzierung der Probanden für eine Mutation des Filaggrinproteins damals noch nicht erfolgte.

Nachdem die Assoziation der Filaggrinmutation mit dem AE und mit der Entwicklung von Asthma im Jahre 2006 beschrieben worden war (Weidinger *et al.*, 2006), begann ein Paradigmenwechsel in Bezug auf die Ätiopathogenese des AE, der sich auf die weitere Forschung zur Hautbarriere auswirkte. Die vorherrschende Theorie zuvor war, dass ein immunologischer Defekt das Ekzem bedinge und durch diesen die Reaktionen auf Allergene und andere Reizstoffe entstünden („inside-outside“-Theorie) (Bos *et al.*, 1994). Parallel dazu existierte die Annahme, dass die Hautbarriere die Schlüsselrolle bei der Ausbildung des AE spiele und das Immunsystem erst durch Reize von außen Allergien entwickle („outside-inside“-Theorie). Welche der beiden Annahmen die richtige ist, wurde in der Literatur oft diskutiert, jedoch konnte bisher keine eindeutige Zuordnung der Pathogenese zur Immunologie oder einem Hautbarrieredefekt erfolgen (Eyerich & Novak, 2013). Das Problem wurde wiederholt mit der Frage nach dem Erstauftreten von Henne oder Ei verglichen (Abb. 25) (Ogawa & Yoshiike, 1993).

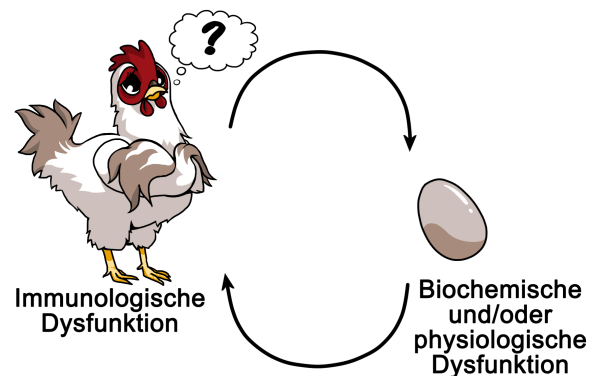


Abbildung 25
Das Henne-Ei-Problem in Bezug auf die Ätiologie des AE
Skizziert nach den Überlegungen von Ogawa *et al.* 1993 (Ogawa & Yoshiike, 1993)

Die Filaggrinmutation und ihre Konsequenz der Filaggrindefizienz wurden zuerst häufig an Ratten untersucht, die ein dem Menschen ähnliches Mutationsmuster mit vergleichbarer Klinik aufweisen – die „flaky tail“ (ft) (engl. „schuppiger Schwanz“) Mäuse. Diese Mäuse sind eine im Jahre 1958 spontan entstandene Rasse, bei der kaum Filaggrinprotein im SC zu finden ist (Fallon *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde sie für Modellversuche zur Filaggrindefizienz und der Entwicklung des AE häufig untersucht. Fallon *et al.* führten mit dieser Mäuserasse einen Versuch durch, der dieselbe Idee wie unser Pilotversuch verfolgte. Hierfür untersuchten sie homozygote Mäuse mit und ohne Mutation (ft/ft und wt/wt) sowie heterozygote Mäuse (ft/wt) in Bezug auf die klinische Reaktion und auf die immunologische Reaktion nach gewebsspezifischer (Haut, Lunge, intraperitoneal) Allergenapplikation. Sie applizierten auf die Haut der Mäuse Ovalbumin (OVA) für 24 Stunden und beurteilten diese anschließend klinisch. Zudem suchten sie im Lungengewebe nach Reaktionen sowie serologisch nach Hinweisen für eine Sensibilisierung in Form von spezifischen IgE Antikörpern. Zwar konnten sie bei allen Mäusegruppen keine

Reaktionen im Lungengewebe feststellen, jedoch fanden sie nach der kutanen Applikation bei den homozygoten Mäusen mit Filaggrindefizienz (ft/ft) einen signifikanten Anstieg der OVA spezifischen Immunantwort in Form von Th2-, Th1- und Th17-Zellen sowie regulatorischen Zytokinen. Intrabronchiale Applikationen führten bei allen Vergleichsgruppen zu keinen Immunantworten. Wiederum ließ sich nach intraperitonealer Applikation von OVA bei allen Mäusen eine Immunantwort provozieren, sodass man bei allen Versuchsgruppen eine Sensibilisierungsfähigkeit vermutete (Fallon *et al.*, 2009).

Diese Ergebnisse sprechen für die Theorie des „Atopic March“. Diese Theorie geht von einer Sensibilisierung über die Haut und weiteren Aktivierung des Immunsystems aus, die zur Ausbildung von allergischer Rhinitis und Asthma führen (1.3) (Spergel & Paller, 2003). Gemäß dieser Theorie müssten die Allergene für eine Sensibilisierung mit dem Immunsystem in Kontakt treten und dafür zuerst die Hautbarriere überwinden. Der Atopic March unterstreicht die Rolle der Hautbarriere. Zudem findet sich Filaggrin nur in der Haut und der oralen Schleimhaut, hingegen nicht in der Schleimhaut von Nase, Pharynx und tieferen Atemwegen (De Benedetto, Qualia, Baroody, & Beck, 2008), was einen weiteren Zusammenhang mit der Filaggrinmutation vermuten lässt.

Ein direkter Vergleich zwischen der „flaky tail“ (ft) Maus und dem Menschen ist dennoch erschwert, da sich die Immunantwort auf die kutane Applikation nur bei homozygoten Mäusen zeigte. Bei den Menschen liegt jedoch zumeist ein heterozygoter Mutationsstatus vor, bei dem sich ebenfalls Hinweise für eine kutane Sensibilisierung mit der Entwicklung von Asthma finden lassen (Weidinger *et al.*, 2006). Da die Details der Immunologie und Hautbarriere der „flaky tail“ Maus kaum bekannt sind (Fallon *et al.*, 2009), und auch kein vollständiger Verlust des Filaggrinproteins auftritt, ist eine genaue Interpretation der Ergebnisse für den Menschen limitiert. Aus diesem Grund wurde mit der „Filaggrin-Null Maus“ ein neues Versuchstier entwickelt, das eine Filaggrin-Nullmutation aufweist und kein Filaggrin produzieren kann (Kawasaki *et al.*, 2012).

Die „Filaggrin-Null Maus“ zeigt ähnliche klinische Stigmata wie die Patienten mit Ichthyosis vulgaris und Filaggrinmutation in Form von Hyperlinearität der Haut. Für den Versuch wurde OVA repetitiv alle zwei Tage und zudem liposomal eingekapseltes Calcein (Fluoreszenzfarbstoff) auf die Haut aufgetragen, ohne dass eine weitere Angabe von Einwirkzeit und Häufigkeit erfolgte. Anschließend konnten Kawasaki *et al.* im Blut spezifische IgG und IgE für OVA im Sinne einer Th2 Reaktion nachweisen. Zudem konnten die Autoren zeigen, dass Calcein liposomal eingekapselt die Hälfte des SC bei den homozygoten Ratten für die Nullmutation durchdringt. Es handelt sich hier um einen sehr ähnlichen Versuch wie der von Fallon *et al.* (Fallon *et al.*, 2009), der sich aber in der Applikationsmethode unterscheidet. Hier erfolgte die Anwendung der Reizstoffe repetitiv über mehrere Tage und nicht okklusiv über 24 Stunden. Neu war hierbei, dass mit dem Fluoreszenzfarbstoff im SC direkt die Penetration und nicht nur indirekt die immunologische Reaktion gezeigt wurde. Zudem bietet die „Filaggrin-Null Maus“ besser vergleichbare Ergebnisse für die Vergleichsgruppen beim Menschen, da der Prozessierungsablauf dem des Menschen nachvollziehbar ähnelt (Kawasaki *et al.*, 2012).

Mildner *et al.* entwickelten diese Versuche im Jahre 2010 weiter (Mildner *et al.*, 2010). Sie verwendeten ein organotypisches Hautmodell aus menschlichen

Keratinocyten (5.3) und beurteilten die Penetration von Luzifer Fluoreszenz durch die Haut bei Modellen mit und ohne Filaggrinexpression, weil sie eine RNS Interferenz durchführten, wobei das Filaggrinprotein nicht prozessiert werden konnte. Bei den Modellen mit Filaggrinproduktion konnte die Fluoreszenzlösung nicht über das SC hinaus in die Tiefe wandern. Bei den Modellen ohne Filaggrinprozessierung hingegen war die Luzifer Fluoreszenz bis zum Stratum basale (SB) nachweisbar (Mildner *et al.*, 2010).

Diese Forschungsentwicklung zeigt, dass der erste Schritt des „Atopic March“ bei lebenden Mäusen und menschlichen Hautmodellen in den bisherigen Publikationen nachvollziehbar ist. Dies gelang mit unterschiedlichen Fluoreszenzstoffen bei Filaggrindefizienz, indem diese das SC durchdringen konnten. Die Ergebnisse unseres Pilotversuchs stehen mit denen unserer Vorgänger im Einklang. Die entscheidende Weiterentwicklung ist, dass wir ein reales potentiell Aeroallergen verwendeten, und dass wir die Penetration des Allergens in der menschlichen Haut *in vivo* untersuchten.

Unser Ergebnis des immunhistochemischen Nachweises von dem Allergen Phleum p6 im SC bei der filaggrindefizienten Patientin entspricht dem ersten Schritt des „Atopic March“ beim Menschen *in vivo*. Im Gegensatz zu den Erörterungen von Gruber *et al.*, die meinten, ein Test mit realen Aeroallergen wäre ethisch nicht vertretbar (Gruber *et al.*, 2011), können wir den Versuchsaufbau ethisch vertreten, da dieser bis zur Hautprobenentnahme exakt wie ein Atopy Patch Test durchgeführt wurde (Ring *et al.*, 1989), der ein etablierter Versuch zur Allergietestung in der medizinischen Praxis ist.

Es würde sich in diesem Fall lohnen, den Versuch mit mehr Probanden und auch mit heterozygoten Trägern der Filaggrinmutation durchzuführen, um die Ergebnisse zum OVA und zum Fluoreszenzfarbstoff damit in Bezug zu setzen (Kawasaki *et al.*, 2012; Mildner *et al.*, 2010). Denn die Frage, ob anders als bei den Tierversuchen und dem organotypischen Versuchsaufbau ein heterozygoter Genotyp für die Filaggrinmutation ausreicht, um eine kutane Allergenpenetration zu erleichtern, ließe sich so konkret beantworten.

Die Einschränkung der Hautbarriere durch die Filaggrinmutation kann den Kontakt des Immunsystems mit dem Allergen erleichtern und könnte so, gemäß der Theorie des „Atopic March“ zur Sensibilisierung und Allergieentwicklung maßgeblich beitragen. Wie Kawasaki *et al.* bei der „Filaggrin-Null Maus“ zeigten, hat diese Maus erhöhte IgE- und IgG-Werte für das applizierte Allergen OVA aufgewiesen (Kawasaki *et al.*, 2012). Indirekt kann man theoretisch so eine vermehrte Aktivierung der von Th2-Zellen gesteuerten Immunantwort mit Stimulierung der B-Zellen und konsekutiver Freisetzung der Antikörper vermuten (Kawasaki *et al.*, 2012). In diesem Sinne spräche das für die „outside-inside“ Theorie, die beschreibt, dass der Barrieredefekt der Haut der Immunantwort beim AE vorausgeht.

Der Defekt der Hautbarriere lässt sich jedoch nicht auf das Vorliegen von Filaggrinmutationen reduzieren. Denn nicht nur durch eine Mutation im Filaggrin-Gen kann die Produktion dieses Schlüsselproteins ausbleiben. Bereits ohne vorhandene Mutation kann das Gen durch DNS-Methylierungsmuster fehlerhaft abgelesen werden und so die Grundlage für einen Filaggrinmangel mit erhöhtem Risiko für das AE bilden (Thyssen & Kezic, 2014). In der weiteren Produktionskaskade sind

Mutationen für jedes einzelne beteiligte Enzym denkbar, die bisher noch nicht alle erforscht werden konnten. Hinzu kommt eine Vielzahl von Umgebungsfaktoren wie Verminderung der Luftfeuchtigkeit, Mikroorganismen wie *propionibacterium acnes* und topische Therapien wie beispielsweise Retinoide, die die Menge des vorliegenden Filaggrinproteins senken (Thyssen & Kezic, 2014). Zudem sinkt die Filaggrinproduktion durch diverse Zytokine, unter anderem die der Th2-Zellen (IL-4, IL-13) (Thyssen & Kezic, 2014), die durch Kontakt zu äußeren Reizstoffen aktiviert werden. Dieser Kontakt ist wiederum bei einer verminderten Hautbarriere möglich, die bei aktivem AE sowie fehlendem Filaggrinprotein vorkommt. Newell *et al.* zeigten, dass bei Patienten mit AE unabhängig von einer Mutation des Filaggrinproteins eine Th2-Zell dominierte Immunantwort auf das Allergen 2,4-dinitrochloro-benzene (DNCB) stattfand (Newell *et al.*, 2013), im Gegensatz zu der zu erwarteten Th1-Zell Antwort, die bei den gesunden Kontrollen gefunden wurde. Somit wurde gezeigt, dass Patienten mit AE unabhängig von der Filaggrinmutation immunologisch anders als gesunde Probanden reagieren (Newell *et al.*, 2013). Aufgrund von Ergebnissen wie diesen ist eine eindeutige ätiologische Zuordnung des AE zum Barrieredefekt nicht möglich. Treffender scheint die von manchen Autoren inzwischen beschriebene „Outside to inside to outside-Theorie“ (Elias, Hatano, & Williams, 2008), bei der das Wechselspiel des Immunsystems mit der Hautbarriere einem Circulus vitiosus entspricht, der das AE immer weiter „anheizt“.

Geht man über den ersten Schritt des Atopic March hinaus, tritt das Immunsystem bei der Reaktion auf Allergene zweifellos weiter in den Vordergrund. Bereits in nicht läsionaler Haut von Patienten mit AE findet eine vermehrte Exposition gegenüber Allergenen statt, die zu einer B- und T-Zell-Priming in den Lymphknoten führen. Ebenfalls finden sich bei Patienten mit AE vermehrt Th2- und Th22-Zellen in der läsionsfreien Haut, die von einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine weiter aktiviert wird. Es wurde beobachtet, dass der Übergang dieser schwachen Entzündungsreaktion (engl. low-level inflammation) in ein akutes Ekzem mit einer großen Bandbreite an genregulatorischen Schritten, wie z.B. einer verminderten Expression von Filaggrin assoziiert ist. Zudem ist eine Aktivierung von dendritischen Zellen (DC) und inflammatorischen dendritischen epidermalen Zellen (IDEC) durch die Allergene bekannt. DC und IDEC präsentieren diese den lokalen Lymphknoten und initiieren so die weitere Anreicherung der Th2- und Th22-Zellen sowie die Anreicherung von Th1- und Th17-Zellen in der Epidermis. Diese Th-Zellgruppierungen bewirken in ihrem Zusammenspiel einen Anstieg der Entzündungsmediatoren sowie eine Verschlechterung der epidermalen Differenzierung. Auf diese Weise entsteht eine epidermale Hyperplasie, die bei weiterem Progress in ein kutanes Remodelling übergehen und von einer Neuroinflammation begleitet werden kann, die die Hautbarriere weiter schwächt und zu einem chronischen Ekzem führt (Weidinger & Novak, 2015).

Diese Entwicklung von der subklinischen Entzündung bis hin zum chronischen Ekzem wurde zusammengefasst aus vielen einzelnen Studienergebnissen (Weidinger & Novak, 2015). Es wäre spannend, diese Theorie mit unserem Versuchsansatz erneut zu evaluieren und dabei jeweils das Allergen und dessen spezifische Antikörper sowie die immunologischen Zellreaktionen in späteren Phasen (d.h. nach späterer Probenentnahme) immunhistochemisch nachzuweisen.

So ließen sich die o.g. einzelnen Schritte in einem Versuchsmodell histologisch nachweisen und nicht nur indirekt über einen spezifischen Immunglobulinanstieg wie

bei Kawasaki *et al.* nachvollziehen. Additiv könnte man die spezifischen IgE und IgG im Blut bestimmen, um die Ergebnisse von Kawasaki *et al.* für weitere Interpretationen miteinzubeziehen. Da eine Lymphknotenbiopsie im Rahmen eines experimentellen Versuchs am Menschen ethisch schwierig ist, könnte man an der „Filaggrin-Null Maus“ additiv Lymphknotenbiopsien durchführen.

Aus vielen einzelnen Studienergebnissen zusammengefasst sowie die Methodik unseres Versuchs könnte man einen Ausgangspunkt für weitere Studien definieren. Wir konnten erstmals zeigen, dass die Hautbarriere bei einer Patientin mit AE und homozygoter Filaggrinmutation von dem Aeroallergen Phleum p6 überwunden werden kann. Leider birgt die Versuchsgröße eine schlechte Verallgemeinbarkeit der Ergebnisse. Aus diesem Grund wäre eine Wiederholung des Versuchs ggf. mit den oben genannten zusätzlichen Untersuchungen zur Fortsetzung des Atopic March mit einer größeren Probandenzahl sinnvoll, um eine größere Aussagekraft gewinnen zu können.

5.5 Dermato-allergologische Relevanz der Befunde

Eyerich *et al.* verglichen die Pathogenese des AE mit einem Mosaik, von dem die aktuelle Forschung noch nicht alle Bausteine gefunden hat (Eyerich & Novak, 2013).

Der Fokus unserer Untersuchungen lag bei der Hautbarriere, die wir mit der Messung von biophysikalischen Parametern sowie des epidermalen Lipidprofils und mit einem Pilotversuch zur Allergenpenetranz des SC untersucht haben.

Eine immunologische Komponente bei der Entstehung des AE ist unbestreitbar. Diese hat ebenfalls Auswirkungen auf die Hautbarriere, was anhand von Beispielen wie der verminderten Filaggrinexpression in Keratinozyten unter Interleukineinfluss (IL-4 und IL-14) deutlich wird (Eyerich & Novak, 2013). Jedoch können wir mit unseren Versuchen keine neuen Erkenntnisse für diese Zusammenhänge liefern, sodass wir uns hier auf die Hautbarriere konzentrieren.

Wir konnten nur eine wissenschaftliche Arbeit, die biophysikalische Parameter der Hautbarriere (pH, TEWL, ∂ -TEWL) für die vier Probandengruppen (AE FLGmut, AE FLGwt, Kont FLGmut, Kont FLGwt) untersucht, im Jahre 2015 finden (Bandier *et al.*, 2015).

Im Gegensatz zu dieser Arbeit aus dem Jahre 2015 hatten wir signifikante Ergebnisse in den meisten unserer Teilversuche, die die Erwartungen für den Vergleich von gesunden Probanden ohne Filaggrinmutation (Gruppe 4) und von unter dem AE leidenden Patienten mit Filaggrinmutation (Gruppe 1) bestätigten, indem die Gruppe 1 einen höheren TEWL, einen höheren pH-Wert und eine erniedrigte Capacitance aufwies (5.2). Besonders interessant waren auch die Werte für die Gruppe 3 (Kont FLGwt), da trotz eines blanden Hautstatus signifikant erhöhte pH-Werte gemessen werden konnten, die eher denen von Patienten mit AE entsprachen. Wiederum hatten diese Probanden im Gruppenvergleich die höchste Capacitance, die vorwiegend mit einem blanden Hautstatus korreliert (5.2).

Das epidermale Lipidprofil untersuchten wir ebenfalls für die oben genannten vier Gruppen. In der bisherigen Literatur konnten wir keinen vergleichbaren Versuch

finden, der Probanden mit Filaggrinmutation ohne AE (Gruppe 3) einschloss. Die Ergebnisse für das epidermale Lipidprofil zeigten, dass sich einzelne Ceramidfraktionen (Ceramide 1,4 und 7) signifikant in den Probandengruppen unterschieden. Ebenfalls zeigte sich, dass die Probanden der Gruppe 3 (Kont FLGmut) die höchsten Werte für die Ceramide 3 und 4 sowie die niedrigsten Werte für das Ceramid 6 aufweisen. Diese Werte waren vermutlich wegen der geringen Probandenzahl nicht signifikant, jedoch wiesen sie auf Unterschiede in dem epidermalen Lipidprofil dieser Probandengruppe hin, die mit einer größeren Teilnehmerzahl voraussichtlich besser zu evaluieren sind.

Seit der Durchführung unserer Versuche lässt sich ein komplexeres Bild des epidermalen Lipidprofils skizzieren, das 342 unterschiedliche Ceramide enthält (Masukawa *et al.*, 2008) und somit vielfältige Kombinationsmöglichkeiten bietet (5.3). Die Idee, ein ideales epidermales Lipidprofil mit der Substitution von Lipiden des SC anzustreben und dadurch einen blanden widerstandsfähigen Hautzustand zu erzielen, ist ein vielfach beschriebenes Ziel der Lipidforschung (5.3).

Bisher wurde eine Komposition von Chamlin *et al.* in dieser Form kreiert, die aufgrund der fehlenden Synthetisierbarkeit keine Ceramide, sondern nur deren Vorstufen und andere Lipide des SC enthielt (Chamlin *et al.*, 2001). Kritisch ist in diesem Zusammenhang zu betrachten, dass die Hautbarriere durch die ungezielte Substitution von Ceramiden auch geschwächt werden kann (Mao-Qiang *et al.*, 1993). Das macht deutlich, dass man nicht pauschal immer dieselbe Ceramidkomposition applizieren sollte, wenn man mit Bezug auf unsere Resultate abhängig vom Filaggrinmutationsstatus und dem AE von einer hohen Variabilität des epidermalen Lipidprofils ausgeht. Das epidermale Lipidprofil scheint zudem anforderungsspezifisch wandelbar zu sein. Der LB setzt erst ab + 4°C seinen lipidreichen Inhalt frei (Fartasch, 2004). Ebenfalls gibt es den Effekt des „Skin Hardenings“, der die Ceramidzusammensetzung nach vermehrter Wasser- und Seifenexposition verändert (5.3) (Heinemann *et al.*, 2005).

Unsere Ergebnisse tragen zur Erfassung dieser Unterschiede bei, indem sie spezifische Profile für die vier untersuchten Probandengruppen zeigen, die man mit einer höheren Probandenzahl in einer Wiederholungsstudie ggf. als signifikant bestätigen könnte. Das ist dermato-allergologisch relevant, da die Kenntnis der unterschiedlichen Profile der erste Schritt zur Untersuchung eines zielgerichteten Therapieansatzes ist. Ließe sich ein spezifisches Lipidprofil von Probanden ohne AE trotz heterozygoten Filaggrinmutationsstatus (entsprechend Gruppe 3) bestätigen, könnte man mittels gezielter Substitution von Lipiden versuchen, das epidermale Lipidprofil von Patienten mit AE und Filaggrinmutation an ein epidermales Lipidprofil von hautgesunden Probanden wie beispielsweise das von den gesunden Filaggrinmutationsträgern anzugleichen. Auf diese Weise könnte man die Rolle der Lipide des SC bei der Genese und Prävention vom AE klären (5.3).

Zudem haben wir in einem Pilotversuch bei einer Patientin mit Filaggrinmutation und AE zeigen können, dass Allergene das SC in läsionsfreier Haut passieren können, und dass dies bei gesunden Probanden ohne Filaggrinmutation nicht zu beobachten war. Da bisher nur Studien mit OVA und Fluoreszenzmarkern aber nicht mit Aeroallergenen bei epidermalen Dysfunktionen untersucht wurden (Kawasaki *et al.*, 2012), konnte bis heute in keiner Publikation gezeigt werden, inwiefern sich die

Permeabilität für aeroallergene Substanzen bei diesen Defekten verändert (Weidinger & Novak, 2015).

Mit den Ergebnissen unseres Pilotversuchs konnten wir illustrieren, dass das Aeroallergen Phleum p6 bei einer defekten Hautbarriere mit Filaggrinmutation im SC nachweisbar ist und bei der gesunden Kontrollperson ohne Filaggrinmutation nicht zu finden war (4.8). Trotz fehlender Signifikanz zeigt sich an diesem Versuchsergebnis, dass unsere Methode bei einer Wiederholung mit einer größeren Probandenzahl das Potential hat, die kutane Sensibilisierung im Rahmen der Theorie des Atopic March wiederholt nachzuweisen. Da es bisher an einem suffizienten Versuchsmodell mangelt (Weidinger & Novak, 2015), können wir mit diesem Pilotversuch einen wichtigen Beitrag zur dermato-allergologischen Forschung liefern.

Unsere Arbeit ist einzigartig in der Kombination dieser einzelnen Versuche und des daraus resultierenden Informationsgewinns. Dieser liefert die Grundlage für Folgeversuche, die zur weiteren Klärung der Rolle der Hautbarriere bei der Entstehung des AE und von Allergien beitragen können.

Neben der Wiederholung von einzelnen unserer Versuche mit einer größeren Probandenzahl (s.o.), schlagen wir vor, dass man die Untersuchung die präventive Wirkung von rehydrierenden Cremes und ggf. individuellen ceramidhaltigen Cremes mit unserem Pilotversuch untersucht. Beispielsweise könnte man bei Probanden mit zuvor nachgewiesener Penetranz von Aeroallergenen untersuchen, ob eine der oben genannten Cremes die Allergenpenetration durch das SC verringert oder verhindert. Ebenfalls könnte man bei diesem Versuch untersuchen, ob die Anwendungsdauer der jeweiligen Creme einen Einfluss darauf hat. Im Rahmen dieses Versuchs ließe sich ebenfalls der Einfluss der Cremes auf die hautphysiologischen Parameter testen. Zudem wäre eine Wiederholung des NLS-Versuchs interessant, um eine Steigerung der epidermalen Widerstandskraft gegenüber diesem Reizstoff durch ceramidhaltige Creme zu untersuchen. Einen Vergleich zu unbehandelter Haut könnte man hier ergänzend im Seitenvergleich durchführen.

Zusammenfassend liefert unsere Arbeit Ergebnisse, auf die man für Folgestudien aufbauen kann. Mit einer Weiterentwicklung unserer Versuche ließen sich entscheidende Fragen der dermato-allergologischen Forschung beantworten: Gibt es das optimale epidermale Lipidprofil? Kann eine lipidreiche Creme das optimale epidermale Lipidprofil erzielen? Kann man mit einem konstant idealen epidermalen Lipidprofil den Atopic March und somit die Entstehung des AE oder von Allergien verhindern?

Wir gehen davon aus, dass man der Klärung dieser Fragen mit detaillierten Untersuchungsmethoden, wie sie von uns oben vorgeschlagen wurden, deutlich näher kommen kann. Somit ließe sich das Mosaik der Pathogenese des AE maßgeblich weiter vervollständigen.

6. Zusammenfassung

Patienten mit atopischem Ekzem und Kontrollpersonen wurden in dieser Arbeit auf das Vorliegen einer Mutation im Gen des zentralen Hautbarriereproteins, Filaggrin, untersucht. Beide Gruppen, unterteilt in Mutationsträger und Wildtypen, wurden mittels verschiedener Hautfunktionsparameter und biochemischer Analysen auf ihre Hautbarrierefunktion und die Zusammensetzung wichtiger Hautlipide getestet. Hierbei konnten bei Mutationsträgern eine Verminderung der Barriere und eine verminderte Konzentration von Ceramid 4 und 7 ermittelt werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen könnten therapeutische Topika entwickelt werden, die individuelle Defizite der Hautbarriere ausgleichen.

Literaturverzeichnis

- Ackerman, A. B., & Ragaz, A. (1982). A plea to expunge the word "eczema" from the lexicon of dermatology and dermatopathology. *Arch Dermatol Res*, 272(3-4), 407-420.
- Agner, T. (1991). Susceptibility of atopic dermatitis patients to irritant dermatitis caused by sodium lauryl sulphate. *Acta Derm Venereol*, 71(4), 296-300.
- Agner, T., & Serup, J. (1989). Skin reactions to irritants assessed by non-invasive bioengineering methods. *Contact Dermatitis*, 20(5), 352-359.
- Agner, T., & Serup, J. (1990). Sodium lauryl sulphate for irritant patch testing--a dose-response study using bioengineering methods for determination of skin irritation. *J Invest Dermatol*, 95(5), 543-547.
- Aichberger, K. J., Mittermann, I., & Reininger, R. (2005). Hom s 4, an IgE-reactive autoantigen belonging to a new subfamily of calcium-binding proteins, can induce Th cell type 1-mediated autoreactivity. *J Immunol*, 175, 1286-1294.
- Akdis, C. A., Blaser, K., & Akdis, M. (2004). Genes of tolerance. *Allergy*, 59(9), 897-913.
- Altekruenger, I., & Ackerman, A. B. (1994). "Eczema" revisited. A status report based upon current textbooks of dermatology. *Am J Dermatopathol*, 16(5), 517-522; discussion 523-531.
- Altmeyer, P., & Paech, V. (2010). Ekzem atopisches (Übersicht) *Enzyklopädie der Dermatologie, Venerologie, Allergologie, Umweltmedizin* (Vol. 2): SPRINGER.
- Aramaki, J., Loffler, C., Kawana, S., Effendy, I., Happle, R., & Loffler, H. (2001). Irritant patch testing with sodium lauryl sulphate: interrelation between concentration and exposure time. *Br J Dermatol*, 145(5), 704-708.
- Arikawa, J., Ishibashi, M., Kawashima, M., Takagi, Y., Ichikawa, Y., & Imokawa, G. (2002). Decreased levels of sphingosine, a natural antimicrobial agent, may be associated with vulnerability of the stratum corneum from patients with atopic dermatitis to colonization by *Staphylococcus aureus*. *J Invest Dermatol*, 119(2), 433-439.
- Bandier, J., Carlsen, B. C., Rasmussen, M. A., Petersen, L. J., & Johansen, J. D. (2015). Skin reaction and regeneration after single sodium lauryl sulfate exposure stratified by filaggrin genotype and atopic dermatitis phenotype. *Br J Dermatol*, 172(6), 1519-1529.
- Barel, A. O., & Clarys, P. (1995). Study of the stratum corneum barrier function by transepidermal water loss measurements: comparison between two commercial instruments: Evaporimeter and Tewameter. *Skin Pharmacol*, 8(4), 186-195.

- Behne, M., Uchida, Y., Seki, T., de Montellano, P. O., Elias, P. M., & Holleran, W. M. (2000). Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol*, 114(1), 185-192.
- Behne, M. J., Barry, N. P., Hanson, K. M., Aronchik, I., Clegg, R. W., Gratton, E., Feingold, K., Holleran, W.M., Elias P.M., Mauro, T. M. (2003). Neonatal development of the stratum corneum pH gradient: localization and mechanisms leading to emergence of optimal barrier function. *J Invest Dermatol*, 120(6), 998-1006.
- Bennett, J. (2015). <http://www.cosmeticsandskin.com/aba/cold-cream.php>.
- Berardesca, C. (1997). EEMCO guidance for the assessment of stratum comeurn hydration: electrical methods. *Skin Research and Technology*, 3, 126-132.
- Berardesca, E., Fideli, D., Borroni, G., Rabbiosi, G., & Maibach, H. (1990). In vivo hydration and water-retention capacity of stratum corneum in clinically uninvolved skin in atopic and psoriatic patients. *Acta Derm Venereol*, 70(5), 400-404.
- Bhuyan, A. K. (2010). On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. *Biopolymers*, 93(2), 186-199.
- Bieber, T. (2008). Atopic dermatitis. *N Engl J Med*, 358(14), 1483-1494.
- Black, D., Del Pozo, A., Lagarde, J. M., & Gall, Y. (2000). Seasonal variability in the biophysical properties of stratum corneum from different anatomical sites. *Skin Res Technol*, 6(2), 70-76.
- Blank, H. (1939). Measurement of pH of the skin surface. *J Invest Dermatol*, 2, 67-79.
- Blank, I. H. (1952). Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 18(6), 433-440.
- Boguniewicz, M., & V.S., B. (Eds.). (2002). *Atopic Dermatitis and Contact Dermatitis*. Philadelphia: Lippincott Williams.
- Bos, J. D., Kapsenberg, M. L., & Smitt, J. H. (1994). Pathogenesis of atopic eczema. *Lancet*, 343(8909), 1338-1341.
- Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Dubbelaar, F. E., Weerheim, A. M., Ijzerman, A. P., & Ponec, M. (1998). Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J Lipid Res*, 39(1), 186-196.
- Bouwstra, J. A., Honeywell-Nguyen, P. L., Gooris, G. S., & Ponec, M. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog Lipid Res*, 42(1), 1-36.
- Braham, S. J., Pugashetti, R., Koo, J., & Maibach, H. I. (2010). Occlusive therapy in atopic dermatitis: overview. *J Dermatolog Treat*, 21(2), 62-72.

- Brattsand, M., & Egelrud, T. (1999). Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem*, 274(42), 30033-30040.
- Braun-Falco, Plewig, Wolff, Burgdorf, & Landthaler. (2005). *Dermatologie und Venerologie* (Vol. 5): SPRINGER.
- Breathnach, A. S., Goodman, T., Stolinski, C., & Gross, M. (1973). Freeze-fracture replication of cells of stratum corneum of human epidermis. *J Anat*, 114(Pt 1), 65-81.
- Candi, E., Schmidt, R., & Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(4), 328-340.
- Caubet, C., Jonca, N., Brattsand, M., Guerrin, M., Bernard, D., Schmidt, R., Egelrud, T., Simon, M., Serre, G. (2004). Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol*, 122(5), 1235-1244.
- Chamlin, S. L., Frieden, I. J., Fowler, A., Williams, M., Kao, J., Sheu, M., & Elias, P. M. (2001). Ceramide-dominant, barrier-repair lipids improve childhood atopic dermatitis. *Arch Dermatol*, 137(8), 1110-1112.
- Chen, H., Ho, J. C., Sandilands, A., Chan, Y. C., Giam, Y. C., Evans, A. T., Lane, E.B., McLean, W. H. (2008). Unique and recurrent mutations in the filaggrin gene in Singaporean Chinese patients with ichthyosis vulgaris. *J Invest Dermatol*, 128(7), 1669-1675.
- Coca, A., & Cooke, R. (1923). On the Classification of the Phenomena of Hypersensitiveness. *The Journal of Immunology*, 8, 163-182.
- Conti, A., Rogers, J., Verdejo, P., Harding, C. R., & Rawlings, A. V. (1996). Seasonal influences on stratum corneum ceramide 1 fatty acids and the influence of topical essential fatty acids. *Int J Cosmet Sci*, 18(1), 1-12.
- Cookson, W. O., & Moffatt, M. F. (1997). Asthma: an epidemic in the absence of infection? *Science*, 275(5296), 41-42.
- Cork, M. J., Robinson, D. A., Vasilopoulos, Y., Ferguson, A., Moustafa, M., MacGowan, A., Duff, G.W., Ward, S.J., Tazi-Ahnini, R. (2006). New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *J Allergy Clin Immunol*, 118(1), 3-21; quiz 22-23.
- Darsow, U., Vieluf, D., & Ring, J. (1995). Atopy patch test with different vehicles and allergen concentrations: an approach to standardization. *J Allergy Clin Immunol*, 95(3), 677-684.
- De Benedetto, A., Qualia, C. M., Baroody, F. M., & Beck, L. A. (2008). Filaggrin expression in oral, nasal, and esophageal mucosa. *J Invest Dermatol*, 128(6), 1594-1597.

Denecker, G., Hoste, E., Gilbert, B., Hochepped, T., Ovaere, P., Lippens, S., Van den Broecke, C., Van Damme, P., D'Herde, K., Hachem, J.P., Borgonie, G., Presland, R.B., Schoonjans, L., Libert, C., Vandekerckhove, J., Gevaert, K., Vandenabeele, P., Declercq, W. (2007). Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat Cell Biol*, 9(6), 666-674.

Di Nardo, A., Wertz, P., Giannetti, A., & Seidenari, S. (1998). Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*, 78(1), 27-30.

Diepgen, T. (2000). Atopic Dermatitis. In T. Diepgen (Ed.), *Is the prevalence of atopic dermatitis increasing?* : Williams HC.

Diepgen, T. L. (2002). Long-term treatment with cetirizine of infants with atopic dermatitis: a multi-country, double-blind, randomized, placebo-controlled trial (the ETAC trial) over 18 months. *Pediatr Allergy Immunol*, 13, 278-286.

Eberlein-Konig, B., Schafer, T., Huss-Marp, J., Darsow, U., Mohrenschlager, M., Herbert, O., Abeck, D., Krämer, U., Behrendt, H., Ring, J. (2000). Skin surface pH, stratum corneum hydration, trans-epidermal water loss and skin roughness related to atopic eczema and skin dryness in a population of primary school children. *Acta Derm Venereol*, 80(3), 188-191.

Eckl, K. M., Tidhar, R., Thiele, H., Oji, V., Hausser, I., Brodesser, S., Preil, M. L., Onal.Akan, A., Stock, F., Müller, D., Becker, K., Casper, R., Nürnberg, G., Altmüller, J., Nürnberg, P., Traupe, H., Futerman, A. H., Hennies, H. C. (2013). Impaired epidermal ceramide synthesis causes autosomal recessive congenital ichthyosis and reveals the importance of ceramide acyl chain length. *J Invest Dermatol*, 133(9), 2202-2211.

Ecover. (2015). Hand-Spülmittel 500ml. (<http://www.ecoverdirect.de>)

Eisenbarth, S. C., Piggott, D. A., Huleatt, J. W., Visintin, I., Herrick, C. A., & Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*, 196(12), 1645-1651.

Ekholm, I. E., Brattsand, M., & Egelrud, T. (2000). Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J Invest Dermatol*, 114(1), 56-63.

Elias, P. M. (1981a). Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *Int J Dermatol*, 20(1), 1-19.

Elias, P. M. (1981b). Lipids and the epidermal permeability barrier. *Arch Dermatol Res*, 270(1), 95-117.

Elias, P. M. (1983). Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol*, 80(1 Suppl), 44s-49s.

Elias, P. M. (2007). The skin barrier as an innate immune element. *Semin Immunopathol*, 29(1), 3-14.

Elias, P. M. (2010). Therapeutic Implications of a Barrier-based Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol*, 22(3), 245-254.

Elias, P. M. (2014). Lipid abnormalities and lipid-based repair strategies in atopic dermatitis. *Biochim Biophys Acta*, 1841(3), 323-330.

Elias, P. M., Cullander, C., Mauro, T., Rassner, U., Komuves, L., Brown, B. E., & Menon, G. K. (1998). The secretory granular cell: the outermost granular cell as a specialized secretory cell. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 3(2), 87-100.

Elias, P. M., Fartasch, M., Crumrine, D., Behne, M., Uchida, Y., & Holleran, W. M. (2000). Origin of the corneocyte lipid envelope (CLE): observations in harlequin ichthyosis and cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 115(4), 765-769.

Elias, P. M., Hatano, Y., & Williams, M. L. (2008). Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*, 121(6), 1337-1343.

European_Task_Force_on_Atopic_Dermatitis. (1993). *Severity scoring of atopic dermatitis: the SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis* (1018-8665 (Print) 1018-8665 (Linking)). Retrieved from Dermatology:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8435513

Eyerich, K., & Novak, N. (2013). Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy*, 68(8), 974-982.

Fallon, P. G., Sasaki, T., Sandilands, A., Campbell, L. E., Saunders, S. P., Mangan, N. E., Callanan, J. J., Kawasaki, H., Shiohama, A., Kubo, A., Sundberg, J. P., Presland, R. B., Fleckman, P., Shimizu, N., Kudoh, J., Irvine, A.D., Amagai, M., McLean, W. H. (2009). A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet*, 41(5), 602-608.

Fartasch, M. (1997). Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. *Microsc Res Tech*, 37(3), 193-199.

Fartasch, M. (2004). The epidermal lamellar body: a fascinating secretory organelle. *J Invest Dermatol*, 122(5), XI-XII.

Fartasch, M., Bassukas, I. D., & Diepgen, T. L. (1992). Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. *Br J Dermatol*, 127(3), 221-227.

Farwanah, H., Raith, K., Neubert, R. H., & Wohlrab, J. (2005). Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch Dermatol Res*, 296(11), 514-521.

Feingold, K. R. (2007). Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J Lipid Res*, 48(12), 2531-2546.

- Flohr, C., Pascoe, D., & Williams, H. C. (2005). Atopic dermatitis and the 'hygiene hypothesis': too clean to be true? *Br J Dermatol*, *152*(2), 202-216.
- Fluhr, J., & Elias, P. M. (2002). Stratum corneum pH: Formation and Function of the 'Acid Mantle'. *Exog Dermatol*, *1*, 163-175.
- Fluhr, J., & Gloor, M. (1999). Comparative study of five instruments measuring stratum corneum hydration (Corneometer CM 820 and CM 825, Skicon 200, Nova DPM 9003, DermaLab). Part I. In vitro. *Skin Research and Technology*, *5*, 161-170.
- Fluhr, J. W., Behne, M. J., Brown, B. E., Moskowitz, D. G., Selden, C., Mao-Qiang, M., Mauro, T. M., Elias, P.M., Feingold, K. R. (2004). Stratum corneum acidification in neonatal skin: secretory phospholipase A2 and the sodium/hydrogen antiporter-1 acidify neonatal rat stratum corneum. *J Invest Dermatol*, *122*(2), 320-329.
- Fluhr, J. W., Elias, P. M., Man, M. Q., Hupe, M., Selden, C., Sundberg, J. P., Tschachler, E., Eckhart, L., Mauro, T. M., Feingold, K. R. (2010). Is the filaggrin-histidine-urocanic acid pathway essential for stratum corneum acidification? *J Invest Dermatol*, *130*(8), 2141-2144.
- Fluhr, J. W., Kao, J., Jain, M., Ahn, S. K., Feingold, K. R., & Elias, P. M. (2001). Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J Invest Dermatol*, *117*(1), 44-51.
- Fulmer, A. W., & Kramer, G. J. (1986). Stratum corneum lipid abnormalities in surfactant-induced dry scaly skin. *J Invest Dermatol*, *86*(5), 598-602.
- Gan, S. Q., McBride, O. W., Idler, W. W., Markova, N., & Steinert, P. M. (1991). Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry*, *30*(23), 5814.
- Geha, R. S., Jabara, H. H., & Brodeur, S. R. (2003). The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol*, *3*(9), 721-732.
- Goldstein, A. M., & Abramovits, W. (2003). Ceramides and the stratum corneum: structure, function, and new methods to promote repair. *Int J Dermatol*, *42*(4), 256-259.
- Gray, G. M., & White, R. J. (1978). Glycosphingolipids and ceramides in human and pig epidermis. *J Invest Dermatol*, *70*(6), 336-341.
- Gray, G. M., & Yardley, H. J. (1975). Lipid compositions of cells isolated from pig, human, and rat epidermis. *J Lipid Res*, *16*(6), 434-440.
- Grayson, S., Johnson-Winegar, A. G., Wintroub, B. U., Isseroff, R. R., Epstein, E. H., Jr., & Elias, P. M. (1985). Lamellar body-enriched fractions from neonatal mice: preparative techniques and partial characterization. *J Invest Dermatol*, *85*(4), 289-294.

Gruber, R., Elias, P. M., Crumrine, D., Lin, T. K., Brandner, J. M., Hachem, J. P., Presland, R. B., Fleckman, P., Janecke, A. R., Sandilands, A., McLean, W. H., Fritsch, P. O., Mildner, M., Tschachler, E., Schmuth, M. (2011). Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function. *Am J Pathol*, 178(5), 2252-2263.

H. Schade, A. M. (1928). Der Säuremantel der Haut (nach Gaskettenmessung). *Klinische Wochenschrift*, 7(1), 12-14.

Hachem, J. P., Crumrine, D., Fluhr, J., Brown, B. E., Feingold, K. R., & Elias, P. M. (2003). pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J Invest Dermatol*, 121(2), 345-353.

Hanifin, J., & Rajka, G. (1980). Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*, 92 (Supplement), 44-47.

Hannun, Y. A., Loomis, C. R., Merrill, A. H., Jr., & Bell, R. M. (1986). Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem*, 261(27), 12604-12609.

Hara, J., Higuchi, K., Okamoto, R., Kawashima, M., & Imokawa, G. (2000). High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 115(3), 406-413.

Hashimoto, K. (1971). Cementsome, a new interpretation of the membrane-coating granule. *Arch Dermatol Forsch*, 240(4), 349-364.

Heinemann, C., Paschold, C., Fluhr, J., Wigger-Alberti, W., Schliemann-Willers, S., Farwanah, H., Raith, K., Neubert, R., Elsner, P. (2005). Induction of a hardening phenomenon by repeated application of SLS: analysis of lipid changes in the stratum corneum. *Acta Derm Venereol*, 85(4), 290-295.

Higuchi, K., Hara, J., Okamoto, R., Kawashima, M., & Imokawa, G. (2000). The skin of atopic dermatitis patients contains a novel enzyme, glucosylceramide sphingomyelin deacylase, which cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *Biochem J*, 350 Pt 3, 747-756.

Higuchi, K., Kawashima, M., Takagi, Y., Kondo, H., Yada, Y., Ichikawa, Y., & Imokawa, G. (2001). Sphingosylphosphorylcholine is an activator of transglutaminase activity in human keratinocytes. *J Lipid Res*, 42(10), 1562-1570.

Holgate, S. T. (1999). The epidemic of allergy and asthma. *Nature*, 402(6760 Suppl), B2-4.

Holleran, W. M. (2006). Stratum Corneum Lipid Processing: The Final Steps in Barrier Formation. In P. M. Elias & K. Feingold (Eds.), *Skin Barrier* (pp. 231-249). New York: Taylor and Francis.

Holleran, W. M., Takagi, Y., Imokawa, G., Jackson, S., Lee, J. M., & Elias, P. M. (1992). beta-Glucocerebrosidase activity in murine epidermis: characterization and localization in relation to differentiation. *J Lipid Res*, 33(8), 1201-1209.

Holleran, W. M., Takagi, Y., & Uchida, Y. (2006). Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett*, 580(23), 5456-5466.

Holm, E. A., Wulf, H. C., Thomassen, L., & Jemec, G. B. (2006). Instrumental assessment of atopic eczema: validation of transepidermal water loss, stratum corneum hydration, erythema, scaling, and edema. *J Am Acad Dermatol*, 55(5), 772-780.

<http://www.courage-khazaka.de>.

<http://www.dcs-diagnostics.de>.

<http://www.liquiband.com>.

<http://www.who.int>.

<http://www.worldallergy.org>.

Illi, S., von Mutius, E., Lau, S., Nickel, R., Gruber, C., Niggemann, B., & Wahn, U. (2004). The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 113(5), 925-931.

Imokawa, G. (2009). A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *J Dermatol Sci*, 55(1), 1-9.

Imokawa, G., Abe, A., Jin, K., Higaki, Y., Kawashima, M., & Hidano, A. (1991). Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol*, 96(4), 523-526.

Imokawa, G., Akasaki, S., Hattori, M., & Yoshizuka, N. (1986). Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol*, 87(6), 758-761.

Imokawa, G., Akasaki, S., Minematsu, Y., & Kawai, M. (1989). Importance of intercellular lipids in water-retention properties of the stratum corneum: induction and recovery study of surfactant dry skin. *Arch Dermatol Res*, 281(1), 45-51.

Imokawa, G., Takagi, Y., Higuchi, K., Kondo, H., & Yada, Y. (1999). Sphingosylphosphorylcholine is a potent inducer of intercellular adhesion molecule-1 expression in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 112(1), 91-96.

Irvine, A. D., & McLean, W. H. (2006). Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 126(6), 1200-1202.

Irvine, A. D., McLean, W. H., & Leung, D. Y. (2011). Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med*, 365(14), 1315-1327.

Ishibashi, M., Arikawa, J., Okamoto, R., Kawashima, M., Takagi, Y., Ohguchi, K., & Imokawa, G. (2003). Abnormal expression of the novel epidermal enzyme, glucosylceramide deacylase, and the accumulation of its enzymatic reaction product, glucosylsphingosine, in the skin of patients with atopic dermatitis. *Lab Invest*, *83*(3), 397-408.

Ishida-Yamamoto, A., Simon, M., Kishibe, M., Miyauchi, Y., Takahashi, H., Yoshida, S., O'Brien, T. J., Serre, G., Iizuka, H. (2004). Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *J Invest Dermatol*, *122*(5), 1137-1144.

Ishida-Yamamoto, A., Takahashi, H., Presland, R. B., Dale, B. A., & Iizuka, H. (1998). Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. *Lab Invest*, *78*(10), 1245-1253.

Jakasa, I., Verberk, M. M., Esposito, M., Bos, J. D., & Kezic, S. (2007). Altered penetration of polyethylene glycols into uninvolved skin of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol*, *127*(1), 129-134.

Jemec, G. B., Na, R., & Wulf, H. C. (2000). The inherent capacitance of moisturising creams: A source of false positive results? *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, *13*(3-4), 182-187. doi:29924 [pii]

Jensen-Jarolim, E., Achatz, G., Turner, M. C., Karagiannis, S., Legrand, F., Capron, M., Penichet, M. L., Rodriguez, J. A., Siccardi, A. G., Vangelista, L., Riemer, A. B., Gould, H. (2008). AllergoOncology: the role of IgE-mediated allergy in cancer. *Allergy*, *63*(10), 1255-1266.

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., Van Cauwenberge, 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*(5), 832-836.

Johansson, S. G., Mellbin, T., & Vahlquist, B. (1968). Immunoglobulin levels in Ethiopian preschool children with special reference to high concentrations of immunoglobulin E (IgND). *Lancet*, *1*(7552), 1118-1121.

Jokura, Y., Ishikawa, S., Tokuda, H., & Imokawa, G. (1995). Molecular analysis of elastic properties of the stratum corneum by solid-state ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Invest Dermatol*, *104*(5), 806-812.

Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, *13*(7), 484-492.

Joshi, A. Y., Iyer, V. N., Boyce, T. G., Hagan, J. B., Park, M. A., & Abraham, R. S. (2009). Elevated serum immunoglobulin E (IgE): when to suspect hyper-IgE syndrome-A 10-year pediatric tertiary care center experience. *Allergy Asthma Proc*, *30*(1), 23-27.

- Jungersted, J. M., Hellgren, L. I., Drachmann, T., Jemec, G. B., & Agner, T. (2010). Validation of Cyanoacrylate Method for Collection of Stratum Corneum in Human Skin for Lipid Analysis. *Skin Pharmacol Physiol*, 23(2), 62-67.
- Jungersted, J. M., Hogh, J. K., Hellgren, L. I., Jemec, G. B., & Agner, T. (2010). Ethnicity and stratum corneum ceramides. *Br J Dermatol*, 163(6), 1169-1173.
- Jungersted, J. M., Scheer, H., Mempel, M., Baurecht, H., Cifuentes, L., Hogh, J. K., Hellgren, L. I., Jemec, G. B., Agner, T., Weidinger, S. (2010). Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy*, 65 (7), 911-918.
- Kamata, Y., Taniguchi, A., Yamamoto, M., Nomura, J., Ishihara, K., Takahara, H., Hibino, T., Takeda, A. (2009). Neutral cysteine protease bleomycin hydrolase is essential for the breakdown of deiminated filaggrin into amino acids. *J Biol Chem*, 284(19), 12829-12836.
- Kannon, G. A., & Garrett, A. B. (1995). Moist wound healing with occlusive dressings. A clinical review. *Dermatol Surg*, 21(7), 583-590.
- Kawasaki, H., Nagao, K., Kubo, A., Hata, T., Shimizu, A., Mizuno, H., Yamada, T., Amagai, M. (2012). Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol*, 129(6), 1538-1546 e1536.
- Kerscher, M. (2009). Dermatokosmetik *Dermatokosmetik* (Vol. 2, pp. 85). Würzburg: Steinkopff Verlag.
- Kezic, S., Kemperman, P. M., Koster, E. S., de Jongh, C. M., Thio, H. B., Campbell, L. E., Irvine, A. D., McLean, W. H., Puppels, G. J., Caspers, P. J. (2008). Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 128(8), 2117-2119.
- Kligman, A. M. (1964). The biology of stratum corneum. In W. Motagna & J. W. C. Lobbitz (Eds.), *The Epidermis* (pp. 387-433). New York: Academic Press.
- Kligman, A. M. (2006). A Brief History of How the Dead Stratum Corneum Became Alive In P. M. Elias (Ed.), *Skin Barrier* (Vol. 1, pp. 15-24). New York: Taylor & Francis Group, LLC.
- Korting, H. C., Hubner, K., Greiner, K., Hamm, G., & Braun-Falco, O. (1990). Differences in the skin surface pH and bacterial microflora due to the long-term application of synthetic detergent preparations of pH 5.5 and pH 7.0. Results of a crossover trial in healthy volunteers. *Acta Derm Venereol*, 70(5), 429-431.
- Krien, P. M., & Kermici, M. (2000). Evidence for the existence of a self-regulated enzymatic process within the human stratum corneum -an unexpected role for urocanic acid. *J Invest Dermatol*, 115(3), 414-420.
- Lai-Cheong, J. E., Elias, P. M., & Paller, A. S. (2013). Pathogenesis-based therapies in ichthyoses. *Dermatol Ther*, 26(1), 46-54.

- Macheleidt, O., Kaiser, H. W., & Sandhoff, K. (2002). Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 119(1), 166-173.
- Madison, K. C. (2003). Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 121(2), 231-241.
- Maibach, C. H. L. a. H. I. (2004). Sodium Lauryl Sulfate in Dermatotoxicology. In H. Z. a. H. I. Maibach (Ed.), *Dermatotoxicology* (Vol. 6, pp. 481-505): CRC Press LLC.
- Mann, T. (1929). Der Zauberberg. Erstes Kapitel. Nr. 34 (<http://pdbooks.ca/books/deutsch/authors/thomas-mann/der-zauberberg/erstes-kapitel/nr-34.html>)
- Mao-Qiang, M., Brown, B. E., Wu-Pong, S., Feingold, K. R., & Elias, P. M. (1995). Exogenous nonphysiologic vs physiologic lipids. Divergent mechanisms for correction of permeability barrier dysfunction. *Arch Dermatol*, 131(7), 809-816.
- Mao-Qiang, M., Feingold, K. R., & Elias, P. M. (1993). Exogenous lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin. *Arch Dermatol*, 129(6), 728-738.
- Markova, N. G., Marekov, L. N., Chipev, C. C., Gan, S. Q., Idler, W. W., & Steinert, P. M. (1993). Profilaggrin is a major epidermal calcium-binding protein. *Mol Cell Biol*, 13(1), 613-625.
- Masukawa, Y., Narita, H., Shimizu, E., Kondo, N., Sugai, Y., Oba, T., Homma, R., Ishikawa, J., Takagi, Y., Kitahara, T., Takema, Y., Kita, K. (2008). Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res*, 49(7), 1466-1476.
- Matsui, T., Miyamoto, K., Kubo, A., Kawasaki, H., Ebihara, T., Hata, K., Tanahashi, S., Ichinose, S., Imoto, I., Inazawa, J., Kudoh, J., Amagai, M. (2011). SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol Med*, 3(6), 320-333.
- Mauro, T., Holleran, W. M., Grayson, S., Gao, W. N., Man, M. Q., Kriehuber, E., Behne, M., Feingold, K.R., Elias, P. M. (1998). Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing. *Arch Dermatol Res*, 290(4), 215-222.
- Mechin, M. C., Enji, M., Nachat, R., Chavanas, S., Charveron, M., Ishida-Yamamoto, A., Serre, G., Takahara, H., Simon, M. (2005). The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations. *Cell Mol Life Sci*, 62(17), 1984-1995.
- Meguro, S., Arai, Y., Masukawa, Y., Uie, K., & Tokimitsu, I. (2000). Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL). *Arch Dermatol Res*, 292(9), 463-468.

- Melnik, B., Hollmann, J., Hofmann, U., Yuh, M. S., & Plewig, G. (1990). Lipid composition of outer stratum corneum and nails in atopic and control subjects. *Arch Dermatol Res*, 282(8), 549-551.
- Melnik, B., Hollmann, J., & Plewig, G. (1988). Decreased stratum corneum ceramides in atopic individuals--a pathobiochemical factor in xerosis? *Br J Dermatol*, 119(4), 547-549.
- Melnik, B. C., Hollmann, J., Erler, E., Verhoeven, B., & Plewig, G. (1989). Microanalytical screening of all major stratum corneum lipids by sequential high-performance thin-layer chromatography. *J Invest Dermatol*, 92(2), 231-234.
- Menon, G. K., Feingold, K. R., & Elias, P. M. (1992). Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol*, 98(3), 279-289.
- Menon, G. K., Ghadially, R., Williams, M. L., & Elias, P. M. (1992). Lamellar bodies as delivery systems of hydrolytic enzymes: implications for normal and abnormal desquamation. *Br J Dermatol*, 126(4), 337-345.
- Mildner, M., Jin, J., Eckhart, L., Kezic, S., Gruber, F., Barresi, C., Stremnitzer, C., Buchberger, M., Mlitz, V., Ballaun, C., Sterniczky, B., Födinger, D., Tschachler, E. (2010). Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model. *J Invest Dermatol*, 130(9), 2286-2294.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16(3), 1215.
- Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A., & Igarashi, Y. (2009). Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie*, 91(6), 784-790.
- Morasso, M. I., Markova, N. G., & Sargent, T. D. (1996). Regulation of epidermal differentiation by a Distal-less homeodomain gene. *J Cell Biol*, 135(6 Pt 2), 1879-1887.
- Mothes, N., Niggemann, B., & Jenneck, C. (2005). The cradle of IgE autoreactivity in atopic eczema lies in early infancy. *J Allergy Clin Immunol*, 116, 706-709.
- Motta, S., Monti, M., Sesana, S., Caputo, R., Carelli, S., & Ghidoni, R. (1993). Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta*, 1182(2), 147-151.
- Murata, Y., Ogata, J., Higaki, Y., Kawashima, M., Yada, Y., Higuchi, K., Tsuchiya, T., Kawainami, S., Imokawa, G. (1996). Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency? *J Invest Dermatol*, 106(6), 1242-1249.
- Nachat, R., Mechin, M. C., Takahara, H., Chavanas, S., Charveron, M., Serre, G., & Simon, M. (2005). Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin. *J Invest Dermatol*, 124(2), 384-393.

- Namazi, S., Niknahad, H., & Razmkhah, H. (2009). Long-term complications of sulphur mustard poisoning in intoxicated Iranian veterans. *J Med Toxicol*, 5(4), 191-195.
- Nemoto-Hasebe, I., Akiyama, M., Nomura, T., Sandilands, A., McLean, W. H., & Shimizu, H. (2009). Clinical severity correlates with impaired barrier in filaggrin-related eczema. *J Invest Dermatol*, 129(3), 682-689.
- Newell, L., Polak, M. E., Perera, J., Owen, C., Boyd, P., Pickard, C., Howarth, P. H., Healy, E., Holloway, J. W., Friedmann, P. S., Ardern-Jones, M. R. (2013). Sensitization via healthy skin programmes Th2 responses in individuals with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*.
- Nomura, T., Akiyama, M., Sandilands, A., Nemoto-Hasebe, I., Sakai, K., Nagasaki, A., Ota, M., Hata, H., Evans, A. T., Palmer, C. N., Shimizu, H., McLean, W. H. (2008). Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and are significantly associated with atopic dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol*, 128(6), 1436-1441.
- Novak, N., & Bieber, T. (2003). Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 112(2), 252-262.
- O'Regan, G. M., Kemperman, P. M., Sandilands, A., Chen, H., Campbell, L. E., Kroboth, K., Watson, R., Rowland, M., Puppels, G. J., McLean, W. H., Caspers, P. J., Irvine, A. D. (2010). Raman profiles of the stratum corneum define 3 filaggrin genotype-determined atopic dermatitis endophenotypes. *J Allergy Clin Immunol*, 126(3), 574-580 e571.
- O'Regan, G. M., Sandilands, A., McLean, W. H., & Irvine, A. D. (2009). Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 124(3 Suppl 2), R2-6.
- Ogawa, H., & Yoshiike, T. (1993). A speculative view of atopic dermatitis: barrier dysfunction in pathogenesis. *J Dermatol Sci*, 5(3), 197-204.
- Ohman, H., & Vahlquist, A. (1998). The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the "acid skin mantle"? *J Invest Dermatol*, 111(4), 674-677.
- Ohnishi, Y., Okino, N., Ito, M., & Imayama, S. (1999). Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6(1), 101-104.
- Okada, H., Kuhn, C., Feillet, H., & Bach, J. F. (2010). The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*, 160(1), 1-9.
- Orsmark, K., Wilson, D., & Maibach, H. (1980). In vivo transepidermal water loss and epidermal occlusive hydration in newborn infants: anatomical region variation. *Acta Derm Venereol*, 60(5), 403-407.
- Paller, A. S., van Steensel, M. A., Rodriguez-Martin, M., Sorrell, J., Heath, C., Crumrine, D., van Geel, M., Cabrera, A. N., Elias, P. M. (2011). Pathogenesis-based therapy reverses cutaneous abnormalities in an inherited disorder of distal cholesterol metabolism. *J Invest Dermatol*, 131(11), 2242-2248.

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'Reagan, 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 Houate, 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(4), 441-446.

Pinnagoda, J., Tupker, R. A., Agner, T., & Serup, J. (1990). Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*, 22(3), 164-178.

Pinnagoda, J., Tupker, R. A., Coenraads, P. J., & Nater, J. P. (1989). Prediction of susceptibility to an irritant response by transepidermal water loss. *Contact Dermatitis*, 20(5), 341-346.

Platzer, U. (1993). Zur Anwendung Natriumlaurylsulfat-haltiger Zahnpasten

Ponec, M., Weerheim, A., Lankhorst, P., & Wertz, P. (2003). New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol*, 120(4), 581-588.

Presland, R. B., Bassuk, J. A., Kimball, J. R., & Dale, B. A. (1995). Characterization of two distinct calcium-binding sites in the amino-terminus of human profilaggrin. *J Invest Dermatol*, 104(2), 218-223.

Presland, R. B., Boggess, D., Lewis, S. P., Hull, C., Fleckman, P., & Sundberg, J. P. (2000). Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris. *J Invest Dermatol*, 115(6), 1072-1081.

Presland, R. B., Haydock, P. V., Fleckman, P., Nirunskisiri, W., & Dale, B. A. (1992). Characterization of the human epidermal profilaggrin gene. Genomic organization and identification of an S-100-like calcium binding domain at the amino terminus. *J Biol Chem*, 267(33), 23772-23781.

Rajka, G. (1974). Transepidermal water loss on the hands in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Forsch*, 251(2), 111-115.

Rawlings, A. V. (2003). Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. *Int J Cosmet Sci*, 25(1-2), 63-95.

Rawlings, A. V. (2006). Sources and Role of the Stratum Corneum Hydration. In P. M. Elias & K. Feingold (Eds.), *Skin Barrier* (Vol. 1, pp. 399-425). New York: Taylor and Francis.

Rawlings, A. V., & Harding, C. R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther*, 17 Suppl 1, 43-48.

Rhodes, H. L., Sporik, R., Thomas, P., Holgate, S. T., & Cogswell, J. J. (2001). Early life risk factors for adult asthma: a birth cohort study of subjects at risk. *J Allergy Clin Immunol*, 108(5), 720-725.

- Rhodes, H. L., Thomas, P., Sporik, R., Holgate, S. T., & Cogswell, J. J. (2002). A birth cohort study of subjects at risk of atopy: twenty-two-year follow-up of wheeze and atopic status. *Am J Respir Crit Care Med*, *165*(2), 176-180.
- Rietschel, R. L. (1978). A method to evaluate skin moisturizers in vivo. *J Invest Dermatol*, *70*(3), 152-155.
- Ring, J. (1982). [Applied allergology, Part 17. Drug allergy]. *MMW Munch Med Wochenschr*, *124*(9), 102-106.
- Ring, J., Kunz, B., Vieluf, D., & Przybilla, B. (1989). *The "Atopy Patch Test" with aeroallergens in atopic eczema*. Paper presented at the The American Academy of Allergy and Immunology 45th Annual Meeting San Antonio, Texas. Oral Presentation
- Rippke, F., Schreiner, V., & Schwanitz, H. J. (2002). The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH. *Am J Clin Dermatol*, *3*(4), 261-272.
- Robson, K. J., Stewart, M. E., Michelsen, S., Lazo, N. D., & Downing, D. T. (1994). 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J Lipid Res*, *35*(11), 2060-2068.
- Rodriguez, E., Baurecht, H., Wahn, A. F., Kretschmer, A., Hotze, M., Zeilinger, S., Klopp, N., Illig, T., Schramm, K., Prokisch, H., Kühnel, B., Gieger, C., Harder, J., Cifuentes, L., Novak, N., Weidinger, S. (2014). An integrated epigenetic and transcriptomic analysis reveals distinct tissue-specific patterns of DNA methylation associated with atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, *134*(7), 1873-1883.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A. D., & McLean, W. H. (2009). Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*, *122*(Pt 9), 1285-1294.
- 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., van Steensel, M. A., Nagtzaam, I., van Gheel, 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*(5), 650-654.
- Sato, J., Denda, M., Chang, S., Elias, P. M., & Feingold, K. R. (2002). Abrupt decreases in environmental humidity induce abnormalities in permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol*, *119*(4), 900-904.
- Sato, J., Denda, M., Nakanishi, J., Nomura, J., & Koyama, J. (1998). Cholesterol sulfate inhibits proteases that are involved in desquamation of stratum corneum. *J Invest Dermatol*, *111*(2), 189-193.
- Sator, P. G., Schmidt, J. B., & Honigsmann, H. (2003). Comparison of epidermal hydration and skin surface lipids in healthy individuals and in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol*, *48*(3), 352-358.

Schafer, T., Vieluf, D., Behrendt, H., Kramer, U., & Ring, J. (1996). Atopic eczema and other manifestations of atopy: results of a study in East and West Germany. *Allergy*, *51*(8), 532-539.

Scheuplein, R. J., & Blank, I. H. (1971). Permeability of the skin. *Physiol Rev*, *51*(4), 702-747.

Schmid-Grendelmeier, P., Flückiger, S., & Disch, R. (2005). IgE-mediated autoimmunity against manganese superoxide dismutase in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, *115*, 1068-1075.

Schmid-Wendtner, M. H., & Korting, H. C. (2006). The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol Physiol*, *19*(6), 296-302.

Schram, M. E., Tedja, A. M., Spijker, R., Bos, J. D., Williams, H. C., & Spuls, P. I. (2010). Is there a rural/urban gradient in the prevalence of eczema? A systematic review. *Br J Dermatol*, *162*(5), 964-973.

Scott, I. R., & Harding, C. R. (1986). Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. *Dev Biol*, *115*(1), 84-92.

Scott, I. R., Harding, C. R., & Barrett, J. G. (1982). Histidine-rich protein of the keratohyalin granules. Source of the free amino acids, urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta*, *719*(1), 110-117.

Seidenari, S., & Giusti, G. (1995). Objective assessment of the skin of children affected by atopic dermatitis: a study of pH, capacitance and TEWL in eczematous and clinically uninvolved skin. *Acta Derm Venereol*, *75*(6), 429-433.

Serre, G., Mills, V., Haftek, M., Vincent, C., Croute, F., Reano, A., Ouhayoun, J. P., Bettinger, S., Soleilhavoup, J. P. (1991). Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J Invest Dermatol*, *97*(6), 1061-1072.

Shahidullah, M., Raffle, E. J., Rimmer, A. R., & Frain-Bell, W. (1969). Transepidermal water loss in patients with dermatitis. *Br J Dermatol*, *81*(10), 722-730.

Smith, F. J., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Munro, C. S., Sergeant, A., O'Reagan, G., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Presland, R. B., Fleckman, R. B., McLean, W. H. (2006). Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet*, *38*(3), 337-342.

Smith, H. W., Clowes, G. H. A., & Marshall, E. K. (1919). On dichloroethylsulfide (mustard gas) IV. The mechanism of absorption by the skin. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, *13*(1), 1-30.

Sonkoly, E., Muller, A., & Lauerma, A. I. (2006). IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, *117*, 411-417.

- Soumelis, V., Reche, P. A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., de Waal-Malefyt, R. D. R., Bazan, F., Kastelein, R. A., Liu, Y. J. (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol*, 3(7), 673-680.
- Spergel, J. M., & Paller, A. S. (2003). Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol*, 112(6 Suppl), S118-127.
- Spruit, D., & Malten, K. E. (1965). Epidermal Water-Barrier Formation after Stripping of Normal Skin. *J Invest Dermatol*, 45, 6-14.
- Steinert, P. M., Cantieri, J. S., Teller, D. C., Lonsdale-Eccles, J. D., & Dale, B. A. (1981). Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(7), 4097-4101.
- Steinhoff, M., Neisius, U., Ikoma, A., Fartasch, M., Heyer, G., & Skov, P. S. (2003). Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci*, 23, 6176-6180.
- Stewart, M. E., & Downing, D. T. (1999). A new 6-hydroxy-4-sphinganine-containing ceramide in human skin. *J Lipid Res*, 40(8), 1434-1439.
- Stewart, M. E., & Downing, D. T. (2001). The omega-hydroxyceramides of pig epidermis are attached to corneocytes solely through omega-hydroxyl groups. *J Lipid Res*, 42(7), 1105-1110.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299(6710), 1259-1260.
- Strachan, D. P. (2000). Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". *Thorax*, 55 Suppl 1, S2-10.
- Strauss, J. S., Pochi, P. E., & Downing, D. T. (1976). The sebaceous glands: twenty-five years of progress. *J Invest Dermatol*, 67(1), 90-97.
- Tagami, H., & Yoshikuni, K. (1985). Interrelationship between water-barrier and reservoir functions of pathologic stratum corneum. *Arch Dermatol*, 121(5), 642-645.
- Thestrup-Pedersen, K. (2003). Atopic eczema. What has caused the epidemic in industrialised countries and can early intervention modify the natural history of atopic eczema? *J Cosmet Dermatol*, 2(3-4), 202-210.
- Thyssen, J. P., & Kezic, S. (2014). Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 134(4), 792-799.
- Tomita, Y., Akiyama, M., & Shimizu, H. (2005). Stratum corneum hydration and flexibility are useful parameters to indicate clinical severity of congenital ichthyosis. *Exp Dermatol*, 14(8), 619-624.

- Törmä, H., & Berne, B. (2009). Sodium lauryl sulphate alters the mRNA expression of lipid-metabolizing enzymes and PPAR signalling in normal human skin in vivo. *Exp Dermatol*, 18(12), 1010-1015.
- Traidl-Hoffmann, C., Mariani, V., Hochrein, H., Karg, K., Wagner, H., Ring, J., Mueller, M. J., Jakob, T., Behrendt, H. (2005). Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *J Exp Med*, 201(4), 627-636.
- Tupker, R. A., Willis, C., Berardesca, E., Lee, C. H., Fartasch, M., Agner, T., & Serup, J. (1997). Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*, 37(2), 53-69.
- Turner, M. C., Chen, Y., Krewski, D., & Ghadirian, P. (2006). An overview of the association between allergy and cancer. *Int J Cancer*, 118(12), 3124-3132.
- Uchida, Y. (2006). 6 Stratum Corneum Ceramides: Function, Origins, and Therapeutic Applications. In P. Elias & K. Feingold (Eds.), *Skin Barrier* (pp. 47). New York: Taylor & Francis Group.
- Uchida, Y., Nardo, A. D., Collins, V., Elias, P. M., & Holleran, W. M. (2003). De novo ceramide synthesis participates in the ultraviolet B irradiation-induced apoptosis in undifferentiated cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 120(4), 662-669.
- Ushijima, T., Takahashi, M., & Ozaki, Y. (1984). Acetic, propionic, and oleic acid as the possible factors influencing the predominant residence of some species of Propionibacterium and coagulase-negative Staphylococcus on normal human skin. *Can J Microbiol*, 30(5), 647-652.
- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., Visser, C. E., Kuijper, E. J., Bartelsman, J. F., Tijssen, J. G., Speelman, P., Dijkgraaf, M. G., Keller, J. J. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile. *N Engl J Med*, 368(5), 407-415.
- van Smeden, J., Hoppel, L., van der Heijden, R., Hankemeier, T., Vreeken, R. J., & Bouwstra, J. A. (2011). LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J Lipid Res*, 52(6), 1211-1221.
- van Smeden, J., Janssens, M., Boiten, W. A., van Drongelen, V., Furio, L., Vreeken, R. J., Hovnanian, A., Bouwstra, J. A. (2014). Intercellular skin barrier lipid composition and organization in Netherton syndrome patients. *J Invest Dermatol*, 134(5), 1238-1245.
- Varley, K. E., Gertz, J., Bowling, K. M., Parker, S. L., Reddy, T. E., Pauli-Behn, F., Cross, M. K. Williams, B.A., Stamatoyannopoulos, J. A., Crwaford, G. E., Absher, D. M., Wold, B. J., Myers, R. M. (2013). Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res*, 23(3), 555-567.

- Vavrova, K., Henkes, D., Struver, K., Sochorova, M., Skolova, B., Witting, M. Y., Friess, W., Schreml, S., Meier, R. J., Schäfer-Korting, M., FLuhr, J. W., Kuchler, S. (2014). Filaggrin deficiency leads to impaired lipid profile and altered acidification pathways in a 3D skin construct. *J Invest Dermatol*, 134(3), 746-753.
- Visscher, M. O., Chatterjee, R., Munson, K. A., Pickens, W. L., & Hoath, S. B. (2000). Changes in diapered and nondiapered infant skin over the first month of life. *Pediatr Dermatol*, 17(1), 45-51.
- von Mutius, E., Braun-Fahrländer, C., Schierl, R., Riedler, J., Ehlermann, S., Maisch, S., Waser, M., Nowak, D. (2000). Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy*, 30(9), 1230-1234.
- Wagner, G. (2010). Anhang 4 Rahmenrezepturen verschiedener Vollwaschmitteltypen (Europa 2009) Waschmittel, Chemie, Umwelt, Nachhaltigkeit (Vol. 4). Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Wallace, A. B. (1951). The exposure treatment of burns. *Lancet*, 1(6653), 501-504.
- Wang, H., & Diepgen, T. L. (2005). Is atopy a protective or a risk factor for cancer? A review of epidemiological studies. *Allergy*, 60(9), 1098-1111.
- 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., Jennek, 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(1), 214-219.
- Weidinger, S., & Novak, N. (2015). Atopic dermatitis. *Lancet*. doi:10.1016/S0140-6736(15)00149-X
- Welsch, U. (2003). Haut. In U. Welsch (Ed.), *Lehrbuch Histologie* (Vol. 1, pp. 549-568). München: Elsevier.
- Werner, Y., & Lindberg, M. (1985). Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*, 65(2), 102-105.
- Wertz, P. (2006). 5 Biochemistry of Human Stratum Corneum Lipids. In P. Elias & K. Feingold (Eds.), *Skin Barrier* (pp. 35). New York: Taylor & Francis Group.
- Wertz, P., & Norlen, L. (2003). "Confidence intervals" for the "true" lipid composition of the human skin barrier? In B. Forslind & M. Lindberg (Eds.), *Skin, Hair, and Nails. Structure and Function* (pp. 85-106). New York: Marcel Dekker Inc.
- Wertz, P. W., & Downing, D. T. (1983). Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res*, 24(6), 759-765.
- Wertz, P. W., & Downing, D. T. (1990). Free sphingosine in human epidermis. *J Invest Dermatol*, 94(2), 159-161.
- Wertz, P. W., Madison, K. C., & Downing, D. T. (1989). Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 92(1), 109-111.

- Wertz, P. W., Miethke, M. C., Long, S. A., Strauss, J. S., & Downing, D. T. (1985). The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J Invest Dermatol*, 84(5), 410-412.
- Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Madison, K. C., & Downing, D. T. (1987). Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *J Invest Dermatol*, 89(4), 419-425.
- Widmer, J., Elsner, P., & Burg, G. (1994). Skin irritant reactivity following experimental cumulative irritant contact dermatitis - Abstract. *Contact Dermatitis*, 30(1), 35-39.
- Wigger-Alberti, W. E., P. (1997). *Evapometrie*. Berlin: Korting, H C Sterry, W.
- Williams, H., Robertson, C., Stewart, A., Ait-Khaled, N., Anabwani, G., Anderson, R., Asher, I., Beasley, R., Björkstén, B., Burr, M., Clayton, T., Crane, J., Ellwood, P., Keil, U., Lai, C., Mallol, J., Martinez, F., Mitchell, E., Montefort, S., Pearce, N., Shah, J., Sibbald, B., Srachan, D., von Mutius, E., Weiland, S. K. (1999). Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J Allergy Clin Immunol*, 103(1 Pt 1), 125-138.
- Williams, H. C., Burney, P. G., Hay, R. J., Archer, C. B., Shipley, M. J., Hunter, J. J., . Bingham, E. A., Finlay, A. Y., Pembroke, A. C. *et al.* (1994). The U.K. Working Party's Diagnostic Criteria for Atopic Dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 131(3), 383-396.
- Williams. (2000). *Atopic dermatitis: the epidemiology, causes and prevention of atopic eczema*. 3-24.
- Wolff, K., & Holubar, K. (1967). [Odland bodies (Membrane coating granules, keratinosomes) as epidermal lysosomes. An electron microscopic-cytochemical contribution on the cornification process of the skin]. *Arch Klin Exp Dermatol*, 231(1), 1-19.
- Yamamoto, A., Serizawa, S., Ito, M., & Sato, Y. (1991). Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res*, 283(4), 219-223.
- Yazdanbakhsh, M., van den Biggelaar, A., & Maizels, R. M. (2001). Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunol*, 22(7), 372-377.
- Zaccone, P., Fehervari, Z., Phillips, J. M., Dunne, D. W., & Cooke, A. (2006). Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunol*, 28(10), 515-523.
- Zhang, D., Karunaratne, S., Kessler, M., Mahony, D., & Rothnagel, J. A. (2002). Characterization of mouse profilaggrin: evidence for nuclear engulfment and translocation of the profilaggrin B-domain during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol*, 119(4), 905-912.

Zienicke, H. (1990). Hautfeuchtigkeit (Transepidermaler Wasserverlust): Meßmethoden und Abhängigkeit vom Waschverfahren *Hautreinigung mit Syndets* (pp. 137-147). Berlin, Heidelberg: Braun Falco, O. , Korting, H C.

Danksagungen

Diese Arbeit ist über mehrere Jahre hinweg entstanden. Es gab viele Wegbegleiter in meinem beruflichen sowie privaten Umfeld, die an ihr Anteil nahmen und zu ihrem Reifungsprozess beitrugen. Allen bin ich für ihre jeweilige Unterstützung dankbar. Folgende Personen möchte ich hier besonders hervorheben.

Prof. Dr. Martin Mempel, Prof. Dr. Stephan Weidinger und Dr. Jakob Mutanu Jungersted danke ich für die gemeinsame Entwicklung der Fragestellung basierend auf ihrem reichen Erfahrungsschatz und die Überlassung des Themas.

Prof. Dr. Martin Mempel hat mich als mein Doktorvater kontinuierlich begleitet. Ihm möchte ich für die ausdauernde und konstruktive Betreuung dieser Arbeit danken. Unsere jahrelange Zusammenarbeit hat mich in meiner wissenschaftlichen Entwicklung maßgeblich geprägt. Seine akademische Strenge gab mir die notwendige Struktur und inspirierte mich zu der differenzierten Diskussionsführung. Einen Großteil meiner wissenschaftlichen Selbstständigkeit verdanke ich ihm.

Prof. Dr. Stephan Weidinger danke ich für die intensive Begleitung dieser Arbeit in den ersten Jahren. Er gab mir die Möglichkeit, die Probanden aus seinem genotypisierten Patientenkollektiv zu rekrutieren und weitere Probanden zu genotypisieren. Er unterstützte sowohl die Versuche als auch die schriftliche Darstellung des Themenkomplexes durch sein breites Fachwissen.

Dr. Jakob Mutanu Jungersted bin ich dankbar für unsere Zusammenarbeit, die die Versuche für diese Arbeit ermöglichten.

Prof. Dr. Dr. Ring danke ich für sein stetiges Interesse an meiner Arbeit. Ebenso danke ich ihm dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit unter seiner damaligen Klinikleitung und innerhalb der dortigen Strukturen durchzuführen.

Meinen Dank möchte ich Prof. Dr. Arnd Petersen und Dr. Cornelia Blume (Forschungszentrum Borstel bzw. ZAUM, München) dafür aussprechen, dass sie mir die polyklonalen Antikörper gegen Phleum p6 sowie das hochgereinigte Phleum p6 zur Verfügung stellten.

Von ganzem Herzen möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und Maurizio Degiacomi danken.

Meine Eltern, Angelika Buddrick-Scheer und Prof. Dr. Matthias K. Scheer, haben mich mit ihrer Lebenserfahrung stets unterstützt und immer an mich und die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt. Meinem Bruder Maximilian Robert Scheer danke ich für seinen stets kompetenten technischen sowie kreativen Rat in der grafischen Gestaltung dieser Arbeit zu jeder Tages- und Nachtzeit. Auf diese Weise konnte die Arbeit an Form gewinnen. Mit unermüdlich liebevoller Unterstützung und Verständnis war Maurizio Degiacomi immer für mich da.

Für diese Selbstverständlichkeit, die Zeit und die Nerven, die das jeweils kostete, bin ich meinen Lieben überaus dankbar.