

## **Inhaltsverzeichnis**

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>0</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>1</i>
<b>Abstract</b>	<b>1</b>
<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>Ziel</b>	<b>2</b>
<b>Methoden</b>	<b>3</b>
<b>Ergebnisse</b>	<b>4</b>
PPAR $\gamma$ Expression bei AD	4
Etablierung eines murinen Dermatitis Modells	5
Immunpathologische Relevanz der PPAR $\gamma$ Aktivierung bei AD	6
Einfluss von Vitamin A auf die postnatale Entwicklung der allergischen Immunantwort	7
<b>Diskussion</b>	<b>9</b>
<b>Literatur</b>	<b>11</b>
<i>Erklärung über den Anteil der beigefügten Publikationen</i>	<i>13</i>
<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	<i>15</i>
<i>Original article 1</i>	<i>16</i>
<i>Original article 2</i>	<i>24</i>
<i>Original article 3</i>	<i>32</i>
<i>Lebenslauf</i>	<i>41</i>
<i>Publikationsliste</i>	<i>44</i>
<b>Publikationen</b>	<b>44</b>
<b>Abstracts</b>	<b>45</b>
<b>Gutachten/Dossiers</b>	<b>46</b>
<b>Vorträge</b>	<b>46</b>
<i>Danksagung</i>	<i>47</i>

## **Zusammenfassung**

### ***Abstract***

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine chronisch entzündliche, mit ausgeprägtem Juckreiz einhergehende Hautkrankheit. Sie resultiert aus dem Zusammenspiel genetischer, immunologischer und umweltbedingter Faktoren. Unsere Arbeitsgruppe konnte in vorangegangenen Untersuchungen zeigen, dass spezifische Liganden des nukleären Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) die systemisch veränderte, allergische Immunantwort auf humoraler und zellulärer Ebene regulieren. Meine weiterführenden Untersuchungen zeigen, dass Patienten mit AD verstärkt PPAR $\gamma$  in peripheren Zellen des Blutes als auch in perivaskulären Zellen läsionaler Haut exprimieren. Die verstärkte Expression des Rezeptors durch CD4 positive T Zellen und Monozyten wird vorwiegend durch die Zytokine IL-4 und IL-13 induziert. Es ist nicht bekannt, ob spezifische Agonisten über die Systemwirkung hinaus positive Effekte auf die lokale allergische Immunantwort ausüben und damit ein Potential für den Einsatz in der dermatologischen Therapie besitzen. Bezüglich dieser Fragestellung wurde ein murines Untersuchungsmodell entwickelt, welches eine AD typische Immunantwort, mit Ausbildung lokaler Hautveränderungen aufweist. Dieses Dermatitis Modell bietet, neben histologischen und serologischen Analysen, erstmals die Möglichkeit allergeninduzierte Ekzeme auch klinisch valide zu bewerten. In diesem Modell untersuchte ich den Einfluss von präventiv und therapeutisch applizierten PPAR $\gamma$ -Liganden auf allergeninduzierte Hautläsionen. Meine Daten zeigen, dass in erster Linie nach präventiver, systemischer Applikation des PPAR $\gamma$ -Liganden, die Induktion ekzematöser Hautläsionen signifikant reduziert ist. Histologische und immunhistochemische Analysen bestätigen, dass durch diese Form der Behandlung die ekzemtypische Verdickung der Haut und die einhergehende Infiltration perivaskulärer Zellen stark reduziert werden. Darüber habe ich verminderte allergenspezifische IgE und IgG1 Antworten und eine eingeschränkte Produktion der Zytokine IL-4 und IFN $\gamma$  nachgewiesen.

Meine Untersuchungen an humanen immunkompetenten Zellen zeigen, dass PPAR $\gamma$  verstärkt bei Patienten mit atopischer Dermatitis exprimiert wird. Dementsprechend kann über eine spezifische Aktivierung des Rezeptors die allergische Immunantwort sowohl systemisch als auch lokal reguliert werden. Im Mausmodell zeigt die systemische Applikation von spezifischen PPAR $\gamma$ -Liganden eine signifikante Verbesserung allergeninduzierter Hautläsionen. Diese Daten bilden die Grundlage für die Entwicklung PPAR $\gamma$  spezifischer Substanzen zur systemischen Behandlung allergischer Erkrankungen, wie der AD.

## **Einleitung**

Der Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren des Typ II. Dieser Rezeptortypus transloziert nach Dimerisierung mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) in den Zellkern und wirkt dort als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor pleiotrop in inflammatorischen Prozessen [1, 2]. Neben endogen vorkommenden Liganden, mit geringer Spezifität hinsichtlich ihrer Bindung an einzelne Isoformen, wurden synthetische Liganden entwickelt, welche auf Grund ihrer Spezifität gezielt pharmakologisch eingesetzt und untersucht werden können. Bekannt ist, dass verschiedene Immunmediatoren die Expression nukleärer Rezeptoren gewebspezifisch regulieren können [3, 4]. Diese Beobachtungen weisen auf eine, vom Aktivierungszustand des Immunstatus abhängige, zellspezifische Expression des Rezeptors hin.

Die atopische Dermatitis (AD) ist eine chronisch entzündliche Hautkrankheit mit steigender Prävalenz [5]. Bislang erfolgt die Therapie der AD vor allem mittels lokal antiinflammatorischer Substanzen, welche potenziell verschiedene Nebenwirkungen entfalten können [6]. Deshalb ist die Anwendung neuer, antientzündlich wirksamer Moleküle eine wichtige Strategie, um individuelle Behandlungsoptionen für die Patienten zu entwickeln. Eigene vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Liganden nukleärer Rezeptoren wie des RXRs [7], des Vitamin D Rezeptors [8] als auch der PPARs [9] sowohl *in vitro* als auch *in vivo* regulierend auf die basale IgE Produktion und auf die Synthese inflammatorisch wirksamer Zytokine bei Allergikern wirken können. Es ist nicht bekannt, ob PPAR $\gamma$ - Liganden über ihre Systemwirkung hinaus positive Effekte auf die lokal veränderte Immunantwort ausüben und damit ein Potenzial für den Einsatz in der dermatologischen Therapie besitzen.

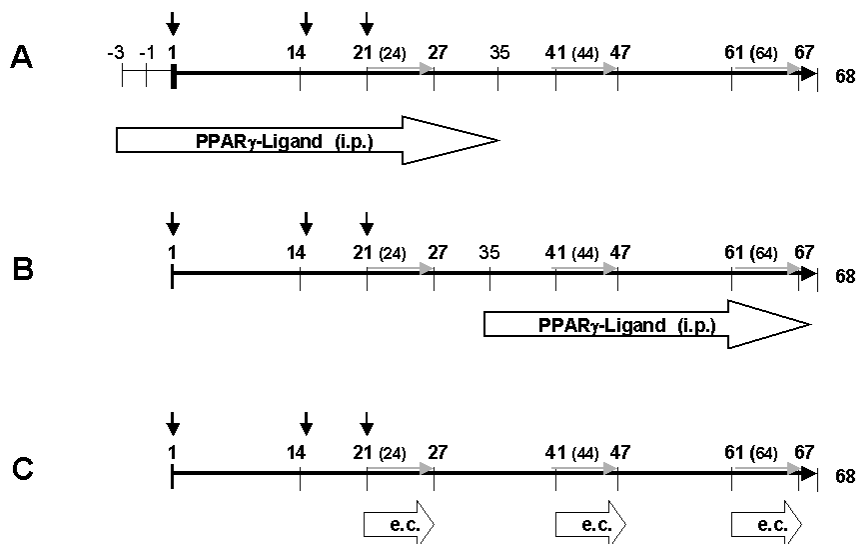
## **Ziel**

Ziel dieser Arbeit ist es, die immunregulatorische Wirkung des nukleären Rezeptors PPAR $\gamma$  auf IgE vermittelte, allergische Erkrankungen am Beispiel der AD zu untersuchen. Mittels molekularbiologischer *in vitro* und *ex vivo* Analysen werden die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors in relevanten humanen Zielzellen analysiert. Aufbauend auf eigenen Voruntersuchungen stehen die Analyse mononukleärer Zellen des peripheren Blutes und der perivaskulären Ekzeminfiltrate in der Haut im Vordergrund der hier vorgelegten Arbeit. Im tierexperimentellen Modell werden präventive und therapeutische Eigenschaften spezifischer Rezeptor- Liganden evaluiert und sollen wegweisend für die Entwicklung neuer Moleküle zur Behandlung allergischer Erkrankungen sein.

## Methoden

Folgende Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit angewandt:

- Isolation, Aufreinigung und Kultur humaner peripherer Blutzellen und muriner Milzzellen
- Proliferations- und Vitalitätsassays
- Expressionsanalyse: Primergenerierung, Sequenzierung und Real time PCR
  - human PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2
  - murin IL-4, IL-10, IFN $\gamma$
- Western Blot und 2D Gelelektrophorese des PPAR $\gamma$  Proteins von humaner, isolierter, peripherer Blutzellen
- Immunhistochemie und Immunfluoreszenz humaner und muriner Hautbiopsate (H&E, CD3, CD4, CD8, CD68, CD11c, Mastzellen, PPAR $\gamma$ )
- Duokit- ELISA murin (total IgE IgG1; OVA -IgE, IgG1, IgG2a, IL-4, IFN $\gamma$ )
- Multiplex- ELISA und FACS murin (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-4, IL-10)
- Tierversuche (Planung, Antragsstellung, stellvertretende Leitung und Durchführung)
  - 1.) „Entwicklung eines geeigneten Maus-Modells zur Evaluierung von Behandlungsmöglichkeiten bei atopischer Dermatitis“
  - 2.) „Einfluss von nukleären Rezeptor- Liganden auf die allergische Immunantwort“.

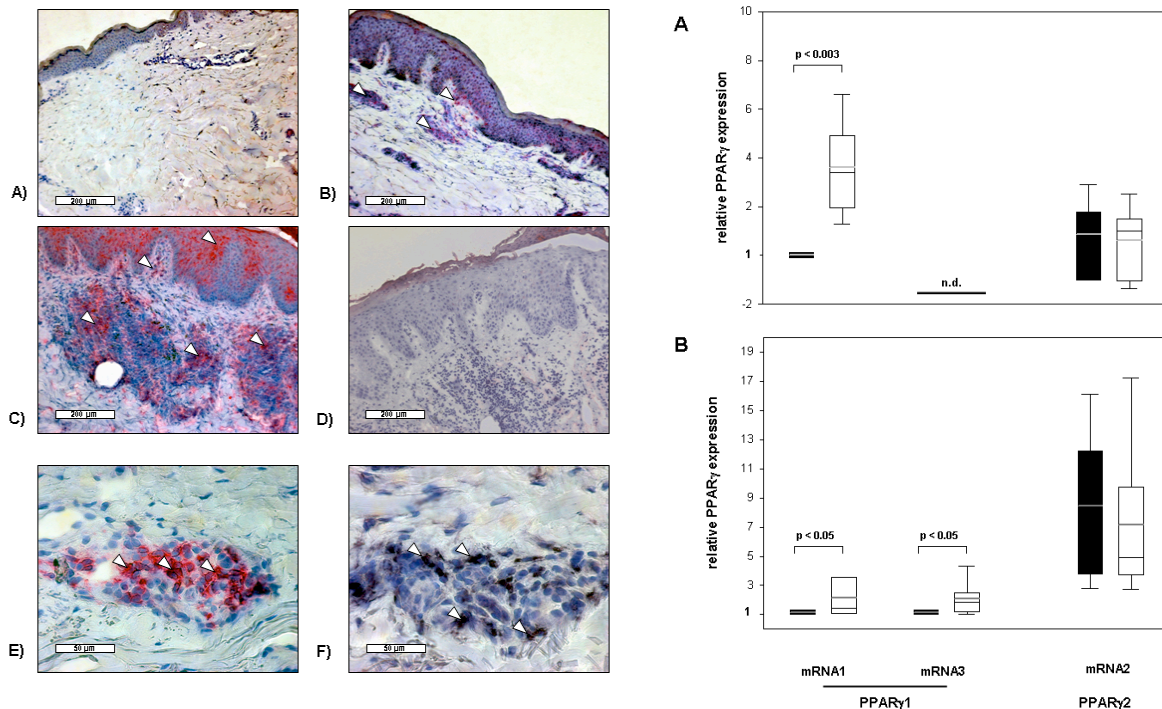


**Abb. 1: Sensibilisierungsprotokoll und Applikationsschema des PPAR $\gamma$ -Liganden im lokalen Dermatitis-Modell. A)** präventive intraperitoneale (i.p.) Applikation des PPAR $\gamma$ -Liganden (Tag -3-35), **B)** therapeutische i.p. Applikation des PPAR $\gamma$ -Liganden (Tag 35-67) und **C)** therapeutische epikutane (e.c.) Applikation des PPAR $\gamma$ -Liganden (Tag 21-27, 41-47, 61-67); OVA-Sensibilisierung i.p. (schwarzer Pfeil), OVA-Sensibilisierung e.c. (graue Pfeil). Zeitachse (Tag 1 bis 68).

## Ergebnisse

### PPAR $\gamma$ Expression bei AD

Initial habe ich untersucht, ob PPAR $\gamma$  in läsionaler Haut von Patienten mit AD exprimiert wird. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigen, dass in ekzematösen Hautläsionen mit zunehmender Infiltration perivaskulärer Zellen verstärkt das PPAR $\gamma$  Protein exprimiert wird (Abb. 2A-F). Die detaillierte Expressionsanalyse der PPAR $\gamma$  Isoformen in mononukleären Blutzellen zeigt, dass CD4<sup>+</sup> T Zellen als auch Monozyten von Patienten mit AD, im Vergleich zu nicht allergischen Probanden verstärkt PPAR $\gamma$ 1 aber nicht PPAR $\gamma$ 2 exprimieren (Abb. 3A-B). Die *in vitro* Analysen weisen darauf hin, dass regulative Zytokine der biphasischen Immunantwort einer AD, wie IL-4, IL-13 und IFN $\gamma$ , die Expression von PPAR $\gamma$ 1 direkt regulieren. Ob über eine spezifische Aktivierung des Rezeptors in diesem Zusammenhang die pathogene Immunantwort reguliert wird, ist Fragestellung der weiterführenden *in vivo* Studien.

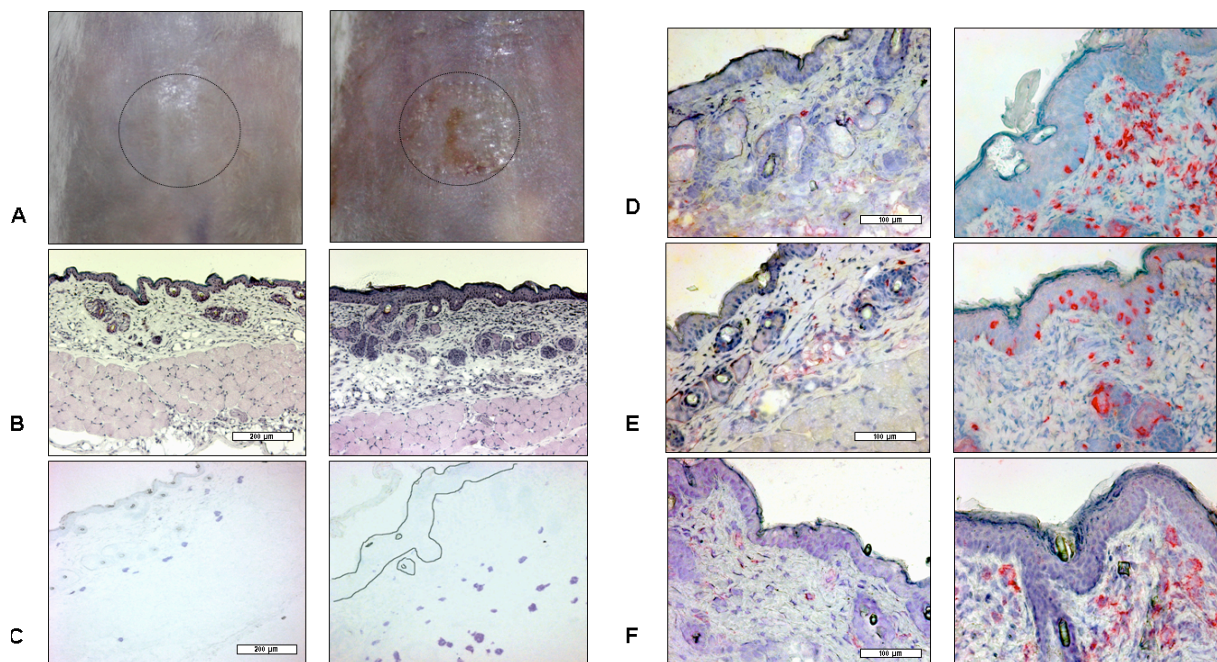


**Abb. 2 (links): PPAR $\gamma$  Expression in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis (A-D).** (A) PPAR $\gamma$  (rot) ist selten detektierbar in nicht läsionaler Haut. Die Expression verstärkt sich mit zunehmender Infiltration perivaskulärer Zellpopulationen (B-C). Diese bestehen überwiegend aus CD3<sup>+</sup> (E) und CD68<sup>+</sup> (F) Zellen. Negativkontrolle (D) mit PPAR $\gamma$ - Blocking Peptid.

**Abb. 3 (rechts): Expression der PPAR $\gamma$  Isoformen kodiert durch drei Promotorabschnitte.** Die mRNA1 und mRNA3 kodieren das Protein PPAR $\gamma$ 1, die mRNA2 das Protein PPAR $\gamma$ 2. PPAR $\gamma$ 1 wird (A) in CD14<sup>+</sup> Monozyten und (B) in CD4<sup>+</sup> T Lymphozyten von AD Patienten (weiß), im Vergleich zu Nicht-Atopikern (schwarz) exprimiert. Dargestellt ist die x- fache Expression der mRNA bei AD Patienten vs. der Expressionsrate 1 bei Nicht-Atopikern.

### Etablierung eines murinen Dermatitis Modells

Eine allergeninduzierte Dermatitis mit histologischen und immunhistologischen Veränderungen im murinen Modell wurde erstmals von Wang *et al.* [11] und folgend von Spergel *et al.* [10] beschrieben. Aufbauend auf diesem epikutanen Sensibilisierungsprotokoll konnten wir ein Proteindermatitis- Modell etablieren das, neben den beschriebenen histologischen Veränderungen, erstmals lokale Ekzeme mit klinischen, sichtbaren Merkmalen wie Erythem, Ödem, Papeln, Trockenheit und Krusten aufweist (Abb. 4A). Diese klinischen Symptome werden mittels eines standardisierten Haut Scores (0 = ohne, 1= mild, 2 = mäßig, 3 = schwer) bewertet und bilden in der Summe ein Maß für die Intensität des induzierten Ekzems. Meine Untersuchungen zeigen, dass diese lokalen Läsionen, im Vergleich zum Protokoll des bisher beschriebenen Modells, signifikante histologische Veränderungen bezüglich der Hautdicke, Infiltration perivaskulärer T Zellen sowie der Mastzellen aufweisen (Abb. 4B–F). Eine allergenspezifische Induktion der humoralen Immunantwort im Serum (IgE, IgG) ist ebenfalls eindeutig detektierbar.

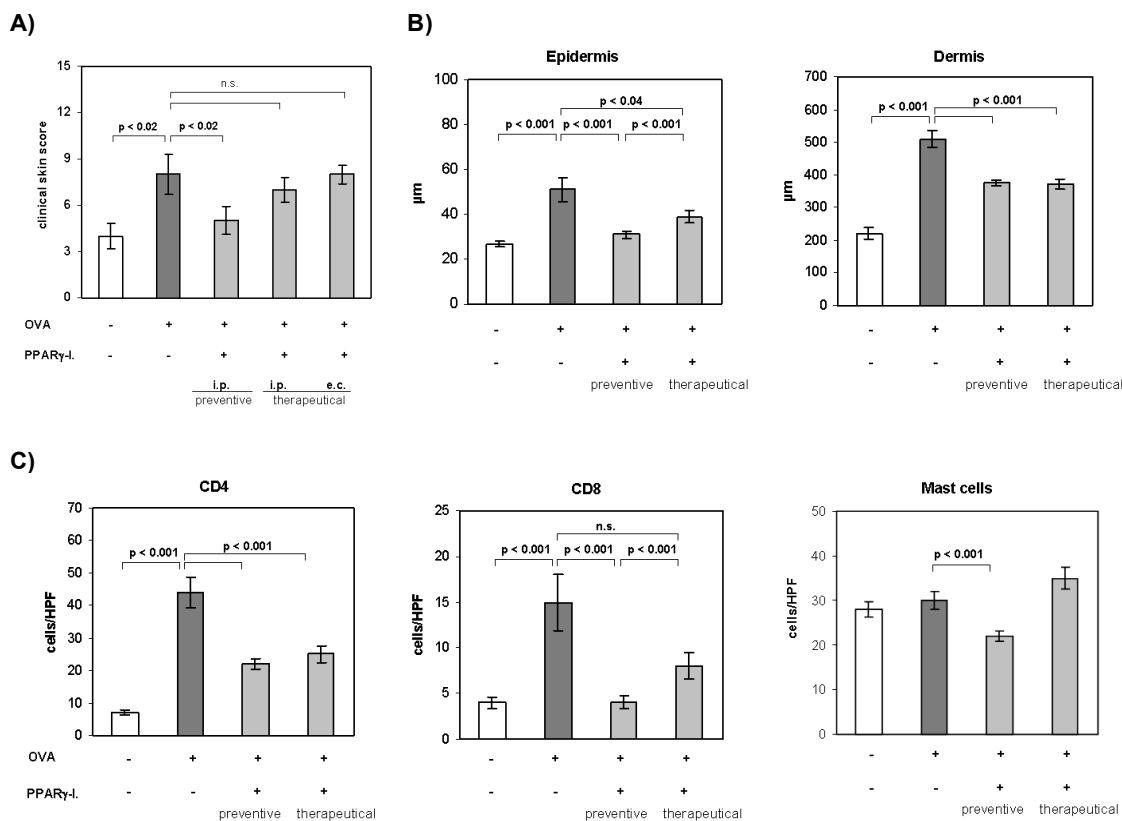


**Abb. 4: Allergeninduzierte Dermatitis im Mausmodell:** Nicht läSIONALE Haut (links) vs. läSIONALER Haut (rechts). **A)** Das klinische Outcome ist gekennzeichnet durch Erytheme, Papeln/Ödeme, Trockenheit und Krusten. **B)** Die Histologie zeigt Spongiose, Parakeratose und verstärkte Infiltration lymphozytärer Zellen sowie **C)** degranulierender Mastzellen (blau). Immunhistologie: **D)** anti-CD4, **E)** anti-CD8 **F)** und anti-CD11c.

Dieses murine Dermatitis Modell stellt auf Grund der AD typischen klinischen Veränderungen ein optimiertes Modell zur Untersuchung neuer präventiver als auch therapeutischer Behandlungsmethoden bei allergischen Erkrankungen wie der AD dar.

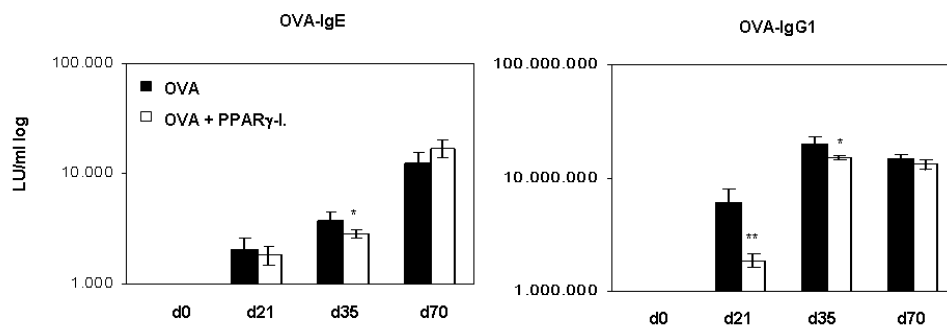
## Immunpathologische Relevanz der PPAR $\gamma$ Aktivierung bei AD

Anhand des etablierten Dermatitis Modells wurde der Einfluss von systemischer und lokaler PPAR $\gamma$  Aktivierung auf die lokale allergische Immunantwort untersucht (Abb. 1). Die Bewertungen des klinischen Phänotyps der lokalen Hautläsionen nach präventiver und therapeutischer Applikation von Ciglitazon weisen auf die präventive Wirksamkeit von systemisch applizierten PPAR $\gamma$ - Liganden. Die signifikant verminderte klinische Ausprägung der lokalen Ekzeme korreliert mit den histologischen Daten, welche neben reduzierten Verdickungen der epidermalen und dermalen Hautabschnitte auch geringere Infiltrate lymphozytärer T Zellen (CD4, CD8) und Mastzellen aufzeigen (Abb. 5). Die systemische Applikation des PPAR $\gamma$ - Liganden während der allergischen Sensibilisierung hat darüber hinaus eine verminderte Induktion der antigenspezifischen IgE und IgG1 Immunantwort zur Folge, während eine Behandlung nach der Etablierung der allergischen Immunantwort keinen Einfluss auf die humorale Immunantwort zeigt (Abb. 6).



**Abb. 5: Der Einfluss von präventiver und therapeutischer Behandlung mit systemisch und lokal appliziertem PPAR $\gamma$ - Liganden auf allergeninduzierte ekzematöse Hautläsionen im murinen Modell.**

(A) Nur die systemisch präventive Behandlung mit dem PPAR $\gamma$ - Liganden hat eine signifikante Verbesserung der lokalen Hautläsionen [clinical skin score] zur Folge. (B-C) Histologischer Vergleich systemisch präventiv und therapeutisch behandelter Hautläsionen: (B) epidermale und dermale Hautdicke in  $\mu$ m und (C) Infiltrate von CD4+, CD8+ T Zellen und Mastzellen, dargestellt als Anzahl der Zellen pro high- power field [HPF] (Vergrößerung 1:200).



**Abb. 6: Verlauf der allergenspezifischen IgE und IgG1 Immunantwort nach systemisch präventiver Behandlung mit dem PPAR $\gamma$  –Liganden (Tag -3-35).** Die allergenspezifische Antikörpersynthese wurde in Seren mittels ELISA bestimmt. [\*] Signifikanz  $p < 0.05$ , [\*\*] Signifikanz  $p < 0.01$ .

Die vorgelegten Daten verdeutlichen, dass die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch spezifische Liganden die Entwicklung des allergischen Phänotyps systemisch als auch lokal reguliert und zu einer Verbesserung von allergeninduzierten Hautläsionen führt.

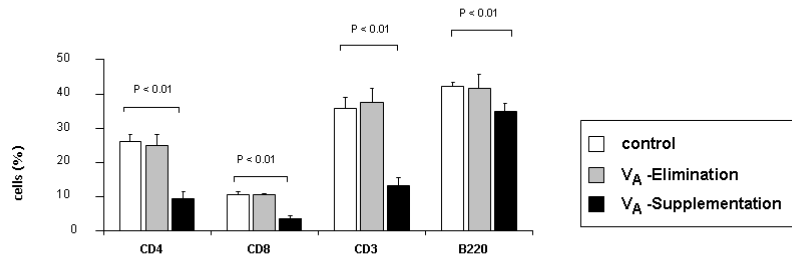
Das etablierte Protokoll der allergeninduzierten Proteindermatitis wurde darüber hinaus in folgenden Projekten als murines Untersuchungsmodell angewendet:

- *A gastrointestinal nematode infection ameliorates allergic airway inflammation but not atopic dermatitis in mice.* C. Schnöller, A. Dahten, A. Avagyan, S. Pillai, S. Rausch, R. Lucius, E. Hamelmann, M. Worm und S. Hartmann.
- *Parasitic cysteineproteinase inhibitor Av17 prevents induction of eczema in a murine model of atopic dermatitis* C. Schnöller, A. Dahten, S. Pillai, D. Ernst, S. Rausch, R. Lucius, M. Worm und S. Hartmann.

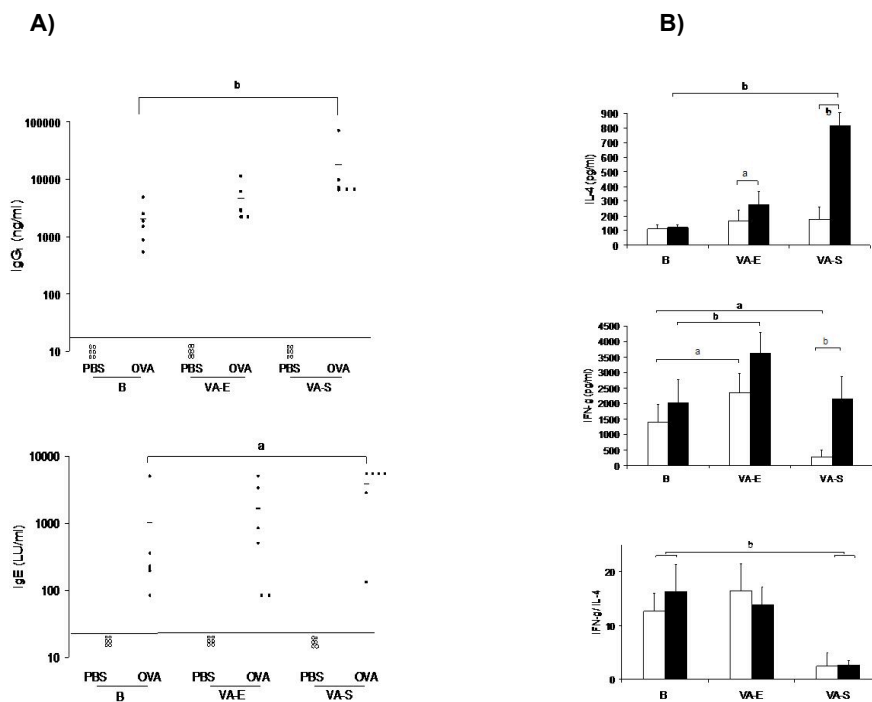
#### *Einfluss von Vitamin A auf die postnatale Entwicklung der allergischen Immunantwort*

In einem murinen Allergiemodel wurde der postnatale Einfluss einer Vitamin A Supplementation als auch Eliminierung auf die allergische Immunantwort untersucht. Diese Daten zeigen, dass die Supplementation von Vitamin A die Anzahl splenozytärer B (B220+) und T Zellpopulationen (CD3+, CD4+, CD8+) signifikant erhöht (Abb. 7). Eine verstärkte humorale Immunantwort bezüglich der allergenspezifischen IgE/IgG1 Synthese, bei zellulär erhöhter IL-4 und verminderter IFN $\gamma$  Produktion (Abb. 8), weisen in diesem Zusammenhang auf eine Induktion der Th2 Immunantwort hin. Diese Daten verdeutlichen, dass eine veränderte Aufnahme von Vitamin A die postnatale Entwicklung der allergischen Immunantwort bereits nach einmaliger Sensibilisierung signifikant beeinflussen kann.





**Abb. 7: Einfluss einer Vitamin A Diät (Eliminierung, Supplementierung) auf die Verteilung der Lymphozytenpopulation in der Milz.** Die prozentuale Anzahl CD3+, CD4+, CD8+ und B220+ Lymphozyten wurde mittels FACS bestimmt.



**Abb. 8 Die Supplementation von Vitamin A [VA-S] führt zu einer Induktion der Th2 Immunantwort.**

**A)** Die allergenspezifische humorale Immunantwort (IgG1, IgE) und **B)** zelluläre Immunantwort (IL-4, IFN $\gamma$ , IFN $\gamma$ /IL-4 ratio). Die allergenspezifische Antikörpersynthese im Serum und die PMA stimulierte Zytokinproduktion in Milzzellüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. [a] Signifikanz  $p < 0.05$ , [b] Signifikanz  $p < 0.01$ .

## **Diskussion**

Die Entstehung und Manifestation allergischer Erkrankungen hat in den letzten Jahren drastisch zugenommen. In diesem Formenkreis ist die atopische Dermatitis (AD) oft der initiiierende Schritt in den so genannten „atopic march“, mit folgender allergischer Rhinitis und bronchialem Asthma [12]. Die Verfügbarkeit nutzbarer Untersuchungsmodelle mit AD typischen Merkmalen, zur Untersuchung pathogener Mechanismen und zur Entwicklung neuer Behandlungsformen ist daher von entscheidender Bedeutung. Auf der Grundlage bekannter Protokolle wurde ein AD ähnliches Dermatitis Modell etabliert, welches erstmals reproduzierbar, klinisch und histopathologisch charakteristische Merkmale eines allergeninduzierten Ekzems aufweist. Im Vergleich zum vormals beschriebenen Modell, sind AD typische histologische Merkmale wie epidermale und dermale Verdickungen der Haut und die vermehrte Infiltration perivaskulärer Zellen (CD4+, CD8+, Mastzellen) detektierbar. Interessant ist in diesem Zusammenhang die verstärkte Rekrutierung von CD8+ Zellen in die Epidermis, welche auch im humanen Ekzem bereits beschrieben sind [13]. Die Funktion dieser Zellpopulation ist bislang nicht eindeutig geklärt, jedoch weisen aktuell einzelne Arbeiten auf die mögliche immunregulative Rolle von CD8+ T Zellen in der Pathogenese der AD hin [14-16].

Meine Untersuchungen zeigen, dass periphere CD4+ T Zellen und Monozyten humaner atopischer Individuen mit moderater bis starker AD, erhöhtem Gesamt IgE (> 2000 kU/l) und polyvalenter Typ I Sensibilisierung, PPAR $\gamma$ 1 verstärkt exprimieren [17]. In den ekzematösen Hautläsionen der AD Patienten konnte mit zunehmender perivaskulärer Infiltrationsrate von T Zellen und Monozyten ebenfalls eine verstärkte Expression des PPAR $\gamma$  Proteins nachgewiesen werden. Eine Induktion der PPAR $\gamma$  Expression wurde ebenfalls im allergischen Asthma-Modell mit allergeninduzierten Entzündungen und verstärkter IgE Synthese beschrieben [18]. Verschiedene Untersuchungen belegen, dass die Expression des Rezeptors in Abhängigkeit vom lokalen Zytokinmilieu reguliert werden kann [19, 20]. Auch meine Untersuchungen haben bestätigt, dass die Expression von PPAR $\gamma$ 1 bei AD Patienten vorwiegend durch Zytokine der biphasischen Immunantwort dieser Erkrankung (IL-4, IL-13, IFN $\gamma$ ) induziert wird. Die verstärkte Expression von PPAR $\gamma$  bedingt durch die lokal veränderte Immunantwort bei AD, weist auf die Möglichkeit der PPAR $\gamma$  Aktivierung im Zuge einer Behandlung durch externe Liganden hin. Meine vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivierung von PPAR $\gamma$  in Lymphozyten und Monozyten des peripheren Blutes regulierend auf die systemisch allergische Immunantwort wirken [9]. Meine aktuellen Daten zeigen, dass die gezielte PPAR $\gamma$  Aktivierung mit spezifischen Liganden nicht nur die systemische Immunantwort, sondern auch die lokale Immunantwort reguliert (Dahten et al., 2008). Klinische und histologische Analysen am murinen Dermatitis-Modell belegen, dass die systemische PPAR $\gamma$  Applikation, während der Ausbildung

der allergischen Immunantwort ebenfalls verstärkt die Ausprägung allergenbedingter Entzündungsreaktionen inhibiert. Maßgeblich für diese Aussage waren zum einen die signifikant reduzierten klinischen Merkmale der ekzematösen Hautläsionen als auch die verminderte Verdickung der Epidermis und Dermis mit reduzierten perivaskulären T Zellinfiltraten (CD4+, CD8+). Dieser Effekt könnte unter anderem auf die verminderte Synthese des Zytokins IFN $\gamma$  zurückzuführen sein, welches nachweislich eine wichtige Rolle bei der Induktion einer allergenvermittelten dermalen Verdickung der Haut spielt [21]. Auf Grund meiner Beobachtung, dass sowohl CD4+ als auch CD8+ T Zellen PPAR $\gamma$  exprimieren, können diese immunregulatorischen Zellpopulationen direkte Zielzellen einer spezifischen PPAR $\gamma$  Behandlung sein [17]. Die Reduktion der allergenausgelösten Hautläsionen korrelierte darüber hinaus mit einer verminderten humoralen (IgE/IgG1) als auch zellulären (IL-4) Th2 Immunantwort. Dass die Intensität der Ausprägung einer AD mit IL-4 getriggertem IgE korreliert, wird für den extrinsischen Typus dieser Erkrankung häufig beschrieben [22, 23]. Meine Beobachtung, dass die therapeutische Behandlung mit dem Liganden in diesem Untersuchungsmodell einen weitaus geringeren Einfluss auf die Ausprägung der allergeninduzierten Hautläsionen zeigt, weist auf die untergeordnete funktionale Rolle von PPAR $\gamma$  nach der Etablierung des allergischen Phänotyps hin. Dies bestätigen auch Untersuchungen im allergischen Asthmodell, welche zeigen, dass die Hemmung des IL-4 Signalweges während einer Sensibilisierung, sowohl die IgE Synthese als auch den Ausprägungsgrad der allergischen Entzündung unterdrückt, während eine Hemmung von IL-4 nach der Sensibilisierungsphase keinen messbaren Einfluss zeigt [24].

Der aktive Vitamin A Metabolit 9-cis-Retinsäure ist ein spezifischer Ligand des nukleären Rezeptors RXR und Dimerisierungspartner anderer nukleärer Rezeptoren (Vitamin D, PPARs, LXR). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass RXR transkriptionsabhängig relevante Gene der Immunantwort moduliert [25, 26]. Die aktuellen Daten zeigen, dass bereits die postnatal veränderte Aufnahme von Vitamin A einen maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung der Immunantwort ausüben kann.

Mit den hier vorgelegten Daten wurde ein optimiertes Grundlagenmodell zur Untersuchung neuer Behandlungsmethoden bei der atopischen Dermatitis vorgestellt.

## Literatur

1. Valledor, A.F., *The innate immune response under the control of the LXR pathway*. Immunobiology, 2005. **210**(2-4): p. 127-32.
2. Zingarelli, B. and J.A. Cook, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation*. Shock, 2005. **23**(5): p. 393-9.
3. Rizzo, G. and S. Fiorucci, *PPARs and other nuclear receptors in inflammation*. Curr Opin Pharmacol, 2006.
4. Greene, M.E., et al., *PPARgamma: observations in the hematopoietic system*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2000. **62**(1): p. 45-73.
5. Leung, D.Y., et al., *New insights into atopic dermatitis*. J Clin Invest, 2004. **113**(5): p. 651-7.
6. Heratizadeh, A., et al., *[Systemic therapy of atopic dermatitis]*. Hautarzt, 2003. **54**(10): p. 937-45.
7. Worm, M., et al., *Effects of retinoids on in vitro and in vivo IgE-production*. Int Arch Allergy Immunol, 2001. **124**: p. 233-236.
8. Heine, G., et al., *1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits anti-CD40 plus IL-4-mediated IgE production in vitro*. Eur J Immunol, 2002. **32**(12): p. 3395-404.
9. Ruhl, R., et al., *Inhibition of IgE-production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(4): p. 757-64.
10. Spergel, J.M., et al., *Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice*. J Clin Invest, 1998. **101**(8): p. 1614-22.
11. Wang, L.F., et al., *Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like response with high IgE production in mice*. J Immunol, 1996. **156**(11): p. 4077-82.
12. Spergel, J.M. and A.S. Paller, *Atopic dermatitis and the atopic march*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(6 Suppl): p. S118-27.
13. Lugovic, L., J. Lipozenovic, and J. Jakic-Razumovic, *Atopic dermatitis: immunophenotyping of inflammatory cells in skin lesions*. Int J Dermatol, 2001. **40**(8): p. 489-94.
14. Akdis, M., et al., *Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD8+ T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis*. J Immunol, 1999. **163**(1): p. 466-75.
15. Hennino, A., et al., *Skin-infiltrating CD8+ T cells initiate atopic dermatitis lesions*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5571-7.
16. Savinko, T., et al., *Topical superantigen exposure induces epidermal accumulation of CD8+ T cells, a mixed Th1/Th2-type dermatitis and vigorous production of IgE antibodies in the murine model of atopic dermatitis*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8320-6.
17. Dahten, A., S. Mergemeier, and M. Worm, *PPARgamma expression profile and its cytokine driven regulation in atopic dermatitis*. Allergy, 2007. **62**(8): p. 926-933.
18. Honda, K., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(5): p. 882-8.
19. Huang, J.T., et al., *IL-4 dependent production of PPARgamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase*. Nature, 1999. **400**: p. 378-382.
20. Tanaka, T., et al., *Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptorgamma expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones*. Diabetologia, 1999. **42**(6): p. 702-10.

21. Spergel, J.M., et al., *Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis*. J Clin Invest, 1999. **103**(8): p. 1103-11.
22. Flohr, C., et al., *How atopic is atopic dermatitis?* J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(1): p. 150-8.
23. Boguniewicz, M., P. Schmid-Grendelmeier, and D.Y. Leung, *Atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(1): p. 40-3.
24. Hahn, C., et al., *Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system prevents allergic sensitization without affecting established allergy in a mouse model for allergic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(6): p. 1361-9.
25. De Luca, L.M., *Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia*. Faseb J, 1991. **5**(14): p. 2924-33.
26. Worm, M., et al., *Retinoic acid inhibits CD40 + interleukin-4-mediated IgE production in vitro*. Blood, 1998. **92**(5): p. 1713-20.

## Erklärung über den Anteil der beigefügten Publikationen

1. A. Dahten, S. Mergemeier and M. Worm. *PPAR $\gamma$  expression profile and its cytokine driven regulation in atopic dermatitis*. Allergy. **2007** Aug; 62(8): p. 926-33.

- Immunhistochemie humaner Hautbiopsate (H&E, CD3, CD68, PPAR $\gamma$ )
- Isolation, Aufreinigung und Kultur humaner peripherer Blutzellen (CD14+, CD4+, CD19+)
- RNA Extraktion, Primergenerierung <sup>50%</sup>, Sequenzierung <sup>70%</sup> und Real Time RT-PCR (PPAR $\gamma$ , PPAR $\gamma$ 1-3)
- Proteinisolation und Western Blot (PPAR $\gamma$ ) humaner peripherer CD14+, CD4+ und CD19+ Blutzellen
- Datenauswertung, graphische Darstellung und Statistik
- Verfassen, Einreichen und Korrektur des Manuskriptes <sup>80%</sup>

▪ **Gesamtanteil 75 %**

2. R. Rühl, A. Hänel, A.L. Garcia, A. Dahten, U. Herz, F.J. Schweigert and M. Worm. *Role of Vitamin A elimination or supplementation diets during postnatal development on the allergic sensitization in mice*. Mol Nutr Food Res. **2007** Sep 14; 51(9): p. 173-1181.

- ELISA (OVA spezifisches IgE und IgG1, IL-4 und IFN $\gamma$ ) 25% gesamt
- Betreuung und technische Assistenz des Diplomanden A. Hänel 20%
- Verfassen, Einreichen und Korrektur des Manuskriptes <sup>20%</sup>

▪ **Gesamtanteil 22 %**

3. A. Dahten, C. Koch, D. Ernst, C. Schnöller, S. Hartmann and M. Worm. *Systemic PPAR $\gamma$  ligation inhibits the allergic immune response in the skin*. J Invest Dermatol. **2008** Apr 10.

- Antragstellung und stellvertretende Leitung der Tierversuche „*Entwicklung eines geeigneten Maus-Modells zur Evaluierung von Behandlungsmöglichkeiten bei atopischer Dermatitis*“ und „*Einfluss von nukleären Rezeptor-Liganden auf die allergische Immunantwort*“.
- Histologie und Immunhistochemie muriner Hautbiopsate (H&E, CD4, CD8, CD11c, Mastzellen) <sup>80%</sup>
- RNA Extraktion und RT PCR <sup>25%</sup>
- Isolation und Kultur muriner Milzzellen <sup>50%</sup>

- ELISA (OVA spezifisches IgE, IgG1, IgG2a, IL-4 und IFN $\gamma$ )
- Datenauswertung, graphische Darstellung und Statistik
- Verfassen, Einreichen und Korrektur des Manuskriptes <sup>80%</sup>
  - **Gesamtanteil 75 %**

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Anja Dahten, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt zu haben.  
Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die angegeben verwandt.



## Original article 1

A. Dahten, S. Mergemeier and M. Worm. *PPAR $\gamma$  expression profile and its cytokine driven regulation in atopic dermatitis*. *Allergy*, 2007, 62(8): p. 926-33.

## Original article 2

A. Dahten, C. Koch, D. Ernst, C. Schnöller, S. Hartmann and M. Worm. Systemic *PPAR $\gamma$*  ligation inhibits the allergic immune response in the skin. *J Invest Dermatol*, 2008, Apr 10.

### Original article 3

R. Ruehl, A. Haenel, A.L. Garcia, A. Dahten, U. Herz, F.J. Schweigert and M. Worm. *Role of Vitamin A elimination or supplementation diets during postnatal development on the allergic sensitization in mice*. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(9): p. 1173-81.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## Publikationsliste

### Publikationen

R. Rühl, A. Dahten, F.J. Schweigert, U. Herz, and M. Worm, *Inhibition of IgE-production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands*. J Invest Dermatol, 2003, 121(4): p. 757-64.

A. Dahten, S. Mergemeier and M. Worm. *PPAR $\gamma$  expression profile and its cytokine driven regulation in atopic dermatitis*. Allergy, 2007, 62(8): p. 926-33.

R. Ruehl, A. Haenel, A.L. Garcia, A. Dahten, U. Herz, F.J. Schweigert and M. Worm. *Role of Vitamin A elimination or supplementation diets during postnatal development on the allergic sensitization in mice*. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(9): p. 1173-81.

A. Dahten, C. Koch, D. Ernst, C. Schnöller, S. Hartmann and M. Worm. *Systemic PPAR $\gamma$  ligation inhibits the allergic immune response in the skin*. J Invest Dermatol, 2008, Apr 10.

G. Heine, A. Dahten, D. Ernst, and M. Worm. *Expression of the nuclear liver-X- receptor in B-cells and its impact on the allergic immune response*. Blood. (in revision)

C. Schnöller, A. Dahten, A. Avagyan, S. Pillai, S. Rausch, R. Lucius, E. Hamelmann, M. Worm, S. Hartmann. *A gastrointestinal nematode infection ameliorates allergic airway inflammation but not atopic dermatitis*. Allergy. (manuscript in preparation)

C. Schnöller, A. Dahten, S. Pillai, D. Ernst, S. Rausch, R. Lucius, M. Worm and S. Hartmann. *Parasitic cysteineproteinase inhibitor Av17 prevents induction of eczema in a murine model of atopic dermatitis*. (manuscript in preparation)

A. Dahten and J. Gruenwald. *Nutricosmetics*. SPC, 2008, Sep.

## **Abstracts**

A. Dahten. *Inhibition of IgE synthesis by peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) ligands in mononuclear peripheral blood cells (PBMCs) of patients with atopic dermatitis.* Europäischer Studentenkongreß, 2001.Vortrag.

A. Dahten, K. Anton, R. Rühl, F: J: Schweigert and M. Worm. *Inhibition of cytokine production and IgE synthesis by PPAR- ligands in peripheral blood cells from patients with atopic dermatitis.* XXIX. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF) 2002. Poster.

A. Dahten, R. Rühl, F: J: Schweigert, U. Herz and M. Worm. *Inhibition of IgE-production by PPAR $\gamma$ -ligand Ciglitazone.* XXXIV. Annual Meeting of the German Society of Immunology, 2003. Poster.

A. Dahten, S. Mergemeier, and M. Worm. *Expression of PPAR $\gamma$  and its isoforms in atopic diseases.* Keystone Symposia: PPAR/LXR, Whistler (BC), 2005. Poster.

A. Dahten, S. Mergemeier, D. Ernst and M. Worm. *Expression of PPAR $\alpha$  and its isoforms in atopic diseases.* 5th International Masterclass Nutrigenomics, 2005. Poster/Vortrag.

A. Dahten, C. Koch, D. Ernst, EO Luger and M. Worm. *Mouse model of allergic atopic eczema.* EAACI/GA2LEN joint summer school/scientific research seminar: Mouse models of allergy and asthma, Antalya, 2006. Poster/Vortrag.

C Koch, A. Dahten, R Ruehl, EO Luger and M Worm. *Supplementation of the n-3-PUFA docosahexaenoic acid (DHA) in ovalbumin mouse model.* EAACI/GA2LEN joint summer school/scientific research seminar: Mouse models of allergy and asthma, Antalya, 2006. Poster/Vortrag.

M. Gerstenberg, A. Dahten, C. Koch, V. Fokuhl, E.O. Luger and M. Worm. *Humoral allergic immune response is age- and hormone dependent in mice.* Mainzer Allergie-Workshop, 2007. Poster.

M. Gerstenberg, A. Dahten, C. Koch, V. Fokuhl, EO. Luger und M. Worm. *Die humorale allergische Immunantwort ist abhängig von Alter, Geschlecht und Stamm der Mäuse.* Ergebnisbericht, Zentrum für Geschlechterforschung, Berlin, 2007.

C. Schnöller, S. Rausch, A. Avagyan, A. Dahten, R. Lucius, M. Worm, E. Hamelmann and S. Hartmann. *Infection with the gastrointestinal nematode Heligmosomoides polygyrus alters allergic airway inflammation but not atopic dermatitis*. World immune regulation meeting, Davos, 2007.

A. Dahten, D. Ernst, D. Hoser and M. Worm. *PPAR $\gamma$ -ligation improves the development of allergen-induced skin inflammation in a murine model of dermatitis*. DGfI-meeting, Heidelberg (05.-08.09.07).

### **Gutachten/Dossiers**

Westfälische Fleischwarenfabrik:

- Bedeutung von Fleisch- und Wurstwaren im Rahmen einer vollwertigen Ernährung. Januar, 2008.
- Gutachten zu Nährwert- und gesundheitsbezogenen Angaben. April, 2008.

Gesellschaft für individuellen Vitalbedarf mbH

- Gutachten zu Nahrungsergänzungsmitteln

### **Vorträge**

A. Dahten. *Inhibition of IgE synthesis by peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) ligands in mononuclear peripheral blood cells (PBMCs) of patients with atopic dermatitis*. Europäischer Studentenkongreß, 2001. Vortrag.

A. Dahten and J. Gruenwald. *Nutricosmetics- A gimmick or a real competition to topicals*. Inaugural SCS annual cosmetic Science Symposium. South Wales, 27.- 29.04.08 April 2008.

## Danksagung

An erster Stelle danke ich meiner Mentorin und Betreuerin Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm für die Ermöglichung dieser Dissertation in Ihrer Arbeitsgruppe und Ihrer persönlichen Unterstützung durch innovative Ideen, konstruktive Kritik und nicht zuletzt Geduld. Herrn Prof. Sterry danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit an der Klinik für Dermatologie und Allergologie anfertigen zu dürfen, für die Bereitstellung von Räumlichkeiten, technischen Geräten und die anteilige Unterstützung bezüglich der Finanzierung dieser Arbeit. In diesem Rahmen gilt mein besonderer Dank der Charité- Universitätsmedizin für die nachhaltige Bereitstellung eines Promotions- Stipendiums.

Mein großer Dank an alle Mitarbeiter der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Charité Campus Mitte, die mir z.T. jahrelang zur Seite standen und mich arbeitstechnisch als auch emotional unterstützten. Diesbezüglich seien besonders genannt:

- Susanne Lescau, Dennis Ernst und Sven Guhl, die mir sehr eng im Labor zur Seite standen und mit mir aufopfernd Mäuse „betreut“ haben,
- meinen PhD Mitstreiterinnen Christin Koch, Anja Köhler, Chantip Dang und Kathi Westphal für ihr offenes Ohr und die technische als auch seelische Unterstützung im Forschungsalltag,
- Lilla Landeck, Steffi Soost, Claudia Rasche und Hae-Hyuk Lee für ihre Hilfsbereitschaft auf der klinischen Ebene,
- Elke Luger, Guido Heine und Marc Gottschling für die konstruktive Unterstützung von postgraduierter Seite,
- meiner Mensa- Mittagsgruppe für die schönen und entspannten Pausen,
- der AG Hartmann für die kooperative Zusammenarbeit,
- und Richard Stefaniak und Florian Losch für Ihr verständnisvolles Zuhören.

Mein ganz großer Dank gilt allen meinen Freunden, die mir privat so viel liebevollen Rückhalt gegeben haben und mich auch in schlechten Momenten noch ertragen wollten, besonders meine Freundinnen Miriam Röber, Jill Menard und Friderike Benzel und meinem Freund und ehemaligen Lebensgefährten Ansgar Bach (Danke für aufopferndes Korrekturlesen und neue Blickwinkel). Dank Euch Mittenmangs und Fräuleins für eure Freundschaft, Nachbarschaftshilfe und finanzielle Unterstützung.

Ein ganz spezieller Dank geht an meine lieben Chef's und Kollegen von a&r für's „Rücken freihalten“ in den letzten Zügen. Ihr wart das Zünglein an der Waage!

Am Schluss der liebste Dank an meine Eltern, die mich immer liebevoll unterstützt haben und geduldig an mich glaubten. Dicker Kuss!