

Aus dem Institut/der Klinik für Dermatologie, Venerologie und
Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss einer systemischen Therapie mit Alitretinoin
(9-cis-Retinsäure) auf die Hautbarriere von Patienten
mit chronischem Handekzem**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kristina Timm
(geb. Heins)

aus Celle

Datum der Promotion: 30.05.2015

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Zusammenfassung	6
2 Abstract.....	8
3 Einleitung.....	9
3.1 Die Haut.....	9
3.1.1 Barrierefunktion, Aufbau und Struktur der Haut.....	9
3.1.2 Tight Junction-Proteine	11
3.1.3 Intermediäre Filamente des Zytoskeletts	13
3.1.4 Proteine des Cornified Envelope	15
3.1.5 Mechanismen der Hautbarriere	16
3.1.6 Störung der Hautbarriere beim Handekzem	17
3.1.7 Thymic stromal lymphopoietin und Interleukin-36 γ als Entzündungsmarker beim Handekzem	18
3.2 Das Handekzem	19
3.2.1 Epidemiologie und Klassifikation	19
3.2.2 Diagnostik und Therapie	21
3.3 Alitretinoin	22
3.3.1 Klinische Eigenschaften: Indikation, Anwendungshinweise und Nebenwirkungen.....	22
3.3.2 Pharmakologische Eigenschaften: Wirkmechanismus, Metabolismus und Elimination	23
3.4 Zielsetzung.....	25
4 Material.....	26
4.1 Antikörper.....	26
4.2 Chemikalien	27
4.3 Puffer und Lösungen.....	27
4.4 Labormaterialien und -geräte.....	28
4.5 Software.....	29
5 Methodik	30
5.1 Patienten.....	30
5.2 Modifizierter Manuscore zur Erhebung des Schweregrades des Handekzems	32
5.3 Transepidermaler Wasserverlust (TEWL).....	33
5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
5.4.1 Aufarbeitung der Hautproben für die PCR	34
5.4.2 Primerdesign und -etablierung	36
5.4.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	40

5.5 Histologie und Immunhistochemie	41
5.5.1 Dokumentation der Histologie und Immunhistochemie	41
5.5.2 Auswertung der Histologie	41
5.5.3 Auswertung der Immunhistochemie	42
5.6 Statistik	45
6 Ergebnisse	46
6.1 Untersuchungskollektiv	46
6.2 Klinische Wirksamkeit von Alitretinoin	47
6.3 Einfluss von Alitretinoin auf den transepidermalen Wasserverlust	48
6.4 Einfluss von Alitretinoin auf die Epidermisdicke	48
6.5 Untersuchung der Hautbarriere vor und nach Alitretinointherapie	49
6.5.1 Tight Junction-Proteine	49
6.5.2 Intermediäre Filamente des Zytoskeletts	53
6.5.3 Proteine des Cornified Envelope	57
6.6 Expression von Ki67	61
6.7 Nachweis von CD3 ⁺ -T-Zellen	63
6.8 Expression des Thymic stromal lymphopoietins (TSLP)	64
6.9 Expression von Interleukin-36 γ	67
6.10 Korrelationen zwischen den Untersuchungsparametern	67
7 Diskussion	70
7.1 Klinischer Verlauf und transepidermaler Wasserverlust unter Alitretinointherapie	70
7.2 Einfluss der Alitretinointherapie auf die Epidermisdicke	72
7.3 Einfluss der Alitretinointherapie auf die Hautbarriere	72
7.3.1 Strukturproteine	73
7.3.2 Proliferations- und Entzündungsmarker	82
7.4 Direkte und indirekte Wirkung von Alitretinoin auf Strukturproteine und Entzündungsmarker	85
7.5 Schlussfolgerungen und Ausblick	88
8 Literaturverzeichnis	90
9 Eidesstattliche Versicherung	99
10 Publikationen	99
11 Lebenslauf	100
12 Danksagung	102

Abkürzungsverzeichnis

Cl1	Claudin1
Cl2	Claudin2
Flg	Filaggrin
Lor	Loricrin
Md	Median
Ocl	Occludin
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
s	Standardabweichung
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
TG1	Transglutaminase1
TSLP	Thymic stromal lymphopietin
ZK10	Zytokeratin10

1 Zusammenfassung

Das Handekzem zählt mit einer Ein-Jahres-Prävalenz von ca. 10% zu den häufigsten Hauterkrankungen. Aktuelle Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Hautbarriere eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese und Therapie des chronischen Handekzems einnimmt. Noxen und Allergene aktivieren in der Epidermis Keratinozyten und Immunzellen. Dadurch wird die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (u.a. Zytokinen) gefördert, die sekundär die Expression der für die Hautbarriere wichtigen Strukturproteine (Claudine, Filaggrin usw.) negativ beeinflussen. Das Vitamin A-Derivat Alitretinoin (9-cis-Retinsäure) ist seit 2008 zur Therapie des schweren, chronischen und auf topische Glukokortikoide nicht ausreichend ansprechenden Handekzems zugelassen. Es hat sich auch in der Praxis als effektives und gut verträgliches systemisches Therapeutikum herausgestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Alitretinoin auf die Hautbarriere von Patienten mit chronischem Handekzem untersucht. Dafür wurde bei den Patienten jeweils direkt vor und nach einer mindestens zweimonatigen Alitretinointherapie der Manuscore in modifizierter Form bestimmt, der transepidermale Wasserverlust (TEWL) gemessen und eine Biopsie im Bereich von läsionaler Haut der Handinnenfläche bzw. der Fußsohle (n=15) entnommen. In den gewonnenen Hautproben wurde die Gen- und Proteinexpression verschiedener Strukturproteine sowie Proliferations- und Entzündungsmarker mittels PCR und Immunhistochemie bestimmt.

Neben einer signifikanten Abnahme des modifizierten Manuscores (Parameter für klinisches Ansprechen) wurde eine erhöhte Gen- und Proteinexpression von Strukturproteinen wie Tight Junction-Proteinen (Claudin1, Occludin), intermediären Filamenten des Zytoskeletts (Filaggrin, Zytokeratin10) und Proteinen des Cornified Envelope (Loricrin) nach der Alitretinointherapie festgestellt. Daneben führte Alitretinoin zu einer Abnahme von Entzündungszellen (CD3⁺-T-Zellen) und dem Entzündungsmediator TSLP. Eine signifikante Zunahme der durch vermehrten transepidermalen Wasserverlust verursachten Trockenheit, die eine klassische Nebenwirkung von Retinoiden ist, konnte nicht festgestellt werden.

Wie bereits in vielen Studien untersucht, zeigen auch die hier vorliegenden Ergebnisse, dass Alitretinoin ein effektives Therapeutikum bei schwerem, chronischem Handekzem ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Alitretinoin zu einer

Verbesserung der epidermalen Hautbarriere führt, indem es die Expression von Strukturproteinen heraufreguliert und Entzündungsmediatoren herunterreguliert. Wie lange diese Normalisierung der Hautbarriere nach Alitretinointherapie anhält und welchen Einfluss Alitretinoin auf die Lipidkomposition in läsionaler Haut beim chronischen Handekzem ausübt, sollte zukünftig genauer untersucht werden.

2 Abstract

Chronic hand eczema (CHE) is one of the most common dermatological disorders with a prevalence of approximately 10%. Recent data have shown, that the skin barrier has a key function in the pathogenesis and therapy of CHE. Both, irritants and allergens are activating keratinocytes and immune cells. This leads to an increased production of inflammatory mediators (e.g. cytokines), which impair the expression of important structural skin barrier proteins (e.g. claudins, filaggrin). Oral alitretinoin (9-cis-retinoic acid), a vitamin A derivate, has been licensed 2008 for the treatment of severe CHE refractory to potent topical corticosteroids. In clinical trials but also in clinical practice alitretinoin has been shown to be an effective and well tolerated systemic therapeutic drug.

In this thesis the influence of alitretinoin on the skin barrier in patients with CHE were examined. Therefore the modified manuscore and the transepidermal waterloss (TEWL) were determined and skin biopsies of lesional skin (n=15) were taken before and after therapy with alitretinoin for at least two months. Gene- and protein expression of structural proteins, proliferation- and inflammatory markers of the skin were measured in the biopsies by using PCR and immunohistochemistry.

Beside a significant decrease of the modified manuscore (parameter for clinical response) an increased gene- and protein expression of the structural proteins of the skin like tight junction-proteins (claudin1, occludin), intermediate filaments of the cytoskeleton (filaggrin, cytokeratin 10) and proteins of the cornified envelope (loricrin) were detected after treatment with alitretinoin. Furthermore, systemic alitretinoin led to a local decrease of inflammatory cells (CD3⁺ cells) and of the inflammatory mediator TSLP in the skin. Although dry skin is known as a side effect of retinoids, there was no significant increase of the transepidermal waterloss.

The results of this thesis confirm the data of several clinical studies that alitretinoin is a well tolerated and effective systemic therapy for severe CHE. Herein, for the first time it has been shown that alitretinoin improves the epidermal skin barrier by upregulation of structural proteins of the skin and a downregulation of inflammatory markers. How long such a normalization of the skin barrier after therapy with alitretinoin will last and what kind of influence alitretinoin has on the lipid composition of lesional skin, should be investigated in future studies.

3 Einleitung

3.1 Die Haut

3.1.1 Barrierefunktion, Aufbau und Struktur der Haut

Die Haut ist mit einer Gesamtfläche von 1,8 m² das größte Organ des Menschen. Als sogenanntes Grenzorgan dient sie dem Schutz des Körperinneren. Sie schützt vor physikalischen Einwirkungen (u.a. mechanischem Stress, UV-Strahlung), biologischen Einflüssen (u.a. Allergenen, Mikroorganismen) und chemischen Einwirkungen (u.a. Chemikalien, Detergenzien) [1]. Die Hornhaut bzw. das Stratum corneum spielt eine besondere Rolle bei der Barrierefunktion der Haut, indem es als sogenannte Permeabilitätsbarriere fungiert. Es schützt den Organismus vor übermäßigem Wasserverlust und reguliert den Stoffaustausch zwischen innen und außen. Ein Mensch ohne Epidermis würde am Tag 20 Liter Wasser über die Haut verlieren [2]. Der Naturforscher David Attenborough behauptete 1980 sogar, dass der evolutionäre Schritt vom Leben im Wasser hin zu einem Leben auf dem Land ohne die Ausbildung dieser „effizienten Hülle“ nicht möglich gewesen wäre.

Die Haut ist (von außen nach innen betrachtet) aus drei Schichten aufgebaut: *Epidermis (Oberhaut)*, *Dermis (Korium, Lederhaut)* und *Subkutis (Unterhaut)* [2].

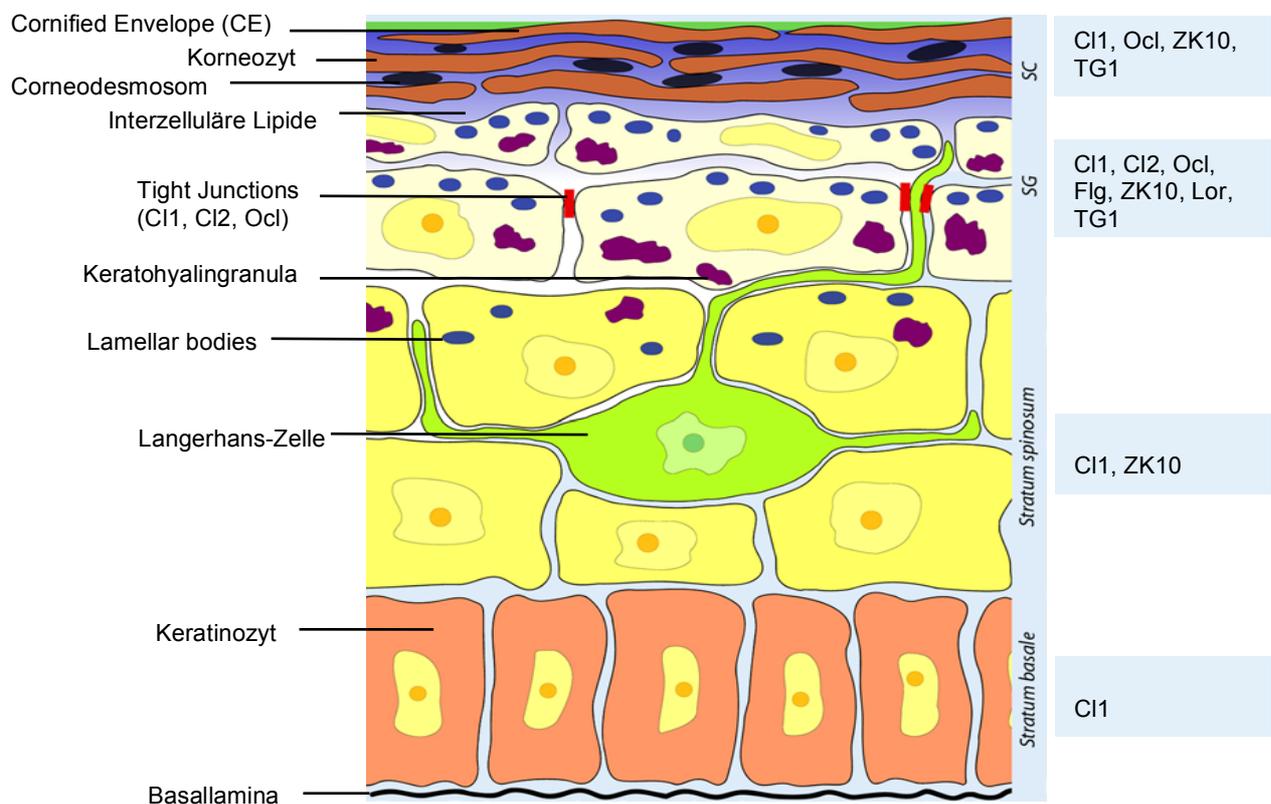
Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, deren histologischer Aufbau (von außen nach innen betrachtet) aus 4 Schichten besteht (Abbildung 1):

- *Stratum corneum (Hornschicht)*
- *Stratum granulosum (Körnerzellschicht)*
- *Stratum spinosum (Stachelzellschicht)*
- *Stratum basale (Basalzellschicht)*

Die Keratinozyten stellen mehr als 90% der Zellen der Epidermis dar [2]. Diese wandern unter Veränderung ihrer Struktur von der Basalzellschicht über das Stratum spinosum und das Stratum granulosum zum Stratum corneum an die Hautoberfläche, wo sie als Hornschuppen abgestoßen werden. Jener Vorgang wird als terminale (epidermale) Differenzierung bezeichnet und dauert in der Regel 4 Wochen [1, 2]. Während dieses Differenzierungsprozesses werden wie in Abbildung 1 dargestellt für die epidermale Hautbarriere wichtige Proteine wie Tight Junction-Proteine, intermediäre Filamente des Zytoskeletts (Keratinfilamente), Proteine des Cornified Envelope, Desmosomen,

Membrane Coating Granules und Keratohyalin granula gebildet [2].

Die Tight Junction-Proteine (u.a. Claudine, Occludin) dienen hauptsächlich als Diffusionsbarriere und werden teilweise bereits im Stratum basale exprimiert. Keratinfilamente (u.a. Zytokeratin10) durchziehen ähnlich einem Netz das Zytoplasma der Keratinozyten. Sie enden an den Desmosomen, den interzellulären Haftstellen der Keratinozyten, und sind mit ihnen zusammen für die mechanische Widerstandsfähigkeit der Epidermis verantwortlich. Membrane Coating Granules sind mit Lipiden gefüllte lamelläre Körperchen. Die Keratohyalin granula tritt hingegen im Stratum granulosum auf und dient als Speicher für das Protein (Pro-)filaggrin (**Filament Aggregating Protein**), das eine Aggregation und Polymerisation von Keratinfilamenten bewirkt und auch den intermediären Filamenten des Zytoskeletts zugeordnet werden kann [3, 4].



SC = Stratum corneum

Cl2 = Claudin2

ZK10 = Zytokeratin10

SG = Stratum granulosum

Ocl = Occludin

Lor = Loricrin

Cl1 = Claudin1

Flg = Filaggrin

TG1 = Transglutaminase1

Abbildung 1: Aufbau der Epidermis; linksseitig sind die Bezeichnungen der einzelnen Strukturen aufgeführt und rechtsseitig die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Strukturproteine [1].

Bei der Differenzierung der Keratinozyten vom Stratum granulosum zum Stratum corneum verlieren sie zunehmend ihre Zellorganellen; ihr Zellkern degeneriert und sie transformieren in tote, kernlose Keratinozyten, sogenannte Korneozyten (Hornzellen) [1, 5]. Währenddessen kommt es zur Ausbildung des **Cornified Envelope (CE)**. Dies ist eine ca. 15nm dicke, schwer lösliche Struktur an der Innenseite der Zellmembran der Korneozyten, die zur Widerstandsfähigkeit der Korneozyten beiträgt. Sie ist aus zahlreichen miteinander verwandten Proteinen, den Cornified Envelope-Proteinen, aufgebaut, die durch wiederholtes Kopieren von Genen im Laufe der Evolution entstanden sind [1, 5]. Zu den Cornified Envelope-Proteinen gehören u.a. Filaggrin, Involucrin, Loricrin und die „small proline rich proteins“ (SPRs), die durch das Enzym Transglutaminase1 untereinander sowie mit den Keratinmassen der Korneozyten verbunden werden [6]. Die Ausschleusung von Membrane Coating Granules führt daneben zu einer fettreichen, verhafteten Interzellulärschicht aus Ceramiden, Fettsäuren und Cholesterol [1].

3.1.2 Tight Junction-Proteine

Tight Junction-Proteine sind dichte Verbindungen der Zellmembranen in der Epidermis, auch „Kissing points“ genannt, die sich im apikolateralen Bereich benachbarter Keratinozyten befinden [7]. Hashimoto et al. beschrieben erstmalig 1971 das Vorhandensein von Tight Junction-Proteinen in der Epidermis [8]. Zu ihren wichtigsten Funktionen zählt die Abdichtung der Interzellulärräume als selektive, parazelluläre Barriere für Wasser, Ionen und Makromoleküle [9]. Bei den Tight Junction-Proteinen unterscheidet man zwischen Transmembran- und Plaqueproteinen. Die Familie der Claudine (Claudin1, Claudin2 usw.), Occludin und die junctionalen Adhäsionsmoleküle (JAM) zählen zu den Transmembranproteinen. Zonula occludens Proteine (ZO-1, ZO-2 usw.) sowie Cingulin gehören zu den Plaqueproteinen, die mit den Transmembranproteinen assoziiert sind und eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellen [10].

Tight Junction-Proteine spielen eine wichtige Rolle für die „inside-outside Barriere“, die u.a. vor übermäßigem Wasserverlust nach außen schützt. Furuse et al. fanden beispielsweise heraus, dass die Diffusion kleiner Moleküle wie ein subkutan injizierter 557 Da Tracer an Occludin-positiven Stellen im Stratum granulosum von Maushaut

gestoppt wurde, wohingegen der Tracer bei Claudin1-defizienten Mäusen die Epidermis ungehindert passieren konnte [11]. Daneben sind Tight Junction-Proteine für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität bedeutend. Hierunter versteht man eine bestimmte Zusammensetzung und Organisation der Membranen von Keratinozyten nahe der Tight Junction-Proteine, wodurch eine unkontrollierte Diffusion von Membrankomponenten verhindert wird [12].

Die Familie der Claudine besteht aus mehr als 24 Mitgliedern, die jeweils aus vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Loops (Schleifen) aufgebaut sind [10, 13]. Diese Schleifen dienen der Ausbildung von Kanälen bzw. wässrigen Poren über die eine parazelluläre Diffusion von Ionen und Molekülen stattfindet [10]. Claudine sind die Hauptkomponenten der Tight Junction-Stränge. Ihr Name leitet sich vom lateinischen Wort „claudere“ für schließen ab [14].

Claudin1 zählt zu den wichtigsten Transmembranproteinen. In der humanen Epidermis wird es vom Stratum basale bis zum Stratum corneum exprimiert [12, 15]. Untersuchungen zeigen, dass Claudin1-defiziente Mäuse einen stark erhöhten transepidermalen Wasserverlust (TEWL, siehe auch Kapitel 5.3) sowie Hyperkeratosen (Verdickungen des Stratum corneums) entwickeln und innerhalb eines Tages nach der Geburt versterben [11]. De Benedetto et al. beobachteten daneben eine Proliferation von Keratinozyten nach einer Herabregulation der Claudin1-Expression [9]. Claudin2 wird im Stratum granulosum der Epidermis exprimiert [12]. Es wird vermutet, dass eine erhöhte Claudin2-Expression, wie bereits für aktinische Keratosen und das spinözelluläre Karzinom beschrieben werden konnte, zu einer Erhöhung der parazellulären Membranpermeabilität führt und somit zu einer gestörten epidermalen Hautbarriere [9, 16]. Untersuchungen zeigen, dass eine verminderte Expression von Claudin1 und eine erhöhte Expression von Claudin2 zu einer erhöhten Durchlässigkeit von Molekülen, d.h. zu einer verminderten Abdichtung der Interzellularräume führt [11, 16]. Dies resultiert in einer gestörten physikalischen Hautbarriere.

Occludin zählt neben Claudin1 zu den wichtigsten Transmembranproteinen. Es ist das erste entdeckte Membranprotein der Tight Junctions [17]. In der Epidermis wird es im Stratum granulosum und Stratum corneum exprimiert [12]. Es konnte gezeigt werden, dass Occludin wie Claudin1 und 2 an der parazellulären Permeabilitätsbarriere beteiligt ist. So zeigten Kirschner et al., dass ein „knockdown“ von Claudin1 oder Occludin bei

Keratinozyten zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität für Na^+ , Cl^- und Ca^{2+} -Ionen sowie für größere Moleküle führt [18].

Die Beobachtungen von Furuse bzw. Saitou et al. relativieren die Bedeutung von Occludin als wichtiges Protein für die Hautbarriere. Sie konnten darstellen, dass Tight Junction-Stränge auch ohne das Vorhandensein von Occludin ausgebildet werden können [17, 19]. Daneben zeigten sie, dass Occludin-defiziente Mäuse im Vergleich zu Claudin1-defizienten Mäusen lebensfähig sind und keine „schwerwiegenden Defekte“ in der Barrierefunktion zeigen [19].

3.1.3 Intermediäre Filamente des Zytoskeletts

Zytokeratin10 und Filaggrin gehören zu den intermediären Filamenten des Zytoskeletts bzw. zu den Differenzierungsmarkern der Epidermis. Filaggrin hingegen kann ebenfalls den Cornified Envelope-Proteinen zugeordnet werden.

Die Forschungen zu dem Protein (Pro-)Filaggrin begannen Ende der 70er bzw. Anfang der 80er Jahre, wo es erstmals als histidinreiches Protein in der Epidermis beschrieben wurde [20, 21]. Filaggrin hat in der Forschung in den letzten Jahren besondere Aufmerksamkeit erhalten, da herausgefunden wurde, dass es eine zentrale Rolle für die Hautbarriere spielt. Filaggrin wird von Keratinozyten des Stratum granulosums aus dem Vorläuferprotein Profilaggrin synthetisiert, das in der Keratohyalin granula gespeichert wird [22]. Profilaggrin hat ein Molekulargewicht von 400 Kilodalton (kDa) und besteht aus 10-12 sich wiederholenden Filaggrin-Sequenzen (Tandem Repeats), die von jeder Seite von 2 spezifischen N- und C-terminalen Domänen flankiert werden [23]. Während der terminalen Differenzierung der Keratinozyten wird Profilaggrin (bei einem Anstieg der Konzentration von Calcium-Ionen) aus der Keratohyalin granula freigesetzt, dephosphoryliert und von der Protease Matriptase in Filaggrinmonomere gespalten [3]. Diese Filaggrinmonomere (sogenannte **Filament-aggregating Proteine**) binden an Keratinfilamente und führen zu einer Aggregation dieser Filamente in Makrofibrillen, was zu der dicht gepackten Hornschicht aus Korneozyten, dem Stratum corneum, führt [3, 4].

Im oberen Stratum corneum wird Filaggrin von Proteasen wie Caspase-14 zu freien Aminosäuren (u.a. Pyrrolidoncarboxylsäure und Trans-Urokanensäure) abgebaut [3]. Pyrrolidoncarboxylsäuren dienen als Hauptkomponente des NMF („natural- moisturizing factor“), der vor allem für die Aufrechterhaltung des Feuchtigkeitshaushaltes der Haut

bzw. des Stratum corneums bedeutsam ist [24]. Trans-Urokanensäuren hingegen dienen zur Protektion vor UV-Strahlung [25].

Forschungen am Protein Filaggrin unterstreichen dessen bedeutende Rolle für die Hautbarriere. Untersuchungen zeigen, dass Mutationen im Filaggrin-Gen mit einer erhöhten Prädisposition für Ichthyosis vulgaris und atopischer Dermatitis einhergehen [26]. In Studien konnte bei 25-50% der Patienten mit atopischer Dermatitis eine Mutation im Filaggrin-Gen festgestellt werden [4, 27]. Bis heute konnten mehr als 40 Mutationen im Filaggrin-Gen nachgewiesen werden, wobei zu den häufigsten Nullmutationen („loss-of-function Mutationen“) im Filaggrin-Gen die R501X und 2282del4 Mutationen gehören [4, 27].

Eine Filaggrindefizienz führt sowohl bei Mäusen als auch bei Neurodermitis-Patienten zu trockener Haut, einer Erniedrigung der freien Aminosäuren bzw. des NMF („natural-moisturizing factor“) im Stratum corneum sowie einer Erhöhung des TEWLs [28-30]. Ebenfalls konnte eine Erhöhung des pH-Wertes im Stratum corneum beobachtet werden, wodurch die physiologische Hautflora beeinflusst wurde und eine vermehrte Besiedlung mit pathogenen Bakterien (v.a. *Staphylococcus aureus*) ermöglicht wurde [30, 31].

Zytokeratin10 gehört zu den Keratinfilamenten, die von Epithelzellen bzw. Keratinozyten synthetisiert werden. Sie durchspannen netzartig die Keratinozyten und dienen der mechanischen Stabilisierung und Integrität von Epithelzellen [27]. Es wird zwischen den sauren Typ-1-Zytokeratinen (Zytokeratin9-23) und den neutralen bis basischen Typ-2-Zytokeratinen (Zytokeratin1-8) unterschieden [27].

Zytokeratin10 wird in allen suprabasalen Schichten der Epidermis calciumabhängig während der Differenzierung von Keratinozyten exprimiert [32]. Es kann daher wie Filaggrin auch als Marker der Differenzierung betrachtet werden. Die Bedeutung von Zytokeratin10 für die epidermale Barrierefunktion konnte mit murinen Experimenten bestätigt werden, bei denen Mäuse aufgrund von Mutationen fehlerhafte Keratin-Intermediärfilamente exprimierten. Hier zeigten Mäuse mit heterozygoten Mutationen im Keratin10-Gen im Alter verstärkt Hyperkeratosen [33, 34]. Mäuse mit homozygoten Mutationen zeigten deutlich schwerere Befunde wie z.B. sehr fragile Haut mit suprabasaler Blasenbildung sowie Erosionen [33, 34]. Sie verstarben kurze Zeit nach der Geburt [33, 34].

3.1.4 Proteine des Cornified Envelope

Proteine des Cornified Envelope wie Transglutaminase1 und Loricrin sind bedeutend für Desquamationsprozesse (Abstoßung der obersten Hautschichten bzw. Abschuppung) sowie für die Struktur und Integrität der Korneozyten in der Epidermis [27]. Gendefekte von Cornified Envelope-Proteinen führen zwar zu Hautveränderungen, in der Regel jedoch nicht zum Tod.

Loricrin wurde Anfang der 90er Jahre erstmals von Mehrel et al. im Stratum granulosum der Epidermis beschrieben [35]. Der Begriff Loricrin (*lat. lorica*) bedeutet soviel wie Panzer bzw. Rüstung. Loricrin ist ein glycin-, cystein- und serinreiches Protein [35, 36]. Während der Korneozytendifferenzierung werden Loricrinmoleküle mit Hilfe von Transglutaminasen mit sich selbst und „small proline rich proteins“ (SPR) über Disulfidbrücken quervernetzt [36]. SPRs sind leicht lösliche Proteine, die eine bessere Vernetzung von Loricrin und weiteren Cornified Envelope-Proteinen ermöglichen [37]. Mit einem Anteil von fast 80% stellt Loricrin den Hauptbestandteil des Cornified Envelope dar [37]. Daher trägt es entscheidend zu einem intakten Stratum corneum bzw. einer intakten Hautbarriere bei.

Koch et al. zeigten, dass Mäuse, bei denen das Loricrin-Gen ausgeschaltet wurde, bei der Geburt eine vorübergehende Erythrodermie (Rötung der Haut) sowie eine glänzende, transparente Haut aufwiesen [38]. Sie waren ebenfalls besonders empfindlich gegenüber mechanischen Reizen, wobei der transepidermale Wasserverlust nicht erhöht war [38]. Interessanterweise verschwanden die Hautveränderungen ca. 4 bis 5 Tage nach der Geburt, was von Koch et al. mit einer kompensierenden Erhöhung von anderen Cornified Envelope-Proteinen wie u.a. den SPR-Proteinen erklärt wurde [38].

In der Epidermis treten die Transglutaminasen1, 2, 3 und 5 auf [39]. Transglutaminase1 ist ein calciumabhängiges, membrangebundenes Enzym der Epidermis, das durch Cathepsin D in seine aktive Form umgewandelt wird [40]. Es ist maßgeblich an der Bildung des Cornified Envelope und des Cornified Lipid Envelope (Anlagerung von Lipiden an den Cornified Envelope) beteiligt, indem es Cornified Envelope-Proteine wie z.B. Loricrin quervernetzt und Lipide wie Hydroxyceramide kovalent an den Cornified Envelope bindet [39]. Somit spielt Transglutaminase1 eine wichtige Rolle für die Ausbildung einer intakten epidermalen Barriere. Bei Transglutaminase1-defizienten Mäusen konnte beispielsweise ein defektes Stratum corneum sowie ein erhöhter

transepidermaler Wasserverlust nachgewiesen werden [40]. Mutationen im Transglutaminase1-Gen, die einen Ausfall des Enzyms bedingen, treten beispielsweise bei Ichthyosen („Fischschuppenkrankheiten“) auf. Neugeborene sind hier von einer Membran wie aus Kollodium („Leim“) überzogen und werden daher Kollodium-Babys genannt [39]. Sie leiden ihr Leben lang an extrem trockener Haut, die permanent schuppt und einen stark erhöhten transepidermalen Wasserverlust aufweist [39].

3.1.5 Mechanismen der Hautbarriere

Zu den Mechanismen der Hautbarriere zählen eine *physikalische*, eine (*bio-chemische bzw. antimikrobielle*) und eine *immunologische* Barriere.

Die *physikalische Barriere* repräsentiert hauptsächlich das Stratum corneum, welches ausgehend von der Basalzellschicht der Epidermis während der epidermalen Differenzierung gebildet wird. Es dient als Permeabilitätsbarriere, indem es einerseits vor übermäßigem Wasserverlust nach außen („inside-outside Barriere“), andererseits vor dem Eindringen schädlicher Substanzen (Allergenen, Mikroorganismen, Irritantien) aus der Umwelt in die Haut („outside-inside Barriere“) schützt [41]. Es besteht aus mehreren Schichten proteinreicher, abgestorbener Zellen (Korneozyten) und einer lipidreichen Interzellulärsubstanz. Die lipidreiche Interzellulärsubstanz umgibt die Korneozyten vergleichbar mit Mörtel, der Ziegelsteine einer Mauer umschließt. So beschrieb Elias 1975 den Aufbau des Stratum corneums anschaulich mit dem „Ziegelstein-Mörtel-Modell“ [42]. Elektronenmikroskopische Verfahren zeigten in den darauffolgenden Jahren, dass an der Barrierefunktion der Haut noch weitere Strukturen im Stratum corneum und in den darunterliegenden Schichten der Epidermis beteiligt sind wie beispielsweise Tight Junction-Proteine, intermediäre Filamente des Zytoskeletts und Proteine des Cornified Envelope [27]. Baroni et al. fassten diese Barrierestrukturen unter dem Begriff „zweite Grenzbarriere“ („second line barrier“) zusammen, wohingegen sie das Stratum corneum als „erste Grenzbarriere“ („first line barrier“) bezeichneten [43]. Interessanterweise konnte zwischen der Dicke des Stratum corneums und der Barrierefunktion bisher kein Zusammenhang festgestellt werden [1].

Es ist erstaunlich, dass es trotz einer dichten Besiedlung der Haut mit Mikroorganismen (bis 10^7 Mikroorganismen/cm²) nur selten zu Infektionen kommt. Dies ist auf die

effektive (*bio-)*chemische bzw. antimikrobielle Barriere der Haut zurückzuführen, die durch das saure Milieu des Stratum corneums (pH-Wert von 4,5 bis 5,0) und die antimikrobiellen Peptide (AMP's), sogenannte „körpereigene Antibiotika“, gebildet wird [43]. Zu den antimikrobiellen Peptiden zählen Defensine, Cathelizidine und RNAsen [43]. Diese führen durch Anlagerung an die Erreger zu deren Lyse. Eine erniedrigte Konzentration von AMP's führt zu einer gestörten Hautbarriere. Der saure pH-Wert des Stratum corneums wird u.a. durch die Proteolyse von Filaggrin zu sauren Aminosäuren, den von der Phospholipase der Lamellar Bodies sezernierten freien Fettsäuren und dem Protonen-/Natriumaustausch durch Membranpumpen aufrechterhalten [1].

Zur *immunologischen Barriere* der Haut gehören adaptive Immunantworten, die durch Immunzellen wie Lymphozyten, dendritische Zellen (Langerhans-Zellen) sowie Makrophagen und sekundär durch Antikörper vermittelt werden. Bei Störungen der Hautbarriere werden Zytokine (u.a. Interleukine) ausgeschüttet, die zu einer Aktivierung der Langerhans-Zellen führen [7]. Gleichzeitig können pathogene Antigene bei defektem Stratum corneum bis in die unteren Schichten des Stratum corneums vordringen. Dort werden sie von den Ausläufern der aktivierten Langerhans-Zellen (Dendriten) aufgenommen. Die Langerhans-Zellen wandern daraufhin in die Lymphknoten und präsentieren antigenspezifischen T-Lymphozyten das Antigen [1]. Dadurch kommt es zur Aktivierung des zellulären Immunsystems, das mit einer klonalen Vermehrung spezifischer T-Zellen und der Bildung bzw. Aktivierung von Memory-Helfer-T-Lymphozyten (Gedächtniszellen) einhergeht [7].

3.1.6 Störung der Hautbarriere beim Handekzem

Die Pathogenese des Handekzems ist multifaktoriell und konnte bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden. Sie beinhaltet neben genetischen Risikofaktoren wie beispielsweise atopischer Diathese exogene Risikofaktoren wie irritative Schädigung und Allergene [44].

Es ist lange bekannt, dass die atopische Dermatitis mit einer Störung der Hautbarriere einhergeht [7]. Dass die Hautbarriere auch eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Handekzems spielt, ist eher Gegenstand jüngster Forschung, sodass diesbezüglich kaum Ergebnisse vorliegen.

Man geht davon aus, dass eine Störung der Hautbarriere auf Veränderungen von Strukturproteinen wie Tight Junction-Proteinen, Filaggrin und Proteinen des Cornified Envelope zurückzuführen ist [45, 46]. Es wird vermutet, dass die verminderte Expression von Strukturproteinen die Penetration von Allergenen erleichtert [9, 45]. Bei physikalischen Barrierestörungen und Entzündungen tritt eine erhöhte Anzahl von Langerhans-Zellen auf. Sie können mit Hilfe ihrer Dendriten die Tight Junction-Barriere im Stratum granulosum penetrieren und Antigene sogar im Bereich des Stratum corneums abfangen [7]. Es wird vermutet, dass dieser Prozess bei einer verminderten Expression von Strukturproteinen wie beispielsweise Claudin1 forciert wird und zur Unterhaltung der Inflammation bei entzündlichen Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis und dem Handekzem beiträgt [9]. Es konnte bereits mit Hilfe von Mausversuchen dargestellt werden, dass bei Filaggrin- oder Claudin1-defizienten Mäusen eine erhöhte Penetration von Allergenen ins Stratum corneum auftritt, was bei diesen Mäusen zu einer erhöhten Anzahl von Kontaktsensibilisierungen (v.a. Nickelallergien) und allergenspezifischen humoralen Immunantworten (IgG und IgE) führte [7, 47]. Umgekehrt führen die beim Handekzem vermehrt produzierten Zytokine wahrscheinlich sekundär zu einer Modulation von Strukturproteinen in der Haut [48]. Epidermale Barrierestörungen und immunologische Reaktionen scheinen sich beim Handekzem gegenseitig zu beeinflussen. Veränderungen der Lipidzusammensetzung sind ebenfalls für eine intakte Hautbarriere beim Handekzem wichtig und sollten der Vollständigkeit halber erwähnt werden. Da sie nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, wird auf weitere Ausführungen verzichtet.

3.1.7 Thymic stromal lymphopoietin und Interleukin-36 γ als Entzündungsmarker beim Handekzem

Eine durch T-Zellen und Zytokine vermittelte Entzündungsreaktion nach Kontakt zu Irritantien und Allergenen spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese des chronischen Handekzems. Untersuchungen zeigen, dass bei akuten Ekzemen vor allem T-Helferzellen-2-Zytokine (TH2-Zytokine) wie Interleukin-4 (IL-4) vorliegen, wohingegen bei chronischen Ekzemen eher T-Helferzellen-1-Zytokine (TH1-Zytokine) wie Interferon- γ auftreten [31, 49]. Beim chronischen Handekzem dominieren vor allem die TH1-Zytokine wie Interferon- γ [50, 51]. In läsionaler Haut von Patienten mit chronischem

Handekzem konnten jedoch auch vermehrt TH2-Zytokine wie IL-4 nachgewiesen werden [50, 51].

Das Thymic stromal lymphopoietin (TSLP), das den Zytokinen zugeordnet wird, fördert beispielsweise eine vermehrte TH2-Antwort [52]. Es wird hauptsächlich von Keratinozyten und Epithelzellen exprimiert; Mastzellen und dendritische Zellen sowie Muskelzellen oder Fibroblasten können ebenfalls TSLP exprimieren [52]. Für das chronische Handekzem liegen bisher keine Untersuchungen bezüglich der TSLP-Expression vor. Es ist jedoch bekannt, dass TSLP in läsionaler Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis hoch exprimiert wird und dass Verletzungen der Haut zu einer erhöhten TSLP-Expression führen [52]. Strukturproteine der Epidermis wie Filaggrin haben ebenfalls Einfluss auf die Expression von TSLP. Lee et al. zeigten, dass humane epidermale mit Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) stimulierte Keratinozyten der HaCaT-Zelllinie (Zellen, die hochproliferatives Gewebe repräsentieren) nach Herabregulation der Filaggrin-Expression zu einer erhöhten Freisetzung von TSLP führten [53].

Die beim chronischen Handekzem dominierende TH1-Immunantwort wird u.a. durch Interleukin-36 γ gefördert [50, 54]. Interleukin-36 γ ist ein Mitglied der Interleukin-1-Familie und gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen [54]. Untersuchungen zeigen, dass Interleukin-36 γ in läsionaler Haut bei inflammatorischen Erkrankungen wie der Psoriasis erhöht ist [55, 56]. Daneben konnte eine erhöhte Expression von Interleukin-36 γ in Hautproben von Patienten mit allergischer Kontaktdermatitis festgestellt werden [57].

3.2 Das Handekzem

3.2.1 Epidemiologie und Klassifikation

Das Handekzem zählt zu den häufigsten Hauterkrankungen. Die Ein-Jahres-Prävalenz in der Bevölkerung liegt bei nahezu 10%, die Lebenszeitprävalenz sogar bei bis zu 15%, wobei Frauen in der Regel doppelt so häufig betroffen sind wie Männer [58, 59]. Chronisch schwere Handekzeme treten bei 5 bis 7% auf; der Anteil an Handekzemen, die refraktär gegenüber lokalen Therapien sind, liegt bei 2 bis 4% [58, 59]. Nicht selten führt das Handekzem zu erheblichen psychosozialen Problemen und zu Einschränkungen der Lebensqualität. Vor allem das chronische Handekzem kann zu lang dauernden Arbeitsunfähigkeiten bis hin zum Arbeitsplatzverlust sowie

Berufsumschulungen führen [58, 59]. Aus genau diesen Gründen hat das Handekzem eine hohe sozialmedizinische und gesundheitsökonomische Bedeutung.

Das Handekzem ist durch polymorphe entzündliche, nicht infektiöse Hautveränderungen an den Händen charakterisiert. Diese Veränderungen beinhalten ein Nach- und Nebeneinander von Rötung, Bläschen, Nässen, Papeln, Schuppung, Exsikkation (Austrocknung der Haut), Juckreiz und Schmerzen [44]. Ein chronisches Handekzem liegt bei einer Erkrankungsdauer von mehr als 3 Monaten (trotz adäquater Therapie) bzw. bei zwei Rezidiven innerhalb eines Jahres vor [59]. Die Ätiologie des Handekzems ist vielfältig. Sie beinhaltet endogene Faktoren wie atopische Diathese und genetisch bedingte Barrierestörungen sowie exogene Faktoren wie Irritantien und Kontaktallergene [59]. Aufgrund einer multifaktoriellen Ätiologie und dem häufigen Auftreten von Mischformen ist eine eindeutige Klassifikation schwierig. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die häufigsten Handekzemtypen und deren Klinik. Besonders hervorzuheben ist hier das hyperkeratotisch-rhagadiforme Handekzem, deren Ätiologie bis heute nicht vollständig geklärt ist und dessen Behandlung aufgrund einer hohen Rezidivneigung und Therapieresistenz eine Herausforderung für den Dermatologen darstellt [59].

Tabelle 1: Klassifikation von Handekzemen nach Ätiologie und Morphologie; häufig multifaktorielle Ätiologie und Mischformen [44, 59]

Typ	Klinik	Bemerkungen
Ätiologische Klassifikation		
irritativ (subtoxisch- kumulatives) HE	Finger-, Handrücken und exponierte Handgelenke; im Verlauf auch Handinnenflächen betroffen, Hautveränderungen nur an Händen → keine Streuphänomene	↑Risiko für allergische Kontaktdermatitis, häufigster HE-Typ
allergisches HE	Expositionsstellen betroffen, unscharfe Begrenzung der Hautveränderungen sowie Streureaktionen in Umgebung (z.B. Unterarm)	Typ-4-Sensibilisierung
atopisches HE	Finger-, Handrücken betroffen; häufig Nagelbeteiligung u. Befall von Gelenkbeugen; Lichenifikationen	↑Risiko für allergische/irritative Kontaktdermatitis

Morphologische Klassifikation

hyperkeratotisch-rhagadiformes HE	Hyperkeratosen und Rhagaden an Handinnenflächen, geringer Juckreiz	hohe Rezidivneigung und Therapieresistenz
dyshidrotisches HE (Pompholyx)	isolierte Bläschenbildung (Pompholyx) palmar/plantar und an Finger-/Zehenzwischenräume; starker Juckreiz	häufig atopische Diathese

HE = Handekzem

3.2.2 Diagnostik und Therapie

Neben einer ausführlichen Anamnese, die sowohl die Frage nach spezifischen Expositionen (in Beruf und Freizeit) als auch die allergologische Eigen- und Familienanamnese beinhalten sollte, ist eine klinische Befunderhebung der Hände und Füße bzw. des gesamten Integuments durchzuführen [59]. Je nach Indikation sollten eine Pricktestung, (spezifische) IgE-Bestimmung(en) oder bei Verdacht auf Typ-4-Sensibilisierungen ein Epikutantest durchgeführt werden [59]. Differentialdiagnostisch ist das Handekzem u.a. von einer Psoriasis pustulosa palmoplantaris (Schuppenflechte), Tinea manuum (Pilzinfektion der Hände) und einem Lichen ruber (Knötchenflechte) abzugrenzen [59]. Bei unklaren Handdermatosen kann eine histologische Diagnostik hilfreich sein.

Die Therapie des Handekzems orientiert sich am Schweregrad und der Chronizität des Handekzems. Sie erfolgt in der Regel stufenförmig nach den aktuellen Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft zum Management von Handekzemen, wobei stets die stadiengerechte Ekzemtherapie und die Ätiologie berücksichtigt werden sollten [59].

Basis der Handekzemtherapie ist die Anwendung von Hautschutzmaßnahmen und rückfettenden Externa sowie die Vermeidung von Triggerfaktoren [59]. Leichte Handekzeme (Stufe 1) werden mit antipruriginösen und antiseptischen Wirkstoffen sowie mit topischen Glukokortikoiden und Calcineurininhibitoren behandelt. Bei Hyperhidrosis der Hände und Füße wird eine Iontophorese (eine Behandlung spezifischer Hautareale mit Gleichstrom) empfohlen. Mittelschwere bis schwere

Handekzeme (Stufe 2) werden zusätzlich mit hochpotenten Kortikosteroiden behandelt sowie mit einer UV-Therapie. Persistierende oder chronisch rezidivierende Handekzeme (Stufe 3) können mit einer systemischen immunmodulierenden Therapie wie z.B. systemischen Kortikosteroiden, Ciclosporin, Methotrexat oder Azathioprin behandelt werden [59]. Klinische Nachweise für die Wirksamkeit und Sicherheit dieser Therapien bei einer langfristigen Anwendung fehlen jedoch noch.

Ab Stufe 2 kann bei Handekzemen, die refraktär auf potente Kortikosteroide und/oder UV-Therapie sind, Alitretinoin angewendet werden. Dessen Wirksamkeit und Verträglichkeit konnte bereits in Studien wie u.a. der BACH-Studie (Benefit of Alitretinoin in Chronic Hand Eczema) gezeigt werden [60]. Kortikosteroide sind u.a. aufgrund ihrer antientzündlichen Wirkung bei der Therapie des Handekzems Mittel der ersten Wahl [61]. Jedoch können bei Anwendung von Kortikosteroiden über einen längeren Zeitraum Nebenwirkungen wie Hautatrophie und Schädigungen der epidermalen Barriere auftreten, die meist mehrere Wochen bis Monate anhalten [59].

3.3 Alitretinoin

3.3.1 Klinische Eigenschaften:

Indikation, Anwendungshinweise und Nebenwirkungen

Alitretinoin (Toctino®) ist in Deutschland seit Ende 2008 zur systemischen Therapie des schweren, chronischen Handekzems zugelassen, das nicht auf die Behandlung mit lokalen Kortikosteroiden anspricht [62]. Es ist bisher das einzige Medikament, das spezifisch zur Therapie des schweren Handekzems zugelassen ist.

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Alitretinoin bei der Therapie des chronischen Handekzems eine hohe Wirksamkeit bei gleichzeitig guter Verträglichkeit besitzt. Die zulassungsrelevante Phase-3-Studie (BACH-Studie) mit 1032 Patienten zeigte eine Reduktion der Handekzem Symptome im Mittel um 75% bei einer täglichen Dosis von 30mg Alitretinoin für 24 Wochen [60]. Bei 48% der Patienten heilte das Handekzem fast vollständig bzw. vollständig ab [60]. Viele Studien zeigen, dass Patienten mit hyperkeratotischen Handekzemen im Vergleich zu anderen Handekzemformen besser auf Alitretinoin ansprechen [60, 63]. Patienten mit kürzerer Krankheitsdauer sprechen ebenfalls besser auf Alitretinoin an als Patienten mit einer sehr langen Krankheitsgeschichte [60, 63, 64].

Alitretinoin wird in einer Dosierung von 10 bis 30mg einmal täglich zu einer fetthaltigen Mahlzeit eingenommen. Die empfohlene Anfangsdosierung beträgt 30mg täglich, wobei die Dosierung bei Nebenwirkungen auf 10mg reduziert werden kann. Die Einnahme von Alitretinoin während der Schwangerschaft ist absolut kontraindiziert, da Alitretinoin teratogen ist. Frauen im gebärfähigen Alter müssen daher mindestens einen Monat vor bis einen Monat nach Alitretinointherapie eine, vorzugsweise zwei Formen der Kontrazeption, anwenden. Weitere Kontraindikationen für Alitretinoin sind u.a. Allergien gegen Erdnüsse oder Soja, Hypothyreoidismus sowie schwere Leber- oder Niereninsuffizienz [62].

Alitretinoin wird über das Cytochrom P450 3A4 (CYP 3A4) verstoffwechselt. Die gleichzeitige Einnahme von CYP 3A4 Inhibitoren wie beispielsweise Ketoconazol oder von CYP 3A4 Induktoren wie Rifampicin sollte vermieden werden, da dies zu Veränderungen des Plasmaspiegels von Alitretinoin führen kann [62].

Die häufigsten Nebenwirkungen von Alitretinoin sind Kopfschmerzen, besonders zu Beginn der Therapie (bei 30mg: 21% der Patienten; bei 10mg: 11% der Patienten), eine Erhöhung der Triglyceride (bei 30mg: 35% der Patienten; bei 10mg: 17% der Patienten) und eine Erhöhung des Cholesterins im Blut (bei 30mg: 28% der Patienten; bei 10mg: 17% der Patienten) [62]. Im Vergleich zu anderen Retinoiden hat Alitretinoin nur einen sehr geringen Einfluss auf die Sebumsekretion, sodass mukokutane Nebenwirkungen wie trockene Lippen, Cheilitis und trockene Haut eher selten beobachtet werden [64, 65].

3.3.2 Pharmakologische Eigenschaften:

Wirkmechanismus, Metabolismus und Elimination

Alitretinoin (9-cis-Retinsäure) ist ein Vitamin A-Derivat (Retinoid), das in kleinen Mengen physiologisch in unserem Körper auftritt. Es bindet an die drei Untereinheiten (α, β, γ) der nukleären Rezeptoren des Retinsäurerezeptors (RAR) und des Retinoid-X-Rezeptors (RXR) [62, 66]. Dabei fungieren die aktivierten Rezeptoren durch Bildung eines Hetero- oder Homodimers (RXR - RAR oder RXR - RXR) als Transkriptionsfaktoren [67]. Diese Hetero- bzw. Homodimere binden an bestimmte DNA-Sequenzen von Promotoren von Retinsäure-empfindlichen Genen, sogenannten „retinoic acid response elements“ (RAREs) oder „retinoic X response elements“ (RXRs) und

beeinflussen so die Expression von Genen [66, 67].

Retinoide beeinflussen im Allgemeinen die Zellvermehrung, Zelldifferenzierung, Keratinisierung und die Sebumsekretion [62]. Immunmodulatorische Effekte auf die Differenzierung von T-Zellen und die Zytokinproduktion konnten bei Retinoiden ebenfalls beobachtet werden. Vor allem über den RAR-Rezeptor wird die TH1-Differenzierung unterdrückt und die TH2-Differenzierung verbessert [68].

Alitretinoin besitzt immunmodulatorische und antiinflammatorische Wirkungen [50]. Inwiefern Alitretinoin mit Genen, die Einfluss auf die Hautbarriere besitzen, interagiert, ist bisher nicht bekannt. Der genaue Wirkmechanismus von Alitretinoin konnte bis heute nicht erforscht werden.

Die Aufnahme von Alitretinoin ist unabhängig vom Gewicht und Alter und es konnte bisher kein Zusammenhang zwischen der klinischen Wirksamkeit von Alitretinoin und dem Körpergewicht gefunden werden [50].

Alitretinoin wird in der Leber mittels CYP 3A4-Isoenzymen in seinen Hauptmetaboliten: 4-Oxo-Alitretinoin umgewandelt, der positiv mit der aufgenommenen Dosis korreliert. Die Halbwertszeit von Alitretinoin beträgt 2 bis 10 Stunden. Die Ausscheidung erfolgt größtenteils über den Urin (ca. 63%) und teilweise über die Fäzes (ca. 30%) [50, 51, 62]. Eine Akkumulation von Alitretinoin im Körper konnte bisher nicht festgestellt werden [50].

3.4 Zielsetzung

Studien (wie u.a. die BACH- und die TOCCATA-Studie) zeigen, dass Alitretinoin ein effektives und sicheres systemisches Medikament zur Therapie des Handekzems darstellt [60, 63]. Vorangehende Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigen, dass Alitretinoin sich positiv auf Entzündungs- bzw. proinflammatorische Immunprozesse beim chronischen Handekzem auswirkt [69]. Jungersted et al. haben bereits den Einfluss von Alitretinoin auf Ceramide und den TEWL von nicht läsionaler Haut von Patienten mit chronischem Handekzem untersucht [70]. Untersuchungen zum Einfluss einer systemischen Alitretinointherapie auf die Hautbarriere beim chronischen Handekzem, die eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese und der Therapie darstellt, liegen bisher nicht vor und waren Ziel dieser Arbeit.

Um den Einfluss von Alitretinoin auf die Hautbarriere zu untersuchen wurde 15 Patienten mit schwerem, chronischen Handekzem jeweils direkt vor und nach einer mindestens zweimonatigen Alitretinointherapie eine Biopsie im Bereich von läsionaler Haut der Handinnenfläche bzw. der Fußsohle entnommen. In der Hautbiopsie wurde die Gen- und Proteinexpression von Strukturproteinen, Proliferations- und Entzündungsmarkern mittels PCR und Immunhistochemie bestimmt. Es wurde die Expression essentieller Strukturen der Hautbarriere in allen Schichten der Epidermis untersucht: Tight Junction-Proteine, intermediäre Filamente des Zytoskeletts und Proteine des Cornified Envelope. Zusätzlich wurde die Expression von Ki67 (Proliferationsmarker), CD3⁺-T-Zellen, TSLP und Interleukin-36 γ (Entzündungsmarker) bestimmt. Daneben wurden klinisch der transepidermale Wasserverlust (TEWL) sowie der Manuscore in modifizierter Form vor und nach der Therapie bestimmt.

4 Material

4.1 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Arbeitskonzentration* (in mg/l)	Hersteller	Katalognummer
Anti-human CD3	Kaninchen	polyklonal	gebrauchsfertig (Verdünnungsfaktor 20)	Dako, Hamburg (Deutschland)	#N1580
Anti-human Claudin1	Kaninchen	polyklonal	1	Sigma-Aldrich, Hamburg (Deutschland)	# HPA029842
Anti-human Filaggrin	Maus	monoklonal (SPM181)	2	Abcam, Cambridge (UK)	#ab17808
Anti-human Ki67(MIB 1)	Maus	monoklonal (MIB 1)	0,0175	Dianova, Hamburg (Deutschland)	#dia 505
Anti-human Loricrin	Kaninchen	polyklonal	0,5	Abcam, Cambridge (UK)	#ab85679
Anti-human Transglutaminase1	Maus	polyklonal	10	Abcam, Cambridge (UK)	#ab167657
Anti-human TSLP	Ziege	polyklonal (L-18)	2	Santa Cruz Biotechnology, Dallas/Texas (USA)	sc-19177
Anti-human Zytokeratin10	Maus	monoklonal (DE-K10)	0,56	Dako, Hamburg (Deutschland)	#M7002

* Arbeitskonzentration = Stockkonzentration : Verdünnungsfaktor

Biotinylierte Sekundärantikörper gegen die entsprechenden Spezies wurden von der Firma Dianova aus Hamburg (Deutschland) bezogen.

4.2 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Spezifikation	Hersteller
β-Mercaptoethanol	14,3M, ≥ 98%	Sigma-Aldrich, Hamburg (Deutschland)
DNase		Machery-Nagel, Düren (Deutschland)
dNTP-Mix-10	10mM	Rapidozym GmbH, Berlin (Deutschland)
Ethanol, CH ₃ CH ₂ OH	Reinst	Merck, Darmstadt (Deutschland)
Ethidiumbromid-Lösung	10mg/ml	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Gel Loading Dye, Blue (6x)		New England BioLabs, Frankfurt am Main (Deutschland)
GenTherm DNA Polymerase	5u/μl	Rapidozym GmbH, Berlin (Deutschland)
LE Agarose		Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf (Deutschland)
Low Molecular Weight DNA Ladder		New England BioLabs, Frankfurt am Main (Deutschland)
NucleoSpin [®] RNA II-Kit		Machery-Nagel, Düren (Deutschland)
Proteinase K	20mg/ml	Qiagen, Hilden (Deutschland)
TaqMan [®] Reverse Transcription Reagenzien		Applied Biosystems, Darmstadt (Deutschland)

4.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	Hersteller
1x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer, pH 8.0	40 mM Tris-Acetat, 1mM EDTA	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)

4.4 Labormaterialien und -geräte

Tabelle 5: Verwendete Labormaterialien und -geräte

Labormaterialien/-geräte	Spezifikation	Hersteller
Analysewaage	Sartorius portable, PT120	Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)
Aqua (ad injectabilia)	10ml	Braun, Melsungen (Deutschland)
CryoPure Gefäß	1,6ml	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Digitales Thermo-Hygrometer		TFA Dostmann GmbH & Co., Wertheim (Deutschland)
Gefrierschrank (-20°C), Kühlschranks (4°C)	TKF380	EUREKA, Bonn (Deutschland)
Gefrierschrank (-80°C)	Hera Freeze	Heraeus Holding, Hanau (Deutschland)
Gel Dokumentationssystem	Gene Genius, Bio Imaging System	Syngene, Cambridge (UK)
Gelkammer	Sub-Cell® GT	Bio-Rad Laboratories, Hercules/Kalifornien (USA)
Homogenisator	Precellys 24	Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux, (Frankreich)
Inkubator	Heracell®	Heraeus Holding, Hanau (Deutschland)
Lichtmikroskop	Axioplan	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Deutschland)
Pipetten	10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Brandt, Sarstedt, BD Falcon, Wesseling-Berzdorf (Deutschland)
Pippettenspitzen	0,2ml, 1ml	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Pippettenspitzen epT.I.P.S	0,5- 20µl	Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Px2 Thermal Cycler		Thermo Electron Corporation, Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts (USA)
Reaktionsgefäße	5ml, 50ml	Falcon/BD, Heidelberg (Deutschland)
Rotor Gene Q		Qiagen, Hilden (Deutschland)
Strip Tubes/Caps	0,1ml	Qiagen, Hilden (Deutschland)
Spektrophotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts (USA)
Tewameter® TM 300		Courage and Khazaka electronic

Tischzentrifuge	Zentrifuge 5417 R	GmbH, Köln (Deutschland) Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
Vortex Mixer	Reax 2000	Heidolph, Schwabach (Deutschland)
Zentrifuge	Varifuge RF	Heraeus Holding, Hanau (Deutschland)

4.5 Software

Tabelle 6: Verwendete Software

Software	Version	Entwickler
Axio Vision	4.6.3	Carl Zeiss AG, Oberkochen (Deutschland)
Endnote [®] Basic	X7.0	Thomson Reuters Corporation, New York City/ New York (USA)
Microsoft Excel	2003, 2007	Microsoft Corporation, Redmond/Washington (USA)
Microsoft Word	2007	Microsoft Corporation, Redmond/Washington (USA)
Prism	5.0	GraphPad, La Jolla/ Kalifornien (USA)
Rotor Gene Q Software	2.2.3.11	Qiagen, Hilden (Deutschland)

5 Methodik

5.1 Patienten

Die Durchführung der klinisch-wissenschaftlichen Untersuchung begann nach Vorliegen des positiven Votums der Ethikkommission (Antragsnummer: EA 1/207 08). Die Patienten wurden im Rahmen der wöchentlich stattfindenden Handekzemsprechstunde der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, rekrutiert.

Die Probanden wurden ausführlich über die Untersuchung aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Ein Rücktritt war jederzeit ohne Angabe von Gründen möglich. Einschlusskriterium war das Vorliegen eines chronischen Handekzems bei einer mindestens 6-monatigen Erkrankungsdauer und gleichzeitigem Nichtansprechen bzw. geringem Ansprechen auf topische Kortikosteroide.

Frauen im gebärfähigen Alter mussten mindestens eine Form, vorzugsweise zwei Formen der Kontrazeption, ab einem Monat vor bis einen Monat nach der Alitretinointherapie durchführen. Daneben musste einen Monat vor bzw. nach Ende der Therapie sowie einmal monatlich während der Therapie ein negativer Schwangerschaftstest vorliegen.

Die Ausschluss- bzw. Abbruchkriterien sind in der nachfolgenden Tabelle 7 aufgeführt:

Tabelle 7: Übersicht über die Ausschluss- bzw. Abbruchkriterien

Ausschluss- bzw. Abbruchkriterien

- Behandlung mit Phototherapie, oralen Kortikosteroiden/Immunsuppressiva während bzw. innerhalb der letzten 2 Monate vor Therapiebeginn
 - Innerhalb der letzten 2 Wochen vor Therapiebeginn Behandlung mit Alitretinoin interagierenden Medikamenten (u.a. Ketoconazole, Erythromycin, Clarithromycin, Simvastatin, Johanniskraut)
 - Gleichzeitige Tetrazyklinbehandlung
 - Überempfindlichkeit gegenüber Alitretinoin, anderen Retinoiden oder Hilfsstoffen (insbesondere Allergien gegen Soja/Erdnüsse, angeborene Fruktoseintoleranz)
 - Leberinsuffizienz (ALAT/ASAT > 250% des oberen Normwertes)
 - Schwere Niereninsuffizienz
 - Hypertriglyceridämie/-cholesterinämie (Triglyceride/LDL > 200% des oberen Normwertes)
-

-
- Hypervitaminose A
 - Hypothyreoidismus
 - Anämie (Hämoglobin < 13g/dl bei Männern, < 12g/dl bei Frauen)
 - Schwere psychiatrische Erkrankungen (u.a. schwere Depression)
 - Schwangerschaft, Stillzeit
-

Die Probanden wurden aufgefordert täglich per os eine Tablette zu einer fetthaltigen Mahlzeit in einer Dosierung von 30mg einzunehmen. Zur Reduktion der Nebenwirkungen wurde bei einigen Studienteilnehmern die Dosis auf 20/10mg pro Tag bzw. 10mg alle zwei Tage reduziert. Die Therapie wurde bei guter Verträglichkeit bis zur vollständigen bzw. fast vollständigen Abheilung des Hautbefundes, in der Regel 12 bis 24 Wochen, durchgeführt oder bei Nichtansprechen nach spätestens 12 Wochen abgebrochen.

Vor, während und nach der Alitretinointherapie wurden in regelmäßigen Abständen folgende Blutparameter bestimmt: Differentialblutbild, Leberwerte (ALAT, ASAT, γ -GT), Nierenretentionsparameter (Kreatinin), Fettwerte (Triglyceride, LDL, HDL, Gesamt-Cholesterin) sowie vor Beginn der Therapie zum Ausschluss von Schilddrüsenfunktionsstörungen das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) und zum Ausschluss von Herz- und Skelettmuskelerkrankungen die Kreatinkinase (CK). Bei pathologischen Veränderungen dieser Laborparameter wurde die Alitretinointherapie abgebrochen.

Den eingeschlossenen Probanden wurde jeweils direkt vor Beginn und nach Abschluss der Alitretinointherapie eine Hautstanze im Durchmesser von 4mm entnommen. Der Einsatz von topischen Kortikosteroiden sollte im Bereich der Hautprobe mindestens 7 Tage vor der Entnahme eingestellt worden sein. Bei 14 Patienten wurde die Hautbiopsie aus der Handinnenfläche und bei einem Patient aus der Fußsohle entnommen, da die Füße vom Ekzem deutlich stärker betroffen waren. Dabei wurde die Hautbiopsie vor der Therapie aus einem ekzematösem Hautbereich und nach der Therapie an einer möglichst nahen Lokalisation zur Erstbiopsie entnommen.

Die Hautprobe wurde sofort nach der Entnahme vertikal zur Epidermis mittig in zwei gleich große Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde für mindestens 6 bis maximal 24 Stunden in 4%-igem Formalin für die Immunhistochemie fixiert. Die andere Hälfte wurde in einem CryoPure-Gefäß (Sarstedt, Nümbrecht/Deutschland) schnellstmöglich für ca. 30

Minuten in flüssigem Stickstoff zur Genexpressionsanalyse schockgefroren und anschließend bei - 80°C gelagert.

5.2 Modifizierter Manuscore zur Erhebung des Schweregrades des Handekzems

Zur Beurteilung des klinischen Schweregrades wurde der von John entwickelte Manuscore in modifizierter Form herangezogen [71, 72]. Der modifizierte Manuscore wurde direkt vor Beginn und nach Ende der Alitretinointherapie (anhand von Fotoaufnahmen und Akteneinträgen) bestimmt.

Der (modifizierte) Manuscore setzt sich aus 3 Teilen zusammen (**Teil A, B und C**): **Teil A** berücksichtigt beim Manuscore die Ausbreitung des Handekzems an beiden Händen: Handinnenfläche (Ausbreitung: 0= keine, 3= geringe, 6= mittlere, 9= (fast) gesamte Handinnenfläche betroffen), Handgelenk (Ausbreitung: 0= keine, 1= geringe, 2= mittlere, 3= (fast) gesamtes Handgelenk betroffen), Handrücken (Ausbreitung: 0= keine, 3= geringe, 6= mittlere, 9= (fast) gesamter Handrücken betroffen) und Fingerinnen-/ außenseiten (Ausbreitung pro Finger: 0= keine, 1= geringe, 2= mittlere, 3= (fast) gesamter Finger betroffen) von der rechten und linken Hand. Durch Summation aller Punkte kann eine Punktzahl zwischen 0 und 72 Punkten erreicht werden.

Beim hier verwendeten modifizierten Manuscore wurde die Ausbreitung des Handekzems an nur einer Hand beurteilt. Es wurde die Palmarseite der schwerer betroffenen Hand beurteilt: Handinnenfläche (Ausbreitung: 0= keine, 3= geringe, 6= mittlere, 9= (fast) gesamte Handinnenfläche betroffen), Handgelenk (Ausbreitung: 0= keine, 1= geringe, 2= mittlere, 3= (fast) gesamtes Handgelenk betroffen) und Fingerinnenseiten (Ausbreitung pro Fingerinnenseite: 0= keine, 0,5= geringe, 1= mittlere, 1,5= (fast) gesamte Fingerinnenseite betroffen). Hier konnte eine Punktzahl zwischen 0 und 19,5 Punkten erreicht werden.

Teil B beurteilt das klinische Erscheinungsbild und die Intensität des Handekzems mit Hilfe von 8 Kriterien: Erythem, Schuppung, Papeln/Infiltrat, Bläschen (+ Papulovesikel), Hyperkeratosen und Lichenifikation (0= keine, 1= leichte, 2= mäßige und 3= starke Ausprägung) sowie Erosionen und Pusteln (0= keine, 2= leichte, 4= mäßige, 6= starke Ausprägung). Es kann eine Punktzahl zwischen 0 und 30 Punkten erreicht werden.

Dieser Teil wurde für den modifizierten Manuscore nicht verändert.

In **Teil C** wird zusätzlich das Vorhandensein von Rhagaden oder Nässen beurteilt (0= keine, 1= leichte, 2= mäßige, 3= starke Ausprägung) und als besonderes Kriterium der Schwere bewertet. Hier wurde für den modifizierten Manuscore die Beurteilung des Juckreizes weggelassen, da dieses Symptom anhand von Fotos nicht ausgewertet werden konnte. Die Punktwerte wurden für den modifizierten Manuscore angepasst. Einem Punktwert von 0-2 im Teil C wurde der Wert 1, einem Punktwert von 3-4 der Wert 2 und einem Punktwert von 5-6 der Wert 3 zur Berechnung zugeordnet.

Das Endergebnis wurde durch Multiplikation der Summen aus Teil A, B und C errechnet. Beim Manuscore kann eine Punktzahl zwischen 0 und 6480 Punkten erreicht werden. Bei dem hier verwendeten modifizierten Manuscore konnte eine Punktzahl zwischen 0 und 1755 Punkten erreicht werden. Die Grenzen zur Einteilung des klinischen Schweregrades des Handekzems wurden, wie in der unten aufgeführten Abbildung 2 beschrieben, angepasst.

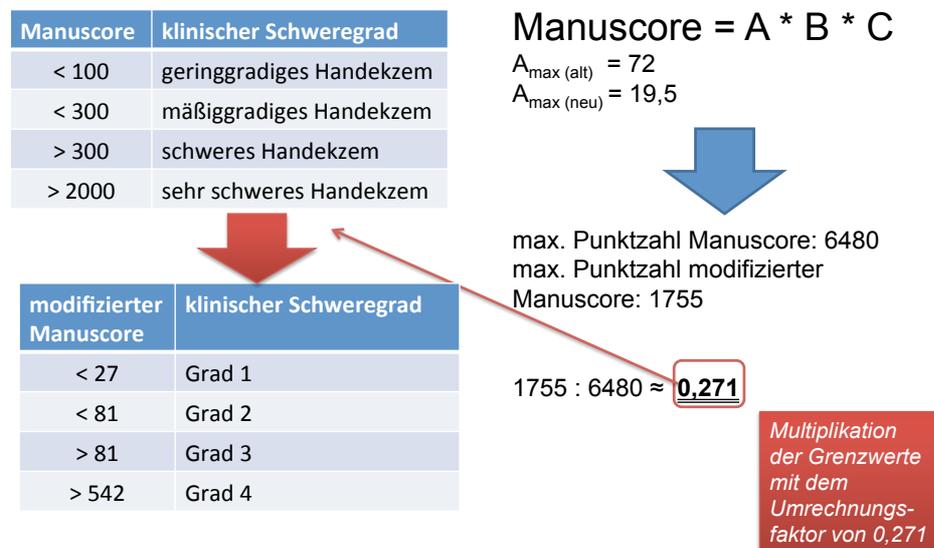


Abbildung 2: Berechnung der Grenzwerte des modifizierten Manuscores; abgeleitet vom Manuscore von John [71, 72].

5.3 Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

Der Wasserverlust der Haut erfolgt durch Schweißsekretion und passive Diffusion. Die passive Diffusion von Wasser durch die Haut wird als transepidermaler Wasserverlust

bezeichnet. Störungen der Barrierefunktion des Stratum corneums führen zu einem pathologisch erhöhten TEWL [73, 74].

Direkt vor Beginn und nach Abschluss der Alitretinointherapie wurde der transepidermale Wasserverlust (TEWL) mit Hilfe des Tewameters® TM 300 (Courage and Khazaka electronic GmbH, Köln/Deutschland) gemessen. Den Probanden wurde eine Akklimatisierungszeit von ca. 30 Minuten gegeben. Es wurden die Luftfeuchtigkeit und die Umgebungstemperatur mit dem digitalen Thermo-Hygrometer (TFA Dostmann GmbH & Co., Wertheim/Deutschland) gemessen. Raumbedingungen mit einer Temperatur von 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von 40-60% wurden angestrebt. Während der Messung des TEWLs wurde die Sonde mit mittlerem Druck auf dem Handrücken des Patienten platziert. Es wurde so lange gemessen bis der TEWL-Wert ein stabiles Plateau erreichte (ca. 45 Sek.). Diese Messung wurde dreimal hintereinander ausgeführt und der daraus errechnete Mittelwert für die Auswertung herangezogen.

5.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

5.4.1 Aufarbeitung der Hautproben für die PCR

RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren/Deutschland) nach Herstellerangaben aus den Hautproben isoliert [75]. Hierbei wurde die RNA im ersten Schritt mit Guanidiniumthiocyanat versetzt und auf eine Silicamembran pipettiert. Dieses Salz lysiert Zellen, inaktiviert RNasen und denaturiert Proteine. Das führt zu einer reversiblen Entfernung der Hydrathülle der RNA und zu einer besseren Bindung der RNA an die Silicamembran. Desoxyribonuklease wurde zur Verdauung von gebundener DNA auf die Säule pipettiert.

Im nächsten Schritt wurden durch mehrere Waschschrte mit Ethanol Kontaminationen entfernt. Zum Schluss wurde die RNA von der Silicamembran in RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur Verwendung bei - 80°C gelagert [75]. Je 3µl des RNA-Eluats wurden zur Bestimmung der RNA-Menge mittels Spektrophotometer (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/ USA) eingesetzt.

Agarosegelelektrophorese

Die Qualität der RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese geprüft. Das Prinzip der Agarosegelelektrophorese besteht darin, dass negativ geladene Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld wandern und sich der Größe nach auftrennen, wobei kleinere Moleküle schneller durch die Gelmatrix wandern als die Größeren. Zum Sichtbarmachen der Nukleinsäuren wird Ethidiumbromid verwendet. Dies lagert sich zwischen zwei benachbarten Basenpaaren ein und fluoresziert im UV-Licht.

Zur Herstellung des 2%igen Agarosegels wurden 200ml 1x TAE-Puffer und 4g Agarose in der Mikrowelle kurz aufgekocht und mit 10µg Ethidiumbromid (Verdünnung 1:20 000) versetzt. Die Elektrophorese wurde für 45 Minuten bei 120 Volt durchgeführt. Mittels UV-Licht ließen sich anschließend die Banden im Gel sichtbar machen. Dies wurde wie in Abbildung 3 zu sehen ist, fotografisch dokumentiert.

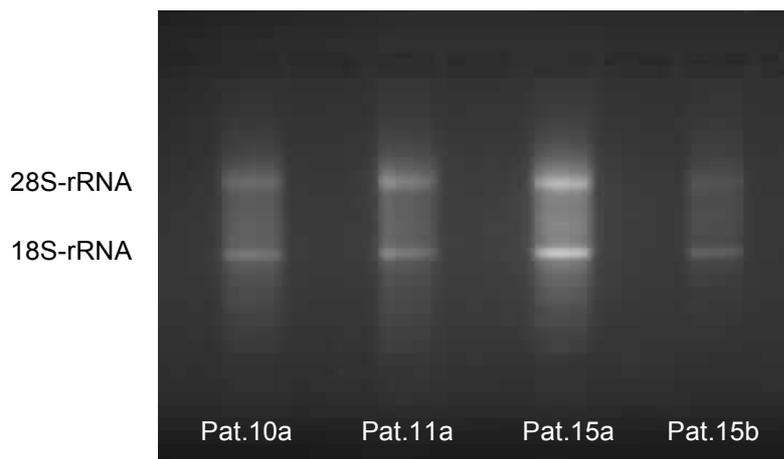


Abbildung 3: Agarosegelelektrophorese der isolierten RNA; 2%iges Agarosegel, Laufzeit: 45 Minuten. Auf dem Foto ist deutlich die 18S- und 28S-rRNA von Patient (Pat.) 10, 11 und 15 als Bande zu sehen; (a= vor Therapie; b= nach Therapie).

Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte zur Umschreibung der messenger-RNA (mRNA) aus der isolierten Gesamt-RNA in cDNA (komplementäre DNA). Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte mit Hilfe der TaqMan® Reverse Transcription Reagenzien (Applied Biosystems, Darmstadt/Deutschland) nach Herstellerangaben.

Pro Ansatz wurde ein Mastermix mit folgenden Komponenten auf Eis hergestellt:

Tabelle 8: Versuchsansatz für die cDNA-Synthese (Angaben pro Ansatz)

Volumen (in μl)	Substanz	Endkonzentration
2	10x TaqMan RT Puffer	1x
4,4	Magnesiumchlorid (25mM)	5,5mM
4	Deoxy NTP's (10mM)	2mM
0,5	Random Hexamer Primer (50 μM)	1,25 μM
0,5	Oligo d(T) ₁₆ Primer (50 μM)	1,25 μM
0,4	RNase Inhibitor (20U/ μl)	0,4U/ μl
0,5	MultiScribe Reverse Transkriptase (50U/ μl)	1,25U/ μl

Je 12,3 μl Mastermix wurden zu 7,7 μl RNA hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend in den Thermocycler (Px2 Thermal Cycler, Thermo Electron Corporation, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts/USA) gestellt. Hier erfolgte im ersten Schritt die Inkubation des Ansatzes für 10 Minuten bei 25°C zur besseren Anlagerung der Random Hexamer Primer und Oligo d(T) Primer an die RNA-Templates. Im zweiten Schritt erfolgte eine Inkubation des Ansatzes für 40 Minuten bei 48°C zur reversen Transkription. Zuletzt wurde der Ansatz für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die cDNA-Proben wurden dann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.4.2 Primerdesign und -etablierung

Das Primerdesign wurde mit Hilfe des Online Programms Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; zuletzt abgerufen 02/2014) durchgeführt. Um bestmögliche PCR Ergebnisse zu erhalten, wurden möglichst Primer design, die einen GC-Gehalt (Guanidin-/Cytosingehalt) von 40-60% haben, einen Genabschnitt von maximal 300 Basenpaaren/Nukleotiden ablesen (Produktlänge) und eine

Schmelztemperatur von ca. 60°C besitzen. Außerdem sollte die Länge des Primers 20-25 Nukleotide nicht überschreiten und keine komplementären Sequenzen aufweisen. Es wurde stets versucht Intron-überspannende Primer zu entwerfen. Die Synthese der konstruierten Primer wurde von der Firma Tib MolBiol (Berlin/Deutschland) durchgeführt. Für Loricrin und Beta-Aktin wurde ein Primer aus der Literatur verwendet [76, 77].

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Primer für die konventionelle PCR und qRT-PCR

Gen	Produktlänge (bp)	Primersequenz (5' → 3', fw= forward, rv= reverse)	Annealingtemperatur (in °C)	Primer-effizienz (E)
Claudin1	139	GGCAGATCCAGTGCAAAGTC (fw) TTCATACACTTCATGCCAACG (rv)	64	2,14
Claudin2	270	CGGTATCCAGGGAACAGAAA (fw) TTCAGCCAAAGTTGTGATCG (rv)	64	2,48
Occludin	145	CCATTGCCATTGTACTGGGG (fw) GGGGGCTGCTCATCATAAAT (rv)	64	2,36
Profilaggrin	122	TGAGGCATACCCAGAGGACT (fw) CTGTATCGCGGTGAGAGGAT (rv)	64	1,96
Loricrin	177	GGAGTTGGAGGTGTTTTCCA (fw) ACTGGGGTTGGGAGGTAGTT (rv)	65	2,16
TSLP	111	TCGCTCGCCAAAGAAATGTT (fw) TCTCCTCTTCTTCATTGCCTGA (rv)	65	2,48
IL-36 γ	152	CAGCCCACATTGCAGCTAAA (fw) TTGGAGGAGGCAATGAACCA (rv)	65	2,40
Beta-Aktin	246	TTAATAGTCATTCCAAATATGA (fw) GGGACAAAAAAGGGGGAAGG (rv)	56	1,95
HPRT	231	ATCAGACTGAAGAGCTATTGTAAT GACCA (fw) TGGCTTATATCCAACACTTCGTG (rv)	64	1,79

Bevor die Primer für die Real-Time-PCR eingesetzt werden konnten, musste die optimale Annealingtemperatur, die Primerkonzentration und die Primereffizienz bestimmt werden.

Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur wurde eine Gradienten-PCR/

konventionelle PCR mit Annealingtemperaturen von 56, 58, 60, 62 und 64°C durchgeführt. Pro Ansatz wurde der in Tabelle 10 beschriebene Mastermix angefertigt.

Tabelle 10: Reaktionsgemisch für die Gradienten-PCR (Angaben pro Ansatz)

Volumen (in μl)	Substanz	Endkonzentration
2,5	10-fach Puffer	1x
1,25	Magnesiumchlorid	2,5nM
0,25	Desoxyribonukleosidtriphosphate	100nM
0,5	Forward Primer	200nM
0,5	Reverse Primer	200nM
0,25	DNA-Polymerase	0,05U/ μl
17,75	RNase freies Wasser	

Je 2 μl cDNA wurden zu 23 μl Mastermix pipettiert, sodass ein Endvolumen von 25 μl pro Ansatz vorhanden war. Die Proben der Gradienten-PCR wurden auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen.

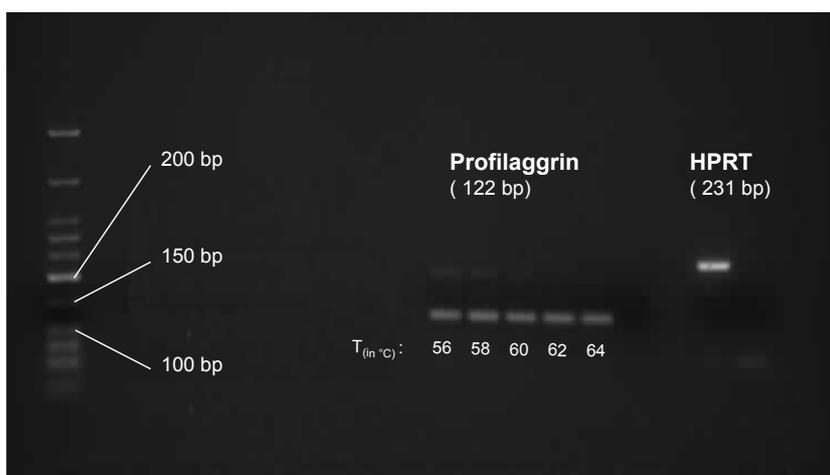


Abbildung 4: Gradienten-PCR des Gens Profilaggrin; (2 %-iges Agarosegel; Laufzeit 45 Min. bei 120 Volt); **links:** Low Molekular Weight DNA Ladder (New England BioLabs, Frankfurt am Main), **mittig:** Banden des Gens Profilaggrin bei Annealingtemperaturen von 56 bis 62°C, **rechts:** Banden des Referenzgens HPRT.

Die Ergebnisse der Gradienten-PCR wurden in der Agarosegelelektrophorese überprüft. Wie in Abbildung 4 beispielhaft für das Gen Profilaggrin dargestellt, wurde untersucht, bei welcher Temperatur nur ein spezifisches PCR-Produkt (ohne Nebenbanden/unspezifische Banden) in der zu erwartenden Größe vorhanden war (hier: Profilaggrin, Größe: 122bp, optimale Annealingtemperatur: 64°C). Diese Temperatur wurde als Annealingtemperatur in den folgenden quantitativen Real-Time-PCR-Analysen (qRT-PCR) verwendet.

Im nächsten Schritt wurde die optimale Primerkonzentration mit Hilfe einer qRT-PCR im Rotor Gene ermittelt. Es mussten 3 verschiedene Mastermixe mit den Primerkonzentrationen 500nM, 200nM und 100nM vorbereitet werden. Pro Ansatz wurde der in Tabelle 11 beschriebene Mastermix angefertigt.

Tabelle 11: Versuchsansatz für die qRT-PCR (Angaben pro Ansatz)

Volumen (in µl)	Substanz	Endkonzentration
5	SYBR Green (Kit-Komponenten: HotStar Taq® DNA Polymerase, Rotor-Gene SYBR Green RT-Puffer, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP))	
0,5/ 0,2/ 0,1	<i>Forward</i> Primer	500nM/ 200nM/ 100nM
0,5/ 0,2/ 0,1	<i>Reverse</i> Primer	500nM/ 200nM/ 100nM
2/ 2,6/ 2,8	RNase freies Wasser	

Es wurden pro Ansatz 8µl Mastermix und 2µl cDNA benötigt. Anhand der Höhe der Schmelzkurven der qRT-PCR wurde die optimale Primerkonzentration ermittelt. Es wurde die Primerkonzentration gewählt, welche die höchste Schmelzkurve erbrachte, bzw. wenn zwei Konzentrationen eine gleich hohe Schmelzkurve hatten, wurde um Primer einzusparen die niedrigere Konzentration gewählt.

Im letzten Schritt der Primeretablierung wurde die Primereffizienz mit Hilfe der Steigung m einer Standardkurve bestimmt. Dafür wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe für eine qRT-PCR im Rotor Gene angefertigt. Die CT-Werte der einzelnen cDNA-Verdünnungen der qRT-PCR konnten dann für die Erstellung einer grafischen Kurve genutzt werden.

Durch diese Kurve wurde eine lineare Regressionsgerade mit der Steigung $-m$ gelegt, sodass folgende Formel zur Errechnung der Primereffizienz (siehe auch Tabelle 9) eingesetzt werden konnte: **Effizienz (E) = 10^{(-1/Steigung (m))}**.

5.4.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Zur quantitativen Analyse bzw. Charakterisierung der Genexpression wird die fluoreszenzbasierte Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) angewendet. Für die hier aufgeführten Versuche wurde die Real-Time-PCR in einem *Rotor-Gene*® Q (Qiagen, Hilden/Deutschland) mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I durchgeführt. SYBR Green lagert sich in doppelsträngige DNA ein und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht in einer Wellenlänge von 494nm. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zur Menge der synthetisierten doppelsträngigen DNA [78].

Normalisierung der relativen Expression

Zur Berechnung der relativen Expression wurden die CT-Werte („Cycle Threshold“) herangezogen. Der CT-Wert entspricht dem Zyklus bzw. Zeitpunkt der PCR, zu dem sich das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant von der Hintergrundstrahlung abhebt. Je kleiner der CT-Wert ist, desto höher ist die Anzahl an Kopien des Zielgens zu Beginn der PCR in der Probe. Da für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt worden ist, wurde zur Berechnung jeweils der Mittelwert der beiden CT-Werte der Doppelbestimmung verwendet.

Um die relative Expression der Zielgene zu ermitteln, wurde wie in Abbildung 5 dargestellt, die Expression auf ein Referenzgen normalisiert [79]. Referenzgene werden unabhängig von äußeren Einflüssen, Zellstadium und -typ exprimiert [77].

$$R = \frac{E_{(\text{Ref.gen})}^{CT_{(\text{Ref.gen})}}}{E_{(\text{Zielgen})}^{CT_{(\text{Zielgen})}}}$$

Abbildung 5: Normalisierung der Relativen Expression auf ein Referenzgen;

R= Relative Expression, E= (Primer-) Effizienz, CT= CT- Wert, Ref.gen= Referenzgen (HPRT/ Beta-Aktin).

Die Normalisierung der Expression auf ein Referenzgen dient der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse. Gewebe- und Matrixeffekte, Unterschiede in der RNA-Extraktionseffizienz und bei der reversen Transkription können so ausgeglichen werden, da sie gleichermaßen das Zielgen und das Referenzgen betreffen [80]. Als Referenzgene wurden HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase), das in humaner Haut niedrig exprimiert ist und Beta-Aktin, das in humaner Haut hoch exprimiert ist, verwendet. Dementsprechend wurde bei niedriger Expression des zu bestimmenden Zielgens (hier: Claudin1, Claudin2, Occludin, TSLP, IL-36 γ) zur Berechnung der Relativen Expression HPRT und bei hoher Expression (hier: Profilaggrin, Loricrin) Beta-Aktin herangezogen.

5.5 Histologie und Immunhistochemie

Die (immun-)histologischen Färbungen wurden in Kooperation mit Frau Dr. rer. medic. Anja Kühl, Charité-Campus Benjamin Franklin, Medizinische Klinik 1, Berlin, durchgeführt.

5.5.1 Dokumentation der Histologie und Immunhistochemie

Die Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskopes Axioplan und der Software AxioVision (Zeiss, Berlin/ Deutschland). Die Schnitte wurden in einer 50- und 100-fachen Vergrößerung mikroskopiert. Pro Schnitt wurde ein repräsentativer Bereich ausgewählt und fotografiert.

5.5.2 Auswertung der Histologie

Für die Messung der Epidermisdicke wurden die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen herangezogen. Es wurde der vertikale Abstand vom Stratum basale bis einschließlich zum Stratum granulosum gemessen (siehe Abbildung 6). Für jeden Schnitt wurden 9 Messungen bei einer 50-fachen Vergrößerung durchgeführt. Es wurde dreimal der kürzeste, mittlere und längste Abstand gemessen und daraus der Mittelwert berechnet.



Abbildung 6: Darstellung der Messungen der Epidermisdicke (50-fache Vergrößerung, Maßstab 100µm) Abstand vom Stratum basale bis zum Stratum granulosum gemessen.

5.5.3 Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte (semi-)quantitativ. Wie in Tabelle 12 zu sehen wurde für jede Färbung festgelegt, ob es sich um ein membranständiges, zytoplasmatisches oder nukleäres Färbemuster handelt und in welchen Hautschichten der Epidermis bzw. Dermis die Antigene auftreten. Hierbei erfolgte stets ein Abgleich mit Daten aus der Literatur.

Tabelle 12: Lokalisation der immunhistochemisch untersuchten Proteine

Protein	Färbemuster	SB	Unteres SS	Oberes SS	SG	SC	Referenz
Tight junction-Proteine							
Claudin1	membranständig	+	+	+	+	+ *	[12]
Intermediäre Filamente des Zytoskeletts							
Filaggrin	zytoplasmatisch (in Keratohyalin-granula)	-	-	-	+	-	[81, 82]
Zytokeratin10	zytoplasmatisch	-	+	+	+	+ *	[81]

Proteine des Cornified Envelope							
Loricrin	zytoplasmatisch, nukleär	-	-	-	+	-	[81, 82]
Transglutaminase1	membranständig	-	-	-	+	(+)*	[83], [82]
Proliferationsmarker							
Ki67	nukleär	+	+	-	-	-	[81], [82]
Zelluläres Infiltrat							
CD3 ⁺ (+Dermis)	membranständig (T-Zell-Ober- flächenantigen)	+	+	+	+	-	[82]
Entzündungsmarker							
TSLP (+ Dermis)*	zytoplasmatisch, nukleär	(+)	+	+	+	+*	[84, 85]

SC = Stratum corneum

SB = Stratum basale

SS = Stratum spinosum

SG = Stratum granulosum

+ = positiv

- = negativ

* nicht in Auswertung mit
einbezogen

Es wurde jeweils für den Anteil der positiv gefärbten Zellen bzw. Zellstrukturen und für die Intensität der Färbungen ein Punktwert vergeben [86]. Durch Multiplikation der Punktwerte wurde ein Score berechnet, der in der Auswertung zur Beurteilung der Veränderung der Proteinexpression von Strukturproteinen, Entzündungs- und Proliferationsmarkern herangezogen wurde.

Auswertungsmodalität Claudin1

Für Claudin1 ließ sich die Intensität der Färbung in 4 Kategorien unterteilen: (0: keine Anfärbung sichtbar; 1: sehr geringe Farbintensität; 2: geringe Farbintensität; 3: mittlere Farbintensität; 4: starke Farbintensität). Dieser Punktwert wurde mit dem Punktwert der angefärbten Fläche multipliziert: (0: <1%; 1: 1-25%; 2: 26-50%; 3: 51-75%; 4: 76-100%). Daraus ergab sich ein Score von 0 bis 16 Punkten. 0 Punkte bedeuteten kein Nachweis von Claudin1, 1-4 Punkte eine sehr schwache Immunreaktivität, 5-8 Punkte eine schwache Immunreaktivität, 9-12 Punkte eine mittelstarke Immunreaktivität und 13-16 Punkte wurden als eine starke Immunreaktivität gewertet. Es wurde postuliert,

dass eine Zu- bzw. Abnahme der Immunreaktivität mit einer Zu- bzw. Abnahme der Proteinexpression von Claudin1 einhergeht.

Auswertungsmodalität Filaggrin, Zytokeratin10, Loricrin, TSLP und Transglutaminase1

Je nach Intensität der Färbung wurden Punktwerte von 0-3 vergeben: (0: keine Anfärbung sichtbar; 1: sehr geringe Farbintensität; 2: geringe Farbintensität; 3: mittlere Farbintensität). Diese Punktwerte wurden mit den Punktwerten der angefärbten Fläche multipliziert: (0: <1%; 1: 1-25%; 2: 26-50%; 3: 51-75%; 4: 76-100%). Daraus ergab sich ein Score von 0 bis 12 Punkten. 0 Punkte bedeuteten kein Antigennachweis, 1-3 Punkte eine sehr schwache Immunreaktivität, 4-6 Punkte eine schwache Immunreaktivität, 7-9 Punkte eine mittelstarke Immunreaktivität und 10-12 Punkte wurden als eine starke Immunreaktivität gewertet. Eine Zu- bzw. Abnahme der Immunreaktivität bedeutete eine Zu- bzw. Abnahme der Proteinexpression der hier aufgeführten Antigene.

Auswertungsmodalität Ki67

Die Auswertung von Ki67 erfolgte mit Hilfe der Software Axiovision. Es wurde ein repräsentativer Bereich ausgewählt, der bei Ki67 das Stratum basale und das untere Stratum spinosum umfasste. Die Fläche des ausgewählten Bereiches wurde gemessen und alle positiv angefärbten Zellen dieser Fläche wurden gezählt. Für die Auswertung erfolgte eine Hochrechnung der Zellen auf eine Fläche von 0,1mm².

Auswertungsmodalität CD3⁺-Zellen

Für die Auswertung von CD3⁺-Zellen wurde ebenfalls die Software Axiovision herangezogen. Es wurde jeweils ein repräsentativer Bereich aus dem Stratum basale der Epidermis sowie aus dem Stratum papillare und dem oberen Stratum reticulare der Dermis ausgewählt. Für beide Bereiche wurde die Fläche berechnet und die positiven Zellen ausgezählt. Für die Auswertung wurde die Summe der positiven Zellen beider Bereiche berechnet und es erfolgte eine Hochrechnung auf eine Fläche von 0,1mm².

5.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft Excel 2007, dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 21 und Graph Pad PrismTM5 durchgeführt. Bei einem symmetrischen und eingipfligen Histogramm mit einer Schiefe zwischen +1 und -1 wurde von einer Normalverteilung ausgegangen.

Bei normalverteilten und intervallskalierten Werten wurde der T-Test für verbundene Stichproben angewandt. Bei nicht normalverteilten intervallskalierten oder ordinalskalierten Werten wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test angewandt. Zur Berechnung von Korrelationen wurde der Pearson'sche Korrelationskoeffizient für metrisch skalierte Merkmale und der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient für ordinalskalierte Merkmale herangezogen. Bei den Auswertungen wurde als Signifikanzniveau $p=0,05$, $p=0,01$ bzw. $p=0,001$ zugrunde gelegt.

6 Ergebnisse

6.1 Untersuchungskollektiv

Zur Untersuchung des Einflusses von Alitretinoin auf die Hautbarriere wurden 20 Patienten zum Screening eingeladen, von denen 15 Patienten in die Studie eingeschlossen werden konnten. Vier Patienten brachen die Studie vorzeitig ab und ein Patient wurde aus der Studie ausgeschlossen, da eine Psoriasis pustulosa palmoplantaris diagnostiziert wurde.

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Charakteristika des Untersuchungskollektivs und eine Übersicht zur Therapiedauer und -dosis. Das Alter der Patienten lag bei Studienbeginn im Durchschnitt bei 57 Jahren (s: $\pm 9,9$ Jahre). Alle eingeschlossenen Patienten litten an einem hyperkeratotisch-rhagadiformen Handekzem, bei 7 Patienten waren zusätzlich die Füße betroffen. Die Erkrankungsdauer des chronischen Handekzems bis zur Einleitung der systemischen Alitretinointherapie lag bei 0,8 bis 32 Jahre (Md: 3,4 Jahre). 13 Patienten erhielten 30mg Alitretinoin pro Tag, von denen bei 3 Patienten im Therapieverlauf eine Dosisreduktion auf 10mg pro Tag aufgrund von Nebenwirkungen erfolgte. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Kopfschmerzen bei Therapiebeginn und ein Anstieg von Fettwerten wie Triglyceride und Cholesterin. Ein Patient erhielt 20mg Alitretinoin pro Tag aufgrund einer geringen Erhöhung eines Leberwertes (γ -GT) bei Therapiebeginn, der im Therapieverlauf stabil blieb. Ein weiterer Patient erhielt 10mg alle 2 Tage. Dieser Patient hatte zuvor schon Alitretinoin erhalten und dies war die niedrigste mögliche Dosis ohne Nebenwirkungen. Insgesamt hatten 5 von 15 Patienten vor der Studie schon einmal Alitretinoin erhalten.

Tabelle 13: Charakterisierung des Untersuchungskollektivs und Übersicht zur Therapiedauer und -dosis

Patienten mit chronischem Handekzem	
Anzahl der Studienpatienten	n= 15
Männer/ Frauen	n= 7/ n= 8
Alter ¹ (in Jahren)	57,0 \pm 9,9
Körpergröße ¹ (in m)	1,73 \pm 0,11
Körpergewicht ¹ (in kg)	78,6 \pm 14,1

Hyperkeratotisch-rhagadiformes Handekzem	n= 15
Handekzem	n= 8
Hand- und Fußekzem	n= 7
Alitretinoin 30mg/ Tag	n= 13
Alitretinoin 20mg/ Tag	n= 1
Alitretinoin 10mg/ jeden 2. Tag	n= 1
Therapiedauer ² (in Wochen)	22 (8 - 27)

¹Angaben: Mittelwert \pm Standardabweichung

²Angaben: Median (Minimum - Maximum)

6.2 Klinische Wirksamkeit von Alitretinoin

Zur Beurteilung der klinischen Wirksamkeit von Alitretinoin wurde der modifizierte Manuscore vor und nach der Behandlung erhoben. Wie in Abbildung 7 dargestellt, kam es im Mittel zu einer signifikanten Abnahme des modifizierten Manuscores ($p= 0,01$; $n= 11$; fehlende Messwerte von 4 Patienten). Der mediane modifizierte Manuscore lag vor der Therapie bei 27 und nach der Therapie bei 0 Punkten. Bei 8 von 11 Patienten (73%) waren nach der Therapie keine klinischen Symptome mehr sichtbar, sodass beim modifizierten Manuscore ein Punktwert von 0 erreicht wurde.

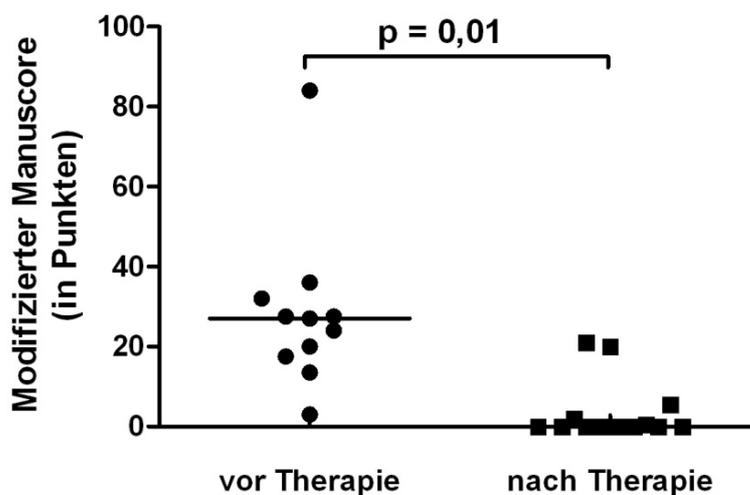


Abbildung 7: Verlauf des modifizierten Manuscores vor und nach Alitretinointherapie. Daten sind als Einzelpunkte mit Median dargestellt, der Median liegt nach der Therapie bei dem Wert 0 bzw. auf der x- Achse ($p= 0,01$; $n= 11$; fehlende Messwerte von 4 Patienten).

6.3 Einfluss von Alitretinoin auf den transepidermalen Wasserverlust

Der transepidermale Wasserverlust (TEWL) wurde als hautphysiologischer Parameter direkt vor Beginn und nach Abschluss der Alitretinointherapie auf dem Handrücken gemessen. Abbildung 8 zeigt bei 5 von 12 Patienten (42%) eine Abnahme und bei 7 von 12 Patienten (58%) eine Zunahme des transepidermalen Wasserverlustes ($p = \text{n.s.}$; $n = 12$; fehlende Messwerte von 3 Patienten). Der mediane TEWL veränderte sich während der Therapie nicht signifikant und lag vor der Therapie bei $18,75 \text{ g/hm}^2$ und danach bei $16,17 \text{ g/hm}^2$.

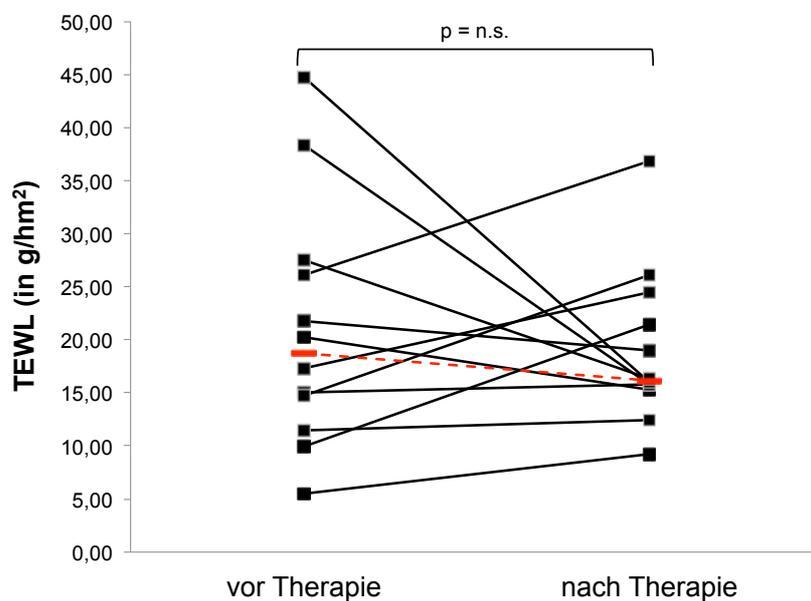


Abbildung 8: Verlauf des transepidermalen Wasserverlustes vor versus nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt ($p = \text{n.s.}$; $n = 12$; fehlende Messwerte von 3 Patienten).

6.4 Einfluss von Alitretinoin auf die Epidermisdicke

Anhand von Hämatoxylin-Eosin-Schnitten wurde die Epidermisdicke (in μm) vom Stratum basale bis einschließlich zum Stratum granulosum vor Beginn und nach Ende der Alitretinointherapie für jeden Patienten gemessen.

Beim Vergleich der Werte vor versus nach Alitretinointherapie zeigte sich, wie in Abbildung 9 zu sehen, bei allen Patienten eine signifikante Abnahme der

Epidermisdicke ($p = 0,001$; $n = 15$). Im Mittel nahm die Epidermisdicke um das 1,7-fache ab, d.h. von 328 auf 188 μm .

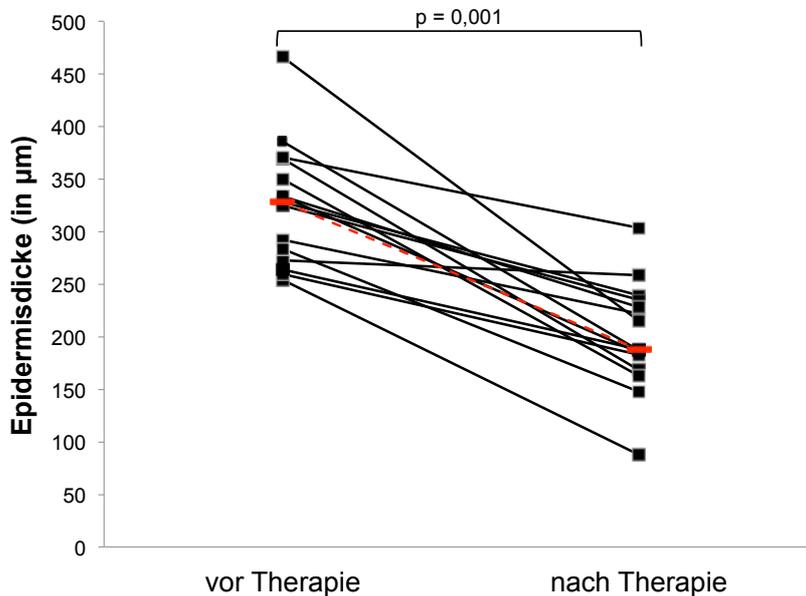


Abbildung 9: Darstellung der mittels Histologie bestimmten Veränderung der Epidermisdicke vor versus nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt ($p = 0,001$; $n = 15$).

6.5 Untersuchung der Hautbarriere vor und nach Alitretinointherapie

6.5.1 Tight Junction-Proteine

Expression von Claudin1

Jeweils direkt vor und nach der Alitretinointherapie wurde die relative Genexpression von Claudin1 mittels qRT-PCR bestimmt.

Die Bestimmung der relativen Expression von Claudin1 ist in Abbildung 10 dargestellt und zeigte für 13 von 13 Handekzem-Patienten einen signifikanten Anstieg der Genexpression ($p = 0,001$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten). Im Mittel stieg die Claudin1-Expression von $2,9 \times 10^{-2}$ auf $9,0 \times 10^{-2}$ an, d.h. sie nahm um das 3,1-fache zu.

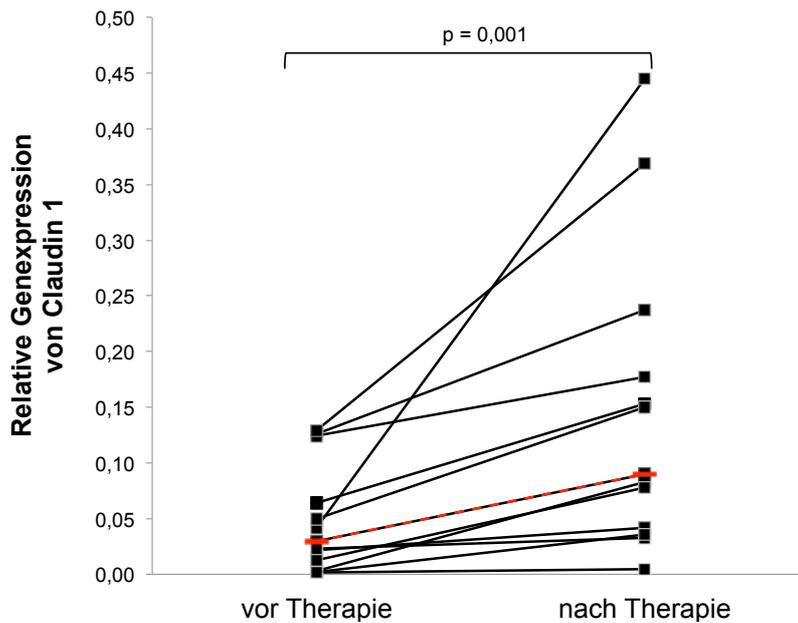


Abbildung 10: Veränderung der mittels qRT-PCR bestimmten relativen Genexpression von Claudin1 vor versus nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt ($p = 0,001$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten).

Die Proteinexpression von Claudin1 wurde ebenfalls direkt vor und nach Alitretinointherapie mittels Immunhistochemie bestimmt. Abbildung 11 zeigt exemplarisch die lichtmikroskopische Darstellung der immunhistochemischen Färbung mittels anti-Claudin1-Antikörper eines Patienten direkt vor und nach 22-wöchiger Alitretinointherapie.

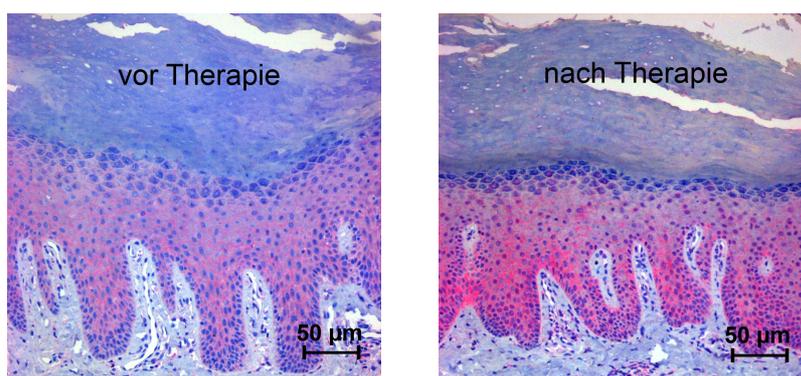


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung mittels anti-Claudin1-Antikörper vor und nach 22-wöchiger Alitretinointherapie (100-fache Vergrößerung; Maßstab: 50µm). Es ist eine membranständige Färbung vom Stratum basale bis zum Stratum granulosum sichtbar. Beim Vergleich der beiden Aufnahmen ist eine deutliche Zunahme der Farbintensität sichtbar, was auf eine Zunahme der Proteinexpression von Claudin1 hinweist.

Zur Auswertung der Proteinexpression von Claudin1 in der Immunhistochemie wurde jeweils die Fläche und die Farbintensität der Anfärbung vom Stratum basale bis zum Stratum granulosum ausgewertet und durch Multiplikation beider Faktoren ein Score berechnet.

Die ausgewertete Fläche der immunhistochemischen Färbung von Claudin1 blieb nach Alitretinointherapie verglichen mit der Fläche vor Therapie bei 11 Patienten (73%) konstant, nahm bei 3 Patienten zu (20%) und bei einem Patienten (7%) ab. Die Farbintensität hingegen nahm bei 8 Patienten (53%) zu, blieb bei 6 Patienten (40%) konstant und nahm bei einem Patienten (7%) ab.

Auffällig war, dass die immunhistochemische Färbung von Claudin1 in der Nähe von Entzündungszellen, die bei einigen Patienten die Epidermis infiltrierten, abnahm. Nach Berechnung des Scores aus Fläche und Farbintensität zur Darstellung der Proteinexpression von Claudin1 konnte eine signifikante Zunahme wie in Abbildung 12 dargestellt, im Mittel von 12 (\approx mittelstarke Immunreaktivität) auf 16 (\approx starke Immunreaktivität) verzeichnet werden ($p = 0,031$; $n = 15$).

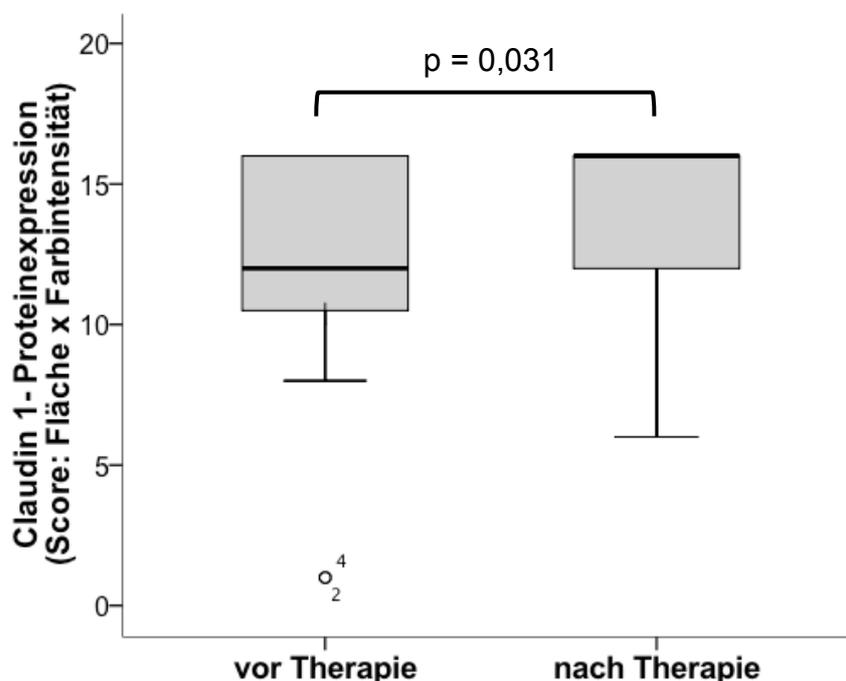


Abbildung 12: Proteinexpression von Claudin1 vor und nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Boxplot mit Median (schwarze Gerade) dargestellt, kleiner Kreis markiert (Patient 2 und 4 als) Ausreißer ($p = 0,031$; $n = 15$). Ein Score von 0 bedeutet kein Nachweis von Claudin1, ein Score von 1-4 wird als eine sehr schwache Immunreaktivität, ein Score von 5-8 als schwache Immunreaktivität, ein Score von 9-12 als mittelstarke Immunreaktivität und ein Score von 13-16 als starke Immunreaktivität gewertet.

Die Korrelation zwischen der Gen- und Proteinexpression von Claudin1 war nicht signifikant (siehe auch Kapitel 6.10).

Expression von Claudin2

Für Claudin2 ließ sich mittels qRT-PCR insgesamt eine sehr niedrige relative Genexpression in humaner Haut feststellen. Vor der Therapie wurden Werte zwischen $0,3 \times 10^{-6}$ und $48,5 \times 10^{-6}$ (Md: $6,0 \times 10^{-6}$), nach der Therapie wurden Werte zwischen $0,4 \times 10^{-6}$ und $118,0 \times 10^{-6}$ (Md: $5,6 \times 10^{-6}$) erreicht.

Eine signifikante Expressionsänderung von Claudin2 vor versus nach Alitretinointherapie konnte, wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, nicht beobachtet werden ($p = \text{n.s.}$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten). Bei 7 von 13 Patienten (54%) nahm die Expression ab und bei 6 von 13 Patienten (46%) nahm die Expression zu.

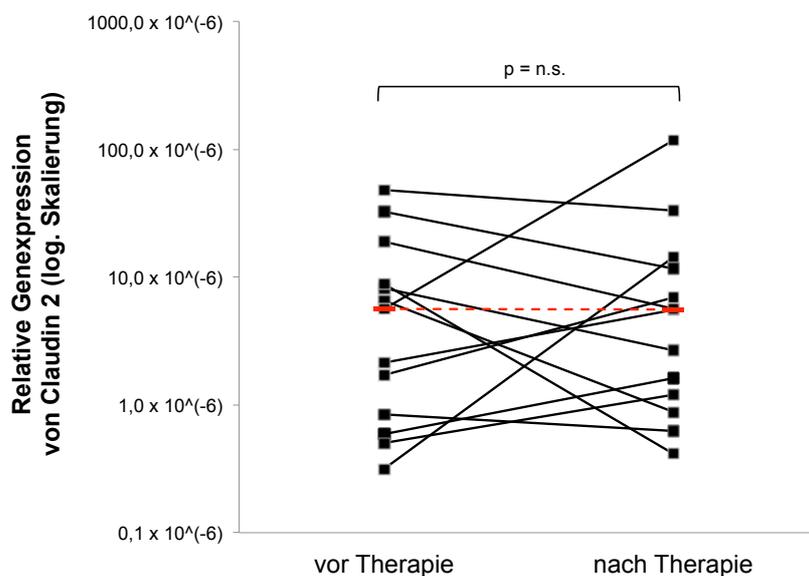


Abbildung 13: Veränderung der mittels qRT-PCR bestimmten relativen Genexpression von Claudin2 vor versus nach Alitretinointherapie. Die Daten sind logarithmisch als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt ($p = \text{n.s.}$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten).

Expression von Occludin

Die relative Genexpression von Occludin zeigte in der qRT-PCR, wie in Abbildung 14 dargestellt, eine signifikante Zunahme im Mittel von $2,2 \times 10^{-3}$ auf $5,9 \times 10^{-3}$, d.h. eine Zunahme um das 2,7-fache vor versus nach Alitretinointherapie ($p=0,013$; $n= 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten). Bei 9 von 13 Patienten (69%) nahm die Expression von Occludin zu und bei 4 von 13 Patienten (31%) ab.

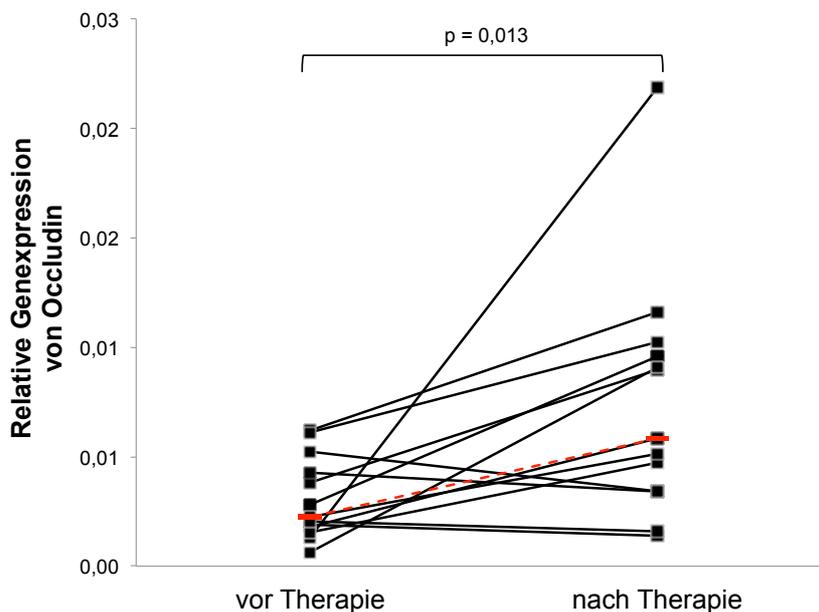


Abbildung 14: Veränderung der mittels qRT-PCR bestimmten relativen Genexpression von Occludin vor versus nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt ($p= 0,013$; $n= 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten).

6.5.2 Intermediäre Filamente des Zytoskeletts

Expression von (Pro-)Filaggrin

Die mittels qRT-PCR bestimmte relative Genexpression von Profilaggrin führte, wie in Abbildung 15 dargestellt, bei 11 von 13 Patienten (85%) zu einem Anstieg und bei 2 von 13 Patienten (15%) zu einem Abfall. Im Mittel zeigte sich ein 7,5-facher Anstieg der relativen Genexpression von Profilaggrin (Md vor Therapie: 4,96 ; Md nach Therapie.: 37,24 ; $p= 0,007$; $n= 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten).

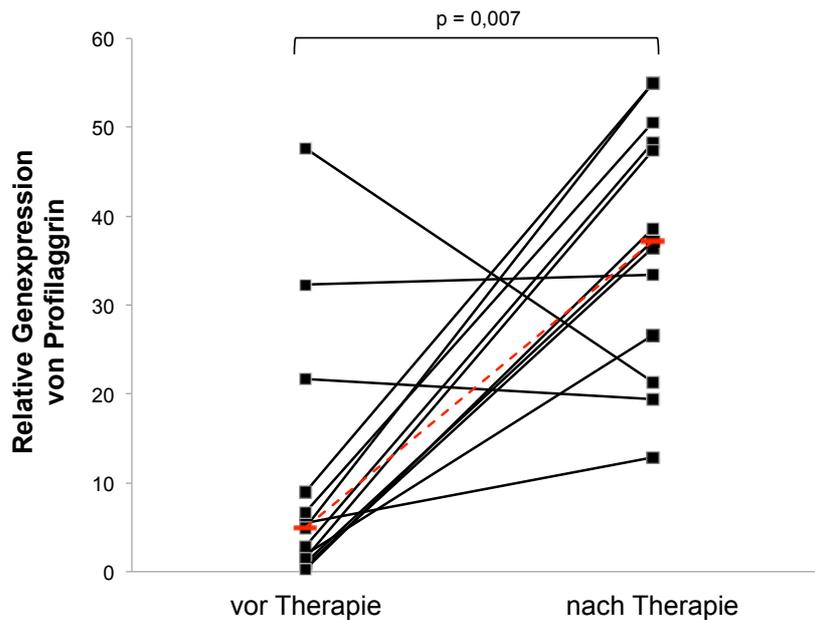


Abbildung 15: Relative Genexpression von Profilaggrin vor und nach Alitretinointherapie (Bestimmung mittels qRT-PCR). Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt ($p = 0,007$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten).

Die Proteinexpression von Filaggrin wurde ebenfalls direkt vor und nach Alitretinointherapie mittels Immunhistochemie bestimmt. Abbildung 16 zeigt exemplarisch die lichtmikroskopische Darstellung der immunhistochemischen Färbung mittels anti-Filaggrin-Antikörper eines Patienten direkt vor und nach 27-wöchiger Alitretinointherapie.

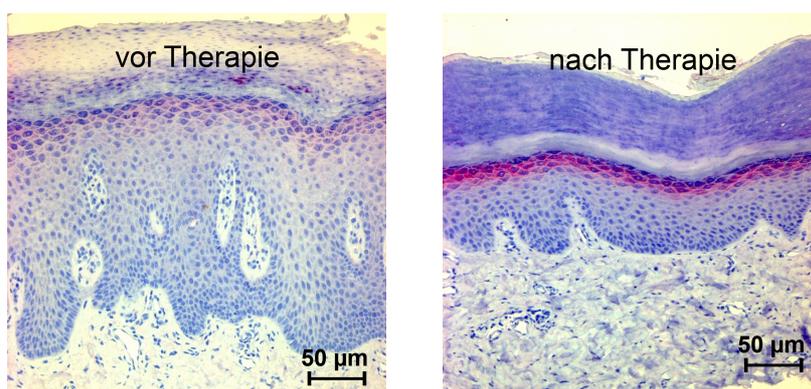


Abbildung 16: Lichtmikroskopische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung mittels anti-Filaggrin-Antikörper vor und nach 27-wöchiger Alitretinointherapie (100-fache Vergrößerung; Maßstab: 50µm). Es ist eine zytoplasmatische Anfärbung des Stratum granulosums sichtbar. Der Vergleich der Aufnahmen zeigt eine starke Zunahme der Farbintensität, die auf einer Zunahme der Proteinexpression von Filaggrin beruht.

Zur Auswertung der Proteinexpression von Filaggrin in der Immunhistochemie wurde jeweils die Fläche und die Farbintensität der Färbung vom Stratum granulosum ausgewertet. Für Filaggrin blieb die ausgewertete Fläche der immunhistochemischen Färbung nach Alitretinointherapie verglichen mit der Fläche vor der Therapie bei 5 Patienten (33%) konstant und nahm bei 10 Patienten (67%) zu. Die Farbintensität hingegen blieb bei 3 Patienten (20%) konstant und nahm bei 12 Patienten (80%) zu.

Nach Berechnung des Scores aus Fläche und Farbintensität konnte, wie in Abbildung 17 dargestellt, für alle Patienten eine signifikante Zunahme des Scores bzw. der Proteinexpression von Filaggrin, im Mittel von 3 (\approx schwache Immunreaktivität) auf 8 (\approx mittelstarke Immunreaktivität) gezeigt werden, d.h. die Proteinexpression von Filaggrin stieg im Mittel um das 2,7-fache an ($p = 0,002$; $n = 15$).

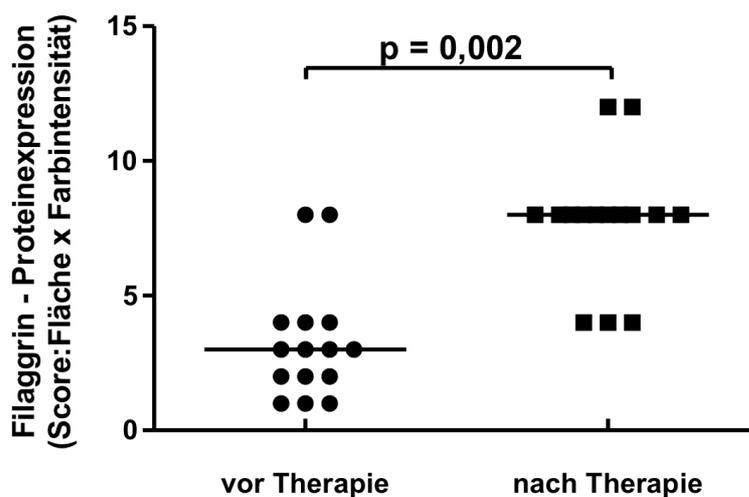


Abbildung 17: Darstellung der mittels Immunhistochemie bestimmten Veränderung der Proteinexpression von Filaggrin vor und nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median dargestellt ($p = 0,002$; $n = 15$). Ein Score von 0 bedeutet kein Nachweis von Filaggrin, ein Score von 1-3 bedeutet eine sehr schwache Immunreaktivität, ein Score von 4-6 eine schwache Immunreaktivität, ein Score von 7-9 eine mittelstarke Immunreaktivität und ein Score von 10-12 wird als eine starke Immunreaktivität gewertet.

Statistisch fand sich eine positive Korrelation zwischen der Genexpression von Profilaggrin und der Proteinexpression von Filaggrin (Korrelationskoeffizient nach Spearman: $r = 0,668$; siehe auch Kapitel 6.10).

Expression von Zytokeratin10

Vor Beginn und nach Abschluss der Alitretinointherapie wurde die Proteinexpression von Zytokeratin10 mittels Immunhistochemie bestimmt. Abbildung 18 zeigt exemplarisch die lichtmikroskopische Darstellung der immunhistochemischen Färbung mittels anti-Zytokeratin10-Antikörper vor und nach 27-wöchiger Alitretinointherapie.

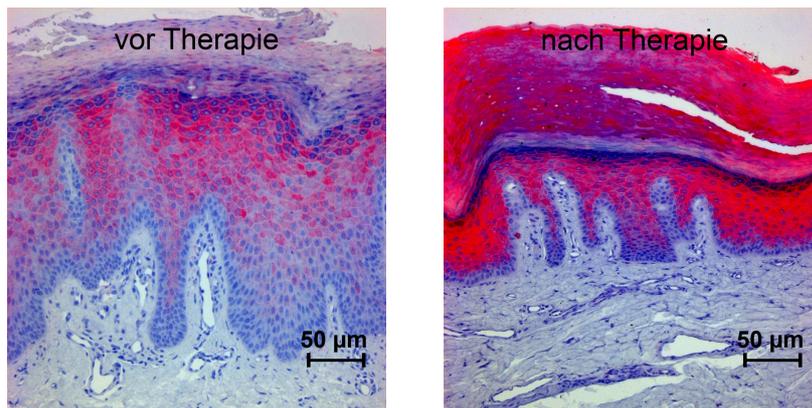


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung mittels anti-Zytokeratin10-Antikörper vor und nach 27-wöchiger Alitretinointherapie (100-fache Vergrößerung; Maßstab: 50µm). Es ist eine zyttoplasmatische Anfärbung vom Stratum spinosum bis zum Stratum corneum zu sehen. Beim Vergleich der beiden Aufnahmen ist eine verstärkte Zunahme der Farbintensität sichtbar, was mit einer Zunahme der Proteinexpression von Zytokeratin10 assoziiert ist.

Für Zytokeratin10 wurde die Fläche und Farbintensität vom Stratum spinosum bis einschließlich zum Stratum granulosum ausgewertet. Die Fläche der immunhistochemischen Färbung von Zytokeratin10 nahm bei 8 Patienten (53%) zu, blieb bei 6 Patienten (40%) konstant und nahm bei einem Patienten (7%) ab. Die Farbintensität blieb bei 8 Patienten (53%) konstant, stieg bei 5 Patienten (33%) an und nahm bei 2 Patienten (14%) ab.

Nach der Berechnung des Scores zur Beurteilung der Proteinexpression von Zytokeratin10 in der Immunhistochemie ließ sich bei 3 Patienten (20%) eine Abnahme der Proteinexpression, bei 5 Patienten (33%) eine konstante Expression und bei 7 Patienten (47%) eine Zunahme der Proteinexpression beobachten. Im Mittel war eine signifikante Zunahme des Scores bzw. der Proteinexpression von Zytokeratin10 von 6 (\approx schwache Immunreaktivität) auf 12 (\approx starke Immunreaktivität) feststellbar ($p=0,051$; $n=15$; siehe Abbildung 19).

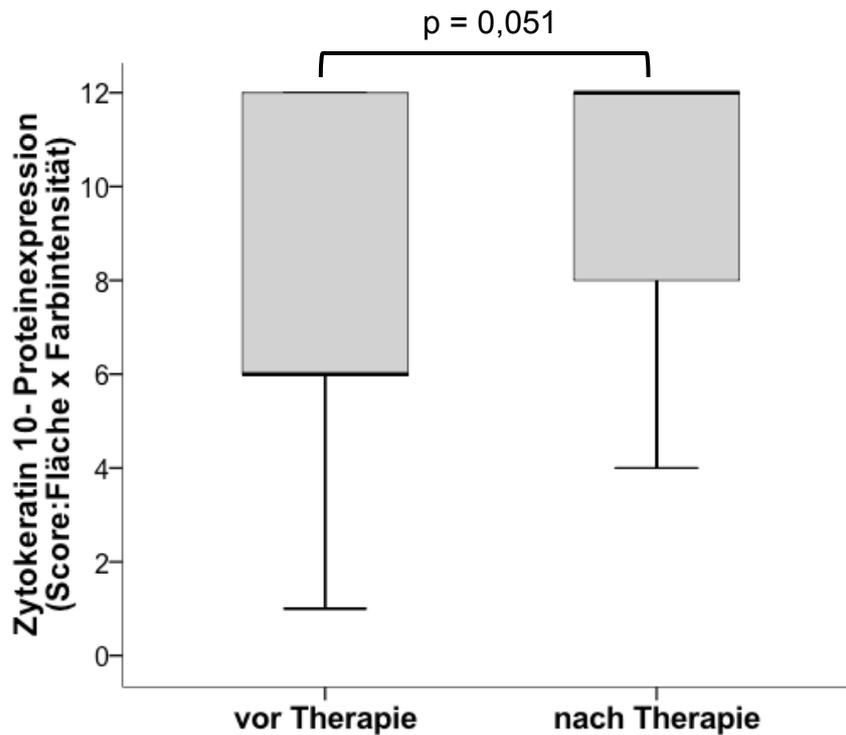


Abbildung 19: Veränderung der Proteinexpression von Zytokeratin10 vor und nach Alitretinointherapie. Die immunhistochemisch gewonnenen Daten sind als Boxplot mit Median dargestellt ($p = 0,051$; $n = 15$). Ein Score von 0 bedeutet kein Nachweis von Zytokeratin10, ein Score von 1-3 bedeutet eine sehr schwache Immunreaktivität, ein Score von 4-6 eine schwache Immunreaktivität, ein Score von 7-9 eine mittelstarke Immunreaktivität und ein Score von 10-12 wird als eine starke Immunreaktivität gewertet.

6.5.3 Proteine des Cornified Envelope

Expression von Loricrin

Die relative Genexpression von Loricrin wurde mittels qRT-PCR ermittelt und führte, wie in Abbildung 20 dargestellt, mit Ausnahme des Patienten mit der niedrigsten Alitretinoindosis (10mg alle 2 Tage) bei 12 von 13 Patienten (92%) zu einem signifikanten Anstieg ($p = 0,011$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten). Im Mittel zeigte sich ein 15,5-facher Anstieg der relativen Genexpression vor versus nach Alitretinointherapie (Md vor Therapie: 0,32; Md nach Therapie: 4,95).

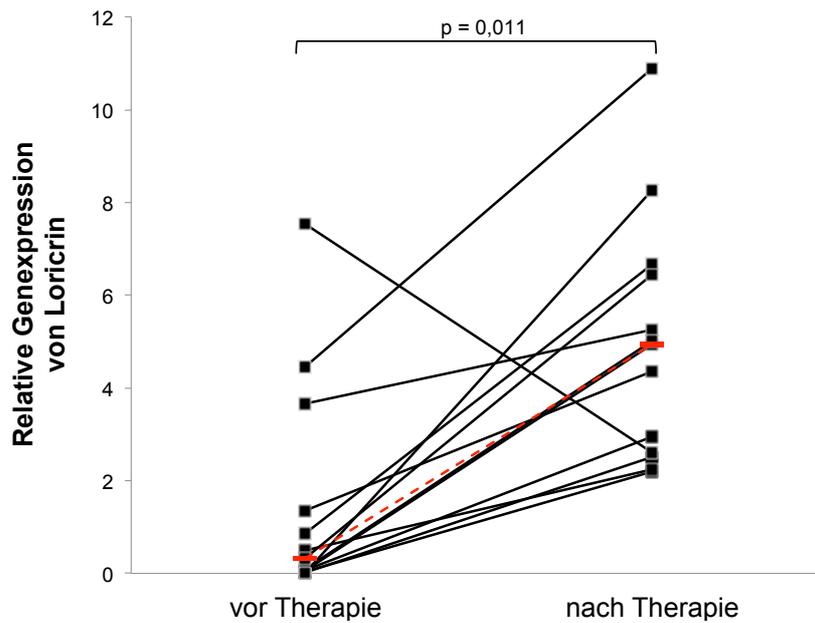


Abbildung 20: Veränderung der mittels qRT-PCR bestimmten relativen Genexpression von Loricrin vor versus nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt ($p = 0,011$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten).

Die Proteinexpression von Loricrin wurde ebenfalls direkt vor und nach Alitretinointherapie mittels Immunhistochemie bestimmt. Abbildung 21 zeigt exemplarisch die lichtmikroskopische Darstellung der immunhistochemischen Färbung mittels anti-Loricrin-Antikörper eines Patienten direkt vor und nach 22-wöchiger Alitretinointherapie.

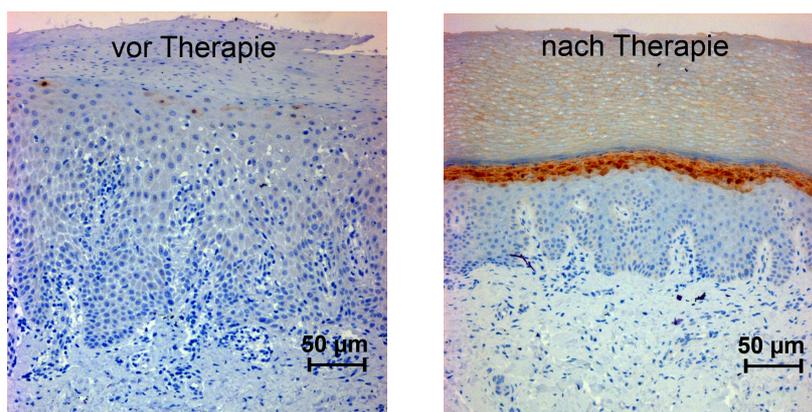


Abbildung 21: Lichtmikroskopische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung mittels anti-Loricrin-Antikörper vor und nach 22-wöchiger Alitretinointherapie (100-fache Vergrößerung; Maßstab: 50 µm). Es ist eine zytoplasmatische und nukleäre Anfärbung des Stratum granulosum zu sehen. Beim Vergleich der beiden Aufnahmen ist eine Zunahme der Farbintensität sichtbar. Dies weist auf eine verstärkte Proteinexpression von Loricrin hin.

Zur Auswertung der Proteinexpression von Loricrin in der Immunhistochemie wurde die Farbintensität und die betroffene Fläche des Stratum granulosums ausgewertet. Die angefärbte Fläche nahm bei 12 Patienten (80%) zu, blieb bei 2 Patienten (13%) konstant und nahm bei einem Patienten (7%) ab.

Die Farbintensität hingegen nahm bei 10 Patienten (67%) zu und blieb bei 5 Patienten (33%) konstant; eine Abnahme der Farbintensität konnte bei keinem Patienten festgestellt werden.

Nach Berechnung des Scores konnte, wie in Abbildung 22 zu sehen, eine hoch signifikante Zunahme der Proteinexpression von Loricrin bzw. des Scores im Mittel von 3 (\approx sehr schwache Immunreaktivität) auf 12 (\approx starke Immunreaktivität) festgestellt werden ($p = 0,002$; $n = 15$).

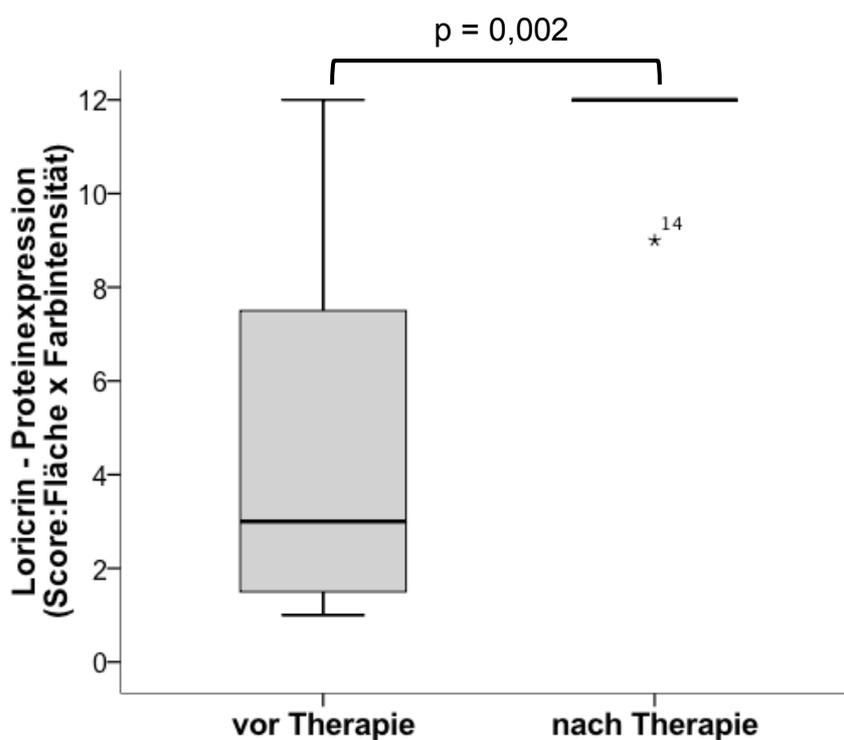


Abbildung 22: Veränderung der Proteinexpression von Loricrin vor und nach Alitretinointherapie. Die immunhistochemisch gewonnenen Daten sind als Boxplot mit Median dargestellt. Der Ausreißer (hier: Patient 14) ist mittels Sternchen markiert ($p = 0,002$; $n = 15$). Ein Score von 0 bedeutet kein Nachweis von Loricrin, ein Score von 1-3 bedeutet eine sehr schwache Immunreaktivität, ein Score von 4-6 eine schwache Immunreaktivität, ein Score von 7-9 eine mittelstarke Immunreaktivität und ein Score von 10-12 wird als eine starke Immunreaktivität gewertet.

Auch hier konnte eine positive Korrelation zwischen der Genexpression von Loricrin und der Proteinexpression von Loricrin bestimmt werden (Korrelationskoeffizient nach Spearman: $r = 0,757$; siehe auch Kapitel 6.10).

Expression von Transglutaminase1

Die Proteinexpression von Transglutaminase1 wurde direkt vor und nach Alitretinointherapie mittels Immunhistochemie bestimmt. Abbildung 23 zeigt beispielhaft die lichtmikroskopische Darstellung der immunhistochemischen Färbung mittels anti-Transglutaminase1-Antikörper direkt vor und nach 22-wöchiger Alitretinointherapie.

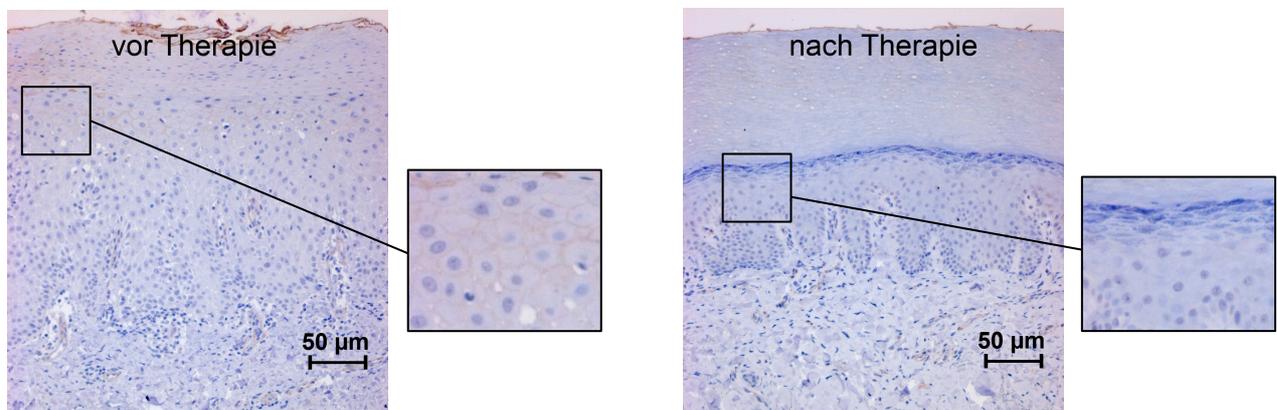


Abbildung 23: Lichtmikroskopische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung mittels anti-Transglutaminase1-Antikörper vor und nach 22-wöchiger Alitretinointherapie (100-fache Vergrößerung; Maßstab: 50µm). Es ist eine membranständige Färbung des Stratum granulosum und Stratum corneum zu sehen. Beim Vergleich der beiden Aufnahmen ist eine Abnahme der Farbtintensität sichtbar, was auf eine Abnahme der Proteinexpression von Transglutaminase1 hindeutet (siehe auch Bildausschnitte).

Um die Proteinexpression von Transglutaminase1 auszuwerten, wurde die Farbtintensität und die betroffene Fläche des Stratum granulosum ausgewertet. Insgesamt zeigte sich bei nur 4 von 15 Patienten (27%) eine sehr schwache Färbung des untersuchten Bereichs. Bei 11 von 15 Patienten (73%) war weder vor noch nach Therapie eine Färbung sichtbar, sodass im Mittel ein Score von 0 (\approx kein Nachweis von Transglutaminase1) erreicht wurde ($p = \text{n.s.}$; siehe Abbildung 24). Bei den 4 Patienten, die eine Färbung zeigten, kam es vor versus nach Alitretinointherapie zu einer Abnahme der Farbtintensität und der gefärbten Fläche.

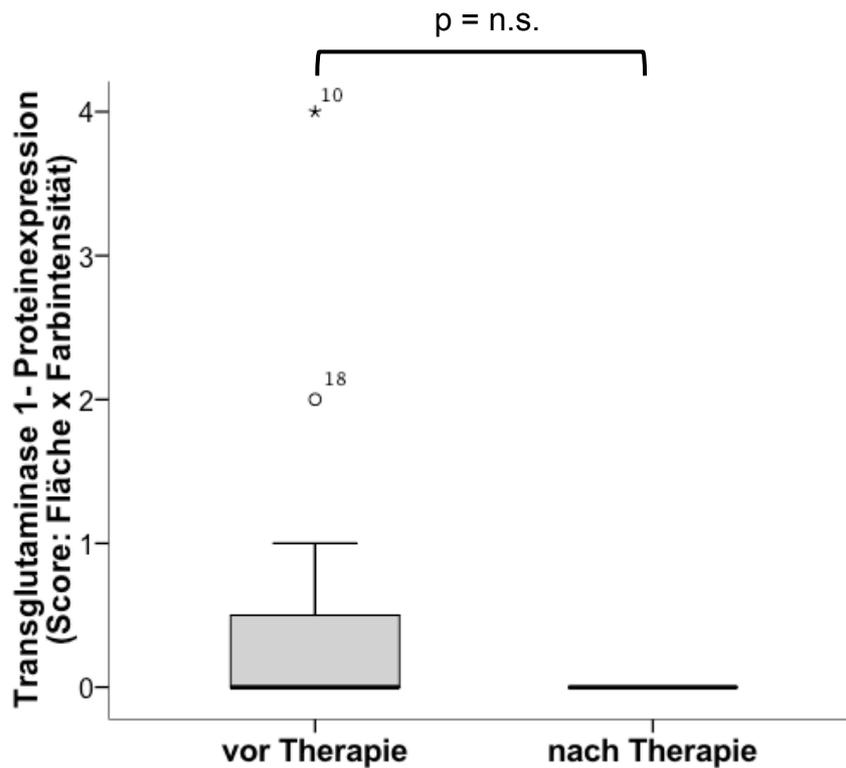


Abbildung 24: Darstellung der mittels Immunhistochemie bestimmten Veränderung der Proteinexpression von Transglutaminase1 vor und nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Boxplot mit Median dargestellt. Der Kreis und das Sternchen markieren den Ausreißer bzw. den Extremwert ($p = n.s.$; $n = 15$). Ein Score von 0 bedeutet kein Nachweis von Transglutaminase1, ein Score von 1-3 bedeutet eine sehr schwache Immunreaktivität, ein Score von 4-6 eine schwache Immunreaktivität, ein Score von 7-9 eine mittelstarke Immunreaktivität und ein Score von 10-12 wird als eine starke Immunreaktivität gewertet.

6.6 Expression von Ki67

Direkt vor und nach der Therapie mit Alitretinoin wurden die Ki67-positiven Zellen/Keratinozyten mittels Immunhistochemie bestimmt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte mittels MIB-1-Antikörper, der spezifisch das Ki67 Antigen anfärbt. Abbildung 25 zeigt exemplarisch die lichtmikroskopische Darstellung der Ki67-positiven Zellen vor und nach 8-wöchiger Alitretinointherapie.

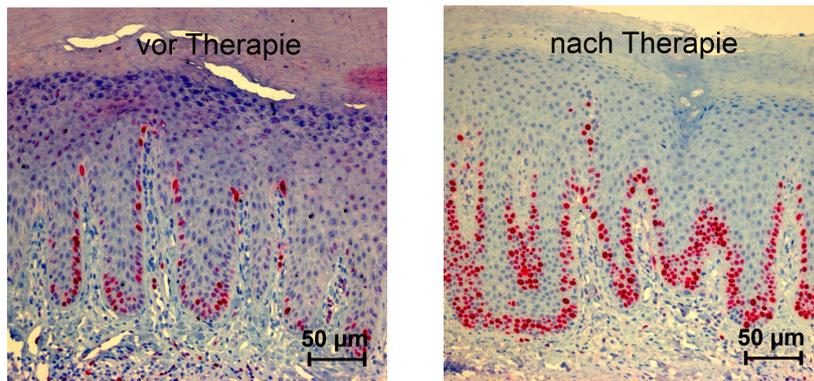


Abbildung 25: Lichtmikroskopische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von Ki67 vor und nach 8-wöchiger Alitretinointherapie (100-fache Vergrößerung; Maßstab: 50µm). Es sind nukleäre Färbungen im Stratum basale und im unteren Stratum spinosum zu sehen. Beim Vergleich der beiden Aufnahmen ist eine Zunahme der Ki67-positiven Zellen/Keratinocyten sichtbar.

Für die Auswertung der Ki67-positiven Zellen wurde ein repräsentativer Bereich der Epidermis ausgewählt, der das Stratum basale und das untere Stratum spinosum umfasste. In diesem Bereich wurden alle Ki67-positiven Zellen/Keratinocyten gezählt. Dann erfolgte eine Hochrechnung der Zellen auf eine Fläche von 0,1 mm².

Bei 10 Patienten (67%) nahm die Anzahl von Ki67-positiven Zellen zu, wohingegen es bei 5 Patienten (33%) zu einer Abnahme kam (Abbildung 26). Im Mittel nahm die Anzahl der Ki67-positiven Zellen von 126 auf 156 pro 0,1 mm² zu ($p = \text{n.s.}; n = 15$).

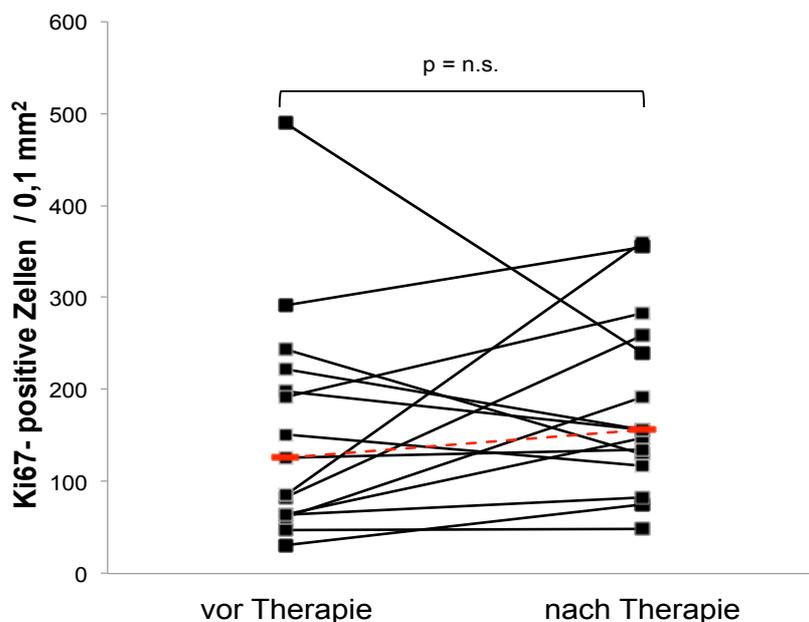


Abbildung 26: Darstellung der mittels Immunhistochemie bestimmten Veränderung der Ki67-positiven Zellen vor und nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt, ($p = \text{n.s.}; n = 15$).

6.7 Nachweis von CD3⁺-T-Zellen

Die Bestimmung von CD3⁺-T-Zellen erfolgte direkt vor und nach der Alitretinointherapie mittels Immunhistochemie unter Verwendung eines spezifischen anti-CD3-Antikörpers. Abbildung 27 zeigt exemplarisch die lichtmikroskopische Darstellung der mittels Immunhistochemie nachgewiesenen CD3⁺-T-Zellen vor und nach 10-wöchiger Alitretinointherapie.

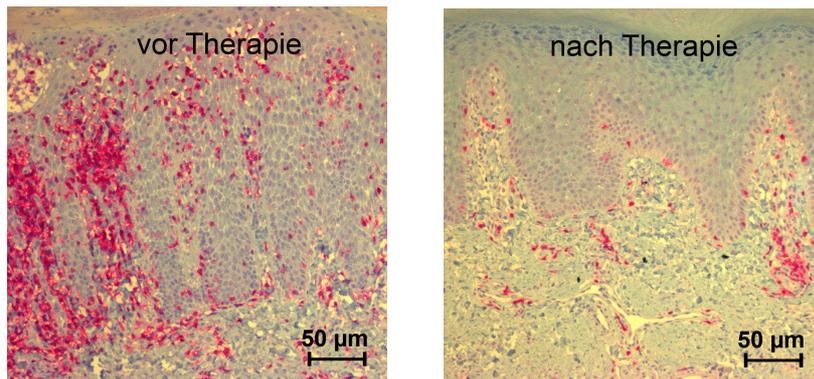


Abbildung 27: Lichtmikroskopische Darstellung der immunhistochemischen Färbung mittels anti-CD3-Antikörper vor und nach 10-wöchiger Alitretinointherapie (100-fache Vergrößerung; Maßstab: 50µm). Beim Vergleich der beiden Aufnahmen ist eine starke Abnahme der Anzahl von CD3⁺-T-Zellen zu erkennen.

Für die Auswertung der Anzahl von CD3⁺-T-Zellen wurde jeweils ein repräsentativer Bereich aus dem Stratum basale der Epidermis sowie dem Stratum papillare und dem oberen Stratum reticulare der Dermis ausgewählt. Es wurden alle angefärbten CD3⁺-T-Zellen in den beiden Bereichen gezählt und summiert. Dann erfolgte eine Hochrechnung der Zellen auf eine Fläche von 0,1mm².

Mit Ausnahme eines Patienten kam es bei allen Patienten zu einer signifikanten Abnahme der CD3⁺-T-Zellen verglichen vor versus nach Alitretinointherapie (siehe Abbildung 28). Im Mittel nahm die Anzahl der CD3⁺-T-Zellen um das 4,5-fache ab, d.h. von 208 auf 46 positive Zellen pro 0,1mm² ($p=0,001$; $n=15$).

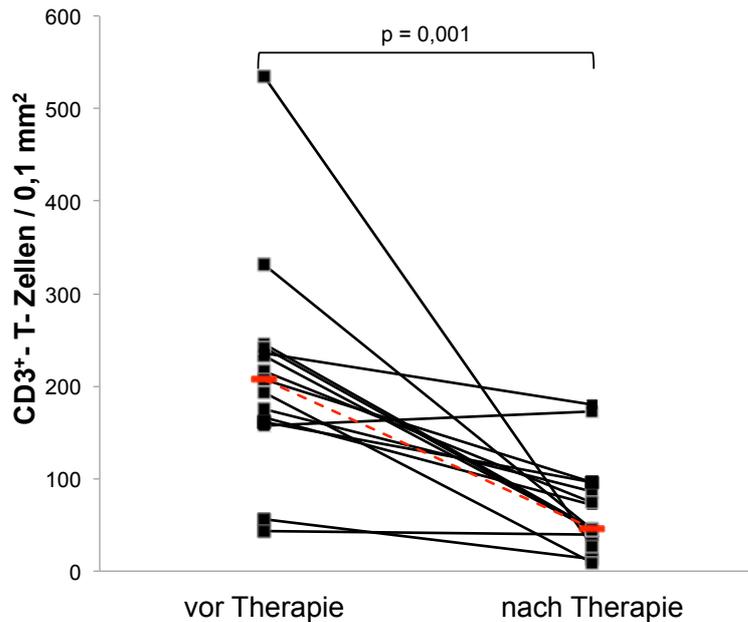


Abbildung 28: Darstellung der mittels Immunhistochemie bestimmten Veränderung der CD3⁺-T-Zellen vor versus nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt ($p = 0,001$; $n = 15$).

6.8 Expression des Thymic stromal lymphopietins (TSLP)

Die relative Genexpression von TSLP nahm in der qRT-PCR, wie in Abbildung 29 zu sehen, bei 8 von 13 Patienten (62%) ab und bei 5 von 13 Patienten (38%) zu ($p = \text{n.s.}$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten). Im Mittel zeigte sich eine 1,8-fache Abnahme der TSLP-Expression vor versus nach Alitretinointherapie (Md vor Therapie: 0,100 ; Md nach Therapie: 0,056).

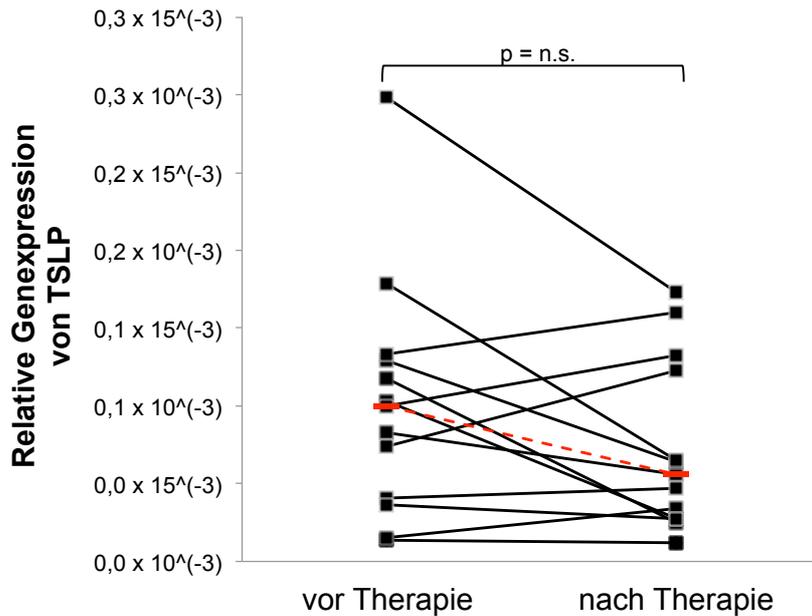


Abbildung 29: Darstellung der mittels qRT-PCR bestimmten relativen Genexpression von TSLP vor und nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt ($p = n.s.$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten).

Die Proteinexpression von TSLP wurde direkt vor und nach der Alitretinointherapie mittels Immunhistochemie bestimmt. Abbildung 30 zeigt beispielhaft die lichtmikroskopische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von TSLP direkt vor und nach 22-wöchiger Alitretinointherapie.

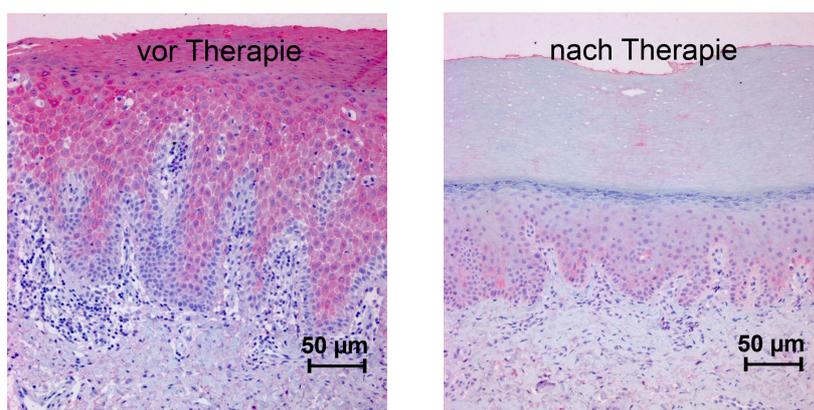


Abbildung 30: Lichtmikroskopische Darstellung einer immunhistochemischen Färbung mittels anti-TSLP-Antikörper vor und nach 22-wöchiger Alitretinointherapie (100-fache Vergrößerung; Maßstab: 50 μm). Es ist eine zytoplasmatische und nukleäre Färbung vom Stratum basale bis zum Stratum corneum zu erkennen. Beim Vergleich der beiden Aufnahmen ist eine starke Abnahme der Farbintensität sichtbar, was auf eine Abnahme der Proteinexpression von TSLP hindeutet.

Zur Beurteilung der Proteinexpression von TSLP in der Immunhistochemie wurde der angefärbte Bereich vom Stratum basale bis einschließlich zum Stratum granulosum ausgewertet. Die Fläche der immunhistochemischen Färbung von TSLP nahm bei 13 Patienten (87%) ab und blieb bei 2 Patienten (13%) konstant. Die Farbintensität nahm bei 12 Patienten (80%) ab und blieb bei 3 Patienten (20%) konstant.

Nach Berechnung des Scores zur Beurteilung der Proteinexpression von TSLP in der Immunhistochemie, ließ sich bei 13 Patienten (87%) eine Abnahme feststellen, wohingegen bei 2 Patienten (13%) der Score bzw. die Proteinexpression konstant blieb ($p = 0,001$; $n = 15$). Im Mittel war eine signifikante Abnahme des Scores von 8 (\approx mittelstarke Immunreaktivität) auf 2 (\approx sehr schwache Immunreaktivität) feststellbar (siehe Abbildung 31).

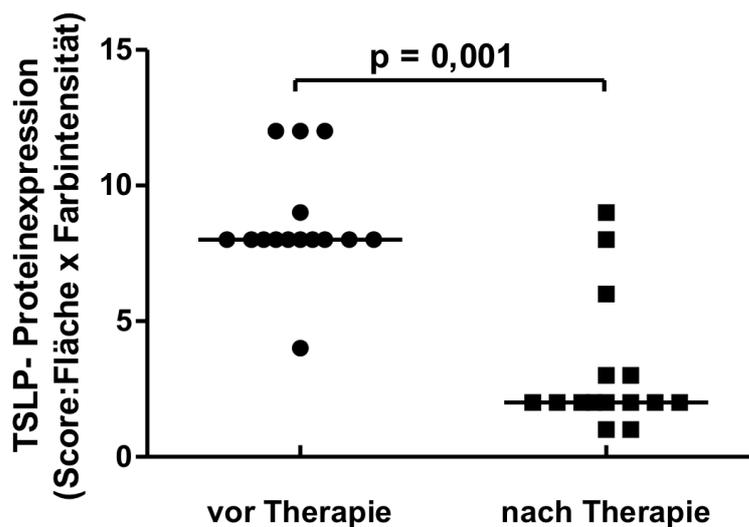


Abbildung 31: Darstellung der mittels Immunhistochemie bestimmten Veränderung der Proteinexpression von TSLP vor und nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median dargestellt ($p = 0,001$; $n = 15$). Ein Score von 0 bedeutet kein Nachweis von TSLP, ein Score von 1-3 bedeutet eine sehr schwache Immunreaktivität, ein Score von 4-6 eine schwache Immunreaktivität, ein Score von 7-9 eine mittelstarke Immunreaktivität und ein Score von 10-12 wird als eine starke Immunreaktivität gewertet.

Die Korrelation zwischen der Gen- und Proteinexpression von TSLP war nicht signifikant (Korrelationskoeffizient nach Spearman: $r = 0,155$).

6.9 Expression von Interleukin-36 γ

Die mittels qRT-PCR bestimmte relative Genexpression von Interleukin-36 γ (IL-36 γ) ist in Abbildung 32 dargestellt und zeigt bei 10 von 13 Patienten (77%) eine Zunahme und bei 3 von 13 Patienten (23%) eine Abnahme der Expression vor versus nach Alitretinointherapie ($p = 0,055$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten). Im Mittel stieg die relative Genexpression von 51×10^{-4} auf 85×10^{-4} , d.h. um das 1,7-fache.

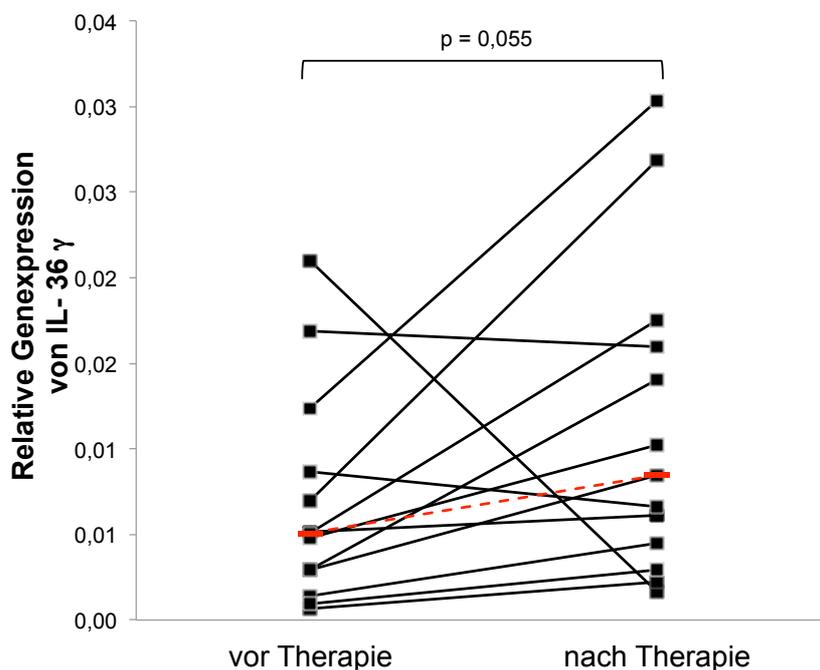


Abbildung 32: Darstellung der mittels qRT-PCR bestimmten relativen Genexpression von Interleukin-36 γ vor und nach Alitretinointherapie. Die Daten sind als Einzelpunkte mit Median (in rot) dargestellt ($p = 0,055$; $n = 13$; fehlende Messwerte von 2 Patienten).

6.10 Korrelationen zwischen den Untersuchungsparametern

Um mögliche Interaktionen zwischen den untersuchten Parametern festzustellen, wurden die Befunde der Einzelparameter miteinander statistisch korreliert. Wie in Tabelle 14 zu sehen, treten die meisten positiven Korrelationen bei Filaggrin und Loricrin auf. Claudin1, Occludin, Zytokeratin10 und Filaggrin bzw. Loricrin korrelieren positiv mit Loricrin bzw. Filaggrin. Daneben bestehen auch positive Korrelationen zwischen der Genexpression und der Proteinexpression von Filaggrin bzw. Loricrin,

d.h., eine Erhöhung der Genexpression von Filaggrin bzw. Loricrin führt zu einer erhöhten Proteinexpression von Filaggrin bzw. Loricrin und umgekehrt (Korrelationskoeffizient nach Spearman: $r = 0,668$ bzw. $r = 0,757$).

Die CD3⁺-T-Zellen und der modifizierte Manuscore hingegen korrelieren vorwiegend negativ mit den hier aufgeführten Strukturproteinen. Je geringer der Schweregrad des Handekzems bzw. der Anteil an CD3⁺-T-Zellen in der Hautbiopsie ist, desto höher ist die Expression der Strukturproteine.

Tabelle 14: Korrelationen nach Spearman. Die Tabelle zeigt Korrelationen zwischen Tight Junction-Proteinen, intermediären Filamenten des Zytoskeletts, Proteinen des Cornified Envelope, dem modifizierten Manuscore und CD3⁺-T-Zellen. Bei einem gelben Feld besteht keine Korrelation, ein grünes Feld zeigt eine positive Korrelation und ein rotes Feld zeigt eine negative Korrelationen zwischen zwei Parametern. Die Sternchen (*/**) beschreiben das Signifikanzniveau; für die Tabelle verwendete Abkürzungen werden in der Legende unterhalb der Tabelle beschrieben.

	mod. Ms	Cl1 (GE)	Ocl (GE)	Flg (GE)	Lor (GE)	Cl1 (PE)	Flg (PE)	ZK10 (PE)	Lor (PE)	CD3 ⁺ (PE)
mod. Ms		*	*	**	*		**		**	**
Cl1 (GE)	*		**				*		*	*
Ocl (GE)	*	**					**		**	**
Flg (GE)	**				**	**	**	**	**	**
Lor (GE)	*			**		**	**	**	**	**
Cl1(PE)				**	**		*	**	*	
Flg (PE)	**	*	**	**	**	*		*	**	**
ZK10 (PE)				**	**	**	*		**	
Lor (PE)	**	*	**	**	**	*	**	**		**
CD3 ⁺ (PE)	**	*	**	**	**		**		**	

gelb = keine Korrelation

grün = positive Korrelation

rot = negative Korrelation

* auf dem 0,05 Niveau signifikant

** auf dem 0,01 Niveau signifikant

mod. Ms = modifizierter Manuscore

Cl1 = Claudin1

Ocl = Occludin

Flg = Filaggrin

Lor = Loricrin

ZK10 = Zytokeratin10

GE = Genexpression

PE = Proteinexpression

Eine Korrelation zwischen der Veränderung des modifizierten Manuscores unter Alitretinointherapie (hier: Punktwert des modifizierten Manuscores vor der Therapie vom Punktwert des modifizierten Manuscores nach der Therapie abgezogen) und dem

Körpergewicht, der Körpergröße oder dem Alter konnte nicht festgestellt werden (Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,502$, $r = 0,484$, $r = 0,110$).

Es ließ sich jedoch eine positive Korrelation zwischen der Erkrankungsdauer und dem modifizierten Manuscore darstellen. Je kürzer die Erkrankungsdauer des chronischen Handekzems war, desto kleiner war der modifizierte Manuscore nach der Therapie (Korrelationskoeffizient nach Pearson: $r = 0,751$).

7 Diskussion

7.1 Klinischer Verlauf und transepidermaler Wasserverlust unter Alitretinointherapie

Wie bereits in verschiedenen Studien untersucht, zeigen auch die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit, dass Alitretinoin ein effektives und gut verträgliches systemisches Therapeutikum bei schwerem, chronischem (hyperkeratotisch-rhagadiformen) Handekzem ist [60].

Die zulassungsrelevante Phase-3-Studie (BACH-Studie) mit 1032 Patienten zeigte eine Reduktion der Handekzemsymptomatik im Mittel um 75% bei einer täglichen Dosis von 30mg Alitretinoin für 24 Wochen. Bei 48% der Patienten heilte das Handekzem fast vollständig bzw. vollständig ab [60]. Die mit 680 Patienten durchgeführte TOCCATA-Studie zeigte bei 57% eine fast vollständige bzw. vollständige Abheilung des Handekzems [63]. Bei beiden Studien war das Ansprechen des hyperkeratotisch-rhagadiformen Handekzems im Vergleich zu anderen Handekzemformen unter Alitretinointherapie am besten [60, 63].

Die bereits publizierten Ergebnisse sind mit den Befunden dieser Arbeit vergleichbar, wobei zu berücksichtigen ist, dass in der vorliegenden Untersuchung ausschließlich Patienten mit hyperkeratotisch-rhagadiformen Handekzemen untersucht wurden. Mit Ausnahme von zwei Patienten konnte bei allen untersuchten Patienten eine signifikante Besserung der Handekzemsymptomatik beobachtet werden, die sich in einer Abnahme des modifizierten Manuscores widerspiegelte. Bei 73% der untersuchten Patienten heilte das Handekzem sogar vollständig ab. Es besteht die Möglichkeit, dass bei den zwei Patienten mit einer Zunahme des modifizierten Manuscores eventuell ein kontaktallergisches Ekzem vorlag und während der Therapie eine hohe Allergenexposition bestand. Da die Einnahme von Alitretinoin nicht unter Aufsicht erfolgte, können ebenfalls Einnahmefehler bzw. ein Versäumnis der Einnahme nicht sicher ausgeschlossen werden. Es ist bekannt, dass die Spitzenplasmaspiegel (C_{max}) von Alitretinoin um das Vierfache höher sind, wenn Alitretinoin wie empfohlen zu einer fetthaltigen Mahlzeit eingenommen wird [87].

Wie bereits in vorhergehenden Studien gezeigt, bestand bezüglich der im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Daten kein Zusammenhang zwischen dem Alter, der Körpergröße oder dem Körpergewicht und dem Ansprechen auf die Alitretinointherapie

bzw. dem modifizierten Manuscore [50, 51]. Jedoch konnte eine positive Korrelation zwischen der Erkrankungsdauer des chronischen Handekzems und dem modifizierten Manuscore nach der Therapie bzw. der klinischen Wirksamkeit der Alitretinointherapie festgestellt werden. Wie bereits in der TOCCATA-Studie beschrieben war bei einer kurzen Erkrankungsdauer der Therapieerfolg der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Alitretinointherapie höher als bei einer langen Erkrankungsdauer [63].

Der transepidermale Wasserverlust (TEWL) bestimmt den Wasserverlust über die Haut und ist bei Störungen der epidermalen Hautbarriere pathologisch erhöht [73, 74]. Bei der Messung des TEWLs zeigten sich keine signifikanten Änderungen: Bei 42% der untersuchten Patienten nahm der TEWL ab und bei 58% der untersuchten Patienten nahm der TEWL zu.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Jungerstedt et al. überein, die bei Patienten mit chronischem Handekzem ebenfalls keine signifikanten Veränderungen beim TEWL nach zweimonatiger systemischer Therapie mit 30mg Alitretinoin verglichen mit TEWL-Werten vor der Therapie, feststellen konnten [70]. Hingegen zeigt die Studie von Stücker et al., in welcher der Einfluss von topischen Retinoiden wie beispielsweise Tazaroten auf den TEWL von Patienten mit Psoriasis untersucht wurde, eine Zunahme des TEWLs [88]. Da Alitretinoin im Vergleich zu anderen Retinoiden nicht so austrocknend auf Haut und Schleimhäute wirkt, ist ein Anstieg des TEWLs nach der Alitretinointherapie nicht zu erwarten [62, 65]. Andere Retinoide wie beispielsweise Tazarotene führen hingegen zu einer verminderten Sebumsekretion bzw. einer erhöhten Austrocknung der Haut, sodass ein erhöhter TEWL nach der Therapie zu erwarten ist [65]. Es ist jedoch zu diskutieren, inwiefern die Krankheitsentität Handekzem versus Psoriasis den TEWL beeinflusst.

Es sollte berücksichtigt werden, dass bei den hier aufgeführten Untersuchungen zum TEWL stabile Versuchsbedingungen wie eine konstante Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit nicht sicher eingehalten werden konnten. Daneben könnten weitere Störfaktoren wie die emotionale Erregung des Patienten, vorheriges Eincremen oder Waschen der Hände Einfluss auf die Messung des TEWLs genommen haben.

Eine Korrelation zwischen dem modifizierten Manuscore, d.h. dem klinischen Schweregrad des Handekzems und dem TEWL konnte nicht festgestellt werden.

7.2 Einfluss der Alitretinointherapie auf die Epidermisdicke

Die histologischen Untersuchungen der Epidermis zeigten durchschnittlich eine 1,7-fache (signifikante) Abnahme der Epidermisdicke bei allen Patienten nach gegenüber vor der Alitretinointherapie. Die Messung der Epidermisdicke erfolgte vom Stratum basale bis einschließlich zum Stratum granulosum. Die Alitretinointherapie führte zu einer Abnahme der Epidermisdicke bzw. Epidermishyperplasie, die ein typisches histologisches Merkmal chronischer Ekzeme ist [89].

Dieses Ergebnis ist auf die bereits bekannten regulierenden Eigenschaften von Retinoiden wie die Regulation der Proliferation zurückzuführen [62, 90]. Die lokale Behandlung von gesunden Probanden mit all-trans-Retinsäure oder die lokale Behandlung von gesunden Mäusen mit 9-cis-Retinsäure (Alitretinoin) führte zu einer Proliferation von Keratinozyten mit gleichzeitiger Zunahme der Anzahl an epidermalen Zellschichten und der Epidermisdicke [91, 92]. Im Gegensatz dazu kam es bei psoriatischen in vitro-Hautmodellen im Vergleich zu gesunden in vitro-Hautmodellen zu einer Abnahme der Epidermisdicke nach der Behandlung mit Retinsäure [93]. Je nachdem, ob Retinoide bei bereits proliferierendem Gewebe wie beispielsweise psoriatischer/ ekzematöser Haut oder bei gesunder Haut angewendet werden, führen sie demnach wahrscheinlich zu einer Ab- oder Zunahme der Epidermisdicke.

7.3 Einfluss der Alitretinointherapie auf die Hautbarriere

Aktuelle Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die Hautbarriere eine Schlüsselfunktion für die Therapie des Handekzems darstellt [45, 46]. Vorangehende Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigen, dass Alitretinoin inflammatorische T-Zell-Zytokine beim chronischen Handekzem herunterreguliert [69]. Untersuchungen zum Einfluss einer systemischen Alitretinointherapie auf die Hautbarriere beim chronischen Handekzem liegen bisher nicht vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Alitretinoin auf Strukturproteine wie Tight Junction-Proteine, intermediäre Filamente des Zytoskeletts und Proteine des Cornified Envelope untersucht. Daneben wurde die Expression des Proliferationsmarkers Ki67, die Expression von Entzündungszellen (CD3⁺-T-Zellen)

sowie der Entzündungsmarker TSLP und IL-36 γ vor und nach der Therapie mit Alitretinoin untersucht.

7.3.1 Strukturproteine

Tight Junction-Proteine

Tight Junction-Proteine spielen eine wichtige Rolle für die Hautbarriere, da sie die Interzellularräume als selektive, parazelluläre Barriere für Wasser, Ionen und Makromoleküle abdichten [9]. Daneben wird vermutet, dass eine erniedrigte Expression von Tight Junction-Proteinen wie Claudin1 die Penetration von Allergenen erleichtert und die Entzündungsreaktion beim Handekzem dadurch getriggert wird [9].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen eine signifikante Zunahme der Gen- und Proteinexpression von Claudin1 und eine signifikante Zunahme der Genexpression von Occludin unter Alitretinointherapie. Die Genexpression von Claudin2 zeigt hingegen keine signifikanten Veränderungen. Sie nahm bei 50% der untersuchten Patienten ab und bei 50% der Patienten zu.

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung von Claudin1 zeigt, dass sich die Zahl positiver Zellen (vom Stratum basale bis zum Stratum granulosum) in der immunhistochemischen Färbung bei bis zu 75% der Patienten unter Alitretinointherapie nicht veränderte, wohingegen die Farbtintensität zunahm. Dies deutet darauf hin, dass beim chronischen Handekzem eine gleichmäßige Herunterregulierung von Claudin1 vorliegt und nicht in einigen Epidermisschichten Claudin1 mehr herunterreguliert wird als in anderen.

Es war jedoch auffällig, dass die immunhistochemische Färbung von Claudin1 in der Nähe von Entzündungszellen, welche die Epidermis infiltrierten, schwächer war. Dies deutet auf eine geringere Proteinexpression von Claudin1 in der Nähe von Entzündungszellen hin. Eine Herunterregulierung von Claudin1 in direkter Nähe zu Entzündungszellen wie beispielsweise einwandernden neutrophilen Granulozyten wurde auch für Darmepithel bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (u.a. Colitis ulcerosa und Morbus Crohn) beschrieben [94].

Der in dieser Arbeit festgestellte inverse Zusammenhang zwischen der Anzahl von CD3⁺-T-Zellen und der Genexpression von Tight Junction-Proteinen wie Claudin1 und Occludin unterstreichen die Vermutung, dass Inflammationszellen bzw. von diesen

Zellen sezernierte Zytokine zu einer Herunterregulierung von Tight Junction-Proteinen wie Claudin1 führen können.

Veränderungen der Gen- und/oder Proteinexpression der Tight Junction-Proteine Claudin1 und 2 sind für das chronische Handekzem in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass entzündliche Hauterkrankungen wie die Psoriasis und die atopische Dermatitis mit einer verminderten Expression von Claudin1 in betroffener Haut, bei der atopischen Dermatitis zusätzlich auch in nicht betroffener Haut, einhergehen [9, 95]. Für Claudin2 konnte im Vergleich zu gesunder Haut eine erhöhte Expression bei aktinischen Keratosen (aktinische Präkanzerose) und Plattenepithelkarzinomen der Haut festgestellt werden [16].

Untersuchungen zum Einfluss einer systemischen Alitretinointherapie auf die Gen- bzw. Proteinexpression von Tight Junction-Proteinen beim chronischen Handekzem liegen in der Literatur bisher nicht vor. Jedoch sind Ergebnisse von in vitro-Untersuchungen mit all-trans-Retinsäure (Tretinoin) publiziert, das wie Alitretinoin den Retinoiden (Vitamin A-Derivaten) zugeordnet wird.

Telgenhoff et al. zeigten, dass all-trans-Retinsäuren dosisabhängig die Expression von Claudin2 in primären humanen epidermalen Keratinozyten (NHEK) steigerte [96]. Bei murinen embryonalen Karzinomzellen (sogenannten F9 Zellen) führte die Inkubation mit all-trans-Retinsäure über 10 Tage ebenfalls zu einem (geringen) Anstieg der Claudin2-mRNA-Expression, wohingegen die Expression von Claudin1-mRNA in der RT-PCR unverändert war [97]. Hatakeyama et al. konnten mit Hilfe eines in vitro-Zellkulturmodells mit murinen Epithelzellen der Mundschleimhaut zeigen, dass eine 5-tägige Exposition mit all-trans-Retinsäure zu einer signifikanten Reduktion der Claudin1-mRNA-Expression führte [98]. Dagegen zeigten Osanai et al. einen signifikanten zeitabhängigen Anstieg der Expression von Claudin1-mRNA in MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney epithelial cells: aus einem gesunden Hund gewonnene Nierenzellen) in der Zellkultur nach der Inkubation mit all-trans-Retinsäure bis zu 5 Tage [99].

Die hier vorliegenden Ergebnisse stimmen mit den Befunden der Arbeitsgruppe von Osanai überein, die ebenfalls einen Anstieg der mRNA-Expression von Claudin1 nach Behandlung mit einem Vitamin A-Derivat (hier: all-trans-Retinsäure) feststellten. Die voneinander abweichenden Ergebnisse sind vermutlich auf den unterschiedlichen Ursprung der verwendeten Zellen zurückzuführen. Telgenhoff et al. verwendeten

primäre humane epidermale Keratinozyten, wohingegen Hatakeyama et al. sowie Kubota et al. Zellen von Mäusen verwendeten und Osanai et al. MDCK-Zellen für die Untersuchungen heranzogen. Im Gegensatz dazu wurden für die hier vorliegenden Untersuchungen keine Zellen, sondern ekzematöses Gewebe von Patienten mit chronischem Handekzem verwendet.

Ein weiterer gravierender Unterschied zu den bereits publizierten Daten ist, dass es sich bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nicht um in vitro-Untersuchungen, sondern um ex vivo-Untersuchungen von Proben, die von mit Alitretinoin therapierten Patienten gewonnen wurden, handelt. Daneben verwendeten die anderen Arbeitsgruppen für die Untersuchungen all-trans-Retinsäure, während für die hier vorliegende Untersuchung 9-cis-Retinsäure (Alitretinoin) eingesetzt wurde.

Das Tight Junction-Protein Occludin zeigte im Mittel eine 2,7-fache Zunahme der Genexpression vor versus nach Alitretinointherapie. In der Literatur wurde bisher nicht beschrieben, ob eine veränderte Gen- und/oder Proteinexpression von Occludin beim Handekzem auftritt.

Es ist jedoch bekannt, dass eine Besiedlung der Haut mit Staphylokokken wie sie beispielsweise bei der Impetigo contagiosa auftritt, einer hochansteckenden bakteriellen vor allem bei Kindern auftretenden Hauterkrankung, zu einer Herunterregulation von Occludin im Bereich der Pathogeninvasion führt [100]. Da Patienten mit chronischem Handekzem häufig eine erhöhte Besiedlung mit Staphylokokken aufweisen, ist zu vermuten, dass diese Besiedlung wie bei der Impetigo contagiosa zu einer Herunterregulation der Occludinexpression beim chronischen Handekzem führt [101]. Da die in dieser Arbeit untersuchten Proben von Patienten mit chronischem Handekzem nicht mit gesunder Haut verglichen wurden, kann keine Aussage bezüglich einer veränderten Occludinexpression beim Handekzem gegenüber gesunder Haut getroffen werden. Die hier vorliegenden Daten zeigen jedoch erstmals, dass eine systemische Alitretinointherapie zu einer verstärkten mRNA-Expression von Occludin bei Patienten mit chronischem Handekzem führt.

Bei Patienten mit Psoriasis oder Lichen planus (Knötchenflechte) wurde beobachtet, dass Occludin nicht wie in gesunder Haut nur im Stratum corneum und im Stratum granulosum der Epidermis vorhanden ist, sondern ebenfalls im Stratum spinosum auftritt [102]. Ob bei Patienten mit chronischem Handekzem ebenfalls eine auf das

Stratum spinosum verbreiterte Occludin-Expression vorliegt, muss noch untersucht werden.

Der Einfluss von Alitretinoin auf die Gen- bzw. Proteinexpression von Occludin wurde bisher nicht untersucht. Es liegen jedoch in vitro-Untersuchungen zum Einfluss von all-trans-Retinsäure auf die Genexpression von Occludin vor. Dort wurde gezeigt, dass all-trans-Retinsäure zu einem Anstieg der mRNA-Expression von Occludin führt [97-99]. Die Ergebnisse stimmen mit den Befunden dieser in vivo-Untersuchungen überein, wo Alitretinoin zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von Occludin in läsionaler Haut führte.

Intermediäre Filamente des Zytoskeletts

Filaggrin bewirkt als sogenanntes **Filament aggregating Protein** eine Aggregation von Keratinfilamenten und trägt somit zur Ausbildung der intakten dicht gepackten Hornschicht des Stratum corneums bzw. einer intakten Hautbarriere bei [3, 27]. Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen eine signifikante Zunahme der Gen- und Proteinexpression von Filaggrin nach systemischer Alitretinointherapie.

Bisher liegen keine Untersuchungen vor, aus denen hervorgeht, dass das chronische Handekzem mit einer pathologisch veränderten Filaggrin-Expression einhergeht. Vorliegende Studien zeigen lediglich, dass Patienten mit atopischer Dermatitis und gleichzeitiger Filaggrin-Mutation im Vergleich zu Patienten ohne Mutation vermehrt am irritativen und allergischen Handekzem sowie dem chronisch irritativen Handekzem erkranken [46, 103].

De Jongh et al. sowie Molin et al. beobachteten einen signifikanten Zusammenhang zwischen Trägern von Filaggrin-Mutationen und dem Auftreten irritativer bzw. allergischer Kontaktdermatitis, die ebenfalls zum Handekzem führt [46, 103]. Learbaek et al. zeigten hingegen, dass sich kein Zusammenhang zwischen Filaggrin-Null-Mutationsträgern und einer Kontaktallergie herstellen lässt [104]. Das abweichende Ergebnis ist eventuell auf die große bevölkerungsbezogene Kontrollgruppe zurückzuführen. Alle 3 Arbeitsgruppen waren sich jedoch einig, dass kein allgemeiner Zusammenhang zwischen Filaggrin-Null-Mutationsträgern und dem Auftreten eines Handekzems besteht, jedoch heterozygote Mutationsträger des Filaggrin-Gens eine gestörte Hautbarriere aufweisen, sodass die Penetration von Allergenen erleichtert wird [46, 103, 104].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der Literatur bisher keine eindeutigen Aussagen zu finden sind, die bestätigen oder widerlegen, dass ein Handekzem mit einer verminderten Expression von Filaggrin einhergeht. Festzuhalten ist allerdings, dass eine verminderte Filaggrin-Expression zu einer gestörten Hautbarriere, wie sie beim chronischen Handekzem auftritt, führt.

Besonders interessant ist, dass beim Fehlen von Filaggrin bzw. bei Filaggrin-Null-Mutationsträgern das Handekzem mit einem bestimmten Phänotyp einhergeht. Kaae et al. zeigten, dass bei Patienten mit Filaggrin-Mutationen vor allem die Handrücken und Rückseiten der Finger vom Ekzem betroffen sind [105]. Dies sind Bereiche, die besonders stark Umweltfaktoren wie Wind und UV-Strahlung ausgesetzt sind. Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe von Kaae zeigten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten die Ekzeme in den Handinnenflächen und den Innenseiten der Finger. Daher ist zu vermuten, dass die in diese Studie eingeschlossenen Patienten keine Träger von Filaggrin-Null-Mutationen sind. Diese Vermutung bestätigt auch die Tatsache, dass bei den meisten Patienten nach Alitretinointherapie ein Anstieg der Filaggrin-Expression auftrat. Um diesbezüglich eine genaue Aussage treffen zu können, müssten die in diese Studie eingeschlossenen Probanden genetisch auf das Vorhandensein von Filaggrin-Mutationen untersucht werden.

Daneben zeigten Thyssen et al. sowie Flohr et al., dass Träger von Filaggrin-Mutationen bzw. Patienten mit einer erniedrigten Filaggrin-Expression in der Regel einen früheren Erkrankungsbeginn und eine längere Persistenz des Handekzems aufweisen [106, 107]. Diese Ergebnisse ließen sich in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigen. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei Therapiebeginn bei 57 Jahren und die Erkrankungsdauer des chronischen Handekzems lag im Mittel bei 3,4 Jahren. Das abweichende Ergebnis ist möglicherweise auf die niedrige Probandenzahl zurückzuführen. Daneben wurde die Filaggrin-Expression in der Haut von den Patienten mit chronischem Handekzem nicht mit der Filaggrin-Expression in gesunder Haut verglichen, sodass diesbezüglich keine Aussage getroffen werden kann.

Untersuchungen zum Einfluss einer systemischen Alitretinointherapie auf die Gen- bzw. Proteinexpression von Filaggrin beim chronischen Handekzem liegen in der Literatur bisher nicht vor. Bernard et al. untersuchten den Einfluss von Alitretinoin auf die Expression von Filaggrin in rekonstruierter humaner Epidermis (RHE) und konnten eine

Herunterregulation der Filaggrin-mRNA-Expression durch Alitretinoin feststellen [108]. Eine weitere Arbeitsgruppe stellte ebenfalls eine supprimierte Filaggrin-mRNA-Expression in primären humanen Keratinozyten nach Behandlung mit all-trans-Retinsäure (Tretinoin) fest [109]. Die Arbeitsgruppe von Jean et al. untersuchte den Einfluss von all-trans-Retinsäure auf psoriatische Hautmodelle, die mittels Hautproben von an Psoriasis erkrankten Patienten in vitro hergestellt wurden [93]. Sie stellten eine verminderte Proteinexpression von Filaggrin in den immunhistochemisch untersuchten psoriatischen Hautmodellen fest [93]. Nach Behandlung dieser psoriatischen Hautmodelle mit all-trans-Retinsäure konnte eine verstärkte Proteinexpression von Filaggrin gefunden werden, welche der Proteinexpression von Filaggrin in gesunder Haut entsprach [93]. Im Gegensatz dazu zeigten Hautmodelle, die mit Hilfe von gesunden humanen Keratinozyten in vitro hergestellt wurden, keine Veränderung der Proteinexpression von Filaggrin nach einer Behandlung mit Retinsäure [93].

Die hier gewonnenen Daten sind mit dem Ergebnis von Jean et al. vergleichbar, da hier auch eine erhöhte Gen- bzw. Proteinexpression von Filaggrin nach der Alitretinointherapie gefunden wurde [93]. Jedoch weichen die hier vorliegenden Ergebnisse von den Resultaten der Arbeitsgruppe von Bernard et al. ab, die eine verminderte Filaggrin-mRNA-Expression in rekonstruierter humaner Epidermis (RHE) nach Inkubation mit Alitretinoin feststellten. Diese Abweichung könnte darauf zurückzuführen sein, dass Retinsäure unterschiedlich auf gesunde und pathologische bzw. kranke Zellen wirkt. Die Ergebnisse von Jean et al. zeigen, dass all-trans-Retinsäure auf kranke bzw. proliferierende Keratinozyten wie sie bei der Psoriasis auftreten induzierend wirkt, wohingegen all-trans-Retinsäure auf gesunde Keratinozyten diesen Effekt nicht ausübt [93]. Äußere Einwirkungen auf die Zellkulturen, die in den Zellen erreichte Dosis von Retinsäure, die Spezies der verwendeten Zellen und der Differenzierungsgrad der Zellen/Keratinozyten können ebenfalls Einfluss darauf haben, ob Retinsäure induzierende oder inhibierende Effekte auf Keratinozyten ausübt. Daneben können indirekte Wirkungen wie beispielsweise T-Zell-Zytokine (Interleukin-4) die Expression von Filaggrin beeinflussen (siehe auch Kapitel 7.4).

Zytokeratin10 trägt zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Epidermis bei, indem es die mechanische Stabilisierung und Integrität von Epithelzellen unterstützt [27]. Die hier vorliegenden Daten zeigen eine signifikante Zunahme der Proteinexpression von

Zytokeratin10 unter Alitretinointherapie.

Es ist bekannt, dass bei inflammatorischen Hauterkrankungen wie der Psoriasis und der atopischen Dermatitis sowie bei gesunden Patienten mit trockener Haut eine verminderte Gen- bzw. Proteinexpression von Zytokeratin10 vorliegt [73, 81, 110, 111]. Daher ergibt sich die Annahme, dass beim chronischen Handekzem ebenfalls eine erniedrigte Gen- bzw. Proteinexpression von Zytokeratin10 vorliegt.

Ein Anstieg der Gen- bzw. Proteinexpression von Zytokeratin10 aufgrund einer systemischen Therapie mit Alitretinoin wurde bei Patienten mit chronischem Handekzem in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es wurde jedoch bereits der Einfluss von all-trans-Retinsäure auf die Proteinexpression von Zytokeratin10 in psoriatischen *in vitro*-Hautmodellen immunhistochemisch untersucht [93]. Vor Inkubation der psoriatischen Hautmodelle mit all-trans-Retinsäure war eine verminderte Proteinexpression von Zytokeratin10 im Vergleich zu gesunder Haut nachweisbar, nach der Behandlung mit all-trans-Retinsäure zeigte sich jedoch eine verstärkte Zytokeratin10-Proteinexpression [93].

Die bereits publizierten Daten sind mit den Ergebnissen dieser Untersuchung vergleichbar, die ebenfalls eine erhöhte Zytokeratin10-Proteinexpression nach der Therapie mit Alitretinoin zeigen. Demgegenüber stehen Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen von Hautbiopsien gesunder Patienten, die 16 Wochen lokal mit all-trans-Retinsäure behandelt wurden [112]. Die Ergebnisse zeigen keine Veränderung der Proteinexpression von Zytokeratin10 nach der Behandlung mit all-trans-Retinsäure [112]. Untersuchungen zum Einfluss von Alitretinoin auf die mRNA-Expression von Zytokeratin10 in rekonstruierter humaner Epidermis zeigten hingegen eine Herunterregulation von Zytokeratin10 durch Alitretinoin [108]. Die voneinander abweichenden Ergebnisse sind wahrscheinlich wie bereits diskutiert auf die unterschiedlichen Versuchsdurchführungen, *in vitro* versus *in vivo*, und die verwendeten Keratinozyten bzw. Hautbiopsien, pathologisches versus gesundes Gewebe/Keratinozyten, zurückzuführen.

Proteine des Cornified Envelope

Loricrin stellt mit 80% den Hauptbestandteil des Cornified Envelopes dar und trägt so entscheidend zu einem intakten Stratum corneum bzw. einer intakten Hautbarriere bei

[37]. Befunde dieser Untersuchung zeigen bei allen untersuchten Patienten eine signifikante Zunahme der Gen- und Proteinexpression von Loricrin mit Ausnahme des Patienten mit der geringsten Dosierung von Alitretinoin (10mg alle 2 Tage).

Inwiefern die Gen- bzw. Proteinexpression von Loricrin beim chronischen Handekzem verändert ist, wurde bisher nicht beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass inflammatorische Erkrankungen wie die Psoriasis und die atopische Dermatitis zu einer erniedrigten Gen- bzw. Proteinexpression von Loricrin in betroffener Haut verglichen mit gesunder Haut führen [36, 113]. Ebenfalls zeigten Rinnerthaler et al., dass die Expression von Cornified Envelope-Proteinen wie Loricrin in älterer/reiferer Haut im Vergleich zu jüngerer Haut niedriger ist [114].

Es ist hervorzuheben, dass die hier vorliegenden Untersuchungen zum Protein Loricrin einen nahezu 16-fachen Anstieg der Genexpression von Loricrin und einen 4-fachen Anstieg der Proteinexpression von Loricrin in der Immunhistologie zeigen. Die Expression von Loricrin wurde von den hier untersuchten Parametern am stärksten durch Alitretinoin verändert. Daneben ließen sich für Loricrin die meisten Assoziationen zu anderen an der Hautbarriere beteiligten Strukturproteinen sowie auch zu den Entzündungszellen feststellen. Je höher die Gen- bzw. Proteinexpression von Loricrin war, desto niedriger war die Anzahl von CD3⁺-T-Zellen bzw. desto niedriger war der modifizierte Manuscore. Daneben ließ sich eine positive Korrelation zwischen der Proteinexpression von Loricrin und der Proteinexpression von Claudin1, Occludin, Zytokeratin10 bzw. Filaggrin feststellen (siehe auch Kapitel 6.10). Dies suggeriert, dass Loricrin eine Schlüsselposition unter den Strukturproteinen der Hautbarriere besitzt und daher möglicherweise als Markerprotein für das Ansprechen auf eine Alitretinointherapie herangezogen werden kann. Diese Theorie wird dadurch bekräftigt, dass es mit 80% den Hauptanteil des Cornified Envelope ausmacht und so entscheidend für die Ausbildung eines intakten Stratum corneums bzw. der Hautbarriere ist [37].

Der Einfluss von Alitretinoin auf die Expression von Loricrin wurde bisher nicht untersucht. Die Behandlung von rekonstruierter humaner Epidermis mit Alitretinoin sowie die Behandlung von primären humanen Keratinozyten mit all-trans-Retinsäure führte zu einer Verminderung der Loricrin-mRNA-Expression [108, 109]. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung von psoriatischen in vitro-Hautmodellen mit all-trans-Retinsäure zu einer Hochregulation der Proteinexpression von Loricrin, die der in

gesunder Haut entsprach [93]. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich wie oben bereits diskutiert auf die regulatorischen Eigenschaften von Alitretinoin zurückzuführen, welches auf gesundes Gewebe anders als auf psoriatisches bzw. ekzematöses Gewebe wirkt.

Das Enzym Transglutaminase1 vernetzt die Cornified Envelope-Proteine (u.a. Loricrin) und Lipide wie Hydroxyceramide miteinander, sodass ein dichter Cornified Envelope an der Innenseite der Zellmembranen der Korneozyten entsteht, der für ein intaktes Stratum corneum von großer Bedeutung ist.

Die hier vorliegenden immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse zeigen insgesamt eine schwache Expression von Transglutaminase1 und eine Herabregulation der Proteinexpression von Transglutaminase1 nach Alitretinointherapie. Bei mehr als 70% der Patienten war weder vor noch nach der Therapie mit Alitretinoin eine immunhistochemische Färbung von Transglutaminase1 darstellbar. Es ist unklar, ob der hier verwendete Antikörper, die aktive oder die inaktive Form des Enzyms Transglutaminase1 anfärbt. Die Firma Abcam, von welcher der anti-Transglutaminase1-Antikörper bezogen wurde, konnte diesbezüglich keine konkrete Aussage geben. Mitarbeiter der Firma vermuten eine gleichzeitige Anfärbung der aktiven und inaktiven Form von Transglutaminase1, da es sich bei dem Antikörper um einen polyklonalen Antikörper handelt. Daneben ist zu diskutieren, ob Transglutaminase1 aufgrund seiner Zuordnung zu den Enzymen gegenüber äußeren Einflüssen im Vergleich zu den anderen Strukturproteinen besonders empfindlich ist. Mögliche Verzögerungen beim Fixieren der Hautproben mittels Formalin nach der Hautprobenentnahme oder eine zu lange Fixierung der Hautproben in Formalin können die zur immunhistochemischen Detektion von Transglutaminase1 benötigten Antigene eventuell verändert bzw. beschädigt haben. Dies könnte fälschlicherweise zu einem stark abgeschwächten Detektionssignal (immunhistochemischen Färbung) geführt haben.

Zur Expression von Transglutaminase1 in Haut von Patienten mit chronischem Handekzem ist bisher nichts beschrieben worden. Lieden et al. beobachteten in läsionaler Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis eine erhöhte Genexpression von Transglutaminase1 [115]. In nicht betroffener Haut von Patienten mit Psoriasis und atopischer Dermatitis konnte nach Tesafilm-Abriss (Tape Stripping) oder der Applikation des Detergens Natriumdodecylsulfat nach 48 Stunden ebenfalls eine erhöhte

Expression von Transglutaminase1 festgestellt werden [83].

Auch zum Einfluss von Alitretinoin auf die Expression von Transglutaminase1 beim chronischen Handekzem ist bisher nichts bekannt. Hashimoto et al. konnten bei einem Patienten mit lamellärer Ichthyose zeigen, dass nach einer systemischen Therapie mit dem Retinoid Etretinate über 8 Monate eine erhöhte Proteinexpression von Transglutaminase1 in der Immunhistologie verglichen mit Proben vor der Therapie nachweisbar war [116]. Griffiths sowie Rosenthal et al. stellten mittels Immunhistochemie ebenfalls eine verstärkte Proteinexpression von Transglutaminase1 in humanen Hautproben von gesunden Probanden fest, die zuvor 4 Tage lokal mit all-trans-Retinsäure behandelt wurden [112, 117]. Im Gegensatz dazu nahm bei in vitro-Untersuchungen die mRNA-Expression von Transglutaminase1 nach der Inkubation von humanen Keratinozyten mit all-trans-Retinsäure ab [117].

Zwei weitere Arbeitsgruppen zeigten ebenfalls eine Herunterregulation von Transglutaminase1 durch all-trans-Retinsäure bei ex vivo- bzw. in vitro-Untersuchungen [93, 109]. Die voneinander abweichenden Ergebnisse sind wahrscheinlich auf eine ungleiche Dosis von Retinsäure in den Zielzellen/Keratinozyten v.a. bei lokaler gegenüber systemischer Therapie sowie auf die unterschiedliche Wirkung von Retinsäure in vivo und in vitro zurückzuführen. Griffiths et al. diskutierten dies bereits und vermuteten, dass Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Calcium Retinsäure und seine Rezeptoren in vivo beeinflussen [117].

Auffallend bezüglich der Analysen der Strukturproteine war, dass die Zunahme der Genexpression der Strukturproteine nicht immer mit der Zunahme der Proteinexpression übereinstimmte. Dies lässt vermuten, dass die Strukturgene posttranslational modifiziert werden. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Werte der Genexpression metrisch skaliert und die Werte der mittels Immunhistochemie bestimmten Proteinexpression ordinal skaliert sind, sodass ein direkter Vergleich aufgrund der unterschiedlichen Skalenniveaus nicht möglich ist.

7.3.2 Proliferations- und Entzündungsmarker

Ki67 ist ein Protein, das sich teilende Zellen markiert, und kann daher als Proliferationsmarker betrachtet werden. Es ist bekannt, dass inflammatorische bzw. hyperproliferative Erkrankungen wie die atopische Dermatitis und die Psoriasis mit einer

erhöhten Expression von Ki67 positiven Zellen einhergehen [81, 93, 118]. Beim chronischen Handekzem liegen bisher keine Untersuchungen zur Expression von Ki67 vor.

Die für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten durchschnittlich vermehrt Ki67 positive Zellen nach der Alitretinointherapie verglichen mit der Expression vor der Therapie, wobei die hier vorliegenden Daten keine statistische Signifikanz erreichten. Da Alitretinoin in dieser Untersuchung zu einer hoch signifikanten Abnahme der Epidermisdicke führte, wäre aufgrund dieses Ergebnisses eine Abnahme des Proliferationsmarkers Ki67 nach der Alitretinointherapie wahrscheinlich gewesen.

Piatelli et al. stellten ebenfalls einen Anstieg der Ki67-positiven Zellen in immunhistochemisch untersuchten Hautproben nach einer lokalen Behandlung mit Isotretinoin (13-cis-Retinsäure) über 4 Monate bei Patienten mit Lichen planus mucosae (Knötchenflechte) fest, der auch den inflammatorischen Hauterkrankungen zugeordnet werden kann [119]. Demgegenüber stehen Ergebnisse von zwei weiteren Studien, in denen die Behandlung von psoriatischen in vitro-Hautmodellen mit Retinsäure oder die Behandlung von Psoriasis-Patienten mit dem Retinoid Acitretin zu einer verminderten Expression von Ki67-positiven Zellen führte [93, 118]. Möglicherweise haben methodische Fehler zu einem falsch positiven Anstieg der Ki67-positiven Zellen bei der Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung geführt. Die Grenze, ob ein Zellkern in der Auswertung als Ki67-positiv gewertet wurde oder nicht, wurde anhand der Farbtintensität der Anfärbung in der Immunhistochemie subjektiv von der auswertenden Person festgelegt. Eventuell könnte die Grenze zu niedrig gesetzt und falsch positive Zellen in die Auswertung mit einbezogen worden sein. Ungenauigkeiten bei der Auswahl des repräsentativen Bereichs, in der die immunhistochemisch angefärbten Zellen ausgezählt wurden, könnten das Ergebnis ebenfalls beeinflusst haben.

TSLP wird den Zytokinen zugerechnet und kann daher als Entzündungsmarker betrachtet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eine (nicht signifikante) Abnahme der Genexpression von TSLP in der qRT-PCR bei 62% der untersuchten Patienten und eine signifikante Abnahme der Proteinexpression von TSLP in der Immunhistochemie bei 87% der untersuchten Patienten nach Alitretinointherapie.

Lee et al. untersuchten bereits den Einfluss von 9-cis-Retinsäure (Alitretinoin) auf die mRNA-Expression von TSLP in einem humanen bronchialen Epithelzellkulturmodell

[120]. Sie stellten ebenfalls eine Herunterregulation der Genexpression von TSLP durch Alitretinoin fest [120]. Diese *in vitro*-Beobachtungen stimmen mit den *in vivo*-Beobachtungen der hier vorliegenden Untersuchung überein und unterstreichen die bereits bekannte antiinflammatorische Wirkung von Alitretinoin wie eine Hemmung der Zytokinproduktion in den Keratinozyten [121].

Interleukin-36 γ gehört als Mitglied der Interleukin-1-Familie zu den proinflammatorischen Zytokinen und kann daher ebenfalls als Entzündungsmarker betrachtet werden. Es ist involviert in die T-Helferzellen-1-Immunantwort, indem es die Expression von TH1-Effektor-Zytokinen wie Interferon- γ , die beim chronischem Handekzem dominieren, erhöht [50, 54].

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen überraschenderweise eine Zunahme des Interleukin-36 γ mRNA-Expressionslevels in der qRT-PCR bei 77% der untersuchten Patienten, wohingegen bei nur 23% der untersuchten Patienten eine Abnahme des Interleukin-36 γ mRNA-Expressionslevels nach Alitretinointherapie feststellbar war ($p=0,055$). Balato et. al. untersuchten bereits den Einfluss von all-trans-Retinsäure auf die mRNA-Expression von Interleukin-1-Familienmitgliedern (u.a. Interleukin-36 γ) [122]. Diese Arbeitsgruppe inkubierte *ex vivo*-Haut-Organokulturen, die mittels Hautbiopsien aus läsionaler Haut von an Psoriasis erkrankten Patienten hergestellt wurden, für 24 Stunden mit proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-17) und stellten eine erhöhte mRNA-Expression von Interleukin-1-Familienmitgliedern (u.a. Interleukin-36 γ) fest [122]. All-trans-Retinsäure konnte diese Erhöhung supprimieren [122]. Ikeda et al. stellten ebenfalls einen supprimierenden Effekt von all-trans-Retinsäure in Kombination mit Vitamin D auf das mRNA-Expressionslevel des Interleukin-1-Rezeptors, der als Rezeptor für Interleukin-1-Familienmitglieder fungiert, bei humanen T-Zellen fest [123].

Die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit weichen demnach von den in der Literatur beschriebenen antiinflammatorischen Effekten von Retinoiden auf die Expression von Interleukin-1-Familienmitgliedern wie Interleukin-36 γ ab. Möglicherweise ist dieser Unterschied darauf zurückzuführen, dass *in vivo* zusätzliche Einflussfaktoren wie beispielsweise weitere Zytokine oder Immunzellen zu einer erhöhten Expression von Interleukin-36 γ führen, die bei den in der Literatur beschriebenen *in vitro*-Untersuchungen nicht vorhanden sind. Außerdem kann eine

ungleiche Dosis von Retinsäure in den Zielzellen/Keratinocyten zu voneinander abweichenden Ergebnissen geführt haben. Daneben könnte das für diese Studie verwendete Retinoid Alitretinoin (9-cis-Retinsäure) nicht dieselben Effekte auf die Expression von Interleukin-36 γ ausgeübt haben wie das in den in vitro-Untersuchungen verwendete Retinoid Tretinoin (all-trans-Retinsäure). In vitro-Untersuchungen zum Einfluss von Alitretinoin auf die Expression von Interleukin-36 γ und in vivo-Untersuchungen größerer Studienpopulationen würden helfen diese Mechanismen besser zu verstehen.

7.4 Direkte und indirekte Wirkung von Alitretinoin auf Strukturproteine und Entzündungsmarker

Es ist zu diskutieren, warum gerade Alitretinoin ein so erfolgreiches Therapeutikum zur Therapie des chronischen Handekzems ist, wohingegen andere Vitamin A-Derivate wie z.B. all-trans-Retinsäure (Tretinoin) oder 13-cis-Retinsäure (Isotretinoin) längst nicht so effektiv zur Behandlung des chronischen Handekzems sind. Dies ist wahrscheinlich auf den besonderen Wirkmechanismus von Alitretinoin, der bis heute nicht vollständig erforscht ist, zurückzuführen. Die Wirkung von Alitretinoin auf Strukturen der Hautbarriere lässt sich wahrscheinlich mit Hilfe zweier verschiedener Effekte, einem direktem und/oder einem indirektem Effekt erklären.

Direkte Effekte beinhalten, dass Alitretinoin direkt an die drei Untereinheiten (α, β, γ) des nukleären Retinsäurerezeptors (RAR) und des Retinoid-X-Rezeptors der Keratinocyten bindet [62, 66]. Das Besondere an Alitretinoin ist, dass es im Vergleich zu anderen Retinoiden nicht nur an einem der beiden Rezeptoren bindet, sondern als sogenannter Panagonist an beide Rezeptoren bindet [121]. All-trans-Retinsäure oder 13-cis-Retinsäure hingegen wirken vorrangig nur am Retinsäurerezeptor (RAR) [121].

Durch die Bindung mit Alitretinoin werden die Rezeptoren aktiviert und fungieren dann als Transkriptionsfaktoren, indem sie an bestimmte Regionen des Promoters von Retinsäure-empfindlichen Genen binden, sogenannten „retinoic acid response elements“ (RAREs) [66]. Inwiefern die hier untersuchten Gene zu den Retinsäure-empfindlichen Genen gehören ist nur teilweise bekannt. In den Promotorregionen von Zytokeratin10, Filaggrin, Loricrin und Transglutaminase1 konnten bereits sog. „retinoic acid response elements“ (RAREs) nachgewiesen werden [124]. Proteine, die für die

Synthese bzw. den Abbau der hier aufgeführten Strukturgene verantwortlich sind, können ebenfalls sog. „retinoic acid response elements“ (RAREs) besitzen (wie beispielsweise Endoproteasen, die der Konversion von Profilaggrin in Filaggrin dienen) und von Alitretinoin reguliert werden.

Untersuchungen zeigen, dass Retinsäure bei in vitro-Untersuchungen von gesunder Haut bzw. gesunden Keratinozyten zu einer Herunterregulation der Expression dieser Retinsäure-empfindlichen Gene führt [108, 109, 117, 125]. Im Gegensatz dazu zeigen in vitro-Untersuchungen von psoriatischen in vitro-Hautmodellen eine Hochregulation der Expression dieser Gene [93]. Retinoide scheinen demnach regulierende Eigenschaften zu haben, da sie je nachdem, ob entzündete oder gesunde Haut vorliegt, die Expression von Strukturgenen der Hautbarriere in der Epidermis hoch- oder herunterregulieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde wie bei Jean et. al. entzündete (hier: ekzematöse) Haut untersucht, in der Alitretinoin (mit Ausnahme der nicht signifikanten Ergebnisse von Transglutaminase1) eine Hochregulation der Strukturgene bewirkte. Es ist ebenfalls hervorzuheben, dass es sich bei der hier vorliegenden Studie um in vivo- bzw. ex vivo-Untersuchungen handelt. Im Gegensatz zu den in vitro-Untersuchungen können Faktoren wie Calcium, Wachstumsfaktoren und Zytokine zusätzlich Einfluss auf die Expression der Strukturgene genommen haben. Es ist beispielsweise bekannt, dass eine erhöhte Calciumkonzentration, zu einer erhöhten Expression von Loricrin führt [126].

Daneben kann Alitretinoin indirekt Einfluss auf die Expression von Zytokinen haben, sodass die Expression der Strukturgene durch Alitretinoin indirekt reguliert wird. In der Literatur wird beschrieben, dass Alitretinoin nicht nur die Zytokinproduktion von Immunzellen, sondern auch die Zytokinproduktion von Keratinozyten beeinflusst [51, 121]. Es hemmt die Chemotaxis von Leukozyten und antigenpräsentierenden Zellen (APC) und führt zur Herunterregulierung von Zytokinen bzw. Chemokinen [90, 121].

Neueste Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass Alitretinoin bei Patienten mit chronischem Handekzem T-Zell-Zytokine wie Interleukin-17 (IL-17) und Interleukin-4 (IL-4) im peripheren Blut herunterreguliert, wohingegen regulatorische T-Zellen in läsionaler Haut von Handekzempatienten hochreguliert werden [69]. Im Gegensatz dazu zeigen in vitro-Untersuchungen, dass Alitretinoin die Expression von IL-4 bei humanen T-Zellen erhöht [127]. Diese Untersuchung unterstreicht bereits bekannte

Wirkungen von Retinoiden auf T-Zellen, die aus einer Induktion der Differenzierung zu TH2-Zellen und einer Suppression der Differenzierung zu TH1-Zellen besteht [68]. Es stellt sich die Frage, inwiefern Zytokine die Expression von Strukturgenen der Hautbarriere beeinflussen.

Andere Untersuchungen zeigen, dass die Behandlung von Keratinozyten mit IL-4 und IL-13 zu einer verminderten Expression von Filaggrin und Loricrin führt [113, 128]. Daneben zeigen Versuche mit Mäusen, die eine IL-4-Defizienz aufweisen, eine erhöhte Filaggrin-Expression [129]. Die Inkubation von bronchialen humanen Epithelzellen mit IL-4 oder IL-13 führte ebenfalls zu einer verminderten Expression von Tight Junction-Proteinen wie Occludin [130]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass IL-4 zu einer erhöhten Expression von TSLP führt, das wiederum die Expression von weiteren Zytokinen wie IL-13 erhöht [52]. Es ist zu vermuten, dass Alitretinoin die IL-4 Expression nicht nur wie bereits untersucht im Blut herunterreguliert, sondern auch in läsionaler Haut von Handekzempatienten und so indirekt die Expression von für die Hautbarriere wichtigen Strukturgenen bzw. -proteinen hochreguliert. Ob Veränderungen der IL-4 Expression in läsionaler Haut von Handekzempatienten auftreten, sollte zukünftig noch untersucht werden.

Weitere Untersuchungen zeigen, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-17 und IL-1 ebenfalls Einfluss auf die Expression von Strukturgenen der Hautbarriere haben. IL-17, was in läsionaler atopischer Haut (mehr in akuten als in chronischen Läsionen) nachgewiesen werden konnte, führte wie IL-4 zu einer Herunterregulierung von Filaggrin und Filaggrin-prozessierenden Enzymen in Keratinozytenzellkulturen [48]. Duffy et al. zeigten, dass IL-1 zu einer verminderten Expression von Occludin in Astrozyten (Nervenzellen) führte, wohingegen die Expression von Claudin1 erhöht wurde [131].

Abbildung 33 zeigt exemplarisch den indirekten Einfluss von Alitretinoin auf die Expression von Strukturproteinen durch Herunterregulation von T-Zellen und Zytokinen. Weitere Untersuchungen zum Einfluss von Alitretinoin auf die Expression von Zytokinen könnten helfen, den möglichen indirekten Wirkmechanismus dieses Therapeutikums besser zu verstehen.

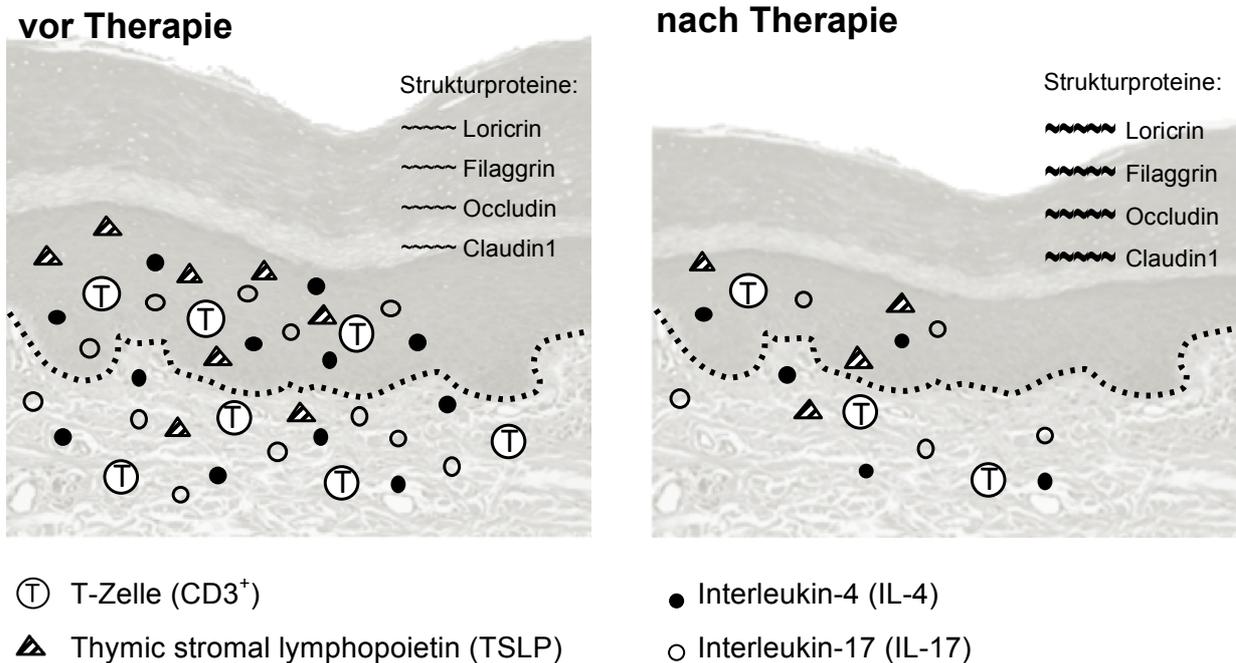


Abbildung 33: Indirekter Einfluss von Alitretinoin auf die Expression von Strukturproteinen durch Herunterregulation von T-Zellen und Zytokinen (IL-4, IL-17, TSLP). Die linke Abbildung (vor Therapie) zeigt eine erhöhte Anzahl von T-Zellen und Zytokinen, die zu einer erniedrigten Expression von Strukturproteinen führt. Die rechte Abbildung (nach Therapie) zeigt neben einer Abnahme der Epidermisdicke eine erniedrigte Anzahl von T-Zellen und Zytokinen, die zu einer erhöhten Expression von Strukturproteinen führt.

7.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Obwohl bekannt ist, dass der häufige Einsatz von Glukokortikoiden die Expression der für die Hautbarriere wichtigen Strukturgene negativ beeinflusst, sind sie bei der Therapie des Handekzems bis heute Therapeutika der ersten Wahl [132, 133].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Alitretinoin nicht nur ein effektives und gut verträgliches systemisches Therapeutikum bei schwerem, chronischem (hyperkeratotisch-rhagadiformen) Handekzem ist, sondern auch dass eine mindestens zweimonatige tägliche Einnahme von Alitretinoin zur Wiederherstellung einer zuvor gestörten Hautbarriere führte. Da die Hautbarriere eine zentrale Rolle in der Pathogenese und der Therapie des Handekzems spielt, lässt sich im Gegensatz zur

Anwendung von Glukokortikoiden der langfristige Therapieerfolg von Alitretinoin wahrscheinlich durch die Wiederherstellung der epidermalen Hautbarriere erklären. Eine gleichzeitige Herunterregulierung von Entzündungsmarkern durch Alitretinoin scheint ebenfalls Einfluss auf die Expression von Strukturproteinen der Hautbarriere zu haben.

Die genauen Wirkmechanismen von Alitretinoin zur Therapie des schweren, chronischen Handekzems sind auch nach den hier vorliegenden Untersuchungen nicht vollständig aufgeklärt, sodass weitere Untersuchungen folgen sollten. Von besonderem Interesse wäre hier die Untersuchung des Einflusses von Alitretinoin auf die Expression von Lipiden in der Epidermis im Bereich ekzematöser Haut der Hände, die für eine intakte Hautbarriere ebenfalls von großer Bedeutung sind. Jungersted et al. untersuchten bisher lediglich den Einfluss von Alitretinoin auf Ceramide am Unterarm im Bereich nicht läsionaler Haut und stellten keine Veränderungen fest [70]. Daneben wäre ebenfalls interessant herauszufinden, wie lange die Hochregulation der für die epidermale Hautbarriere wichtigen Strukturproteine nach einer Alitretinointherapie anhält.

Es ist zu diskutieren, ob der kurzzeitige Einsatz von Alitretinoin beim mittelschweren Handekzem frühzeitiger erfolgen sollte, da es gut verträglich ist und im Gegensatz zu Glukokortikoiden Schlüsselfaktoren des Handekzems wie die Störung der Hautbarriere vermindert bzw. beseitigt werden. Insbesondere im Hinblick auf die Gefahr einer Chronifizierung wären solche Untersuchungen von großem klinischen Interesse.

8 Literaturverzeichnis

1. Gruber R, Schmuth M: **[The barrier function of normal skin. Morphologic and functional aspects of the skin barrier]**. *Hautarzt* 2014, **65**(3):234-240.
2. Moll IA, M.; Jung, E.: **Dermatologie, Duale Reihe**. In. Edited by Thieme, 7.Auflage edn; 2010: 524.
3. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WH: **Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease**. *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 9):1285-1294.
4. Kawasaki H, Kubo A, Sasaki T, Amagai M: **Loss-of-function mutations within the filaggrin gene and atopic dermatitis**. *Curr Probl Dermatol* 2011, **41**:35-46.
5. Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W: **Cell death by cornification**. *Biochim Biophys Acta* 2013, **1833**(12):3471-3480.
6. Harding CR, Long S, Richardson J, Rogers J, Zhang Z, Bush A, Rawlings AV: **The cornified cell envelope: an important marker of stratum corneum maturation in healthy and dry skin**. *Int J Cosmet Sci* 2003, **25**(4):157-167.
7. Kubo A, Nagao K, Amagai M: **Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases**. *J Clin Invest* 2012, **122**(2):440-447.
8. Hashimoto K: **Intercellular spaces of the human epidermis as demonstrated with lanthanum**. *J Invest Dermatol* 1971, **57**(1):17-31.
9. De Benedetto A, Rafaels NM, McGirt LY, Ivanov AI, Georas SN, Cheadle C, Berger AE, Zhang K, Vidyasagar S, Yoshida T et al: **Tight junction defects in patients with atopic dermatitis**. *J Allergy Clin Immunol* 2011, **127**(3):773-786.e771-777.
10. Schneeberger EE, Lynch RD: **The tight junction: a multifunctional complex**. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004, **286**(6):C1213-1228.
11. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S: **Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice**. *J Cell Biol* 2002, **156**(6):1099-1111.
12. Kirschner N, Brandner JM: **Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin**. *Ann N Y Acad Sci* 2012, **1257**:158-166.
13. Van Itallie CM, Anderson JM: **Claudins and epithelial paracellular transport**. *Annu Rev Physiol* 2006, **68**:403-429.
14. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S: **Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin**. *J Cell Biol* 1998, **141**(7):1539-1550.
15. Brandner JM, Kief S, Grund C, Rendl M, Houdek P, Kuhn C, Tschachler E, Franke WW, Moll I: **Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes**. *Eur J Cell Biol* 2002, **81**(5):253-263.
16. Hintsala HR, Siponen M, Haapasaari KM, Karihtala P, Soini Y: **Claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in solar keratosis and squamocellular carcinoma of the skin**. *Int J Clin Exp Pathol* 2013, **6**(12):2855-2863.
17. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S: **Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions**. *J Cell Biol* 1993, **123**(6 Pt 2):1777-1788.
18. Kirschner N, Rosenthal R, Furuse M, Moll I, Fromm M, Brandner JM: **Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes**. *J Invest Dermatol* 2013, **133**(5):1161-1169.

19. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S: **Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands.** *Mol Biol Cell* 2000, **11**(12):4131-4142.
20. Barrett JG, Scott IR: **Pyrrrolidone carboxylic acid synthesis in guinea pig epidermis.** *J Invest Dermatol* 1983, **81**(2):122-124.
21. Scott IR, Harding CR: **Studies on the synthesis and degradation of a high molecular weight, histidine-rich phosphoprotein from mammalian epidermis.** *Biochim Biophys Acta* 1981, **669**(1):65-78.
22. Pellerin L, Henry J, Hsu CY, Balica S, Jean-Decoster C, Méchin MC, Hansmann B, Rodriguez E, Weindinger S, Schmitt AM *et al*: **Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin.** *J Allergy Clin Immunol* 2013, **131**(4):1094-1102.
23. Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM: **Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene.** *Biochemistry* 1990, **29**(40):9432-9440.
24. Rawlings AV, Harding CR: **Moisturization and skin barrier function.** *Dermatol Ther* 2004, **17 Suppl 1**:43-48.
25. Mildner M, Jin J, Eckhart L, Kezic S, Gruber F, Barresi C, Stremnitzer C, Buchberger M, Mlitz V, Ballaun C *et al*: **Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model.** *J Invest Dermatol* 2010, **130**(9):2286-2294.
26. Sandilands A, Terron-Kwiatkowski A, Hull PR, O'Regan GM, Clayton TH, Watson RM, Carrick T, Evans AT, Liao H, Zhao Y *et al*: **Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema.** *Nat Genet* 2007, **39**(5):650-654.
27. Nishifuji K, Yoon JS: **The stratum corneum: the rampart of the mammalian body.** *Vet Dermatol* 2013, **24**(1):60-72.e15-66.
28. Kezic S, Kemperman PM, Koster ES, de Jongh CM, Thio HB, Campbell LE, Irvine AD, McLean WH, McLean IW, Puppels GJ *et al*: **Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum.** *J Invest Dermatol* 2008, **128**(8):2117-2119.
29. Jungersted JM, Scheer H, Mempel M, Baurecht H, Cifuentes L, Høgh JK, Hellgren LI, Jemec GB, Agner T, Weidinger S: **Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema.** *Allergy* 2010, **65**(7):911-918.
30. Winge MC, Hoppe T, Berne B, Vahlquist A, Nordenskjöld M, Bradley M, Törmä H: **Filaggrin genotype determines functional and molecular alterations in skin of patients with atopic dermatitis and ichthyosis vulgaris.** *PLoS One* 2011, **6**(12):e28254.
31. Boguniewicz M, Leung DY: **Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation.** *Immunol Rev* 2011, **242**(1):233-246.
32. Moll R, Divo M, Langbein L: **The human keratins: biology and pathology.** *Histochem Cell Biol* 2008, **129**(6):705-733.
33. Porter RM, Leitgeb S, Melton DW, Swensson O, Eady RA, Magin TM: **Gene targeting at the mouse cytokeratin 10 locus: severe skin fragility and changes of cytokeratin expression in the epidermis.** *J Cell Biol* 1996, **132**(5):925-936.
34. Reichelt J, Bauer C, Porter R, Lane E, Magin V: **Out of balance: consequences of a partial keratin 10 knockout.** *J Cell Sci* 1997, **110 (Pt 18)**:2175-2186.

35. Mehrel T, Hohl D, Rothnagel JA, Longley MA, Bundman D, Cheng C, Lichti U, Bisher ME, Steven AC, Steinert PM: **Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin.** *Cell* 1990, **61**(6):1103-1112.
36. Hohl D: **Expression patterns of loricrin in dermatological disorders.** *Am J Dermatopathol* 1993, **15**(1):20-27.
37. Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM: **Assembly of the epidermal cornified cell envelope.** *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 17):3069-3070.
38. Koch PJ, de Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M *et al*: **Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein.** *J Cell Biol* 2000, **151**(2):389-400.
39. Karpati S: **Transglutaminases in cutaneous barrier formation and environmentally induced allergic and immunological skin diseases.** In: *Allergo J*; 2013: 550-552.
40. Egberts F, Heinrich M, Jensen JM, Winoto-Morbach S, Pfeiffer S, Wickel M, Schunck M, Steude J, Saftig P, Proksch E *et al*: **Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation.** *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 11):2295-2307.
41. Proksch E, Fölster-Holst R, Bräutigam M, Sepehrmanesh M, Pfeiffer S, Jensen JM: **Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis.** *J Dtsch Dermatol Ges* 2009, **7**(10):899-910.
42. Elias PM, Friend DS: **The permeability barrier in mammalian epidermis.** *J Cell Biol* 1975, **65**(1):180-191.
43. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R: **Structure and function of the epidermis related to barrier properties.** *Clin Dermatol* 2012, **30**(3):257-262.
44. Golden S, Shaw T: **Hand dermatitis: review of clinical features and treatment options.** *Semin Cutan Med Surg* 2013, **32**(3):147-157.
45. Molin S, 16. Jahrestagung der Dermatologischen Wissenschafts- und Fortbildungsakademie D: **Brennpunkt Handekzem: Status quo der leitliniengerechten Behandlung.** In: <http://www.dermaforum.com/2014/01/07/brennpunkt-handekzem-status-quo-der-leitliniengerechten-behandlung/>; 2014.
46. Molin S, Vollmer S, Weiss EH, Ruzicka T, Prinz JC: **Filaggrin mutations may confer susceptibility to chronic hand eczema characterized by combined allergic and irritant contact dermatitis.** *Br J Dermatol* 2009, **161**(4):801-807.
47. Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: **Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice.** *J Allergy Clin Immunol* 2012, **129**(6):1538-1546.e1536.
48. Hänel KH, Cornelissen C, Lüscher B, Baron JM: **Cytokines and the skin barrier.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**(4):6720-6745.
49. Hamid Q, Boguniewicz M, Leung DY: **Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis.** *J Clin Invest* 1994, **94**(2):870-876.
50. J.English: **Alitretinoin for the Treatment of Chronic Eczema of the Hand.** In: *Clinical Medicine Insights: Dermatology*; 2011: 7 - 16.

51. Bissonnette R, Diepgen TL, Elsner P, English J, Graham-Brown R, Homey B, Luger T, Lynde C, Maares J, Maibach HI: **Redefining treatment options in chronic hand eczema (CHE)**. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010, **24 Suppl 3**:1-20.
52. Takai T: **TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms**. *Allergol Int* 2012, **61**(1):3-17.
53. Lee KH, Cho KA, Kim JY, Baek JH, Woo SY, Kim JW: **Filaggrin knockdown and Toll-like receptor 3 (TLR3) stimulation enhanced the production of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) from epidermal layers**. *Exp Dermatol* 2011, **20**(2):149-151.
54. Vigne S, Palmer G, Martin P, Lamacchia C, Strebel D, Rodriguez E, Olleros ML, Vesin D, Garcia I, Ronchi F *et al*: **IL-36 signaling amplifies Th1 responses by enhancing proliferation and Th1 polarization of naive CD4+ T cells**. *Blood* 2012, **120**(17):3478-3487.
55. Tortola L, Rosenwald E, Abel B, Blumberg H, Schäfer M, Coyle AJ, Renaud JC, Werner S, Kisielow J, Kopf M: **Psoriasiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk**. *J Clin Invest* 2012, **122**(11):3965-3976.
56. Carrier Y, Ma HL, Ramon HE, Napierata L, Small C, O'Toole M, Young DA, Fouser LA, Nickerson-Nutter C, Collins M *et al*: **Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines in vitro and in vivo: implications in psoriasis pathogenesis**. *J Invest Dermatol* 2011, **131**(12):2428-2437.
57. Mattii M, Ayala F, Balato N, Filotico R, Lembo S, Schiattarella M, Patruno C, Marone G, Balato A: **The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is crucial in human allergic contact dermatitis pathogenesis: the role of IL-1 family members**. *Exp Dermatol* 2013, **22**(12):813-819.
58. Thyssen JP, Johansen JD, Linneberg A, Menné T: **The epidemiology of hand eczema in the general population--prevalence and main findings**. *Contact Dermatitis* 2010, **62**(2):75-87.
59. Diepgen TL, Elsner P, Schliemann S, Fartasch M, Köllner A, Skudlik C, John SM, Worm M, Gesellschaft DD: **Guideline on the management of hand eczema ICD-10 Code: L20. L23. L24. L25. L30**. *J Dtsch Dermatol Ges* 2009, **7 Suppl 3**:S1-16.
60. Ruzicka T, Lynde CW, Jemec GB, Diepgen T, Berth-Jones J, Coenraads PJ, Kaszuba A, Bissonnette R, Varjonen E, Holló P *et al*: **Efficacy and safety of oral alitretinoin (9-cis retinoic acid) in patients with severe chronic hand eczema refractory to topical corticosteroids: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial**. *Br J Dermatol* 2008, **158**(4):808-817.
61. Soost S, Abdollahnia M, Kostev K, Worm M: **Topical therapy of hand eczema - analysis of the prescription profile from dermatologists in private practice**. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012, **10**(3):180-184.
62. **Fachinformation Toctino Stand: Jan.2013**. In.
63. Diepgen TL, Pfarr E, Zimmermann T: **Efficacy and tolerability of alitretinoin for chronic hand eczema under daily practice conditions: results of the TOCCATA open study comprising 680 patients**. *Acta Derm Venereol* 2012, **92**(3):251-255.
64. Bissonnette R, Worm M, Gerlach B, Guenther L, Cambazard F, Ruzicka T, Maares J, Brown TC: **Successful retreatment with alitretinoin in patients with relapsed chronic hand eczema**. *Br J Dermatol* 2010, **162**(2):420-426.

65. Geiger JM, Hommel L, Harms M, Saurat JH: **Oral 13-cis retinoic acid is superior to 9-cis retinoic acid in sebosuppression in human beings.** *J Am Acad Dermatol* 1996, **34**(3):513-515.
66. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH: **Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**(9):685-698.
67. McGrane MM: **Vitamin A regulation of gene expression: molecular mechanism of a prototype gene.** *J Nutr Biochem* 2007, **18**(8):497-508.
68. Iwata M, Eshima Y, Kagechika H: **Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors.** *Int Immunol* 2003, **15**(8):1017-1025.
69. Schindler M, Drozdenko G, Kühl AA, Worm M: **Immunomodulation in Patients with Chronic Hand Eczema Treated with Oral Alitretinoin.** *Int Arch Allergy Immunol* 2014, **165**(1):18-26.
70. Jungersted JM, Høgh JK, Hellgren LI, Jemec GB, Agner T: **Changes in skin barrier during treatment with systemic alitretinoin: focus on skin susceptibility and stratum corneum ceramides.** *Arch Dermatol Res* 2010, **302**(9):653-656.
71. Dulon M, Skudlik C, Nübling M, John SM, Nienhaus A: **Validity and responsiveness of the Osnabrück Hand Eczema Severity Index (OHSI): a methodological study.** *Br J Dermatol* 2009, **160**(1):137-142.
72. Schwanitz HJ: **Nach John SM, Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Diagnostik in der Berufsdermatologie in Studien zur Prävention in Allergologie, Berufs- und Umweltdermatologie (ABU); 2011.**
73. **Firmeninformation der Firma Courage und Khazaka Electronic GmbH;** <http://www.courage-khazaka.de/>. In.
74. Jana Pardeike & Rainer Müller FUB: **Bestimmung der Hautfeuchtigkeit, Hautelastizität und des Transepidermalen Wasserverlusts (TEWL).** In., edn. *Moderne Pharmazeutische Pharmakologie*; 2009.
75. Macherey-Nagel: **RNA isolation.** In. [http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA and mRNA/UM_TotalRNA.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalRNA.pdf); 2014.
76. Gschwandtner M, Mildner M, Mlitz V, Gruber F, Eckhart L, Werfel T, Gutzmer R, Elias PM, Tschachler E: **Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model.** *Allergy* 2013, **68**(1):37-47.
77. Sun Y, Li Y, Luo D, Liao DJ: **Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions.** *PLoS One* 2012, **7**(8):e41659.
78. **Firmeninformation der Firma Qiagen; Rotor-Gene SYBR Green Handbuch;** <http://www.qiagen.com/>. In.
79. Schmittgen TD, Livak KJ: **Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.** *Nat Protoc* 2008, **3**(6):1101-1108.
80. M.W. P: **Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung.** *BIOspektrum* 2004:92-95.
81. Jensen JM, Fölster-Holst R, Baranowsky A, Schunck M, Winoto-Morbach S, Neumann C, Schütze S, Proksch E: **Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis.** *J Invest Dermatol* 2004, **122**(6):1423-1431.

82. Consortium U: **Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)**. *Nucleic Acids Res* 2014, **42**(1):D191-198.
83. de Koning HD, van den Bogaard EH, Bergboer JG, Kamsteeg M, van Vlijmen-Willems IM, Hitomi K, Henry J, Simon M, Takashita N, Ishida-Yamamoto A *et al*: **Expression profile of cornified envelope structural proteins and keratinocyte differentiation-regulating proteins during skin barrier repair**. *Br J Dermatol* 2012, **166**(6):1245-1254.
84. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A *et al*: **Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP**. *Nat Immunol* 2002, **3**(7):673-680.
85. Wu WH, Park CO, Oh SH, Kim HJ, Kwon YS, Bae BG, Noh JY, Lee KH: **Thymic stromal lymphopoietin-activated invariant natural killer T cells trigger an innate allergic immune response in atopic dermatitis**. *J Allergy Clin Immunol* 2010, **126**(2):290-299, 299.e291-294.
86. Molinié V, Balaton A, Rotman S, Mansouri D, De Pinieux I, Homsy T, Guillou L: **Alpha-methyl CoA racemase expression in renal cell carcinomas**. *Hum Pathol* 2006, **37**(6):698-703.
87. Schmitt-Hoffmann AH, Roos B, Sauer J, Schleimer M, Kovács P, Stoeckel K, Maares J: **Influence of food on the pharmacokinetics of oral alitretinoin (9-cis retinoic acid)**. *Clin Exp Dermatol* 2011, **36 Suppl 2**:18-23.
88. Stücker M, Hoffmann M, Altmeyer P: **Instrumental evaluation of retinoid-induced skin irritation**. *Skin Res Technol* 2002, **8**(2):133-140.
89. Plewig G, Landthaler M, Burgdorf W, Hertl M, Ruzicka T: **Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie**. In., 6. Auflage edn. Springer Verlag; 2012: 2061.
90. Homey B: **[Retinoids appearing in a 'new' light]**. *Hautarzt* 2008, **59**(11):946.
91. Fisher GJ, Esmann J, Griffiths CE, Talwar HS, Duell EA, Hammerberg C, Elder JT, Finkel LJ, Karabin GD, Nickoloff BJ: **Cellular, immunologic and biochemical characterization of topical retinoic acid-treated human skin**. *J Invest Dermatol* 1991, **96**(5):699-707.
92. Takahashi N, Fujii Y: **Effects of the aminophenol analogue p-Dodecylaminophenol on mouse skin**. *J Invest Dermatol* 2010, **130**(5):1258-1267.
93. Jean J, Soucy J, Pouliot R: **Effects of retinoic acid on keratinocyte proliferation and differentiation in a psoriatic skin model**. *Tissue Eng Part A* 2011, **17**(13-14):1859-1868.
94. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A: **Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins**. *Am J Pathol* 2001, **159**(6):2001-2009.
95. Watson RE, Poddar R, Walker JM, McGuill I, Hoare LM, Griffiths CE, O'Neill CA: **Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis**. *J Pathol* 2007, **212**(4):450-458.
96. Telgenhoff D, Ramsay S, Hilz S, Slusarewicz P, Shroot B: **Claudin 2 mRNA and protein are present in human keratinocytes and may be regulated by all-trans-retinoic acid**. *Skin Pharmacol Physiol* 2008, **21**(4):211-217.
97. Kubota H, Chiba H, Takakuwa Y, Osanai M, Tobioka H, Kohama G, Mori M, Sawada N: **Retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor gamma**

- mediate expression of genes encoding tight-junction proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. *Exp Cell Res* 2001, **263**(1):163-172.
98. Hatakeyama S, Ishida K, Takeda Y: **Changes in cell characteristics due to retinoic acid; specifically, a decrease in the expression of claudin-1 and increase in claudin-4 within tight junctions in stratified oral keratinocytes.** *J Periodontal Res* 2010, **45**(2):207-215.
99. Osanai M, Nishikiori N, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N: **Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor alpha agonists in colitis.** *Mol Pharmacol* 2007, **71**(1):250-258.
100. Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P, Rohde H, Wladykowski E, Vidal S, Horstkotte MA, Aepfelbacher M, Kirschner N, Behne MJ *et al*: **Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative Staphylococcus strains.** *J Invest Dermatol* 2008, **128**(4):906-916.
101. Haslund P, Bangsgaard N, Jarløv JO, Skov L, Skov R, Agner T: **Staphylococcus aureus and hand eczema severity.** *Br J Dermatol* 2009, **161**(4):772-777.
102. Pummi K, Malminen M, Aho H, Karvonen SL, Peltonen J, Peltonen S: **Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes.** *J Invest Dermatol* 2001, **117**(5):1050-1058.
103. de Jongh CM, Khrenova L, Verberk MM, Calkoen F, van Dijk FJ, Voss H, John SM, Kezic S: **Loss-of-function polymorphisms in the filaggrin gene are associated with an increased susceptibility to chronic irritant contact dermatitis: a case-control study.** *Br J Dermatol* 2008, **159**(3):621-627.
104. Lerbaek A, Bisgaard H, Agner T, Ohm Kyvik K, Palmer CN, Menné T: **Filaggrin null alleles are not associated with hand eczema or contact allergy.** *Br J Dermatol* 2007, **157**(6):1199-1204.
105. Kaae J, Menné T, Carlsen BC, Zachariae C, Thyssen JP: **The hands in health and disease of individuals with filaggrin loss-of-function mutations: clinical reflections on the hand eczema phenotype.** *Contact Dermatitis* 2012, **67**(3):119-124.
106. Thyssen JP, Carlsen BC, Menné T, Linneberg A, Nielsen NH, Meldgaard M, Szecsi PB, Stender S, Johansen JD: **Filaggrin null mutations increase the risk and persistence of hand eczema in subjects with atopic dermatitis: results from a general population study.** *Br J Dermatol* 2010, **163**(1):115-120.
107. Flohr C, England K, Radulovic S, McLean WH, Campbel LE, Barker J, Perkin M, Lack G: **Filaggrin loss-of-function mutations are associated with early-onset eczema, eczema severity and transepidermal water loss at 3 months of age.** *Br J Dermatol* 2010, **163**(6):1333-1336.
108. Bernard FX, Pedretti N, Rosdy M, Deguercy A: **Comparison of gene expression profiles in human keratinocyte mono-layer cultures, reconstituted epidermis and normal human skin; transcriptional effects of retinoid treatments in reconstituted human epidermis.** *Exp Dermatol* 2002, **11**(1):59-74.
109. Lee DD, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Vouthounis C, Blumenberg M, Tomic-Canic M: **Retinoid-responsive transcriptional changes in epidermal keratinocytes.** *J Cell Physiol* 2009, **220**(2):427-439.

110. de Jong EM, Ferrier CM, de Zwart A, Wauben-Penris PJ, Korstanje C, van de Kerkhof PC: **Effects of topical treatment with budesonide on parameters for epidermal proliferation, keratinization and inflammation in psoriasis.** *J Dermatol Sci* 1995, **9**(3):185-194.
111. Engelke M, Jensen JM, Ekanayake-Mudiyanselage S, Proksch E: **Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation.** *Br J Dermatol* 1997, **137**(2):219-225.
112. Rosenthal DS, Griffiths CE, Yuspa SH, Roop DR, Voorhees JJ: **Acute or chronic topical retinoic acid treatment of human skin in vivo alters the expression of epidermal transglutaminase, loricrin, involucrin, filaggrin, and keratins 6 and 13 but not keratins 1, 10, and 14.** *J Invest Dermatol* 1992, **98**(3):343-350.
113. Kim BE, Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD: **Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6.** *Clin Immunol* 2008, **126**(3):332-337.
114. Rinnerthaler M, Duschl J, Steinbacher P, Salzmann M, Bischof J, Schuller M, Wimmer H, Peer T, Bauer JW, Richter K: **Age-related changes in the composition of the cornified envelope in human skin.** *Exp Dermatol* 2013, **22**(5):329-335.
115. Liedén A, Winge MC, Sääf A, Kockum I, Ekelund E, Rodriguez E, Fölster-Holst R, Franke A, Illig T, Tengvall-Linder M *et al*: **Genetic variation in the epidermal transglutaminase genes is not associated with atopic dermatitis.** *PLoS One* 2012, **7**(11):e49694.
116. Hashimoto K, Gee S, Tanaka K: **Lamellar ichthyosis: response to etretinate with transglutaminase 1 recovery.** *Am J Dermatopathol* 2000, **22**(3):277-280.
117. Griffiths CE, Rosenthal DS, Reddy AP, Elder JT, Astrom A, Leach K, Wang TS, Finkel LJ, Yuspa SH, Voorhees JJ: **Short-term retinoic acid treatment increases in vivo, but decreases in vitro, epidermal transglutaminase-K enzyme activity and immunoreactivity.** *J Invest Dermatol* 1992, **99**(3):283-288.
118. Werner B, Bresch M, Brenner FM, Lima HC: **Comparative study of histopathological and immunohistochemical findings in skin biopsies from patients with psoriasis before and after treatment with acitretin.** *J Cutan Pathol* 2008, **35**(3):302-310.
119. Piattelli A, Carinci F, Iezzi G, Perrotti V, Goteri G, Fioroni M, Rubini C: **Oral lichen planus treated with 13-cis-retinoic acid (isotretinoin): effects on the apoptotic process.** *Clin Oral Investig* 2007, **11**(3):283-288.
120. Lee HC, Headley MB, Iseki M, Ikuta K, Ziegler SF: **Cutting edge: Inhibition of NF-kappaB-mediated TSLP expression by retinoid X receptor.** *J Immunol* 2008, **181**(8):5189-5193.
121. Molin S, Ruzicka T: **[Alitretinoin: a new treatment option for chronic refractory hand eczema].** *Hautarzt* 2008, **59**(9):703-704, 706-709.
122. Balato A, Schiattarella M, Lembo S, Mattii M, Prevete N, Balato N, Ayala F: **Interleukin-1 family members are enhanced in psoriasis and suppressed by vitamin D and retinoic acid.** *Arch Dermatol Res* 2013, **305**(3):255-262.
123. Ikeda U, Wakita D, Ohkuri T, Chamoto K, Kitamura H, Iwakura Y, Nishimura T: **1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 and all-trans retinoic acid synergistically inhibit the differentiation and expansion of Th17 cells.** *Immunol Lett* 2010, **134**(1):7-16.

124. Balmer JE, Blomhoff R: **Gene expression regulation by retinoic acid.** *J Lipid Res* 2002, **43**(11):1773-1808.
125. Presland RB, Tomic-Canic M, Lewis SP, Dale BA: **Regulation of human profilaggrin promoter activity in cultured epithelial cells by retinoic acid and glucocorticoids.** *J Dermatol Sci* 2001, **27**(3):192-205.
126. Eckert RL, Welter JF: **Transcription factor regulation of epidermal keratinocyte gene expression.** *Mol Biol Rep* 1996, **23**(1):59-70.
127. Dawson HD, Collins G, Pyle R, Key M, Weeraratna A, Deep-Dixit V, Nadal CN, Taub DD: **Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes.** *BMC Immunol* 2006, **7**:27.
128. Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider L, Beck LA, Barnes KC, Leung DY: **Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression.** *J Allergy Clin Immunol* 2009, **124**(3 Suppl 2):R7-R12.
129. Sehra S, Yao Y, Howell MD, Nguyen ET, Kansas GS, Leung DY, Travers JB, Kaplan MH: **IL-4 regulates skin homeostasis and the predisposition toward allergic skin inflammation.** *J Immunol* 2010, **184**(6):3186-3190.
130. Saatian B, Rezaee F, Desando S, Emo J, Chapman T, Knowlden S, Georas SN: **Interleukin-4 and interleukin-13 cause barrier dysfunction in human airway epithelial cells.** *Tissue Barriers* 2013, **1**(2):e24333.
131. Duffy HS, John GR, Lee SC, Brosnan CF, Spray DC: **Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes.** *J Neurosci* 2000, **20**(23):RC114.
132. Lee SE, Choi Y, Kim SE, Noh EB, Kim SC: **Differential effects of topical corticosteroid and calcineurin inhibitor on the epidermal tight junction.** *Exp Dermatol* 2013, **22**(1):59-61.
133. Jensen JM, Pfeiffer S, Witt M, Bräutigam M, Neumann C, Weichenthal M, Schwarz T, Fölster-Holst R, Proksch E: **Different effects of pimecrolimus and betamethasone on the skin barrier in patients with atopic dermatitis.** *J Allergy Clin Immunol* 2009, **124**(3 Suppl 2):R19-28.

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kristina Timm, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss einer systemischen Therapie mit Alitretinoin (9-cis-Retinsäure) auf die Hautbarriere von Patienten mit chronischem Handekzem“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

10 Publikationen

Manuskript in Vorbereitung

Titel: Influence of alitretinoin (9-cis-retinoic acid) on the skin barrier in patients with chronic hand eczema

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Margitta Worm für die Überlassung des interessanten Themas und die besondere Unterstützung in allen Phasen dieser Promotionsarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. med. Guido Heine, Frau Dr. med. Anna Dinkloh und Mandana Schindler für die Unterstützung bei der Rekrutierung der Patienten bzw. für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial bedanken. Ich danke Frau Dr. rer. medic. Anja Kühl und ihrer Arbeitsgruppe für die Durchführung der (immun-)histologischen Färbungen. Daneben möchte ich mich bei allen Patienten bedanken, die an dieser Studie teilgenommen haben.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Vandana Kumari für die Hilfe bzw. Durchführung der RNA-Isolation und der PCR von TSLP und IL-36 γ sowie Frau Dr. rer. nat. Christin Weise und allen weiteren Mitgliedern der AG Worm (u.a. Dennis Ernst, Juliane Lindner, Kiran Kumar, Maria Nassiri) für die stetige Unterstützung und angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die immer für mich da sind. Schließlich danke ich meinem geliebten Mann, Mathias Timm, für seine durchgehende Unterstützung und Motivation.