

*Stress, Tight Junctions und Hautbarriere:  
Neurotrophine exazerbieren stressabhängig Hautentzündung*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schotte, Laura Helene, geboren Ivanovas  
aus Ravensburg

Gießen 2024

*Stress, Tight Junctions und Hautbarriere:  
Neurotrophine exazerbieren stressabhängig Hautentzündung*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Schotte, Laura Helene, geboren Ivanovas  
aus Ravensburg

Gießen 2024

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Labor für Psychoneuroimmunologie  
Klinik für Psychosomatik und Psychotherapie

Gutachter/in: Prof. Dr. Eva Peters

Gutachter/in: Prof. Dr. Thilo Jakob

Tag der Disputation: 16.10.2024

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>WISSENSCHAFTLICHER HINTERGRUND .....</b>	<b>2</b>
1.1.1	STRUKTUR DER HAUT: EINE MEHRSCICHTIGE BARRIERE .....	2
1.1.1.1	Die Regulation der epidermalen Differenzierung .....	4
1.1.1.2	Mechanisch-unspezifische Barriere im Stratum corneum.....	5
1.1.1.3	Tight Junctions: Physikalisch-spezifische Barriere im Stratum granulosum	6
1.1.1.4	Immunologische Barriere der Epidermis .....	8
1.1.2	EPIDERMALES CHOLINERGES SYSTEM, EINE SCHNITTSTELLE ZWISCHEN DIFFERENZIERUNG, IMMUNFUNKTION UND HOMÖOSTASE.....	10
1.1.3	NEUROPEPTIDE UND NEUROTROPHINE: SCHLÜSSELPOSITION ZWISCHEN NERVENSYSTEM UND AUTOREGULATION DER HAUT.....	12
1.1.4	STRESSREAKTION: EINE „BLACK BOX“. SYSTEMTHEORETISCHE ANALYSE VON STRESSMECHANISMEN .....	13
1.1.5	KONTROLLEBENEN DES KÖRPERS: EIN BEISPIEL DER „DISTRIBUTED CONTROL“ 19	
1.1.5.1	Systemische Kontrollebene: Nervenbahnen und Mediatoren .....	20
1.1.5.1.1	Das autonome und sensible Nervensystem, der „direkte Draht“ .....	20
1.1.5.1.2	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindendachse: Beispiel eines Systems mit Multistabilität.....	21
1.1.5.1.3	Neurotrophine: endokrine Stress- und Homöostasefaktoren.....	21
1.1.5.2	Immunologische Ebene: deterministisches Chaos in Aktion .....	23
1.1.5.2.1	Cutanes Immunsystem: ein Beispiel von Konnektivität und adaptiver Funktion	23
1.1.5.2.2	Immunologische Reaktion der Haut bei Barriestörung, eine „hoch organisierte Abwehrreaktion“ .....	25
1.1.5.2.3	Cholinerges System und immunologische Modulation .....	27
1.1.5.2.4	Neuroimmunologische Achsen: wie Stress in die Haut kommt.....	28
1.1.5.3	Lokal-funktionelle Ebene der Epidermis und „Crosstalk“ der Kinasen .	30
1.1.6	ATOPISCHE DERMATITIS: EINE STRESSSENSITIVE HAUTERKRANKUNG MIT DYSREGULATION VON IMMUNSYSTEM, HAUTBARRIERE UND NEUROTROPHINEN .....	31
1.1.6.1	Pathogenese der atopischen Dermatitis und Rolle der Barrierefunktion 32	
1.1.6.2	Neurogene Inflammation und Neurotrophine bei atopischer Dermatitis 34	
1.1.6.3	Atopische Dermatitis und Stress .....	35
<b>1.2</b>	<b>PROBLEM- UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>36</b>

<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>38</b>
<b>2.1</b>	<b>STUDIENDESIGN</b>	<b>38</b>
<b>2.2</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>38</b>
2.2.1	TIER-, GEWEBE UND ZELLHERKUNFT	38
2.2.1.1	AID-Modell	38
2.2.1.2	Hautorgankultur, murine Proben	38
2.2.1.3	HaCaT-Zellen	39
2.2.2	AUSSTATTUNG, INSTRUMENTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	39
2.2.3	SOFTWARE	41
2.2.4	VERBRAUCHSMATERIALIEN	42
2.2.5	ANTIKÖRPER	45
2.2.6	PCR-PRIMER	46
<b>2.3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>47</b>
2.3.1	ALD-MAUSMODELL	47
2.3.1.1	TEWL	48
2.3.1.2	Probengewinnung	49
2.3.2	HAUTORGANKULTUR	49
2.3.3	HACAT-ZELLKULTUR	50
<b>2.4</b>	<b>DATENERHEBUNG UND MESSMETHODEN</b>	<b>52</b>
2.4.1	ANFERTIGUNG DER GEWEBESCHNITTE	52
2.4.2	FÄRBE-METHODEN	52
2.4.2.1	Giemsa-Färbung	52
2.4.2.2	IHC - Färbeprotokolle	52
2.4.2.3	Verfahren zur Antigendemaskierung bei perfusionsfixierter Haut	54
2.4.2.4	Doppelfärbungen mit Primärantikörpern aus gleicher Spezies	55
2.4.3	HISTOMORPHOMETRIE UND INTENSITÄTSMESSUNG	57
2.4.4	RNA-ISOLATION UND cDNA-SYNTHESE	58
2.4.4.1	Probendesintegration und RNA-Isolation	58
2.4.4.2	Photometrische RNA-Bestimmung und cDNA-Synthese	59
2.4.5	GENEXPRESSIONSANALYSE - REAL-TIME DETECTION PCR	60
2.4.6	MICROARRAY	61
<b>2.5</b>	<b>STATISTIK</b>	<b>62</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>STRESS FÜHRT NGF-ABHÄNGIG ZU GESTÖRTER EPIDERMALER MORPHOLOGIE UND DIFFERENZIERUNG BEI ALLERGISCHER INFLAMMATION</b>	<b>63</b>
<b>3.2</b>	<b>STRESS STEIGERT TJ MOLEKÜLE, GEGENTEILIGER UND BDNF-ABHÄNGIGER EFFEKT BEI ALD-INFLAMMATION</b>	<b>65</b>
<b>3.3</b>	<b>ABNAHME DER TJ-MARKER mRNA-EXPRESSION UNTER STRESS UND INFLAMMATION, ABHÄNGIG VON NEUROTROPHINEN</b>	<b>69</b>

<b>3.4</b>	<b>KLINISCH GESTÖRTE BARRIERE UNTER INFLAMMATION, EFFEKT VON STRESS</b>	
	TEILABHÄNGIG VON BDNF .....	70
<b>3.5</b>	<b>PLASTISCHE VERÄNDERUNGEN DES NÄCHR-A7 UNTER STRESS</b> .....	71
	3.5.1    BDNF DYSREGULIERT UNTER NIKOTIN-STRESS HAUTTROPHIK <i>EX-VIVO</i>	
	NÄCHR-A7-ABHÄNGIG, MARGINALE TJ-MRNA-VERÄNDERUNG JEDOCH UNABHÄNGIG DES NÄCHR-	
	A7	72
<b>3.6</b>	<b>AKUSTISCHER STRESS VERÄNDERT DAS TRANSKRIPTOM DER HAUT, AUCH DIE EXPRESSION</b>	
	<b>VON TJ-REGULATOREN</b> .....	75
<b>3.7</b>	<b>METHODISCHE MÖGLICHKEIT, DIE EPIDERMAL E DIFFERENZIERUNG UNTER ZELLULÄREM</b>	
	<b>STRESS MIT VERÄNDERTER CLDN-1-VERTEILUNG DURCH PKC<sub>α</sub>-MEDIATION, DARZUSTELLEN</b> .....	76
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	78
<b>4.1</b>	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</b> .....	78
	4.1.1    INFLAMMATIONSASSOZIIERTE DIFFERENZIERUNGSSTÖRUNG UNTER	
	ALLERGISCHER HAUTENTZÜNDUNG, ROLLE VON ZUSÄTZLICHEM STRESS UND NEUROTROPHINEN .	78
	4.1.2    DIE WIRKUNG VON STRESS AUF DIE TJ UND DEREN FUNKTION IST ABHÄNGIG	
	VON EINER ALD-INFLAMMATION. SIND NEUROTROPHINE DABEI "THE GOOD, THE BAD OR THE UGLY"?	80
	4.1.3    REGULATORISCHE GENEXPRESSION FÜHRT ZUR ABNAHME VON TJ-MARKERN	
	UNTER STRESS UND INFLAMMATION, CLDN-1 DABEI AUCH ABHÄNGIG VON BDNF .....	82
	4.1.4    DER NÄCHR-A7 ALS POTENZIELLER STRESSMEDIATOR, ABHÄNGIG VON	
	ALLERGISCHER INFLAMMATION UND NEUROTROPHINEN .....	82
	4.1.5    TRANSKRIPTOM ZEIGT UNTER AKUSTISCHEM STRESS MEHRERE MUSTER AN	
	VERÄNDERUNGEN IN RICHTUNG DER TJ.....	84
	4.1.6    AUSBlicKE IN KÜNFTIGE METHODEN FÜR DIE FRAGE NACH „BYSTANDER ODER	
	MITTELSMANN“ – STRESS, NPKC <sub>α</sub> UND TIGHT JUNCTIONS IM ZELLMODELL.....	85
<b>4.2</b>	<b>STÄRKEN UND SCHWÄCHEN DER STUDIE</b> .....	86
	4.2.1    TIERE UND PROBEN .....	86
	4.2.2    FIXIER- UND ANTIGENDEMASKIERUNGS-VERFAHREN .....	87
	4.2.3    UNTERSUCHTE MARKER.....	87
	4.2.4    BESONDERHEITEN DER ANALYSE MITTELS QPCR UND MICROARRAY.....	88
	4.2.5    PENETRATIONS- UND BARRIERETESTS .....	88
	4.2.6    ZELLKULTUR .....	88
<b>4.3</b>	<b>BEDEUTUNG DER STUDIE</b> .....	89
<b>4.4</b>	<b>ABSCHLIEßENDE AUSBLICKE</b> .....	90
<b>5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b> .....	92
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	93

<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>I</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>II</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>12</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>LV</b>
<b>13</b>	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</b>	<b>LXIII</b>
<b>14</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>LXIV</b>
<b>15</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>LXV</b>

# 1 Einleitung

Die Haut stellt eine große Grenzfläche zwischen unserem Körper und der Umwelt dar [8]. Sie ist in dieser Funktion andauernd vielfältigen Reizen ausgesetzt, aus der Umgebung wie dem Körperinneren [634]. Diese unterschiedlichen Einflüsse machen eine aktive Anpassung nötig, um eine erfolgreiche Barriere zu erstellen und zeitgleich eine Schutzfunktion aber auch Kommunikation mit der Umwelt aufrecht zu erhalten [44; 513]. Hierfür sind lokale und systemische Regulationsmechanismen notwendig, die zusammen ein komplexes System ergeben [513; 656].

Stress ist einer der Faktoren, der die Funktionalität und das lokale Reaktionsvermögen des Systems „Haut“ auf mehrere Arten beeinflusst [28]. Bei einer Stressreaktion führen Botenstoffe und neuronale Signale zu lokalen Reaktionen [29]. Dabei sind, neben den bekannteren Botenstoffen wie Cortisol oder Katecholamine, auch verschiedene Neurotrophine (NT) und das cholinerge System beteiligt [125; 153; 513; 541]. Im Brennpunkt von Hautbarriere und Stressreaktion steht das Immunsystem der Haut, denn Stress und die Hautbarriere beeinflussen die lokale Immunfunktion und alle drei Komponenten regulieren sich gegenseitig [10; 72; 92; 281; 326; 336; 513].

Von besonderem Interesse sind die Anpassungsmechanismen der Haut bei Erkrankungen wo lokale funktionelle und immunologische Störungen vorliegen, wie zum Beispiel bei der atopischen Dermatitis (AD). Dabei wird eine Störung der Hautbarrierefunktion vermehrt als Ursache und Trigger der AD gewichtet [116; 425]. Denn die Störung der Hautbarriere trägt potenziell dazu bei, dass der Entzündungsmechanismus bei AD in Gang kommt oder aufrechterhalten wird [388]. In bestimmten Kontexten kann außerdem ein inadäquates Verhalten der Haut gegenüber Stressoren interpretiert werden [193; 413]. Werden zum Beispiel an AD erkrankte Personen zusätzlichem Stress ausgesetzt, verschlimmert sich die Symptomatik der Haut [460]. Im Pathomechanismus dieser Verschlechterung spielen NT eine Rolle [244; 571]. Die Bedeutung dieser NT im Rahmen der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion, sowie das Zusammenspiel zwischen Barrierefunktion und systemischer wie lokaler Stressreaktion wurden bisher wenig untersucht [426].

Diese Arbeit fasst wesentliche Aspekte der bekannten Systematik der Barrierefunktion und Immunologie der Haut, sowie der lokalen und systemischen Stressreaktion, zusammen. Ein Teil der Anpassungsmechanismen wird hier weiter untersucht, im Kontext von immunologischer Dysregulation bei AD-ähnlicher Inflammation, sowie unter Gewichtung von NT.

# 1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

## 1.1.1 Struktur der Haut: eine mehrschichtige Barriere

Die Barriere, welche die Haut gegen eindringende und entweichende Substanzen und Organismen bildet, ist in der äußersten Hautschicht, der Epidermis, zu finden [723]. Die Funktion und Regulation der Epidermis hängen direkt mit ihrer Struktur zusammen, die für alle Säugetiere ähnlich ist [8] und ein integriertes Netzwerk an zytoskelettalen Elementen und Zellverbindungen notwendig macht [628]. Während des Prozesses der Reifung der Epidermis bilden die Strukturzellen, die Keratinozyten (keratinocyte, KC), entsprechend eine Reihe von Proteinen und Lipiden, die zur Stabilität und Funktion der Haut beitragen [328]. Viele Untersuchungen sind dazu an menschlicher Haut erfolgt [458]. Da aber auch Mausmodelle regelhaft für Studien herangezogen werden [573], erfolgen hier auch strukturelle Vergleiche zwischen beiden Spezies.

Durch den geregelten Ablauf der auch Differenzierung genannten Abfolge der Zellreifung, kommt es zur Bildung funktionell unterschiedlicher Schichten in der Epidermis, wodurch die Hautbarriere erst zustande kommen kann [46]. Für die Stabilität der Zellen sind unter anderem die Zytokeratine verantwortlich [87]. Diese zu den Intermediärfilamenten zählenden Komponenten des Zellskelettes dienen mechanischer Integrität, Konnektivität und Transportprozessen in den KC [432] und werden während der Differenzierung der Zellen schrittweise angepasst [390; 567]. Die Analyse dieser Proteine kann somit genutzt werden um den Differenzierungsgrad und damit die unterschiedlichen epidermalen Schichten abzugrenzen [379]. Zusätzlich sind die epidermalen Schichten anhand unterschiedlicher morphologischer Kriterien unterscheidbar, wie auch in Abbildung (Abb. 1) schematisch dargestellt.

Auf der Basalmembran (BM) der Epidermis liegen die undifferenzierten KC des Stratum basale (SB). Die KC sind kubisch bis hochprismatisch und folgen der BM entlang des dermoepidermalen Übergangs [587]. Sie haben runde Zellkerne und zeigen eine mitotische Aktivität. An Zytokeratinen finden sich das kleinere Keratin 14 (K14) und der zugehörige Bindepartner Keratin 5 (K5) [88]. Zur mechanischen Stabilisierung der Zellen untereinander bestehen bereits ab dem SB basolateral spezialisierte Verbindungspunkte, die Hemidesmosome und Desmosome, sowie nach apical auch erste Adherens Junctions (AJ) [499]. Neben der mechanischen Stabilisierung sind diese spezialisierten Proteinkomplexe auch an der Signaltransduktion beteiligt [478].

Im Rahmen des Differenzierungsprozesses wandern die KC aus dem SB nach apical und geben den Kontakt zur BM auf [497]. Auf das SB folgt das Stratum suprabasale oder Stratum spinosum (SS). Die KC werden hier größer, polygonal und synthetisieren zunehmend Strukturproteine. Der Zellkern nimmt an Volumen zu und flacht leicht ab [190]. Die Filamente der Zytokeratine werden dichter gepackt. Dabei werden das K14/K5 gegen die größeren und stabileren Keratine 1 und 10 ausgetauscht [88; 148]. Verschiedene Arten an Desmosomen verknüpfen die Intermediärfilamente einzelner KC mechanisch miteinander, AJ vermitteln zusätzlich Stabilität über Kopplung der zellulären Aktinfilamentsysteme [589]. In der Regel

besteht das SS der gesunden, behaarten Haut des Menschen aus 5-7 Zellschichten [463; 726]. Bei der Maus ist es in den Regionen der behaarten Haut, soweit sichtbar vorhanden, eine Zellschicht dick [314].

Weiter nach apical vom SS befindet sich das Stratum granulosum (SG). Hier flachen die Zellen und Zellkerne weiter ab [190]. In der Regel besteht das SG beim Menschen aus 3 Zellschichten, bei der Maus ist lichtmikroskopisch in der Regel nur eine zellhaltige Schicht sichtbar [30]. In den oberen granulären Zellschichten findet sich das „cornified envelope“ im Inneren der Zellen, ein makromolekulares stabilisierendes Polymer, das unter anderem die Proteine Involucrin (INV), Loricrin und Filaggrin (FLG) enthält und wasserunlöslich ist [492]. Außerdem bilden die Zellen, beginnend im oberen SS, zunehmend spezialisierte Vesikel, sogenannte Lamellarkörperchen (lamellar bodies, LB) [198]. Hierüber werden Lipide und weitere Substanzen gemeinsam mit zugehörigen Enzymen in den Zwischenzellraum sezernieren [570]. Charakteristisch für das SG sind außerdem die Schlussleistenkomplexe oder Tight Junctions (TJ). Dies sind Proteinkomplexe der Zellmembran, die den Zwischenzellraum durchspannen und gegen Wasser und kleine Moleküle abdichten. Sie bilden den größeren Teil der physisch-chemischen Barriere und werden im Detail im Kapitel 1.1.1.3 beschrieben.

Im letzten Schritt der Differenzierung stoßen die KC ihren Zellkern aus und platten zu Zellresten ab. Sie bilden schließlich eine stabile Keratinmatrix, die mit den zwischengelagerten Lipiden das Stratum corneum (SC) bildet, das die äußerste Grenze zur Umwelt darstellt [287] und dessen oberste Schicht sich kontinuierlich abschilfert [166].

Die Epidermis benötigt zur Funktion und Stabilität zusätzlich die darunter liegende Dermis, die an die BM des SB anschließt [713]. Die Dermis und die darunter liegende Subkutis dienen der mechanischen Unterstützung und stellen die Verbindungsmatrix zum umgebenden Gewebe dar [335]. Sie sind vaskularisiert, innerviert und enthalten die lokalen Lymphgefäße, neben der Ernährung der Epidermis, auch für die Kommunikation mit dem Nerven- und Immunsystem Voraussetzung ist [1].

Um die Vernetzung mit dem Nervensystem zu optimieren, besteht in der Haut eine besondere Organisation der Nervenstrukturen. Die sensiblen und vegetativen Nervenfasern bilden in der behaarten Haut einen oberflächlichen (subepidermaler Plexus, SEP) und einen tiefen dermalen Plexus (deep dermal plexus, DDP), die miteinander in Verbindung stehen [75] und sich dynamisch entwickeln und anpassen [309; 312]. Neben den zu Mechanosensoren gehörenden, teils myelinisierten, Fasern finden sich in der Haut auch unmyelinisierte Nerven, die vom DDP und SEP Richtung Epidermis ziehen und via synapsenähnlichen Verbindungen in Kontakt mit den KC [123], aber auch mit den Immun- und Mastzellen der Haut treten [309]. Zur Vernetzung der Zellen der Haut mit dem Immunsystem besteht somit ein „direkter Draht“. Freie Nervenendigungen sind in der gesamten Epidermis zu finden und es besteht eine direkte Interaktion mit der Hautbarriere und den TJ [654]. Die Epidermis wurde entsprechend bereits als „sensorisches Epithel“ beschrieben [655].

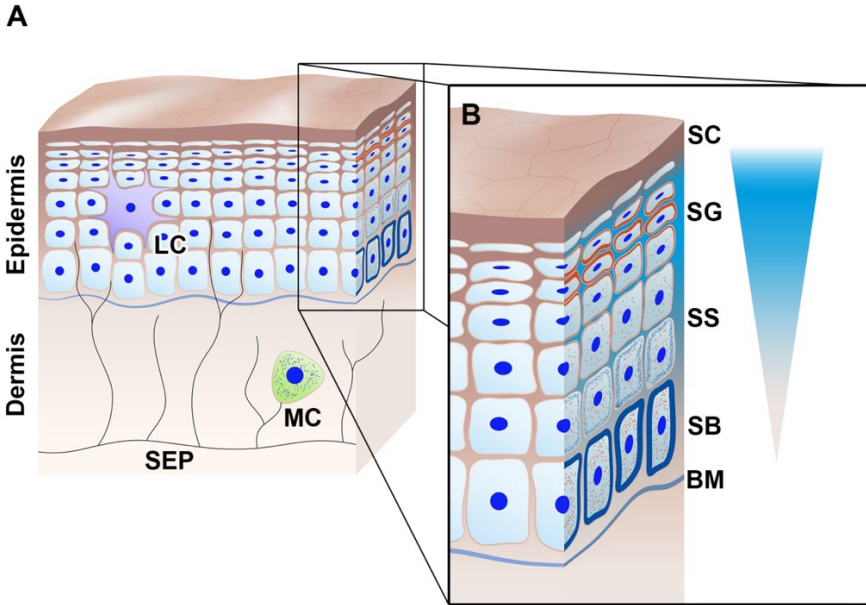


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Haut

Das Bild (A) zeigt den schematischen Aufbau der Haut mit einzelnen Komponenten des lokalen funktionalen Systems, der Ausschnitt (B) im Detail den Aufbau der Epidermis. Gezeigt sind die Verteilung der basalen Zytokeratine wie beispielsweise Keratin-14 (dunkelblau) und eines der barrieretragenden Moleküle, das Claudin-1 (rot, siehe Kapitel 1.1.1.3). Außerdem ist der epidermale Calciumgradient angedeutet (blaues Dreieck, siehe Kapitel 1.1.1.1). Abkürzungen: BM= Basalmembran, LC= Langerhanszellen, MC= Mastzelle, SB= Stratum basale, SC= Stratum corneum, SEP= Subepidermaler Nervenplexus, SG= Stratum granulosum, SS= Stratum spinosum.

### 1.1.1.1 Die Regulation der epidermalen Differenzierung

Der Vorgang der Differenzierung der Epidermis beinhaltet den komplexen Ablauf von Proliferation der KC bis hin zur Bildung der Zellresiduen des SC [651]. Störungen dieses Ablaufes können Hauterkrankungen verursachen und medieren [7] und bis zu einem Zusammenbruch der epidermalen Funktion führen [30; 192]. Der Prozess der Differenzierung wird entsprechend durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst (z.B. Transkriptionsfaktoren, Signalwege u.v.m. [81; 109; 384]), die aufeinander abgestimmt sind. Der gesamte Ablauf wird zusätzlich durch epigenetische Faktoren beeinflusst [3]. Es stehen zwei wesentliche Gradienten in der Epidermis zur Verfügung, die eine zeitliche Koordinierung der Differenzierung ermöglichen: ein Calcium- [61] und ein Acetylcholin-Gradient (ACh-Gradient) [153].

Die Konzentration des Calciums ist im Bereich des SB am niedrigsten und nimmt bis zum SG zu, um über das SC wieder abzunehmen [60; 202; 456; 680] (siehe Abb. 1). Der Wechsel der Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) führt zu morphologischen und genomischen Veränderungen der KC mit Bildung und Veränderung der Zell-Zell-Kontakte [61], was auch die Bildung von INV und FLG initiiert [61; 710]. Dieser Prozess ist Voraussetzung zur Reifung der KC vom SS in das SG und zum Aufbau der Barrierefunktion der Epidermis [680]. Somit sind Calcium-abhängige Zellkontakte, deren intrazelluläre Komponenten und der Calciumgradient

ein potenter Ansatzpunkt für Regulationsmechanismen, wofür bereits mathematische Modelle vorgeschlagen wurden [164]. Über das ACh als weiteren Differenzierungsfaktor und –gradient wird in Kapitel 1.1.2 berichtet.

Die verschiedenen zellulären Kompartimente und Komponenten in der Epidermis führen zu einer mehrschichtigen Barriere der Haut [458], die von außen nach innen zunehmend spezialisierter wird. Die Barrierefunktion entwickelt sich von unspezifisch-allgemein zu gerichtet und reizadaptiert [46; 210], was auf verschiedenen Ebenen reguliert und im Folgenden im Detail aufgeführt wird.

#### 1.1.1.2 Mechanisch-unspezifische Barriere im Stratum corneum

Das SC als äußerste Schicht der Haut und erstes Hindernis für Fremdstoffe hat primär physisch-chemische Eigenschaften durch Fettgehalt, Art der vorhandenen Fettsäuren und pH-Wert [72; 216; 555]. Das SC besteht im Wesentlichen aus Corneozyten, Lipiden und Wasser. Funktionell resultiert eine wie „Ziegel und Mörtel“ anmutende Struktur aus Corneozyten und Lipidmatrix [492]. Die Corneozyten, als Residuen der ausdifferenzierten KC, bestehen aus aggregierten Keratinen, die an das „cornified envelope“ aus vernetztem INV und Loricrin anschließen, was wiederum extrazellulär an ein „lipid envelope“ kovalent gebunden ist [429]. Es resultiert somit eine Verbindung zwischen Protein- und Lipidschicht. Die Lipide bilden hierbei organisierte Schichten [198], es entstehen regelrechte multilamellare extrazelluläre Systeme [199]. Die Lipide sorgen für die hydrophobe Eigenschaft, was die Permeabilität des SC einschränkt [199]. Der „freie“ Wasseranteil ist ungleichmäßig im SC verteilt [86], in Form von hydrophilen „Zisternen“, die im Austausch mit der Umgebung stehen [702].

Der saure pH des SC ist, als zusätzliche chemische Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen, fein reguliert [201]. Er beeinflusst das lokale Mikrobiom [383], reguliert aber auch die Desquamation der Epidermis und die strukturelle Integrität des SC [200]. Die Feinstruktur und Organisation des SC ist aber nicht statisch, sondern kann bei Bedarf aktiv angepasst werden. Zum Beispiel wird auf eine Störung der Hautbarriere die Exozytose von Lipiden aus den LB im SG aktiv gesteigert [457], im Sinne eines Homöostasemechanismus.

Neben der chemischen Abwehr ist im SC aber auch ein biologischer Abwehrmechanismus zu finden [210]. Zwischen den oberflächlich abschilfernden Zellresten des SC findet sich eine große Anzahl an Mikroorganismen [142]. Sie können potenziell pathogene Bakterien in ihrem Wachstum einschränken oder verdrängen, beispielsweise über bakterieneigene, antimikrobiell wirksame Peptide (AMP) [304]. Es resultiert eine große Ansammlung variabel zusammengesetzter Mikroorganismen, mit bis zu  $10^6$  Bakterien pro  $\text{cm}^2$  Haut [273]. Die Epidermis wird bei der Geburt mit Mikroorganismen besiedelt und dieses Mikrobiom reift mit jedem Individuum, zusammen mit dessen Immunsystem [126]. Es ist für jeden Menschen einzigartig [1] und eine Voraussetzung für eine funktionierende immunologische Barriere [486]. Das Mikrobiom interagiert mit dem lokalen Immunsystem der Epidermis über die Grenzen des SC hinweg, sodass ein „Fine Tuning“ der lokalen Immunantwort erfolgt [401; 485]. Die Interaktion findet in beide Richtungen statt, die Zusammensetzung des Mikrobioms hängt also auch von der lokalen Immunsituation ab [653].

Durch eine immungesteuerte Unterstützung einer gesunden Flora können beispielsweise pathogenetische Erreger oder deren Virulenzfaktoren, wie beim Bakterium *Staphylococcus aureus*, kontrolliert werden [24].

#### 1.1.1.3 Tight Junctions: Physikalisch-spezifische Barriere im Stratum granulosum

Die hauptsächliche Barrierefunktion der Epidermis findet sich im oberen SG bei den TJ [303]. Hier werden Wasser und lösliche Substanzen wie Ionen und größere Moleküle zurückgehalten, effektiver und gezielter als im SC und mit Anpassung der Durchlässigkeit nach Bedarf [19; 373]. Lokalisiert ist diese Barriere beim Menschen zwischen der zweiten und dritten Zellschicht des SG [723]. Die teils zirkumferenten oder „gürtelähnlichen“ Proteinkomplexe der TJ verbinden an der apicalen Zellmembran die KC miteinander und kompartimentieren dadurch den interzellulären Raum [93]. TJ haben neben der reinen Barrierebildung weitere wichtige Funktionen in vielen Zellen. Sie ermöglichen die Entwicklung der Zellpolarität [184; 449], regulieren die Genexpression [449] wie auch die zelluläre Proliferation [678]. Zudem spielen sie bei der Signaltransduktion eine wesentliche Rolle [261]. TJ erscheinen in der Differenzierung der Haut bereits vor der Bildung des SC [556] und beeinflussen die SC-Bildung und -Integrität [373; 649; 729].

Viele Arten an TJ-Proteinen sind bekannt und sie können in Bezug auf die Zellmembran in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: integrale Membranproteine und zytoplasmatische Plaque-Proteine [609]. Die Membranproteine durchspannen die Zellmembran und besitzen luminal und intrazelluläre Komponenten [19]. Die Plaque-Proteine schließen intrazellulär an die integralen Membranproteine an und koppeln diese an das Zellskelett und an das intrazelluläre Informationssystem [609]. Von den TJ-Molekülen sind Claudin-1 (CLDN-1) und Zonula occludens-Protein-1 (ZO-1) bei der Barriere in der Haut gegen größere Moleküle besonders wichtig [373].

CLDN-1 ist in der Haut eines der wichtigsten barriere tragenden Proteine [663]. Im Tierversuch versterben Mäuse ohne funktionales CLDN-1 in den ersten Lebenstagen an den Folgen eines Barriereverlustes [236]. Die Familie der Claudine umfasst bei Säugetieren mindestens 27 Mitglieder [679], die mit vier Transmembrankomponenten und jeweils kurzen amino- und carboxyterminalen zytoplasmatischen Enden ausgestattet sind [387]. CLDN-1 als Vertreter dieser Familie ist 23 kDa groß und sein carboxyterminales Ende bindet an die zytoplasmatischen Plaque-Proteine [677]. CLDN-1 ist in allen Zellschichten der Epidermis von Mensch und Maus zu finden [93]. Die Lokalisation in der Zelle spiegelt auch die Funktion wieder [54; 727]. Basal in der Epidermis ist CLDN-1 ein potenzieller Proliferations-, Migrations- und Verankerungsfaktor [54; 373; 515], apical dient es der Barrierebildung. Die nach apical zunehmende  $[Ca^{2+}]$  in der Epidermis löst einen Lokalisationswechsel aus, mit Translokation von CLDN-1 von nukleär und perinukleär an die Zellmembran [54; 727]. Im SB und SS findet sich das Protein entsprechend teils peri- und intrazellulär, im SG wechselt es auf Zell-Zell-Kontakte [371] (siehe Abb. 1). CLDN-1 beeinflusst bei dessen Inkorporation in die TJ auch deren Form. Die TJ bilden hierdurch ein großes, verzweigtes Netzwerk [235]. Alleine kann CLDN-1 jedoch

keine funktionierende TJ bilden, Voraussetzung für eine funktionelle Anordnung des CLDN-1 in den TJ sind weitere, zytoplasmatische Proteine, wie das E-Cadherin und das ZO-1 [682; 690].

ZO-1 ist ein zytoplasmatisches Plaque-Protein von 220 kDa Größe, das eine „scaffolding“-Funktion im Sinne einer Strukturierung von Proteinkomplexen der Zellmembran hat [282; 449]. Hierfür hat es mehrere strukturelle Domänen zur Proteininteraktion, unter anderem eine Membran-assoziierte Guanylatzyklase und eine C-terminale Domäne zur Aktinbindung [37; 329]. ZO-1 findet sich entsprechend seiner Funktion in TJ [329], auf die Epidermis bezogen folglich in den suprabasalen Zellschichten, vor allem im oberen SS und im SG [92; 371]. Es reguliert unter anderem die Polymerisation von Claudinen in den TJ [690], verbindet TJ mit dem Aktinfilamentsystem und ist an der Signaltransduktion beteiligt [37]. Unter gewissen Umständen ist ZO-1 auch im Zellkern zu finden [609], wo es die Proliferation der Zelle herunterregulieren kann [37; 449]. Die essenzielle Rolle von ZO-1 wird auch dadurch bestätigt, dass ZO-1-Knock-out (KO)-Mäuse bereits intrauterin versterben [345].

Occludin (Ocl) ist ein weiteres integrales Membranprotein der TJ [609]. Es ist ein 4-Transmembranprotein von ca. 60 kDa Größe, mit zwei extrazellulären „loops“ und beiden Proteinenden im Intrazellulärraum [609]. Es existieren zwei Splicevarianten mit etwa gleicher Verteilung [480]. In den epidermalen TJ findet sich Ocl im Bereich des oberen SG [371], wo es den parazellulären Raum apical, in Kooperation mit Claudinen, abschließt [369]. Es bindet ebenso an zytoplasmatische Proteine wie ZO-1 [89]. Allerdings zeigen Studien von KO-Mäusen, dass in Abwesenheit von Ocl die TJ trotzdem normal konfiguriert und funktional sind [592]. Weitere TJ-Moleküle haben eine relevante Bedeutung in der Haut [91], sind jedoch nicht Inhalt dieser Arbeit.

Um die notwendige Flexibilität für ihre dynamische Aufgabe zu erhalten, werden die drei hier vorgestellten TJ-Moleküle nach Bildung in der Zelle verändert, also einer posttranslationalen Modifikation unterzogen [221; 261]. Dies beeinflusst deren Funktion und Mobilität in der Zelle (siehe auch Kapitel 1.1.5.3). Während ZO-1 selbst Kinaseaktivität besitzt [300], können CLDN-1 [221; 261] und Ocl [594], von ZO-1 und anderen Kinasen phosphoryliert und aktiviert werden. Entsprechend ihrer Aktivität unterliegen die TJ-Moleküle einem „Remodeling“. Sie sind zwischen der Zellmembran und dem Intrazellulärraum mobil, auch in ruhendem Gewebe [405]. Dies macht eine schnelle „Bedarfsanpassung“ möglich [36; 370]. CLDN-1 wechselt dabei primär innerhalb lokaler TJ, muss aber phosphoryliert sein, um funktionell aktiv zu sein [261; 598]. ZO-1 tauscht sich überwiegend mit dem intrazellulären Pool aus [405]. Ocl-Moleküle sind innerhalb der Plasmamembran sehr dynamisch mobil, für die Inkorporation in TJ muss Ocl ebenso phosphoryliert sein [214; 594]. Unphosphoryliert findet es sich vor allem an der basolateralen Membran einer Zelle [214].

Durch die Menge der TJ-Proteine, ihrer Verteilung in der Zelle und ihrer Funktionalität kommt eine effektive Hautbarriere zustande. Dabei handelt es sich um einen dynamischen Prozess, sodass die ausdifferenzierenden KC bei der Apicalwanderung im SG durch eine kontinuierliche Erneuerung der TJ-Verbindungen die Barriere „dicht halten“ können [722].

#### 1.1.1.4 Immunologische Barriere der Epidermis

Die Haut stellt ein eigenes „immunologisches Organ“ dar und beinhaltet in allen Schichten Vertreter des Immunsystems [1]. Die Epidermis mit ihrer Immunausstattung ist als erste Kontaktstelle mit der Außenwelt ein funktionell eigenes Kompartiment, das eine Schlüsselrolle bei immunvermittelten Hauterkrankungen einnimmt [130]. Eine lokale Fehlregulation in der Epidermis kann bereits zu immunmedierten Hauterkrankungen führen [336] oder diese verstärken [352]. Entsprechend wird das Immunsystem der Epidermis hier gesondert aufgeführt, denn es ist fest verknüpft mit den anderen Barrierekomponenten [644; 645].

Von außen an die Haut herantretend, finden sich auf und im SC, neben dem Mikrobiom und dessen Abwehrstoffen, bereits körpereigene antimikrobielle Fette und Proteine, die als AMP zusammengefasst werden [200; 242]. Sie werden weiter basal von den vitalen KC und von Schweißdrüsen sezerniert [283; 299]. AMP bilden eine erste unspezifische Abwehrstation und helfen dem Mikrobiom der Haut pathogene Keime in Schach zu halten [53]. Die Ausschüttung von AMP kann bei Bedarf, wie z.B. bei einer Inflammation, hochreguliert werden [283].

Wird das SC von einem Pathogen überwunden, ist anschließend ein Treffen mit Vertretern des zellulären Immunsystems der Epidermis vorprogrammiert [1]. KC selbst haben als „first line“ Verteidigung eigene Abwehrmechanismen [130] (s. auch Kapitel 1.1.5.2.2). Die anschließend am weitesten verbreitete epidermale Immunzellart ist beim Menschen die Langerhanszelle (LC), bei Mäusen die den Lymphozyten zuzuordnende dendritische epidermale T-Zelle (DETC) [493].

LC als epidermaler Teil des Monozytären-Makrophagen-Systems machen ca. 2 – 4 % der epidermalen Zellen aus [180]. Sie sind Vertreter des angeborenen Immunsystems, die schnell und ohne vorherigen Kontakt mit einem Pathogen reagieren können [1]. LC sind im SS zu finden, wobei ihre Pseudopoden bis zum SC reichen (s. Abb. 1), mit Erhalt der TJ zu den KC, sodass ein Antigenkontakt ohne Kompromittierung der Barriere stattfinden kann [7]. Die LC überwachen damit, ob eine Infektion oder Verletzung der Haut besteht [161; 180]. Natürliche lymphoide Zellen (innate lymphoid cells, ILC), werden auch dem angeborenen oder inneren Immunsystem zugeordnet und in Kapitel 1.1.5.2.1 beschrieben. Für eine geregelte epidermale Funktion ist jedoch ein immunologisches Gleichgewicht vor Ort von Nöten, wofür auch Vertreter des adaptiven Immunsystems in der Epidermis zu finden sind [1; 102; 152], die hier in Kürze vorgestellt werden.

In gesunder Epidermis finden sich mehrere Arten von T-Lymphozyten während B-Lymphozyten fast vollständig fehlen [152] (s. auch Kapitel 1.1.5.2). T-Zellen werden anhand der Art ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) in  $\alpha\beta$ - und  $\gamma\delta$ -T-Zellen unterteilt [152]. Sie sind entweder ortsansässig in der Epidermis oder Dermis vorhanden, oder sie wandern über Blut- und Lymphbahnen ab, um im Verlauf in die Haut zurückzufinden, ein „Rezirkulieren“, was auch „homing“ genannt wird [653].

Eine Unterteilung der  $\alpha\beta$ -T-Zellen erfolgt über die Co-Rezeptoren an der Oberfläche der Zellen. Hier werden  $CD4^+$ -T-Helferzellen, die major Histokompatibilitäts-Komplex-II-abhängig (MHC-II-abhängig) von anderen Zellen aktiviert werden und selbst andere Immunzellen aktivieren können, von zytotoxischen  $CD8^+$ -T-Zellen unterschieden, die MHC-I-abhängig sind [152]. In die Epidermis werden bei einer Entzündungssituation unter anderem mehrere Arten der  $CD4^+$ -T-Helferzellen rekrutiert, die proinflammatorisch aktiv sind [315]. Nach Oberflächenmarkern und ihrem Zytokinverhalten werden diese  $CD4^+$ -T-Zellen in Subtypen unterteilt, wie die  $TH_1$ ,  $TH_2$ ,  $TH_9$ ,  $TH_{17}$  oder  $TH_{22}$ -Zellen [703]. Von den aktiven oder auch „Effektor“-T-Zellen werden T-regulatorische Zellen ( $T_{reg}$ ) und verschiedene Subtypen von ruhenden T-Gedächtniszellen ( $T_{MC}$ ) unterschieden [703]. Die meisten  $\alpha\beta$ -T-Zellen in der Epidermis gehen nach Beseitigung des aktivierenden Pathogens in Apoptose über, bis auf die langlebigen  $T_{MC}$  [152]. Diese sind vor allem gegen epidermale Viren gerichtet und können bei Bedarf schnell reaktiviert werden [315].  $CD4^+$ - $T_{MC}$  rezirkulieren häufig, während  $CD8^+$ - $T_{MC}$  in der Epidermis nahe des Infektionsortes verbleiben [245]. Wenn keine Entzündungssituation in der gesunden Epidermis vorliegt, sind die zu findenden  $\alpha\beta$ -T-Zellen entsprechend fast ausschließlich  $CD8^+$ - $T_{MC}$  [493]. Die wesentliche Funktion von  $\alpha\beta$ -T-Zellen in der Haut werden in Tabelle 1 zusammengefasst, für das Verständnis der lokalen Immunfunktion und –Reaktion.

T-Zellen, die den  $\gamma\delta$ -TCR exprimieren, entsprechen in der Epidermis von Mäusen den DETC [188] und bilden dort den Großteil der epidermalen sessilen T-Zellen [305]. DETC-ähnliche  $\gamma\delta$ -T-Zellen finden sich auch beim Menschen [498; 660]. Ihre Aktivierung erfolgt unabhängig von MHC, lediglich über den TCR [477; 660]. Der sessile Teil der DETC liegt zwischen den vitalen Zellschichten der Epidermis [660]. Nach apical über eher starren Dendriten besteht jeweils Kontakt mit den TJ-tragenden KC, nach basal über mobile Dendriten mit angrenzenden Zellen [660]. Bei Mäusen können DETC über Zytokine weitere Zellen des inneren Immunsystems rekrutieren und über Interleukin (IL)-17A und Interferon (IFN)- $\gamma$  KC aktivieren [428; 652]. Ihnen wird eine Rolle bei der Wundheilung und der Tumorabwehr zugesprochen. Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen haben beim Menschen wahrscheinlich eine ähnliche Funktion [498].

Tabelle 1:  $\alpha\beta$ -Effektor-T-Zellen und ihre Funktion

Dargestellt sind die  $CD4^+$ -T-Helferzell-Subtypen, zytotoxische  $CD8^+$ -T-Zellen sowie T-regulatorische Zellen ( $T_{reg}$ ), jeweils mit ihren wichtigsten Eigenschaften sowie den Chemokinen, die sie bei Aktivierung exprimieren. Abkürzungen: AMP= antimikrobielle Peptide, DC= dendritische Zellen, FOXP3= Forkhead box P3, IFN= Interferon, IL= Interleukin, KC= Keratinozyten, TNF= Tumor-Nekrosefaktor.

Immunzelle	Typische Chemokine	Funktion, Pathologie und Besonderheit	Quelle
<b>TH<sub>1</sub></b>	IFN- $\gamma$ , IL-12	Bekämpfung von Bakterien und intrazellulären Pathogenen. Spielen eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen und immunmedierten Hauterkrankungen wie Psoriasis.	[469; 506]
<b>TH<sub>2</sub></b>	IL-4, IL-5, IL-13, IL-31	Abwehr extrazellulärer Erreger und nicht-bakterieller Fremdstoffe, Aktivierung eosinophiler Granulozyten und Mastzellen in der Dermis. Spielen eine Rolle bei atopischen Erkrankungen.	[22; 23], s. auch Kapitel 1.1.6.1
<b>TH<sub>9</sub></b>	IL-9	Werden durch IL-9 aktiviert, mit Folge einer mehrere Tage anhaltenden IL-9-Ausschüttung. Beteiligung bei Abwehr extrazellulärer Erreger,	[103; 605; 719]

Immunzelle	Typische Chemokine	Funktion, Pathologie und Besonderheit	Quelle
		Rekrutierung anderer T-Zellen. Spielen eine Rolle bei atopischen Erkrankungen.	
TH <sub>17</sub>	IL-17, IL-22	Werden über KC aktiviert oder über dendritische Zellen aus Lymphknoten in die Haut rekrutiert. Locken neutrophile Granulozyten an. Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen. Spielen eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie der Psoriasis.	[506; 580; 599; 642]
TH <sub>22</sub>	IL-22	Schütten unabhängig von IL-17 das IL-22 aus. Aktivieren Zellen des inneren Immunsystems, fördern epidermale Differenzierung, steigern KC-Proliferation und Ausschüttung von AMP aus KC. Spielen eine Rolle bei diversen Hauterkrankungen.	[209; 233; 506; 712]
CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	Werden durch Virusinfektionen und entartete Zellen aktiviert, der Signalweg erfolgt über DC. Lysieren infizierte Zellen und produzieren proinflammatorische Zytokine.	[330]
T <sub>reg</sub>		Kennzeichen ist der Transkriptionsfaktor FOXP3. Funktion ist die Zytotoxizität oder Inhibition von B-Zellen bzw. DC oder Suppression von anderen T-Zellen. Sind nur selten proinflammatorisch aktiv. Bilden Kontrollelemente der Autoimmunität, begrenzen eine epidermale Inflamationsreaktion, regulieren die immunologische Homöostase der Haut. Die Population entwickelt sich mit dem Mikrobiom und reguliert die Selbst- und Mikrobiom-Toleranz.	[55; 290; 593; 604]

Der allgemeine Ablauf einer Immunreaktion in der Haut ist äußerst komplex, beinhaltet viele Zellgruppen aus Epidermis, Dermis und anderen Kompartimenten und das Verständnis dieser Interaktionen ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung [487]. Ein Überblick wird gemeinsam mit einer Einführung über die Immunausstattung der Dermis in Kapitel 1.1.5.2.1 gegeben.

### 1.1.2 Epidermales cholinerges System, eine Schnittstelle zwischen Differenzierung, Immunfunktion und Homöostase

Zwischen Aufbau und Funktion der Epidermis, sowie bei der Integration des lokalen Immunsystems, sind funktionelle „Brücken“ notwendig, die übermittelnde lösliche Faktoren beinhalten [513]. Eine von diesen Brücken kann das cholinerge System der Haut bilden. Denn das ACh, das parakrin und autokrin wirksam ist, ist ein Kontrollelement der epidermalen Differenzierung [264; 268], der funktionellen Barriere [153; 400] sowie der Immunreaktion [73; 153]. Es bildet einen eigenen homöostatischen Kontrollmechanismus der Haut [709]. Da diese cholinerge Regulation in der Epidermis unabhängig von der Funktion des ACh als Neurotransmitter ist, gilt sie als Teil des nicht-neuronalen cholinergen Systems (NNCS) [397; 709].

Die Konzentration von ACh in der Epidermis ist von der Regulation der Enzyme zu dessen Bildung und Abbau abhängig. ACh wird von den KC mittels der Cholinazetyltransferase (ChAT) synthetisiert, die in allen epidermalen Zellschichten zu finden ist [264]. Die

Acetylcholinesterase (AChE) degradiert ACh und findet sich vor allem in den basalen Zellschichten [264]. In der Epidermis bildet sich, analog zum Calciumgradienten, ein „cholinerges Mikromilieu“ aus, mit höchster Konzentration von ACh in den äußersten Epidermisschichten [153; 494].

Der Effekt von ACh wird über verschiedene Rezeptoren vermittelt und umfasst unter anderem die Proliferation und Differenzierung von KC, deren Adhäsions- und Migrationseigenschaften, sowie deren Apoptose [163; 264; 395; 732]. In der Epidermis ändert sich nach Reifegrad der KC auch die Ausstattung der Zellen mit ACh-Rezeptoren, sodass je nach Differenzierungsstufe der KC eine angepasste Reaktion auf ACh erfolgen kann [269]. Bei den Rezeptoren für ACh werden nikotinerge Rezeptoren (nAChR), welche Ligand-aktivierte Ionenkanäle sind [228], von muskarinergen Rezeptoren (mAChR) unterschieden, die G-Proteingekoppelte Rezeptoren darstellen [324].

Die nAChR sind Pentamere aus transmembranen Untereinheiten ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -Untereinheiten), die als Homo- oder Heteropentamere vorliegen können, von denen KC nur  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten exprimieren [265]. Die Zusammensetzung der Rezeptoren entscheidet über die Sensitivität gegenüber Kanal-Agonisten und -Antagonisten, sowie über die Permeabilität der geöffneten Kanäle für Kationen wie Calcium, Natrium und Kalium [239]. Die Zusammensetzung eines Rezeptors kann somit zu unterschiedlichen metabolischen Konsequenzen in der Zelle führen [398]. Bei den KC ist der nAChR-abhängige Calcium-Influx ein wesentlicher Akteur [267].

Die mAChR sind monomere 7-Transmembranrezeptoren, von denen es fünf verschiedene genetische Varianten gibt, mit jeweils unterschiedlichen „second messenger“-Signalkaskaden [324]. Angeschlossene second messenger sind  $G_q$ -Proteine ( $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_5$ ) mit Phospholipase C- oder D-Anschluss, oder  $G_i$ -( $M_2$ ,  $M_4$ ) Signalkaskaden, mit Inhibierung der Adenylatzyklase. Alle Rezeptortypen sind in der Epidermis zu finden [266; 396; 489] und haben hier vielfältige Effekte auf die KC [271].

In der Epidermis ist die Verteilung der AChR variabel, vor allem die der  $\alpha_3$ -Untereinheiten, die je nach Lokalisation, Alter und Gesundheitszustand des Individuums variieren können [398]. In gesunder, humaner Haut findet sich typischerweise im SB der  $\alpha_3\beta_2(\beta_4)$  nAChR, mit oder ohne  $\alpha_5$ -Untereinheiten, sowie  $M_2$  und  $M_3$ -AChR. Im SS sind mehr  $\alpha_3$ nAChR, die zusätzlich  $\alpha_5$ -Untereinheiten enthalten können, aber auch  $\alpha_9$ nAChR sowie  $M_4$  und  $M_5$  zu finden. Das in Bezug auf die Barrierefunktion wichtige SG hat vor allem eine Ausstattung mit  $\alpha_7$ -nAChR und  $\alpha_9$ -nAChR, zusätzlich werden dort auch  $M_1$ -AChR exprimiert [269; 400].

Der  $\alpha_7$ -nAChR wird durch  $\alpha_7$ -Untereinheiten zusammengesetzt, die wiederum durch das „cholinergic receptor nicotinic alpha subunit“-7-Gen (CHRNA7) kodiert werden [400]. Erwartungsgemäß ist der  $\alpha_7$ -nAChR an der terminalen Differenzierung und Barrierebildung der KC beteiligt [33; 519], sowie potenziell auch notwendig für einen Funktionserhalt der Barriere [154]. Nicht nur die Aktivierung des  $\alpha_7$ -nAChR, sondern auch dessen Modulation mittels nicht-kanonischer Liganden wie „secreted mammalian Ly-6/urokinase-type plasminogen activator

receptor-related proteins“ (SLURP) -1 und -2, sind für ein Fine Tuning der Rezeptoren verfügbar [128; 129].

Der  $\alpha 9$ -nAChR und  $M_1$ -AChR haben ebenso eine Bedeutung in der KC-Proliferation und epidermalen Differenzierung im SG [154; 269; 398; 688], ob ein Einfluss auf die TJ der Epidermis besteht, ist aber bisher nicht bekannt. Entsprechend wird auf ihre Funktion in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

### **1.1.3 Neuropeptide und Neurotrophine: Schlüsselposition zwischen Nervensystem und Autoregulation der Haut**

Zwischen Nervensystem und Haut sind zur Übermittlung von Informationen, neben den direkten Zell-Zell-Kontakten, auch eine Vielzahl kleiner Peptide bekannt („Neuropeptide“), die hormonell aktiv sind und eine wichtige Rolle für die epidermale Homöostase, sensorische Wahrnehmung, Regulation der Durchblutung aber auch für die lokale Inflammation spielen [635]. Substanz P, Calcitonin gene-related peptide (cGRP), vasoaktives intestinales Peptid, Neuropeptid Y und  $\beta$ -Endorphin sind einige Vertreter dieser Neuropeptide [127; 635]. Zum Zusammenspiel zwischen verschiedenen Neuropeptiden und der epidermalen Funktion, insbesondere im Kontext von Stress und Hautinflammation, gibt es bereits einige Studien [31; 517; 540; 635]. In dieser Arbeit wird entsprechend nur auf die Gruppe der NT eingegangen, die zu den Neuropeptiden zählen [80; 82].

NT beeinflussen nicht nur Wachstum und Überleben von cutanen Nervenfasern, wie der Gruppenname suggeriert [416]. Sie sind auch homöostatische Faktoren in der Haut [80; 541], die zusätzlich zwischen den Zellen von Haut [674], Immunsystem [455] und Nervensystem vermitteln [584]. Die NT sind strukturell und funktionell ähnliche Substanzen, die an Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Trk) binden [415]. Sie wirken in der Haut überwiegend para- und autokrin [97; 546]. Zielrezeptoren der NT sind der unselektive p75-NT-Rezeptor, sowie die Trk-Rezeptoren A, B und C [415]. Die einzelnen NT haben eine unterschiedliche Affinität zu den Rezeptoren, auch abhängig davon ob das jeweilige NT in reifer oder unreifer Form vorliegt [80]. An den unselektiven p75-NT-Rezeptor binden alle NT-Vorstufen mit hoher Affinität, reife NT aber mit niedriger Affinität [80].

Quelle der NT in der Haut sind Nervenendigungen [584] und dermale sowie epidermale Zellen, wie zum Beispiel KC [177; 673], Mastzellen [410], Fibroblasten [114] oder lokale Immunzellen [276]. Den NT-sezernierenden Zellen ist gemeinsam, dass sie auf Trigger wie eine Verletzung oder Inflammation die Sekretion von NT anpassen können [584]. Alle drei Trk-Rezeptoren der NT wurden in epidermalen humanen KC gefunden, wobei der TrkB dort nicht funktional ist [439], während bei murinen KC nur der TrkA und der TrkB exprimiert wird [78]. Von den bekannten NT wird in dieser Arbeit der Nerve growth Factor (NGF) und der Brain-derived neurotrophic Factor (BDNF) weiter untersucht.

NGF bindet mit hoher Affinität an TrkA [636]. Mit Beginn der Innervation ist NGF auch in der Haut zu finden [127], wobei die Epidermis eine relevante Quelle des NGF darstellt [65]. Schmerzwahrnehmung, Juckreiz und neurogene Inflammation werden über NGF moduliert [18].

Als lokaler Stressmediator in der Haut kann NGF Nervenendigungen der Haut zu Wachstum und Verzweigung anregen, Mastzellen zur Degranulation bringen und die Ausschüttung von anderen NT, Neuropeptiden, sowie proinflammatorischen Zytokinen bewirken, aber auch über diese vermehrt ausgeschüttet werden [80; 127; 636]. In KC-Kulturen führt NGF zur vermehrten Proliferation und verminderten Apoptose im Sinne eines „Überlebenssignals“ [438; 547]. Dabei wird NGF von proliferierenden KC selbst ausgeschüttet [546], sodass eine konstante NGF-Konzentration in den basalen Zellschichten der Epidermis besteht, die autokrin auf die Zellen wirksam ist [65; 127; 548]. Auch Mastzellen und andere Immunzellen synthetisieren und schütten NGF aus [67; 500; 715].

BDNF bindet mit hoher Affinität an den TrkB [691]. Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist BDNF im Zusammenhang mit neuronaler Regulation und neuronalem Überleben ausgiebig erforscht worden. Ein Zusammenhang zwischen BDNF und psychischen Verhaltensweisen, psychischen Erkrankungen, kognitiver Funktion, Lernen, Gedächtnis sowie neurodegenerativen Erkrankungen wurde beschrieben [418; 424]. In der Haut findet sich BDNF bei Mäusen hauptsächlich an Nervenendigungen [78], beim Menschen auch in KC, Mastzellen und Fibroblasten [276], sowie allgemein in der Epidermis mit Konzentration auf das SG [65]. Diverse Immunzellen können auch BDNF sezernieren [501]. Bei Mäusen beeinflusst BDNF die Nerventrophik im Rahmen der sensorischen [394; 409] und adrenergen Innervierung [76]. Beim Menschen erfüllt es wahrscheinlich eine ähnliche Funktion [127]. Auch wirkt sich BDNF bei Menschen und Mäusen proliferativ auf die Trophik der Epidermis aus und beeinflusst das Haarwachstum [77–80]. BDNF der Nervenendigungen spielt auch eine Rolle in der Schmerzverarbeitung [627]. Lokaler Stress, wie Behandlung mit Milchsäure, steigert hierbei die BDNF-Ausschüttung von KC [302]. Da humanen KC ein funktioneller TrkB-Rezeptor fehlt [439], wird davon ausgegangen, dass der Effekt von BDNF auf KC entsprechend über Zwischenwege erfolgen muss, oder nur den p75-NT-Rezeptor involviert, was die proapoptischen Effekte in einigen Versuchen erklären würde [675]. Ein Binden von BDNF an die verkürzte Rezeptorvariante des TrkB in der humanen Epidermis könnte dazu dienen, lokales freies BDNF zu reduzieren oder intrazelluläre Signale zu reduzieren [409].

Zusammengefasst vermitteln NT über die hochaffinen TrkA-, B- oder C-Rezeptoren „Überleben und Proliferation“ und gemeinsam mit den Trk unterstützt der p75-NT-Rezeptor die jeweilige Trk-Aktivität [80]. Alleine aktiviert, induziert der p75-NT-Rezeptor jedoch eine Apoptose [80].

#### **1.1.4 Stressreaktion: eine „Black Box“. Systemtheoretische Analyse von Stressmechanismen**

Stress spielt eine relevante Rolle für die Hautbiologie [525], steuert die Immunsituation der Haut [173] und beeinflusst somit die Ausprägung und Entwicklung von Hauterkrankungen [571]. Entsprechend ist das Verständnis von Stress und den verschiedenen Stressmechanismen ein zentrales Thema dieser Arbeit. Um nachvollziehbare Konzepte von Stressoren, Stressmediatoren und lokalem Resultat zu erstellen, ist es sinnvoll, systemtheoretische Ansätze zu verwenden, die in der Lage sind, komplexe biologische

Netzwerke und deren Systematik zu modellieren [183]. Die wichtigsten Theorien und Termini hierzu werden im Folgenden aufgeführt.

Historisch betrachtet stammt der Begriff „Stress“ von der physikalischen Beschreibung einer Kraft, die deformiert und mit gegenwirkenden Rückstellkräften assoziiert ist [260]. Cannon und Selye übernahmen den Begriff und beschrieben damit die Störung der Homöostase eines lebenden Körpers [111]. Als Homöostase definierten sie die Fähigkeit eines höher entwickelten Lebewesens, trotz Veränderungen der Umgebungsbedingungen, die inneren „Konditionen“ stabil zu halten, mit Hilfe von koordinierten Reaktionen [111]. Stress ist dabei Ausdruck der „allgemeinen Alarmsituation“ eines Organismus, der plötzlich mit einer kritischen Situation konfrontiert ist [616] und führt zu einer „fight or flight“-Reaktion, einer unspezifischen Reaktion die unabhängig von den auslösenden Faktoren ist [110; 614; 615]. Moderner beschrieben McEwen und Seeman die Stressreaktion als eine über hormonelle und Neurotransmitter-Mediatoren koordinierte physiologische Reaktion von Zellen und Geweben im gesamten Körper, als Reaktion auf ein internes oder externes Umfeld [452, p. 31]. Nach Juster resultiert „Stress“ zudem aus einer realen oder real gewerteten Bedrohung der physischen und psychischen Unversehrtheit, die zu einer biologischen oder Verhaltens-Reaktion führt [343]. Der Sinn der Stressreaktion für den Organismus besteht darin, eine „unmittelbare Krise“ zu überstehen, was schützende und adaptive, aber auch schädliche Effekte haben kann [452].

Dieses Konzept der Reaktion eines System im Rahmen von „Stress“ wurde von Sterling und Eyer übernommen und so formuliert, dass ein Organismus erst über eine Veränderungen von Parametern des internen „Milieus“ (z.B. Blutdruck, Hormonkonzentrationen) auf externe Anforderungen adäquat reagieren und somit Stabilität erreichen kann. Diese Fähigkeit „Stabilität durch Veränderung“ zu erlangen, wurde „Allostasis“ genannt [641] und stellt einen Ansatz zum Verständnis der akuten und chronischen biologischen Konsequenzen einer Stressreaktion dar [259].

Eine anhaltende Stressreaktion ist für den Körper ein Ressourcen-intensives Unterfangen [260]. Eine allostatistische Reaktion, die durch einen Stressor initiiert wurde, wird entsprechend nach angemessener Reaktionszeit durch Gegenregulations-Mechanismen des Organismus beendet [452]. Regulatorische Systeme, welche die allostatistische Auslenkung beenden können, minimieren die Belastung des Systems und führen den Organismus zu einer Gleichgewichtssituation zurück [121]. Ein Organismus befindet sich somit zu jedem Zeitpunkt in einem „allostatistischen Zustand“ [259], der die Gesamtheit der Interaktionen von Gehirn und Körper beinhaltet [408].

Die allostatistische Belastung oder allostatistische Last („allostatic load“) ist entsprechend ein Maß der Belastung, die ein Organismus durch wiederholte Auslenkung aus seinem Gleichgewicht beziehungsweise seiner Homöostase erfährt [382]. Auch eine fehlende Adaptation auf einen Stressor, das verzögerte Herunterfahren einer Stressreaktion oder eine inadäquate Stressreaktion kann eine allostatistische Last bedeuten, die chronifizieren kann [452]. Chronischer Stress ist in dem Zusammenhang definiert als ein andauernder Stimulus über Tage bis Wochen oder ein repetitiver Einzelstress auf täglicher Basis mit hoher Intensität [169; 326].

Die dadurch entstehende allostatische Belastung führt zu einer katabolen Energiesituation, die bei längerer Dauer zur Dysregulation des Organismus führen kann [382].

McEwen und Seemann unterschieden beim Messen einer allostatischen Belastung im Rahmen einer Stressreaktion folgende Komponenten [452]:

- Primäre Mediatoren: Substanzen, die im Rahmen der Allostasereaktion ausgeschüttet werden, z.B. Cortisol, Adrenalin.
- Primäre Effekte: Zelluläre Reaktionen auf die primären Mediatoren, z.B. Enzymaktivierung, Aktivierung sekundärer Messenger-Systeme, Protein-Phosphorylierung.
- Sekundäres „Outcome“: Gewebe- oder organspezifische Reaktion auf die Summe der Primärmediatoren, z.B. Blutdruckanstieg, allergische Reaktion, Inflammation.
- Tertiäres „Outcome“: Erkrankungen als Folge der allostatischen Belastung, die durch Messen von Primärmediatoren oder sekundärem Outcome teilweise vorhergesagt werden können, wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebserkrankungen oder in Kontext dieser Arbeit Hauterkrankungen.

Vielfältige Reize können als Stressoren dienen und allostatische Reaktionen auslösen. Dazu gehören physikalische Einflüsse (z.B. Hitze, Kälte, Strahlung), aber auch körperliche Faktoren, wie physische Aktivität, Ernährung, Verletzung, Infektion oder Tumorerkrankung [525; 616]. In die Liste der Stressoren gehören gleichermaßen psychosoziale Faktoren oder Emotionen, psychische Herausforderungen oder Lebensereignisse [452]. Die allostatische Reaktion und Belastung ist entsprechend für jeden Organismus individuell und unter anderem abhängig von genetischen Eigenschaften und epigenetischen Komponenten [454]. Darüber hinaus bestimmen auch Lernprozesse das Verhalten des Systems [356; 509]. Das bedeutet, persönliche Erfahrungen, Kultur, traumatische Ereignisse, Persönlichkeit und andere prädisponierende Faktoren können die psychologische Reaktion beeinflussen und festlegen, ob eine Situation Stress auslöst oder nicht [351]. Die Interaktion dieser Einflüsse legt die individuelle Vulnerabilität einer Person oder eines Organismus fest [121], beeinflusst somit dessen allostatisches Auslenkungs-Stadium und das entsprechende Gleichgewicht oder Ungleichgewicht. Die Fähigkeit wiederum, sich von negativen Erfahrungen zu erholen oder mit Widrigkeiten auf positive Art und Weise zurechtzukommen, wird Resilienz genannt [629].

Die Intensität eines Stressors, die Anzahl an Stressoren, aber auch die Dauer der Einwirkung, beeinflussen somit die allostatische Belastung und bestimmen, zusammen mit der Resilienz, ob und welches System eines Organismus von einer Dysregulation betroffen sein wird [121]. Lernvorgänge, die zum Herausbilden unterschiedlicher (stabiler) Gleichgewichte führen, beeinflussen die Stressreaktion eines Organismus, sind individuell und fangen bereits vor der Geburt an [159].

Mechanismen der Allostase- und Homöostase-Prozesse sind unter anderem negative und positive Feedback-Systeme [122; 259; 686]. Im biologischen System liegt ein negatives Feedback vor, wenn ein Signal sich selbst inhibiert oder die Expression seines eigenen Inhibitors hervorruft. Es dient dazu, das eigentliche Signal abzdämpfen oder zu limitieren [226], es entsteht ein „steady state“ [183]. Durch negatives Feedback kann beispielsweise die stabile

Expression von Enzymen gewährleistet werden [640]. Bei positivem Feedback bewirkt ein Signal die eigene Induktion, die Funktion ist eine Verstärkung oder Verlängerung des Signals [226]. Der Wechsel zwischen verschiedenen Gleichgewichtssituationen ist erst durch ein positives Feedback möglich [122], es können somit auch zelluläre „Entscheidungsmechanismen“ wie eine Differenzierung in Gang gesetzt werden [640]. Eine schnelle Reaktion auf bedrohende Reize oder Prozesse kann durch positives Feedback erfolgen, das System gewinnt an Sensitivität [122]. Bei einer Immunreaktion kann theoretisch die „stochastische“ Aktivierung einer einzelnen Zelle, gefolgt von positivem Feedback, den Unterschied zwischen „gesund“ und „krank“ ausmachen [250]. Positive Feedback-Mechanismen werden entsprechend in ihrem Verhalten unvorhersagbar, wenn sie nicht durch negatives Feedback begrenzt werden [311]. Die Kombination beider Feedback-Mechanismen führt zur „Robustheit“, also der Fähigkeit eines Systems, trotz sich ändernder Rahmenbedingungen eine stabile, gleichbleibende Funktion aufrecht zu erhalten [402], ganz im Sinne der Homöostase.

Neben der Robustheit durch Feedback gewinnt ein System durch organisatorische und hierarchische Eigenschaften an Funktionalität [183] (siehe auch Kapitel 1.1.5). Zusammenfassen lassen sich diese Eigenschaften in einem „komplexen adaptiven System“ (KAS) [121; 246; 350], also ein System, das sich selbst organisiert, reguliert und unter anderem durch drei essenzielle Komponenten definiert ist:

1. „Irritabilität“: Die dynamische Reaktion (Allostase) auf eine Störung, bei der von dem Zustand des „Gleichgewichtes“ abgewichen wird, um einer Anforderung zu begegnen und schließlich zum Gleichgewicht zurückzukehren.
2. „Vernetzung“ oder „Konnektivität“: Die Ausprägung von Verbindungen der Komponenten oder Subkomponenten des Systems untereinander, beispielsweise durch selbstregulierende Feedback-Wege.
3. „Plastizität“: Die Fähigkeit auf Veränderungen in der Umgebung auch strukturell zu reagieren. Diese Veränderungen, die entsprechend der Einwirkung der Umwelt entstehen, können persistieren [167].

Diese plastischen Veränderungen finden oft auf eine nicht-lineare Art statt, im Sinne einer „Phasenumkehr“ (engl. „state transition“ oder „phase transition“) [121]. Solch eine Phasenumkehr ist definiert als qualitative Änderung des Verhaltens eines Systems, bei gleichbleibendem oder sich graduell veränderndem Stimulus, und ist ein gängiges biologisches Phänomen [215]. Ein wichtiges Charakteristikum dieser „nicht-Linearität“ ist, dass bereits kleine Reize zu großen Veränderungen führen können, obwohl starke Reize dies nicht unbedingt vermögen [121]. Biologische Beispiele solch einer nicht-Linearität sind die Zelldifferenzierung [219; 686; 687], aber auch Immunprozesse [179; 277] oder die Komplementaktivierung [381].

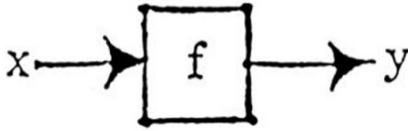
Zusammengefasst wird ein adaptives System durch Allostase aus seinem Gleichgewicht ausgelenkt um anschließend durch seine Homöostase-Mechanismen zum ursprünglichen Zustand zurückzukehren oder, je nach plastischer Veränderung, in ein anderes stabiles Gleichgewicht überzugehen [259]. Beschreiben lässt sich diese Eigenschaft der zwei

oder mehreren unterschiedlichen, stabilen Zustände eines Systems mit dem Begriff der Bi- bzw. Multistabilität [258; 661; 686]. Es handelt sich um distinkte allostatistische Zustände [259]. Autoimmunerkrankungen und deren Verlauf wurden bereits mit dem Konzept von multistabilen System erklärt [569]. Trigger können die Erkrankung zum Aufflammen bringen („Flares“). Eine Immunsuppression führt bestenfalls über die Unterbrechung einer positiven Feedbackschleife zur Wiederherstellung eines apathogenen Zustands, zu einer Remission. Nach aktuellen Erkenntnissen liegt dabei häufig keine Heilung im Sinne einer „gesunden“ Funktion vor, da weiterhin eine immunologische Dysregulation fortbesteht [453]. Es besteht also weiterhin die Bereitschaft zu einer Phasenumkehr, einem Rezidiv. Gesundheit, Remission und Flare stellen jeweils stabile Situationen dar. Das System ist tristabil.

In einem multistabilen System wird der Übergang zwischen den Stadien durch Veränderung der „Input“-Parameter herbeigeführt [21]. Die Ausprägung der Stabilität eines Zustandes wird durch die Robustheit bzw. Resilienz des Systems bestimmt [51; 402]. Die Input-Faktoren sind meist so vielfältig und interagierend, dass eine monokausale Beschreibung in der Regel unzureichend ist. In der Kybernetik und Systemtheorie wird in diesem Fall auf das Konzept der sogenannten „Black Box“ zurückgegriffen [254]. Das bedeutet, dass ein letztlich nicht ganz in seiner Funktion verstehbares System vorliegt, das ein bestimmtes Verhalten aufweist [694].

Die Frage dabei ist, ob diese Black Box ein erwartbares Verhalten aufweist oder nicht. Hilfreich ist in diesem Zusammenhang der Begriff der trivialen und nicht-trivialen Maschine, die auf Alan Turing zurückgeht und von Heinz von Förster modifiziert wurde [224]. Wenn das Verhalten erwartbar und voraussagbar ist, handelt es sich um einen trivialen Prozess. Ist das Verhalten nicht vorhersagbar, ist der Prozess nicht-trivial. Maschine bezeichnet in diesem Zusammenhang einen Satz von gegenseitigen Abhängigkeiten. Eine triviale Maschine besitzt einen festgelegten, Vergangenheits-unabhängigen Mechanismus, wobei jeder eingehende Reiz in derselben Weise beantwortet wird (Abb. 2a). Dieses Prinzip trifft für KAS nicht zu, sie funktionieren nach dem Prinzip der nicht-trivialen Maschine [223]. Hierbei trifft ein Stimulus auf einen inneren Funktionsmechanismus, der sich entsprechend des Reizes adaptiert, wobei ein späterer Reiz zu einer anderen Reizantwort führen kann (Abb. 2b), im Sinne einer plastischen Reaktion. Die Reizantwort ist somit vergangenheitsabhängig und zu einem bestimmten Grad unvorhersagbar [222]. Das Konzept der Black Box sowie der trivialen und nicht-trivialen Maschine sind geeignet, die Reizantwort eines Organismus auf einen Stressor angemessen zu modellieren [718]. In dieser Arbeit wird postuliert, dass dies nicht nur die Gesamtreaktion eines Organismus betrifft, sondern auch die lokalen Auswirkungen, beispielsweise in der Haut.

a



b

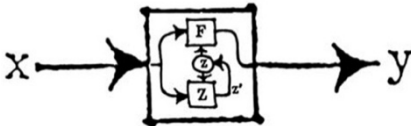


Abb. 2: Schematische Zeichnung einer trivialen und nicht-trivialen Maschine

Bei der trivialen Maschine (a) führt ein Reiz „x“ über einen festgelegten Mechanismus „f“ zu einer vorhersagbaren Antwort „y“. Bei der nicht-trivialen Maschine (b) liegt ein innerer Mechanismus „Z“ vor, der anhand des Reizes „x“ adaptiert werden kann („z“/“z'“), was die Funktionsweise „F“ verändert. Die Antwort „y“ bleibt zu gewissem Maße unvorhersagbar und ist Vergangenheits-abhängig.

Abbildung von Heinz von Förster, aus Foerster, H. von, Pörksen, B., 2013. Wahrheit ist die Erfindung eines Lügners: Gespräche für Skeptiker, 10th ed. Carl-Auer-Systeme-Verl., Heidelberg. Abdruck genehmigt durch Carl-Auer Verlag GmbH.

Trotz der nicht-trivialen Natur von Stressreaktionen funktioniert die Reizantwort eines Systems nach festen Prinzipien und Ablaufmechanismen, nach festen „Clustern“ oder „Mustern“ [483], es gibt gewissermaßen Verhaltens-„Schemata“ eines Systems [247]. Dieses Prinzip der distinkten Musterbildung einer Reizantwort wurde z.B. bei *Escherichia Coli* mittels eines *in-silico* Modells gezeigt [47], das mit *in-vivo*-Ergebnissen übereinstimmt [217]. Als Antwort auf Umgebungsveränderungen bilden sich nur wenige stabile metabolische Situationen aus, trotz einer Vielzahl von Reaktionsmöglichkeiten [47]. Ein ähnliches Konzept der distinkten Cluster an Reaktionen trifft auch auf das Immunsystem [417] und die Inflammationsreaktion des Menschen zu [618]. Das Immunsystem kann entsprechend als eigenständiges KAS mit distinkten Verhaltensschemata betrachtet werden [247; 366], wobei das Verhalten in gewissem Maße unvorhersagbar bleibt.

Zur Beschreibung des unvorhersagbaren Verhaltens eines dynamischen Systems, obwohl eine klare zugrundeliegende Ordnung besteht, kann auch der Begriff des deterministischen Chaos genutzt werden [622]. Die Chaostheorie, auf ein biologisches System bezogen, besagt, dass selbst wenn alle Ausgangsparameter eines Systems bekannt sind, dessen Verhalten nicht vorhersehbar sein wird, da durch minimal unterschiedliche Ausgangsbedingungen und die nicht-lineare Dynamik des Systems ein komplett unterschiedliches Verhalten resultieren kann [380]. Ein dynamisches System ist hierdurch in der Lage zu reagieren und sich zu adaptieren [622]. Der sogenannte Attraktor legt in solch einem System die Art der Multistabilität fest [551] und repräsentiert entsprechend die stabilen Verhaltensmuster oder Zustände, auf die sich das System hinbewegt [622]. In einem chaotischen System ist der Attraktor immer nicht-periodisch und scheinbar irregulär (sogenannter „seltsamer Attraktor“) und per Definition ein Fraktal [622], also ein sich „selbst ähnliches“ Gebilde, dessen Einzelkomponenten kleine Kopien des Ganzen darstellen [435]. Fraktale sind in biologischen Systemen von Interesse, da chaotische Systeme mathematisch

dadurch angenähert werden können und gesunde, stabile lebende Systeme grundsätzlich Chaos- und Fraktalnaturen haben [380]. Durch die fraktale Dimension kann auf die „Gesundheit“ des Systems geschlossen werden [380]. Je höher die fraktale Dimension des Attraktors, desto „zufälliger“ scheint das Verhalten des Systems [622] und desto komplexer und variabler kann das Verhalten und die Reaktion des Systems sein [380]. Entsprechend könnte die fraktale Analyse von primären Mediatoren eines biologischen Systems, wie beispielsweise des Immunsystems, herangezogen werden um Dysfunktionen zu erkennen und eine Optimierung zu unterstützen [179].

Zusammengefasst hat ein KAS über Allostasereaktionen die Fähigkeit auf externe oder interne Stressoren zu reagieren, was bei Ineffizienz zu einer allostatischen Belastung führen kann. Neben stabilisierenden Homöostasemechanismen führen eine Konnektivität innerhalb des Systems, sowie eine Adaptierung im Sinne von „plastischem“ Verhalten zu Robustheit und individueller Resilienz. Es resultiert eine Multistabilität, geprägt durch nicht-lineares Verhalten, was teils unvorhersagbar ist, auch wenn äußere Bedingungen berechenbar erscheinen.

### **1.1.5 Kontrollebenen des Körpers: ein Beispiel der „distributed control“**

Für ein detaillierteres Verständnis der Adaptationsvorgänge des Organismus auf Stressfaktoren ist es erforderlich, die lokalen und systemischen Reaktionsmuster zu integrieren. Sie finden auf verschiedenen Ebenen statt, was als „zentrale“ und „dezentrale Kontrolle“ bezeichnet werden kann [26]. Mit „Kontrolle“ ist dabei die Regulierung, Handhabung oder zielgerichtete Beeinflussung eines Prozesses oder Systems gemeint [251]. Die „zentrale Kontrolle“ kann als eine Einflussnahme eines Zentrums auf periphere Stellglieder oder Effektoren verstanden werden [122]. Dieses Konzept lässt sich jedoch nicht auf komplexe Netzwerke und selbstorganisierende biologische Systeme anwenden [25; 468]. Am Beispiel des Organs „Haut“, das lokal und autonom seine Homöostase wahren kann [120; 635], zweigt sich das Konzept einer dezentralen Kontrolle oder „distributed control“ [631].

Eine zentrale Kontrolle, am Beispiel eines mit unendlichen Bearbeitungs-Kapazitäten ausgestatteten „Supercomputers“, verliert durch die Verzögerung von Informationsweitergabe und –Verarbeitung erheblich an Effizienz [251]. Eine dezentrale Kontrolle löst dieses Problem und ist zugleich widerstandsfähiger gegenüber Fehlern. Wenn eines der Module eine Fehlfunktion aufweist, kann das restliche System noch verlässliche Lösungen bieten [251; 311]. Bei zentraler Kontrolle hört im Falle eines Fehlers im zentralen Prozessor oder in den Informationskanälen das gesamte System auf zu funktionieren [251]. Die dezentrale Organisation eines biologischen Netzwerkes in „semi-autonome funktionelle Einheiten“, also eine „Modularität“ des Netzwerkes, trägt daher zur Robustheit des Systems bei [183]. In KAS sind die einzelnen Module oder Ebenen teilweise autonom. Sie organisieren und regulieren sich selbst, stehen für die höhere Funktion des Systems aber miteinander in Verbindung [122].

Nach Chapman führt bei einer Stressreaktion diese Konnektivität der einzelnen Ebenen zu einer systemischen Gesamtreaktion, mit Beteiligung aller Formen des

physiologischen Informationsaustausches. Involviert sind beispielsweise neuronale Bahnen, die Blutbahn und das Immunsystem. „Werkzeuge“ oder primäre Mediatoren der Konnektivität sind unter anderem Neurotransmitter, Peptide, Hormone oder Zytokine [122]. Diese können nach anatomischen oder funktionellen Gesichtspunkten in verschiedene „Kommunikationsachsen“ oder „Stressachsen“ gegliedert werden [29; 121; 306; 527; 535]. Durch den konstanten Informationsaustausch im Körper kann so eine koordinierte Antwort auf den Stressor erfolgen, ganz gemäß der Definition von McEwen und Seeman [452]. Im Rahmen dieser Arbeit wird in Bezug auf die Haut zwischen einer systemischen, einer lokal-immunologischen und einer lokal-morphologisch-funktionellen Kontrollebene unterscheiden. Diese und wichtige Verbindungen zueinander werden im Folgenden aufgeführt.

#### 1.1.5.1 Systemische Kontrollebene: Nervenbahnen und Mediatoren

Das ZNS, als primärer Integrationsort des Informationsflusses im Körper, kann als Reaktion auf Reize Nervenimpulse aussenden oder via neuronaler Bahnen primäre Mediatoren lokal oder in den Blutstrom ausschütten [137; 206; 256; 521]. Neben der selektiven Ansteuerung eines Organs oder Systems mittels Nervenfasern liegt bei systemisch verbreiteten löslichen Mediatoren eine geringere Selektivität auf das Ziel vor, die im Wesentlichen von den Rezeptoren der Gewebe und Zellen abhängt.

Beide Informationsachsen, Nervensystem und endokrine Faktoren, können zur Übermittlung von Stressreaktionen genutzt werden und ihre Analyse ist entsprechend wesentlicher Bestandteil der psychoneuroimmunologischen Forschung [717]. Von den Stressachsen des Nervensystems werden die Systematik der Nervenbahnen, die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) und die systemischen Neurotrophine hier einführend vorgestellt.

##### 1.1.5.1.1 Das autonome und sensible Nervensystem, der „direkte Draht“

Das somatische und das autonome sympathische und parasympathische Nervensystem sind in die Informationsvermittlung im Rahmen der Stressreaktion vom ZNS zu Geweben wie der Haut eingebunden [196]. Durch die vegetative Innervation können Gewebe zielgerichtet angesprochen [333; 553; 584] oder systemisch über Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark erreicht werden [704]. Auch besitzt das sensible Nervensystem efferente Eigenschaften [49]. Aus Nervenendigungen können Neuropeptide und NT ausgeschüttet werden, die para-, auto- und endokrin wirksam sein können [131; 635].

In der Haut überwiegen sensible und sympathische cholinerge Nervenfasern [698], die mit verschiedenen lokalen Strukturen, Zellen der Epidermis und dem cutanen Immunsystem in Kontakt treten (s. auch Kapitel 1.1.1). Es handelt sich somit um eine Eingliederung der lokalen Kontrolle in die Gesamtfunktion des Organismus („neuro-immuno-cutaneus system“) [85]. Die Aktivität des autonomen Nervensystems ist nicht zuletzt auch mit der Hautbarrierefunktion verknüpft [507]. Periphere Nervenendigungen können, entsprechend dem Konzept der autonomen Funktion, auch direkt auf Reize wie Toxine reagieren und immunotrope Substanzen

ausschütten [126]. Die lokale Interaktion der sensiblen Nervenfasern mit dem hauteigenen Immunsystem ist dabei wesentlich für die lokale Homöostase [656].

#### 1.1.5.1.2 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse: Beispiel eines Systems mit Multistabilität

Die HHN-Achse umfasst den Hypothalamus mit Ausschüttung des Corticotropin-releasing Hormons, die Hypophyse mit hierdurch stimulierter Freisetzung des adrenokortikotropen Hormons (ACTH), sowie die Nebennierenrinde mit folgender Glukokortikoid (GC)-Sekretion [162]. Die Aktivität dieser Achse ist essenziell zur Modulation von physiologischen Prozessen im Körper sowie zur Übermittlung einer Stressreaktion und ist entsprechend über Feedback-Systeme vernetzt [162].

Je nach Stress-Kontext können die ausgeschütteten systemisch wirksamen GC auf die Zielzellen des Immunsystems suppressiv oder unter gewissen Umständen auch proinflammatorisch wirksam sein [170; 579]. Dysregulationen der physiologischen Tagesrhythmik oder eine verminderte Aktivität der HHN-Achse im Stressfall, eine „abgestumpfte“ Reaktion, sind in der Pathophysiologie vieler Erkrankungen beschrieben [162]. Beispielsweise wurden eine abgestumpfte Reaktionsfähigkeit der HHN-Achse unter wiederholtem [124] oder chronischem Stress [186; 464] oder nach traumatischen Ereignissen beobachtet [145; 578]. Neben dem Einfluss der Umwelt werden auch genetische und epigenetische Ursache einer HHN-Achsen-Dysregulation diskutiert [145; 407; 720]. Nicht nur die Effektorachsen zeigen ein variables Verhalten im Organismus, sondern auch die Adressaten [579]. Unter chronischem Stress kommt es zu erhöhten systemischen Cortisol-Konzentrationen [419], bei zeitgleich verminderter HHN-Aktivität [464]. Die GC-Sensitivität im peripheren Gewebe wird herabgesetzt, beispielsweise durch die Reduktion von GC-Rezeptoren [577; 579], möglicherweise auch durch eine veränderte Wirkung der GC-Rezeptoren auf die Zielzellen [681]. Es zeigt sich zusammengefasst ein multistabiles Verhalten.

Dieses Verhalten ist vermutlich ein adaptiver Prozess der peripheren Gewebe, um die allostatische Belastung möglichst gering zu halten und beispielsweise eine weiterhin funktionierende Stressvermittlung über das sympathische Nervensystem zu ermöglichen [565] oder eine ausreichende Wundheilung in Geweben wie der Haut zu erhalten [35].

#### 1.1.5.1.3 Neurotrophine: endokrine Stress- und Homöostasefaktoren

NT und Neuropeptide werden bei Menschen und anderen Säugetieren stressabhängig nicht nur lokal, sondern auch systemisch sezerniert [11; 502]. Da zusätzlich multiple Zellen mit Rezeptoren für NT und Neuropeptide ausgestattet sind [11; 501; 696], wurde das Konzept einer eigenen NT/Neuropeptid-Stressachse etabliert [543]. Die Funktion der systemisch sezernierten NT ist unter anderem immunmodulatorisch, möglicherweise als Teil einer adaptiven, homöostatischen Reaktion [139; 522; 696; 705]. Zu der zusätzlichen neuronalen Wirkung von NT und deren Effekt im ZNS besteht eine breite Datenbasis [253; 416]. NT sind dabei „essenzielle Werkzeuge in der aktivitätsabhängigen neuronalen Plastizität“ [115].

Bei der systemischen Ausschüttung und Wirkung von NT gibt es spezieabhängige Unterschiede und nicht zuletzt auch gravierende Unterschiede innerhalb der Nachweismethoden, was die Vergleichbarkeit der Werte einschränkt [502; 564]. In dieser Arbeit wird auf die wichtigsten Daten zu NGF und BDNF beschränkt.

Das systemische NGF stammt bei Mäusen und Ratten am ehesten aus den Speicheldrüsen [139], beim Mensch ist die Herkunft nicht genau beschrieben [502], wengleich viele Zelltypen und -verbände in Frage kommen (s. Kapitel 1.1.5.2.1 und 1.1.6.2). Bei akuten Stressereignissen ist bei Menschen wie Mäusen eine NGF-Freisetzung ins Blut festgestellt worden, unabhängig des sympathischen Nervensystems [14; 15]. Besonders emotionaler Stress und Angst sind mit NGF-Ausschüttung assoziiert [12; 139]. Es besteht dabei keine sichere Korrelation von NGF-Konzentration zur Aktivierung der HHN-Achse [502]. Im Tierversuch konnte durch NGF jedoch die Ausschüttung von GC angeregt [520] und eine Hypertrophie der Nebennieren induziert werden [13]. Bei chronischem Stress oder damit assoziierten Erkrankungen finden sich teils normale [340], teils erhöhte [289] Serum-NGF-Konzentrationen. Darüber hinaus können Stressepisoden während der Entwicklung die NGF-Produktion im Erwachsenenalter beeinflussen [12; 139]. In dem Zusammenhang wurde eine Verstärkung oder Sensibilisierung der HHN-Achse durch NGF postuliert [139]. Nicht zuletzt wird durch NGF auch eine cholinerge Modulation vermutet, durch Einfluss von NGF auf die Funktion des zentralen cholinergen Systems [139] und des NNCS von Zielgeweben wie der Haut [270].

Als Quelle des systemischen BDNF werden unter anderem Thrombozyten vermutet, da diese BDNF aufnehmen, speichern und abgeben können [232]. Eine Ausnahme bilden Mäuse, bei denen kein BDNF in Serum oder Plasma nachgewiesen werden konnte [374; 564], da wahrscheinlich Maus-Thrombozyten kein BDNF enthalten [119]. BDNF-Messungen beim Menschen zeigen entsprechend einen bis zu 200-fachen Unterschied zwischen Serum und Plasma [585]. Dabei besteht wie bei Cortisol eine zirkadiane Rhythmik des Plasma-BDNF [52]. Körperliche Aktivität, Hyperthermie oder andere körperliche Stressoren steigern die Konzentration von BDNF in Serum [699] und Plasma bzw. Thrombozyten [133]. Mentale Arbeit [657] oder psychosozialer Stress [139] führen ebenso zur BDNF-Ausschüttung, wobei keine sichere Korrelation zwischen Stress-Intensität und Plasma-BDNF besteht [104]. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass wenn gesunde Probanden nach psychosozialen Stress höhere Serum-BDNF-Werte haben, eine geringere Cortisol-Ausschüttung stattfindet [420]. Eine BDNF-assoziierte HHN-Modulation wurde somit vermutet [139; 484]. Bei gesunden Probanden konnte unter Stress eine Negativ-Korrelation zwischen BDNF- und Cortisol-Konzentrationen in Haarproben gefunden werden, wobei niedrigere BDNF-Konzentrationen mit Angaben von vermehrtem Stressempfinden korrelierte [298]. Marosi et al. postulierten entsprechend, dass BDNF bei körperlicher oder psychischer Belastung die negativen Effekte von Stress im Allgemeinen und GC im Speziellen relativieren und vor negativen Stressauswirkungen schützen könnte [442; 450; 586].

### 1.1.5.2 Immunologische Ebene: deterministisches Chaos in Aktion

Das Immunsystem eines Individuums stellt ein eigenes „sensorisches System“ dar, das auf interne und externe Stimuli reagieren und sich adaptieren muss, um seine „Reaktionsfähigkeit“ zu erhalten [96]. Funktionelle immunologische Ziele eines Organismus sind dabei die Verteidigung des Wirtes, bei zeitgleich geringer Ausprägung von Allergien oder autoimmuner Erkrankungen, mit optimaler Organ- und Gewebemöiostase und möglichst wenig schädigender Reaktion auf Stressoren [179]. Als Folge der multiplen Einflussfaktoren resultiert eine hohe interindividuelle Variabilität im immunologischen Verhalten [96; 179]. Da nicht-lineares Verhalten eine wesentliche Eigenschaft von physiologischen Systemen wie dem Immunsystem ist [179], ist eine systemtheoretische Immunologie („Systems immunology“) eine vielversprechende Herangehensweise für ein tieferes Verständnis der Funktion [96; 160].

Die Bestandteile und Funktionen des Immunsystems können als Teil eines chaotischen Systems betrachtet werden [96; 155; 176]. Das System zeigt dabei keine zufällige Unvorhersagbarkeit, sondern einen gewissen Determinismus, die Zufälligkeit bewegt sich innerhalb spezifischer Parameter und nach nachvollziehbaren Regeln [155]. Es bestehen distinkte Muster in der Reaktion [648], deren Analyse über die „Gesundheit“ des Systems Auskunft geben kann [417].

Eine Strukturierung oder Stratifizierung ist außerdem eine wichtige Voraussetzung für die Funktion dieses hochkomplexen Systems [179], was unter anderem mittels Organisation in zell- und gewebespezifische Netzwerke erfolgt [296; 648]. Hier wird ein Überblick über die Strukturierung, Vernetzung sowie wesentlichen Regeln des Immunsystems der Haut gegeben.

#### 1.1.5.2.1 Cutanes Immunsystem: ein Beispiel von Konnektivität und adaptiver Funktion

Das funktionelle Immunsystem der Haut beinhaltet alle lokalen immunologisch kompetenten Zellen, sowie die zugehörigen lokalen Lymphknoten [71]. Neben der Immunausstattung der Epidermis (s. Kapitel 1.1.1.4) beinhaltet das System somit viele Zellgruppen, inklusive Fibroblasten, Mastzellen und Endothelzellen [1]. Die Dermis bietet eine deutlich heterogene und variabelere Immunlandschaft als die Epidermis, mit stark variierender Anzahl an Zellen des inneren Immunsystems, wie dendritische Zellen (DC), Makrophagen, oder ILC [330; 436].

DC der Haut sind zum Beispiel die epidermalen LC (s. Kapitel 1.1.1.4) sowie sessile dermale myeloide DC oder plasmazytoide DC [731]. Je nach Inflamationsreaktion werden zusätzliche DC rekrutiert [523]. Den DC ist als Antigen-präsentierenden Zellen (Antigen presenting cells, APC) gemeinsam, dass sie Zellen des inneren und adaptiven Immunsystems aktivieren können, speziell zur Reifung naiver T-Zellen.

Gewebemakrophagen und Monozyten sind phagozytierende Zellen und APCs, welche die Haut „patrouillieren“ zur Unterstützung der DC [475]. Sie stehen im engen Austausch mit Zellen des adaptiven Immunsystems und tragen die Inflamationsreaktion mit [391]. Mastzellen können ebenso eine Inflamationsreaktion initiieren und modulieren, durch schnelle

antigenvermittelte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus ihren Granula oder durch APC-Fähigkeiten. Sie unterstützen die DC in der Aktivierung von T-Zellen, rekrutieren aber auch selbst Effektor-T-Zellen [187].

Die ILCs sind eine Sondergruppe von Lymphozyten, die weder B- noch T-Zell-Marker tragen [66; 178]. Anhand ihrer exprimierten Transkriptionsfaktoren können sie in drei Kategorien unterteilt werden (ILC<sub>1-3</sub>) [377]. Bei den wenigen Exemplaren in der interfollikulären Epidermis überwiegt der ILC<sub>3</sub>-Phänotyp [697], in der Dermis findet sich vor allem der ILC<sub>2</sub>-Typ. Die ILC<sub>1</sub> sind in ihrem Zytokinmuster TH<sub>1</sub>-ähnlich, ihnen werden außerdem die natürlichen Killerzellen (NK) zugeordnet. Ihre Funktion bei der Virusbekämpfung oder der Bekämpfung maligner transformierter Zellen ist überwiegend zytotoxisch [117; 146]. Die ILC<sub>2</sub> machen bis zu 5 – 10 % aller dermalen Leukozyten aus [66; 361], sie exprimieren bereits im inaktiven Zustand konstitutiv IL-13. Das macht sie zu bedeutenden Akteuren bei der TH<sub>2</sub>-gewichteten Inflammation im Rahmen der Parasitenabwehr oder bei allergischen oder atopischen Erkrankungen [361]. Sie stehen vermehrt in Interaktion mit eosinophilen Granulozyten und Mastzellen [574]. ILC<sub>3</sub> schütten IL-17 und IL-22 aus und sind somit bedeutsam für die epidermale Inflamationsreaktion [117; 697].

Auch Zellen des adaptiven Immunsystems, wie B-Lymphozyten, Subpopulationen von  $\alpha\beta$ -T-Zellen (TH<sub>1</sub>, TH<sub>2</sub>, TH<sub>9</sub>, TH<sub>17</sub>, TH<sub>22</sub> und T<sub>reg</sub>) und  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind in der Dermis zu finden [506]. Die reine Anzahl von T-Lymphozyten in normaler menschlicher Haut (Epidermis und Dermis) wird doppelt so hoch geschätzt, wie die der zirkulierenden T-Zellen [140]. Die wichtigsten Eigenschaften der Effektor-T-Zell-Gruppen wurden im Kapitel 1.1.1.4 vorgestellt, hier wird auf die Besonderheiten der Dermis eingegangen.

Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind in gesunder menschlicher Haut überwiegend (ca. 95 %) TH<sub>1</sub>-Lymphozyten [140], was durch ein besseres Ansprechen der KC auf TH<sub>1</sub>-typischen Zytokine zurückgeführt wurde [9]. Eine Fehlregulation mit Überexpression der TH<sub>2</sub>-assoziierten Immunmodulatoren kann zur atopischen oder allergischen Inflammation führen [508]. Die T<sub>reg</sub> der Dermis sind sessil und können durch Antigeninduktion zusätzlich akkumulieren [596]. In gesunder menschlicher Haut bilden sie ca. 20 % der CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten [290; 620]. Beim Menschen befindet sich die überwiegende Anzahl der T<sub>reg</sub> an den Haarfollikeln und nur ein kleiner Teil in der interfollikulären Dermis am dermoepidermalen Übergang [596; 617]. Die verschiedenen T<sub>reg</sub>-Subtypen und -Phänotypen reifen mit dem Mikrobiom [620] und unterliegen epigenetischen Kontrollmechanismen, was verschiedene adaptive Veränderungen der Hautimmunologie erklären aber auch einen pathologisch stabilisierenden Faktor bei Hauterkrankung bilden könnte [593].

Durch eine zusätzlich hohe Anzahl an T<sub>MC</sub> in der oberen Dermis und in geringerem Maße auch in der basalen Epidermis liegt eine vollständige Ausstattung des adaptiven Immunsystems in der Haut vor [140]. Die Gedächtniszellen bilden mehrere Untergruppen je nach Funktionalität und Mobilität [1]. T<sub>MC</sub> sind dabei entweder sessil oder stehen im Austausch mit den Blut-T<sub>MC</sub> [315]. Die Gesamtheit der T<sub>MC</sub> macht in der gesunden menschlichen Haut ca. 80 % der T-Zellen aus [140]. Hierdurch kann ein guter Teil der Immunabwehr autonom und lokal

erfolgen, ohne ein weiteres System in Anspruch zu nehmen [140]. Somit können Zeit und Ressourcen für das System gespart werden [330]. Eine Rolle bei der Konzentration der T<sub>MC</sub> spielt das körpereigene Mikrobiom und dessen Interaktion mit dem Immunsystem, da die Anzahl und Art der T<sub>MC</sub> daran angepasst wird [315]. Eine Barrierestörung und Fehlbesiedelung der Haut kann dementsprechend eine Entzündungsreaktion begünstigen [353] und ist als Erklärungsansatz in der Pathogenese von Hauterkrankungen wie der AD aufgeführt worden [1].

#### 1.1.5.2.2 Immunologische Reaktion der Haut bei Barrierestörung, eine „hoch organisierte Abwehrreaktion“

Eine akute Barrierestörung, beispielsweise durch eine Wunde, führt zu einer proinflammatorischen Immunreaktion. Abdallah et al. fassten die Reaktion der „Immunlandschaft der Haut“ zusammen, und beschrieben drei große Schritte: 1. Das Zusammenspiel aus cutanem Immunsystem und einer Pathogeninvasion, 2. den Beginn der Immunantwort und 3. das Immungedächtnis [1].

KC, die mit eindringenden Mikroorganismen und körperfremden Substanzen in Kontakt kommen, können mittels spezieller Rezeptoren (Pattern-Recognition-Rezeptoren und mehrere Kategorien von Toll-Like-Rezeptoren) verschiedene Antigene erkennen und über MHC-II-Rezeptoren sogar Antigene wie APC präsentieren [545]. KC lösen über diese Rezeptoren im Falle einer fehlenden Inflammationsreaktion eine Immuntoleranz auf die Fremdstoffe aus [38]. Durch die Aktivierung der eigenen Rezeptoren oder über Zytokine anderer Immunzellen werden KC aktiviert und schütten pro- aber auch antiinflammatorische Zytokine und Chemokine (z.B. IL-1 $\beta$ , Tumor-Nekrosefaktor [TNF]- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-18), sowie AMP, Wachstumsfaktoren, NT und Neuropeptide aus [1; 64; 711]. Den Substanzen ist gemeinsam, dass sie para- und autokrin wirksam sind, aber auch Zellen des nachgeschalteten, inneren Immunsystems aktivieren und rekrutieren können. Außerdem leiten sie die notwendigen Reparaturmechanismen der Haut ein [545].

Die LC, DC oder andere sessile oder mobile Zellen mit Phagozyten-eigenschaften können unabhängig von KC Pathogene aufnehmen und zur Antigenpräsentation prozessieren. Dabei reifen einige von ihnen und wandern in die drainierenden Lymphknoten ab, um naive T-Lymphozyten zu rekrutieren (s. Abb. 3) [731]. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen wandern zur Unterstützung der LC aus der Dermis ein, um eingedrungene Mikroben zu eliminieren. Dabei wandeln sich die Monozyten-Vorläufer und die sessilen dermalen Makrophagen in proinflammatorische (CD80/CD86<sup>+</sup>) Makrophagen um, die Zytokine ausschütten (z.B. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ), um die Inflammationssituation aufrecht zu erhalten [391]. Wenn eingedrungene Mikroorganismen beseitigt wurden, werden Makrophagen antiinflammatorisch wirksam, zur Eindämmung der Inflammation und um den lokalen Aufräum- und Heilungsprozess voranzutreiben [385]. Die Intensität der immunologischen Gegenreaktion hängt dabei vom Gleichgewicht des individuellen Immunsystems ab [1; 451]. Sollte durch das innere Immunsystem keine Eindämmung der Infektion oder Inflammation möglich sein, kommt das adaptive Immunsystem ins Spiel (s. Abb. 3). Die Zusammensetzung der lokalen Zytokine

bestimmt dabei, welche T-Effektorgruppen aktiviert werden und welche Inflammation resultiert [1].

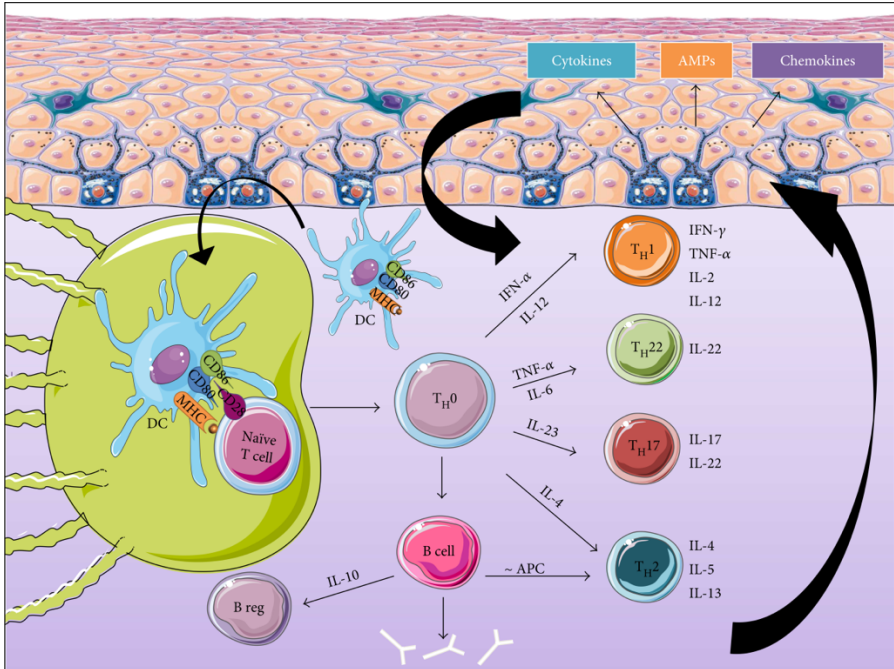


Abb. 3: Adaptive Immunantwort der Haut und Differenzierung von Lymphozyten

Bei der Aktivierung von T- und B-Zellen (engl. T cell, B cell) bestimmt die Zusammensetzung der Zytokine und Chemokine (engl. Cytokines bzw. Chemokines, z.B. aus der Epidermis = oberer großer Pfeil), die Rezeptor-Ausstattung der antigen-präsentierenden Zellen (APC), das Vorliegen von Co-Faktoren (wie im Schaubild CD28, als Co-Rezeptor des TCR [378]), die Art des Antigens sowie die Population der lokalen dendritischen Zellen (DC), welche TH-Subgruppenentwicklung aus den naiven TH-Zellen (TH<sub>0</sub>) erfolgt oder ob die T-Zellen in Anergie gehen [38; 295; 465; 495] (Literatur zu TH<sub>1</sub> und TH<sub>2</sub> [144], zu TH<sub>17</sub> [665], zu TH<sub>22</sub> [207–209]). Auch ist die Aktivierung von TH<sub>9</sub>-Zellen (über IL-4 und TGF- $\beta$ ) möglich, was hier nicht aufgeführt ist [332; 505]. Die Zytokine IL-17, IL-22 oder TNF- $\alpha$  führen zur Aktivierung von KC (großer Pfeil rechts), die ihrerseits vermehrt Zytokine ausschütten (positives Feedback) oder z.B. über antimikrobielle Peptide (AMP) direkte Abwehrfunktion haben. Voraussetzung für die Initiierung der Inflammation ist eine Aktivierung von KC oder die Aufnahme eines Antigens durch eine APC (in der Epidermis hellblau dargestellt) mit Präsentation an T-Zellen über den MHC-II-Rezeptor. Dafür wandern APCs regelhaft in drainierende Lymphknoten ab (linker schmaler Pfeil). Bild von Abdallah et al. [1], veröffentlicht unter Creative Commons Lizenz CC BY 4.0. Weitere Abkürzungen: CD= Cluster of differentiation, IFN= Interferon, IL= Interleukin, KC=Keratinocyten, MHC= major Histokompatibilitäts-Komplex, TH= T-Helferzelle, TNF= Tumornekrosefaktor.

In der Epidermis von Mäusen findet die „First Line“-Abwehr auch über DETC statt [315], die T<sub>MC</sub>-ähnliche Eigenschaften haben und die murine Immunantwort bei einer Barriestörung beeinflussen [305].

Neben den CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen werden je nach Antigen auch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hinzugezogen, sowie bei anhaltender cutaner Inflammation auch B-Lymphozyten. B-Zellen produzieren ihre spezifischen Antikörper (AK) und schütten diese lokal und systemisch aus. Antigen-gebundene AK aktivieren weitere APCs. Zusätzlich können B-Zellen auf TH<sub>1</sub> und

TH<sub>17</sub> durch Ausschüttung von IL-10 supprimierend wirken und T<sub>reg</sub> aktivieren. Sie wurden in dieser Rolle auch als B-regulatorische Zellen („B<sub>reg</sub>“) bezeichnet [113]. Über ihren MHC-II-Komplex können B-Zellen auch eine TH<sub>2</sub>-gewichtete Inflammation unterstützen [411]. Über KC, DC und Lymphozyten erfolgt ein positives Zytokin-Feedback, sodass eine TH-Subgruppen-Differenzierung weiter verstärkt wird [22].

Der inflammatorischen Antwort des adaptiven Immunsystems wirken die T<sub>reg</sub> entgegen, die sich im Inflammationsbereich ansammeln und die Geweberegeneration unterstützen [620]. Es resultiert im Normalfall ein Gleichgewicht, bei dem im Verlauf die Inflammationsreaktion konsekutiv eingedämmt wird. Zeitgleich erfolgt eine Anpassung der lokalen T<sub>MC</sub> [427], im Sinne einer „plastischen Reaktion“ und Bildung eines Immungedächtnisses.

#### 1.1.5.2.3 Cholinerges System und immunologische Modulation

Eine potente antiinflammatorische neuroimmunologische Homöostasereaktion durch eine cholinergen Aktivierung über den N. Vagus als efferenten „Reflexschenkel“ („inflammatory reflex“) [349; 530; 671] wurde bereits im Jahr 2000 nach Verletzungen oder Mikroben-Invasion bei einem Wirt beobachtet [69]. Die Unterdrückung einer Zytokin-vermittelten Inflammation konnte so erreicht werden. Mittlerweile wird vermutet, dass es sich eher um eine immunmodulierende Wirkung handelt [73], in Abhängigkeit vom lokalen Zytokinmilieu [344].

Solch eine neurogene Modifikation von Struktur und Funktion des lokalen cholinergen Netzwerkes über das ZNS wurde als Signalweg auch in der Haut postuliert [269]. Eine cholinerge Regulation könnte demnach systemisch, parakrin und lokal stattfinden. Eine neuronale ACh-Ausschüttung aus efferenten und möglicherweise auch afferenten Nervenfasern kann zusätzlich die lokale Freisetzung von nicht-neuronalem ACh triggern, im Sinne eines positiven Feedbacks mit entsprechender lokaler Verstärkung und Weitergabe des neurogenen Signals [514; 709]. Diese Veränderung des lokalen cholinergen Systems kann wiederum das Immunsystem vor Ort modulieren, durch eine vielfältige Wirkung auf Komponenten des Immunsystems und durch Modulation der lokalen Allo- und Homöostase [73; 230; 347; 399; 445].

Lymphozyten haben, ähnlich wie KC, die vollständige Enzymausstattung zur Herstellung und Degradation von ACh [346], mit zeitgleich variierender Rezeptorausstattung je nach Aktivität. Bei murinen T-Zellen ist eine Wirkung von ACh abhängig von der Rezeptorart gezeigt worden; eine Stimulation der nAChR führt zur TH<sub>1</sub>-Differenzierung, eine Aktivierung der mAChR zur TH<sub>2</sub> und TH<sub>17</sub>-Differenzierung [557]. Aber auch hier scheint eine Abhängigkeit vom inflammatorischen Milieu zu bestehen [237]. Auch B-Zellen können cholinerg moduliert werden [231], *in-vitro* führt ACh auch bei Makrophagen und ILC<sub>2</sub> zur Unterdrückung von proinflammatorischen Zytokinen oder zu einer TH<sub>2</sub>-gewichteten Zytokinproduktion [73; 153].

Beim cholinergen immunmodulierenden Signalweg scheint der nAChR-α7 eine besondere Rolle zu spielen [318]. Über diesen Rezeptor wirkt ACh an vielen aktivierten Immunzellen hemmend auf die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF-α,

IL-1 $\beta$ , IL-6) [519; 557]. Auch wirkt sich der nAChR- $\alpha 7$  dämpfend auf die zelluläre Immunreaktion aus [230; 709], mit zumindest *in-vitro* gezeigter Stimulation von T<sub>reg</sub> [700]. Dabei ist die allosterische Regulation des Rezeptors über SLURP-1 möglicherweise eine Schaltstelle zwischen einer pro- und antiinflammatorischen Wirkung des nAChR- $\alpha 7$  [128; 204; 474].

Zusammengefasst hängt der cholinerge Effekt von Umgebungsbedingungen des Zielgewebes ab, bei einer nikotinergen Aktivierung insbesondere vom inflammatorischen Kontext. Zusätzlich scheint die Dauer der cholinergen Aktivierung bei der immunologischen Reaktion auf ACh eine Rolle zu spielen [519].

#### 1.1.5.2.4 Neuroimmunologische Achsen: wie Stress in die Haut kommt

Systemischer Stress kann über mehrere Regulationsebenen die Immunzellen der Haut erreichen und ansprechen [121; 323]. Es besteht ein „direkter Draht“ durch Nervenfasern-Immunkontakte, zum Beispiel zwischen den dermalen Nervenzellen und Mastzellen [301; 625; 626], LC [157; 322] oder direkt mit den KC [123; 313]. Außerdem schütten Nervenendigungen parakrin Botenstoffe aus und endokrine Substanzen können von der Blutbahn in die Haut übertreten [455; 656].

Dabei trifft die zentrale Regulation auf die autonome „endokrine Einheit“ Haut, die funktionell in eine epidermale und dermale Komponente aufgeteilt werden kann [635]. Die Haut beinhaltet neben einer lokalen HHN- [632] und adrenergen Achse [269] sowie dem lokalen NNCS [269; 397] auch weitere autonome endokrine Komponenten wie ein serotoninerger, ein melatoninerger oder ein cannabinoides System [635]. Hier sind auch die lokalen Neuropeptide und NT integriert, die im Kapitel 1.1.3 beschrieben wurden. Bei einer systemischen, aber auch lokalen, Stressreaktion kommt es zu einem komplexen Zusammenspiel aus systemischen und lokalen Informationssignalen, aber auch homöostatischen Mechanismen [635], von denen hier nur eine Auswahl vorgestellt wird, unter Berücksichtigung der immunologischen Bedeutung.

Bei einer akuten systemischen Stressreaktion kommt es in der Haut zu einer Zytokinausschüttung der KC mit folgendem vermehrten Abwandern von LC in die lokalen Lymphknoten [375]. Auch verteilen sich mehrere Subgruppen von Immunzellen über den Blutstrom [169; 172; 552; 634], was zu einer schnellen, aber reversiblen Zunahme der zirkulierenden Lymphozytenzahl führt [17]. Die hautselektiven NK, DC, T- und B-Lymphozyten finden über Homing-Mechanismen wieder in die Haut zurück [171; 572; 602]. Diese Mobilisation und Migration der Immunzellen führt dazu, dass immunaktive Zellen schnell potenziell verletztes Gewebe erreichen [341]. Akuter Stress führt außerdem zur systemischen Ausschüttung pro-(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) und antiinflammatorischer (IL-10) Zytokine mit insgesamt TH<sub>1</sub>-polarisierender Wirkung [431; 443]. Über die KC führt akuter Stress zu einer IL-12-Ausschüttung und Unterstützung der TH<sub>1</sub>-Immuninduktion, chronischer Stress führt jedoch zur TH<sub>2</sub>-Induktion und über IL-10 zur Immunsuppression [4; 174; 195; 255; 414; 552].

Als Ursache der stressbedingten Ausschüttung von Zytokinen und der Immunzellmobilität wurde neben der Wirkung von GC eine gesteigerte sympathische und verminderte parasympathische Aktivität diskutiert [171; 256; 481; 531; 566]. Durch die Wirkung

von GC ist die zeitliche Komponente im Effekt der Stressreaktion auf KC teilweise erklärbar. GC blockieren *in-vitro* bei humanen KC nach bereits einer Stunde die TNF- $\alpha$ -Wirkung, nach 24 Stunden die Wirkung von IL-1 $\beta$ , IL-4 und IL-11 und nach 48 Stunden die Signalwege von IFN- $\gamma$  [643]. In der Haut kann zusätzlich ihr lokales Korrelat der HHN-Achse auf lokale Stressoren schnell und effektiv reagieren [632; 633]. Eine periphere Gegenregulation bei zentraler Überaktivierung ist als zusätzliche Funktion denkbar [341; 342].

Die Aktivierung der adrenergen Achse kann, je nach Kontext, zu einer verminderten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führen, was in Richtung einer TH<sub>2</sub>-Immunantwort polarisiert [137; 482]. Eine zentrale Modulation des lokalen „nicht-neuronalen“ adrenergen System in der Epidermis ist ebenso zu vermuten, da in der Haut, ähnlich wie bei der lokalen HHN-Achse, auch vor Ort Katecholamine produziert und degradiert werden können [269]. Lokale Katecholamine können entsprechend die Hauttrophik und Homöostase der Haut beeinflussen [153].

Nervenzellen, GC, die cholinerge und die adrenerge Achse sind mit NT und deren Expression in der Haut gekoppelt [319]. Eine akute Stressreaktion führt zur Ausschüttung verschiedener Neuropeptide und NT aus dem System von Nervenendigungen, Mastzellen und Immunzellen [125]. NGF und BDNF können dabei als Akteure, Ziel- aber auch Homöostasefaktoren der Stressreaktion fungieren und sie können zusätzlich gezielt von KC ausgeschüttet werden [156; 272; 326; 543]. Mastzellen, Endothelzellen, Makrophagen und Lymphozyten können auch selbst NGF ausschütten [274; 560; 696]. Auch andere Neuropeptide haben immunologische Effekte [455], auf die hier jedoch nicht eingegangen wird.

NGF führt bei T-Zellen zur Proliferation und Verstärkung der Antigenpräsentation, bei B-Zellen unter Umständen zu Wachstum, Differenzierung und verstärkter IgM-Ausschüttung [257]. BDNF wurde in Bezug auf das Immunsystem sowohl als modulatorisch beschrieben, als auch verstärkend im Rahmen einer allergischen Inflammation [504]. BDNF scheint dabei eine TH<sub>2</sub>-spezifische Immunantwort zu verstärken [319]. Dies mag daran liegen, dass eher TH<sub>1</sub>-typische Zellen mit einem funktionalen TrkB-Rezeptor ausgestattet sind [57] und statt einer allgemeinen Inflammations-Eindämmung eine TH<sub>1</sub>-selektive Immunsuppression stattfindet.

Ein Teil der immunologischen BDNF-Wirkung könnte auf eine Interaktion mit dem cutanen cholinergen Systems zurückzuführen sein. Eine Assoziation von BDNF mit dem nAChR- $\alpha$ 7 ist für das ZNS bereits beschrieben, mit einer BDNF-induzierten Steigerung von nAChR- $\alpha$ 7 [447; 692], aber auch einer BDNF-gesteuerten Reduktion des postsynaptischen nAChR- $\alpha$ 7-Effektes [218]. Im peripheren Nervensystem führte eine BDNF-Gabe zur Zunahme von nAChR- $\alpha$ 7 [700]. Je nach Zielzelle oder -Gewebe könnte entsprechend BDNF im Zusammenhang mit dem nAChR- $\alpha$ 7 einerseits nikotinergen Stress verstärken, andererseits als Homöostasehormon wirken, das den Stresseffekt abmildert.

Die Barrierefunktion der Haut kann durch akuten Stress beim Menschen und im murinen Versuch gleichermaßen kompromittiert werden [17; 132; 134; 135; 154]. Auch erholt sich die Hautbarriere unter Stressbedingungen weniger gut von einer Störung [135; 243]. Akuter Stress kann dabei über das cholinerge System zur Veränderung der terminalen Differenzierung

und somit zur Störung der Hautbarriere führen [154; 398]. Bei chronischem Stress mit entsprechender Barriestörung scheint insbesondere der nAChR- $\alpha 7$  eine Rolle zu spielen, da eine spezifische lokale Blockade der Rezeptors mittels  $\alpha$ -Bungarotoxin den Stress-Effekt aufhebt [154].

Zusammengefasst besteht für die Stressreaktion eine enge Interaktion zwischen der systemischen Ebene und dem Immunsystem, die eine Vielzahl von Signalwegen nutzt und sich autonomer lokaler Homöostasesysteme bedient, bei denen NT und das cholinerge System eine Rolle zu spielen scheinen, und die ultimativ eine Auswirkung auf die Barrierefunktion der Haut haben.

#### 1.1.5.3 Lokal-funktionelle Ebene der Epidermis und „Crosstalk“ der Kinasen

Die Epidermis stellt funktionell ein eigenständiges System dar, das autonom seine Homöostase wahrt und den Ablauf der Differenzierung und Barrierebildung koordiniert [227; 263; 722]. Sie ist jedoch auch Ziel von vielen lokalen und systemischen Stressoren [294; 426; 524], schließlich sind hier die Endstrecken der neuroimmunologischen Stressachsen zu finden [125], deren Auswirkungen in das lokale Homöostasesystem integriert werden [157; 319; 440; 513; 579], und die sich folglich auch auf die Hautbarriere auswirken. Bei Störung der Barrierefunktion durch Stressoren resultiert eine proinflammatorische Immunreaktion [210] (s. Kapitel 1.1.5.2.2). Die lokale Reaktion auf systemischen Stress ist nicht unähnlich der Reaktion bei „zellulärem“ Stress (z.B. oxidativem Stress) und führt zu eher gleichförmigen Reaktionsmechanismen, ganz nach der „allgemeinen Alarmreaktion“ von Cannon und Selye, also einem allgemeinen „Reaktionsmuster“ mit konsekutiven („plastischen“) morphologischen Veränderungen [525; 591]. Eine Verbindung zwischen der zellulären und systemischen Stressreaktionen ist dabei wahrscheinlich [714]. Die lokale Allostasereaktion ist gekennzeichnet durch eine Veränderung der Lipid- und Protein-Bildung mit einer entsprechend vermehrten DNA-Synthese [17; 29; 125]. Strukturelle Veränderungen sind in der Regel erst nach ein bis drei Tagen Stresseinfluss sichtbar und beinhalten unter anderem eine Verminderung der epidermalen Proliferation [134; 135] oder eine Reduktion der LB-Sekretion mit folgender Störung der SC-Integrität [2; 200].

Um eine Reaktionsfähigkeit und Wiederherstellung der Hautbarriere nach Störung zu ermöglichen, gibt es ein starkes lokales Informations-Netzwerk in der Epidermis [150; 210; 261]. Gemeinsamer Kommunikationsweg für die Barrierefunktion, also auch die Vernetzung der TJ mit dem intra- und interzellulären Informationsstrom, ist im Wesentlichen ein kompliziertes System von Kinasen und Phosphatasen [261]. Zu dieser „Informations-Endstrecke“ zählt die Familie der Proteinkinasen C (PKC) [165; 261; 449; 630], die sich in drei Untergruppen einteilen lassen: „konventionelle“ PKC, „atypische“ PKC und „neue“ PKC (nPKC). Je nach Isoform wirken die Kinasen unterschiedlich und sind anders in der Epidermis und den KC verteilt [308]. Die verschiedenen Kinasen und Phosphatasen beeinflussen neben der korrekten Lokalisation der TJ-Moleküle auch deren Aktivierung [261; 307] und bilden somit potenzielle lokale Homöostasefaktoren. Wenn die TJ-Funktion gestört wird, beispielsweise durch oxidativen

Stress [623], erfolgt entsprechend ein lokaler Kinasen-vermittelter Reparaturversuch [5]. Als erster Schritt werden dabei bestehende TJ-Proteine wiederverwendet [461].

PKCs sind jedoch nicht nur Bestandteile der Homöostasemechanismen, sie können, neben vielen anderen Faktoren auch, Stress weiter an das System der Epidermis vermitteln [261; 297]. Die Endstrecke der PKCs kann auch über die Trk-Rezeptoren der NT genutzt werden [416]. Zudem spielen PKCs eine Rolle bei Inflammationsreaktionen [149]. Passend hierzu verändert sich auch dynamisch und zeitabhängig die Phosphorylierung und Lokalisation von TJ-Markern unter Inflammationsbedingungen [533], von einer Steigerung der Mobilität von TJ-Proteinen bis hin zu einer Steigerung der Proteinexpression der TJ, was möglicherweise PKC-mediiert ist [684; 685]. Insgesamt haben PKCs im Inflammationskontext an epithelialen Barrieren Einfluss auf die TJ-Funktion [149; 248; 262; 728]. Eine mögliche Rolle der PKC bei der Integration der Barrierefunktion und TJ in das neuroimmunologische cutane System wird in dieser Arbeit daher angenommen.

#### **1.1.6 Atopische Dermatitis: eine stressensitive Hauterkrankung mit Dysregulation von Immunsystem, Hautbarriere und Neurotrophinen**

Die AD ist eine der häufigsten Hauterkrankungen der Industrieländer, die 15 bis 25 % der Kinder betrifft und bei 1 bis 10 % der Erwachsenen zu finden ist [490; 668]. Dieser chronisch-rezidivierenden Hautentzündung liegen multiple pathogenetische Faktoren zugrunde, wie eine Dysfunktion des Immunsystems und eine Hautbarrierestörung [229]. Bei der AD liegt dabei nicht nur eine lokale, sondern auch eine systemische immunologische Fehlreaktion vor [662]. Es besteht dabei ein Zusammenhang zu anderen atopischen Erkrankungen, denen die AD häufig voraus geht. In der weiteren Entwicklung kann eine allergische Rhinitis, eine Lebensmittelallergie oder ein Asthma bronchiale hinzukommen, im Rahmen des sogenannten „atopischen Marsches“ (engl. „atopic march“) [668]. Auch besteht eine Assoziation zu Stress, da die Erkrankung durch Stress verstärkt wird [45] sowie psychologische Faktoren in der Pathogenese eine Rolle spielen [31]. Aufgrund der zunehmenden Prävalenz und den psychosozialen sowie ökonomischen Kosten dieser chronischen Erkrankungen besteht ein zunehmendes Interesse an der Pathogenese und den Behandlungsmöglichkeiten der AD [105].

Charakteristisch für die AD ist ein Ekzem an prädisponierten Körperstellen, dessen Ausprägung und Lokalisation je nach Lebensalter differiert und das mit ausgeprägtem Juckreiz assoziiert ist [412; 706]. Histologisch betrachtet kann die AD der allergischen Kontaktdermatitis in ihrer Entzündungsreaktion pathophysiologisch als ähnlich beschrieben werden [354], wobei die allergische Kontaktdermatitis der AD häufig vorausgeht [554]. Histologisch und funktionell liegen dem Ekzem ein vermehrter Blutfluss, ein intra- und interzelluläres Ödem, eine intrazelluläre Blasenbildung bzw. Vesiculation mit dem histologischen Bild einer Spongiose, eine Immigration von Immunzellen in die obere Dermis und eine Freisetzung von pruritogenen Substanzen zugrunde. Die Epidermis weist durch Störungen im Proliferationsablauf eine verminderte Stabilität auf [676], mit einer Reduktion von INV und Loricrin [42; 43; 359]. Auch liegt eine pathologische Veränderung des SC vor, mit einer Reduktion des FLG-Gehaltes [612],

einer veränderten Lipidzusammensetzung, einer reduzierten Menge an Lipiden [325] sowie einer veränderten Expression von AMP [240]. Die Dermis ist insgesamt hyperinnerviert und es penetrieren vermehrt Nervenendigungen in die Epidermis [473; 664]. Charakteristisch für die AD ist außerdem eine Störung des Mikrobioms mit geringer Diversität und vermehrter Staphylococcus-aureus>Last, sowohl auf der läsionalen wie auch der unbetreffenen Haut [365; 404].

Mehrere funktionelle autoregulatorische Systeme sind bei der AD gestört, wie unter anderem das cholinerge System mit einer veränderten Expression verschiedener ACh-Rezeptoren [367]. Die Expression des nAChR- $\alpha 7$  ist in der läsionalen Haut von AD-Patienten auf RNA-Ebene vermindert, die des allosterischen Liganden SLURP-1 in nicht-läsionaler Haut [537]. Die ACh-Konzentration ist in der Haut von AD-Patienten deutlich erhöht, bis zu 14-fach [611; 708], entsprechend auch die ChAT-Konzentration in läsionaler Haut [708]. Ein Überwiegen der proinflammatorischen cholinergen Funktion hierdurch wurde postuliert, mit begleitendem Einfluss auf die Hautbarriere [638]. Auf die Pathogenese der Erkrankung, die Rolle der Hautbarriere und anderer lokaler regulatorischer Systeme wie der NT gehen wir im Folgenden ein.

#### 1.1.6.1 Pathogenese der atopischen Dermatitis und Rolle der Barrierefunktion

Obgleich eine Vielzahl von intrinsischen und extrinsischen Faktoren für die Ausprägung der AD bekannt ist, ist das Ergebnis in seiner Erscheinungsform relativ stabil [59]. Man könnte es als distinktes „Reaktionsmuster“ der Haut beschreiben. Häufig haben die auslösenden Faktoren eine vorübergehende oder dauerhafte Barriestörung zur Folge [158]. Zu den intrinsischen Faktoren zählen Stress und andere psychosoziale Komorbiditäten sowie eine genetische und epigenetische Prädisposition [48; 558]. Erwähnenswert sind beispielsweise FLG-Mutationen, die bei bis zu 50 % der AD-Patienten zu finden sind. Extrinsische Einflussfaktoren sind vielfältig, unter anderem eine Exposition gegenüber Allergenen oder Toxinen, aber auch Ernährungs- und Genussgewohnheiten, Umweltfaktoren und Veränderungen des individuellen Mikrobioms [376; 496; 662]. Diese Faktoren prädestinieren bei Menschen mit empfindlicher Haut entsprechend auch zur Entwicklung einer AD [213].

Die Barriestörung durch intrinsische oder extrinsische Faktoren oder ein frühes mechanisches Trauma der Haut führt zur Aktivierung von KC mit nachfolgender Zytokinproduktion (z.B. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-18, IL25, IL33, TNF- $\alpha$ ) [100; 353; 354; 360]. Die Aktivierung von KC kann über Feedback-Schleifen auto- und parakrin verstärkt werden [354; 595; 637]. Durch die Aktivität der KC werden Effektor-T-Zellen in die Haut rekrutiert und LC sowie DC zur Antigenpräsentation angeregt. Es erfolgt jedoch kein geregelter und selbstlimitierender Inflamationsprozess, sondern es entwickelt sich eine gestörte Immunabwehr [476]. Unter anderem überleben T-Zellen und eosinophile Granulozyten in der Haut deutlich länger als bei einer physiologischen Immunaktivierung [672], es persistiert eine Inflammationssituation. Dieses multistabile Verhalten der Haut, abhängig von Pathogeninvasion, Barrierefunktion und Immunaktivität, mit plastischem Übergang von reversibler akuter Inflammation zu irreversibler immunologischer Störung, wurde anhand von

*in-silico* Modellen bereits modelliert [181]. Dieser „Schalter“ in der frühen Pathogenese der AD ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Neben einem (unkontrollierten) positiven Feedback [181] wurden auch potenziell autoallergische oder autoreaktive Immuneigenschaften [575] sowie eine prädispositionsbedingte lokale Dysbalance an Zytokinen [99] als Ursache vorgeschlagen.

Die Folge der initialen Immunaktivierung kann ein „Juckreiz-Kratz-Zyklus“ sein, mit hierdurch Verstärkung der Barriestörung, zunehmender Inflammation und sukzessiv zunehmender Lymphozyten-Infiltration in die Haut [288]. Die gestörte Hautbarriere führt zu vermehrtem Übertreten von Substanzen, die die Inflammation triggern können, darunter auch Allergene und potenzielle Pathogene [63; 404; 619]. Es finden sich in den Infiltraten zunehmend CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, inklusive TH<sub>9</sub>-, TH<sub>17</sub>- und TH<sub>22</sub>-Subtypen, ILC<sub>2</sub> und TH<sub>2</sub>-Zytokinproduzierende CD8<sup>+</sup>-T-Zellen [207; 404; 719]. Einige KC gehen im Verlauf der Inflammation, teils T-Zell-induziert, in Apoptose. Das kann die Inflammation erhalten oder limitieren [354; 672].

Es entsteht insgesamt eine dynamische wie statische Dysregulation der Zytokin- und Inflammationssituation, die erkrankte ebenso wie äußerlich gesunde Hautareale betrifft [471; 662]. Nicht-läsionale Haut zeigt entsprechend auch einen „pathologischen Phänotyp“ mit einer gestörten terminalen Differenzierung und funktionellen Veränderungen [425]. Es finden sich auch höhere Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen und deren Rezeptoren in Zellen der Epidermis und Dermis [647]. Auch liegen vermehrt T-Lymphozyten in der Dermis vor, wobei über ein Gleichgewicht proinflammatorischer und antiinflammatorischer Lymphozyten eine Toleranzsituation entsteht [433; 662]. Durch eine getriggerte Expansion der pathognomonischen Lymphozytengruppen, beispielsweise durch die Zunahme der lokalen Zytokin-Dysregulation, kann der ruhende Phänotyp in den der akuten AD-Läsionen übergehen [647].

In Bezug auf die epidermale Barrierefunktion kommt es durch Zunahme von TH<sub>2</sub>-typischen Zytokinen in der Haut von AD-Patienten zu einer zunehmend undichten Barriere, über eine konzentrationsabhängige Herunterregulation von Proteinen wie FLG und CLDN-1 [50; 662] sowie Veränderung weiterer TJ-Proteine [516; 725]. Die Expression von CLDN-1 ist dabei am detailliertesten beschrieben, mit verminderter Bildung in läsionaler Haut, im SG wie in den tieferen Zellschichten [205; 279]. Klinisch ist passend dazu im Bereich von Läsionen die funktionelle Barriere gestört, wie Messungen des Wasserverlustes über die Haut (transepidermal water loss, TEWL) demonstrieren [362]. Zur Verteilung von ZO-1 und Ocl in läsionaler Haut von AD-Patienten wird anhand der Pathophysiologie insgesamt eine Reduktion oder Funktionsstörung dieser TJ-Proteine in der Epidermis angenommen [650]. Eine Verteilung und Verbreiterung von ZO-1 auf mehr Zellschichten, sowie eine allgemeine Reduktion von ZO-1 in der Haut, wurde beschrieben, mit einer Ocl-Verteilung die sich dabei überwiegend mit der von ZO-1 deckte [724; 730].

Was die Veränderung der TJ-Marker in nicht-läsionaler AD-Haut angeht, besteht eine uneinheitliche Studienlage, je nach Herkunft der AD-Patienten oder Art des genutzten Mausmodells. Teilweise wird eine reduzierte Expression von CLDN-1 beschrieben, aber auch

eine vermehrte Präsenz in den suprabasalen Zellschichten [48; 54; 279; 730]. ZO-1 und OcL fanden sich in nicht-läsionaler Haut teilweise nur im oberen SG [54], bzw. ZO-1 reduziert in der gesamten Haut [730]. Funktionell liegt auch in den nicht-läsionalen Bereichen der Haut eine Störung der Barriere vor, wie erhöhte TEWL-Werte demonstrieren [68; 406; 613]. Die gestörte lokale Homöostase bei AD ist somit auch mit einer dauerhaften Barriestörung assoziiert, was sich funktionell und morphologisch darstellen lässt.

#### 1.1.6.2 Neurogene Inflammation und Neurotrophine bei atopischer Dermatitis

Einen wesentlichen Aspekt bei der Pathogenese der AD stellt eine neurogene Inflammation dar [118; 584]. Neben der pathologischen Innervierung liegt eine gestörte Neurophysiologie der Haut vor [466], mit Veränderung der assoziierten Zytokine und Chemokine [244]. Exo- oder endogene Trigger können über die Stimulation afferenter Nervenfasern Neuropeptid- und NT-Ausschüttungen hervorrufen, mit konsekutiver Inflammationsreaktion [639]. Es folgt eine Störung der lokalen Regulationssysteme, mit Folge einer Zunahme und Unterhaltung von Inflammation, Juckreiz und Ekzem [244; 437]. In dieser Arbeit wird nur auf die NT NGF und BDNF weiter eingegangen, weitere NT und Neuropeptide spielen in der neurogenen Inflammation bei AD aber ebenso eine Rolle [212; 252; 272; 334; 344; 576].

Die NGF-Konzentration ist in Hautläsionen von AD-Patienten deutlich erhöht [274], betont in den basalen Zellschichten der Epidermis [512]. Auch der zugehörige Rezeptor TrkA ist, überwiegend in den basalen Zellschichten, vermehrt exprimiert [392; 448], beides passend zur beschriebenen Hyperproliferation [554]. Im Zellmodell ließ sich diese TrkA-Steigerung durch TH<sub>2</sub>-spezifische Zytokine auslösen [448]. Auch kann die KC-Apoptose im Rahmen einer allergischen Hautreaktion durch NGF beeinflusst werden [118], möglicherweise über den unspezifischen p75-NT-Rezeptor. Bei AD-Patienten wird NGF vermehrt aus Mastzellen, KC [275] und potenziell Lymphozyten ausgeschüttet [597]. NGF führt aber wiederum selbst bei Mastzellen zur Histamin-Ausschüttung [321]. Dies kann einen parakrinen, positiven Feedback-Loop zwischen KC und Mastzellen bilden, was die Inflammation antreiben kann [502]. Auch die vermehrte Innervierung der Haut in AD-Läsionen, die NGF-vermittelte Ausschüttung von Neuropeptiden wie Substanz P oder cGRP [698] sprechen für ein neurogenes Inflammationskonzept [664].

BDNF ist in läsionaler Haut bei AD-Patienten auch vermehrt zu finden, mit einer Zunahme der Konzentration je nach Schwere der lokalen Reaktion [544]. Nicht-läsionale Haut scheint ebenfalls eine erhöhte BDNF-Konzentrationen zu besitzen [544]. Der zugehörige Rezeptor TrkB ist in der Haut von AD-Patienten auch hochreguliert [584]. In eosinophilen Granulozyten und peripheren Nervenendigungen aus der Haut von AD-Patienten ließ sich vermehrt BDNF nachweisen [284]. Das BDNF, das von eosinophilen Granulozyten aus der Haut von AD-Patienten ausgeschüttet wurde, steigerte wiederum *in-vitro* die Verzweigung von Hautnervenendigungen [284]. BDNF wurde, wie NGF, bei AD lokal als inflammationsverstärkend beschrieben, da durch chemotaktische Eigenschaften weitere eosinophile Granulozyten und Inflammationszellen in die Haut rekrutiert werden können [559;

562]. Neben der Expression von NT und Neuropeptiden ist auch deren lokaler Abbau maßgeblich für den Erhalt der Inflammation verantwortlich. Eine Störung in der Regulation von Endopeptidasen mit einer verminderten Aktivität wurde als weiterer Faktor im Erhalt der atopischen Inflammation diskutiert [584].

Bei Betrachtung der NT im systemischen Kontext der AD zeigen sich ebenfalls relevante Veränderungen. Es sind beispielsweise deutlich erhöhte NGF-Werte im Serum und Plasma von AD-Patienten festgestellt worden, korrelierend mit der Krankheitsaktivität [561; 659; 670]. Das Gleiche wurde für BDNF in Serum und Plasma von AD-Patienten gezeigt [225; 320; 559]. Trotz der Einflüsse von NGF und BDNF auf den Verlauf der AD besteht, zumindest anhand einer deutschen Kohorte, kein Hinweis für eine Mutation im NGF- oder BDNF-Gen als Ursache von AD [316].

#### 1.1.6.3 Atopische Dermatitis und Stress

Zum Einfluss von psychosozialen Stress auf AD und einer Stress-assoziierten Exazerbation der Erkrankung gibt es eine breite Datenlage [31; 105; 352; 536; 646]. Longitudinale Studien zeigen, dass Änderungen im Stressniveau der Exazerbation einer AD um etwa einen Tag vorausgehen und diese vorhersagen können [368]. Diese Ergebnisse lassen sich im Tiermodell bei allergischem Kontaktekzem bestätigen [171], mit stressbedingter Zunahme der Immunzell-Infiltration und -Aktivität in der Haut, die unter anderem durch die HHN- und adrenerge Achse vermittelt wurde.

Eine Theorie besagt, dass Stress im Kontext atopischer Erkrankungen, statt einer TH<sub>1</sub>-gewichteten Immunaktivierung wie beim Gesunden, eine gegenteilige, starke TH<sub>2</sub>-Aktivität bewirkt [10] und somit die immunologische Dysregulation verstärkt. Störungen der verschiedenen Stress-Achsen geben Hinweise zu der pathologischen psychoimmunologischen Situation. Die Wirkung der zentralen HHN-Achse wurde bei AD-Patienten als dysreguliert beschrieben, mit einer unter Stress verminderten GC-Bildung [107; 291], jedoch insgesamt deutlicher erhöhter GC-Konzentration, korrelierend mit der Krankheitsaktivität [470]. Auch besteht bei AD-Patienten eine deutliche Steigerung der Katecholamin-Ausschüttung in Ruhe, im Gegensatz zur GC-Achse aber auch nach Stressexposition, wahrscheinlich in Kombination mit einer reduzierten Expression der Zielrezeptoren [106].

Möglicherweise unabhängig von der HHN-Achse wird die neurogene bzw. NT-assoziierte Inflammation durch Stress bei AD gesteuert [10]. Zum Menschen gibt es bis dato wenige Studien zum Effekt von Stress auf die lokalen und systemischen NT bei AD. Experimenteller Stress durch häufig klingelnde Mobiltelefone führte bei Patienten mit AD zur Zunahme der Plasma-NGF-Konzentration [357]. Fast schon anekdotisch beschrieb Kimata, wie ein Stress-Abbau durch Küssen bei AD-Patienten die im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhten Plasma-Konzentration von NGF und BDNF reduzierte [358]. Im Mausmodell führte Stress zur Zunahme der NGF-Konzentration in der Haut [542]. Durch Blockade von NGF konnte ein Rückgang der stressbedingten Inflammation festgestellt werden, allerdings ohne Besserung der begleitenden Barrierestörung [542].

Bezüglich der cholinergen Stressachse führte psychosozialer Stress bei AD-Patienten zur Zunahme der SLURP-2-mRNA, sowie zu einem tendenziellen Anstieg von CHRNA7-mRNA in läsionaler Haut [537]. Eine Störung des Fine-tunings der proliferativen und antiinflammatorischen Reaktionsfähigkeit der Haut auf Stress wurde entsprechend vorgeschlagen [537]. Es wurde auch postuliert, dass psychosozialer Stress insgesamt zu Störungen im cholinergen Signalweg führt und als Teil eines „Two-Hit“-Modells eine Erkrankung wie AD auslösen oder fortschreiten lassen kann [10; 511].

## 1.2 Problem- und Fragestellung

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein Zusammenhang zwischen der Barrierefunktion der Haut und psychosozialen Stress zwar bekannt ist, bisher aber wenig untersucht wurde. Bei allergischen Hauterkrankungen wie der AD, die mit einer gestörten Barrierefunktion einher gehen, ist diese Wechselwirkung jedoch von besonderem Interesse, weil Stress-Exazerbationen für die Betroffenen eine Belastung darstellen [45]. Die zellulären Mechanismen solcher Interaktion können den klinischen Beobachtungen einerseits eine objektivierbare Grundlage bieten, andererseits ergäbe sich eine Basis, auf der zukünftige Studien zur Besserung der Lebensqualität entworfen werden könnten. Dies würde Behandlungsstrategien entsprechend des individuellen Reaktionsmusters ermöglichen [607].

Das Ziel der hier vorgelegten Arbeit ist es, zu untersuchen, ob und wie die lokale Funktion der Haut, mit Fokus auf die Barrierefunktion, durch psychosoziale Stressoren, insbesondere bei allergischen Entzündungsbedingungen, beeinträchtigt werden kann, welche Rolle dabei die NT NGF und BDNF haben und ob das cholinerge System der Haut über den nAChR- $\alpha 7$  involviert ist. Diese Frage wird an einem Mausmodell für Lärmstress und neurodermitisartige Hautentzündung beantwortet und mit ergänzenden *ex-vivo* und *in-vitro*-Versuchen weiter untersucht. Folgende Fragen sollen konkret beantwortet werden:

1. Führt Stress in gesunder oder allergisch entzündeter muriner Haut zu morphologischen Veränderungen und lassen sich auf Proteinebene Zeichen einer gestörten Differenzierung zeigen, in Form einer veränderten Expression des Zytokeratins K14? Ist ein eventueller Effekt durch die Neutralisation der NT NGF oder BDNF aufzuheben?
2. Findet sich bei den TJ-Proteinen eine Veränderung in der Expression als Hinweis auf eine stress- oder entzündungsbedingte Barriestörung? Bewirkt dabei eine Ausschaltung von NGF oder BDNF einen Rückgang der stress- und entzündungsbedingten Veränderungen?
3. Führt der Stresseffekt in gesunder und allergisch entzündeter Haut zu Veränderungen der Genexpression von TJ, die auf regulatorische Mechanismen hinweisen können? Werden diese durch Neutralisation von NGF oder BDNF beeinflusst?
4. Stimmt eine physikalische Testung der Barriere mit den Veränderungen der barriere tragenden Moleküle überein?

5. Ist ein Effekt von BDNF in der Epidermis über den nAChR- $\alpha 7$  unter Organkultur-Bedingungen nachzuweisen und welches ist der Einfluss auf die Hautbarriere?
6. Gibt es im epidermalen Transkriptom unter Stressbedingungen weitere veränderte TJ-Regulatoren?
7. Was können zukünftige zu untersuchende Methodiken sein, um Stresseffekte an den TJ darzustellen?

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Studiendesign

Zur Beantwortung der experimentellen Fragestellungen wurde ein etabliertes murines Modell einer Kontaktdermatitis verwendet, deren lokale und systemische Immunreaktionen ähnlich der AD sind (atopischer-Dermatitis-ähnliche allergische Dermatitis, AID) [285; 734]. Die gezielte Provokation des Ekzems macht eine geplante Stressapplikation und NT-Modulation möglich, sowie eine nicht-invasive Testung der Hautbarriere. Die Protein- und mRNA-Expression kann anschließend in der Haut untersucht werden. Der Versuch lieferte Daten für verschiedene Studien, von denen einige bereits publiziert wurden [542; 583]. Erkenntnisse aus dem Mausmodell wurden in dieser Arbeit anschließend *ex-vivo* weiter adressiert, an murinem Gewebe. Humane immortalisierte Zellen wurden zuletzt untersucht, um zukünftige *in-vitro* Methoden zu Studien der TJ unter Stressbedingungen zu entwickeln. Wir folgten damit dem Grundsatz des „3R-Prinzipes“ (Replace, Reduce, Refine) zum verantwortungsvollen Umgang mit Tieren und zur Reduktion von Tierexperimenten. Zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen werden weitere Studien nötig sein.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Tier-, Gewebe und Zellherkunft

#### 2.2.1.1 AID-Modell

Für das AID-Modell wurden weibliche C57BL/6-Mäuse von den Charles River Laboren (Sulzfeld, Deutschland) erworben und in den Forschungseinrichtungen der Charité Berlin, Campus Virchow Klinikum, gehalten. Es wurde ein Alter von 6 bis 8 Wochen gewählt, da hier eine Stressreaktion verlässlich und nachvollziehbar auszulösen ist [539]. Auf männliche Mäuse wurde verzichtet, da diese durch die Anwesenheit der Artgenossen bereits einen Stressor erfahren würden [441]. Beim Eintreffen der Mäuse wurde darauf geachtet, dass die Haare der Rückenhaut im telogenen Stadium waren, um eine Haarzyklus-abhängige Immunmodulation auszuschließen [538].

#### 2.2.1.2 Hautorgankultur, murine Proben

Für die Hautorgankultur (HOK) wurden postmortal von Mäusen Hautproben entnommen, von Wildtyp-C57BL/6J-Mäusen, sowie KO-Mäusen mit Hintergrundstamm C57BL/6J und Ausschaltung der  $\alpha 7$ -Untereinheit der nAChR [518]. Die Mäuse und die entsprechenden Proben wurden von der Arbeitsgruppe „Kardiopulmonale Neurobiologie“ des Institutes für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen und der Arbeitsgruppe „Immunphysiologie“ des Institutes für Physiologie und Pathophysiologie der Philipps-Universität Marburg, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. W. Kummer und Frau Prof. Dr. del Rey, zur Verfügung gestellt. Über die genetischen Hintergründe, Etablierung und Haltung dieser Mäuse wurde bereits berichtet [518; 582; 716]. Das Alter der Mäuse bei Tötung

lag bei 7 – 8 Wochen. Die Wildtyp-Mäuse wurden im entsprechenden Tierstall konventionell gehalten, die KO-Tiere unter SPF-Bedingungen und entsprechend der S1-Sicherheitsstufe für Labore mit gentechnisch veränderten Organismen. Für die Tötung der Tiere lagen jeweils Tiertötungsgenehmigungen der zuständigen Tierschutzbeauftragten der Justus-Liebig-Universität Gießen bzw. der Philipps Universität Marburg gemäß des § 7 – 9 des Tierschutzgesetzes vor.

### 2.2.1.3 HaCaT-Zellen

Für die Zellkultur nutzten wir die *in-vitro* spontan immortalisierte humane KC-Linie HaCaT. Die Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Banning aus dem Biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen überlassen. Die ursprüngliche Herkunft war das deutsche Krebsforschungszentrum in Heidelberg, mit freundlicher Weitergabe durch Frau Prof. Boukamp [84; 510]. Die Zellen befanden sich in Passage 9 bei Ankunft im Labor, eingefroren in CM1-Einfriermedium.

## 2.2.2 Ausstattung, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Laborinstrumente und Labormaterialien sind tabellarisch aufgelistet (Tabelle 2 und Tabelle 3).

Tabelle 2: Liste der verwendeten Laborinstrumente

Gerät	Name/Modell	Hersteller
Abzug	2-453-GAND	Köttermann (Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Autoklav	3870 ELV	Systec (Wettenberg, Deutschland)
Backofen	FD115#05-83275	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Brutschrank	Heraeus BB 6000	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Durchlicht-Mikroskop	73002	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Feinwaage	ABJ 80-4M	Kern GmbH (Balingen, Deutschland)
Flockeneisbereiter	Scotsman AF 80	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Fluoreszenz-Mikroskop	DMI 6000B	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Fluoreszenz-Mikroskop	Keyence BZ-9000E	Keyence (Neu-Isenburg, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop-Kamera	DFC345 FX	Leica (Wetzlar, Deutschland)
GeneArray Scanner	3000	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Haartrimmer	Typ 1574	Moser (Unterkirnach, Deutschland)
Konfokal-Mikroskop	LSM 710	Carl Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Konfokal-Mikroskop	TCS SP2	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Kryostat	Microm HM560	Thermo Scientific (Walldorf, Deutschland)
Kugelmühle	MM400	Retsch (Haan, Deutschland)
Kühlschrank +4 °C	FKS 5000-20	Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
Magnetrührer	RCT	IKA (Staufen, Deutschland)
Maulwurfscheuche	n.a.	Conrad Electronic (Hirschau, Deutschland)
Mikrotom	Microm HM560	Thermo Scientific (Walldorf, Deutschland)
Mikrotom	HistoStar	Thermo Scientific (Walldorf, Deutschland)
Mikrowelle	Intellowave	LG Electronics Deutschland (Eschborn, Deutschland)

Gerät	Name/Modell	Hersteller
NanoDrop Spektralphotometer	ND-1000	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
PCR System	StepOne	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
PCR Werkbank	90-UV/PCR	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
pH-Meter	pH 521	Wissenschaftlich-technische Werkstätten (Weilheim, Deutschland)
Pipetten	2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5000 µl, Multi	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra (Zizers, Schweiz)
Rüttler	VXR	IKA (Staufen, Deutschland)
Stand-Gefrierschrank -20 °C	GSU34431/04	Robert Bosch (München, Deutschland)
Sterilwerkbank	HS 18	Thermo Scientific (Walldorf, Deutschland)
Tewameter	TC350	Courage+Khazaka (Köln, Deutschland)
Thermoblock	BT 100	Kleinfeld Labortechnik (Gehrden, Deutschland)
Thermocycler	T-Gradient	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Trockenschrank	FD240#05-84308	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Ultratiefkühlschrank	Hera freeze HFU686Top	Thermo Scientific (Walldorf, Deutschland)
Vortexer	REAX top	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Waage	PJ360	Mettler (Gießen, Deutschland)
Wasseraufbereiter	Elix 10 UV	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Wasserbad	MSZ 2850	Köttermann (Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Zentrifugen	Rotina 380R / Universal 1200 / Mikro 220 Centrifuge 5424	Hettich (Tuttlingen, Deutschland) Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 3: Auflistung aller Labormaterialien

Material	Spezifikation	Hersteller
Biopsie-Stanze	3 mm	pfm medical (Köln, Deutschland)
Brozell Tücher, fusselfrei	90663	Brod (Hanau, Deutschland)
Cellscraper	541070	Greiner Bio-One (Frickenhäuser, Deutschland)
CryoPure Röhrchen	1,8 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Deckgläser	24x60 mm	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Dry Heat Indikator Tape	804-0226	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Edelstahlkugeln	7 mm	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Falcon	15 ml, 50 ml	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Färbetrog	Assistent 1205	Karl Hecht GmbH (Sondheim, Deutschland)
Fettstift	Dako Pen	Dako (Glostrup, Dänemark)
Feuchtkammer mit Lichtschutz		Eigene Konstruktion
Filterkartuschen, steril 0,22 µm	Millex-FG, SLFG025LS	Millipore (Carrigtwohil, Irland)
Filterkartuschen, steril 0,45 µm	FP30/0,45CA-S	Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)

Material	Spezifikation	Hersteller
Filterpapier	MN 615 1/4	Machery-Nagel (Hoerd, Frankreich)
Filterpapier	S&S Filter Paper Circles 100 150 mm	Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
Glaswaren	Flaschen, Messzylinder	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Grünes saugfähiges Handtuchpapier	n.a.	n.a.
Hammer (Reflexhammer)	n.a.	n.a.
Handschuhe	Nobaglove Latex	NOBA (Wetter, Deutschland)
Handschuhe	Nitra-Tex	Ansell (Brüssel, Belgien)
Handschuhe	KC500	Kimberly Clark (Koblenz, Deutschland)
Kanülen, steril	Butterfly-Nadel	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Messflaschen	Vial 20 ml	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Multiwell-Plate	6 Well	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Neubauer Zählkammer Marinfeld	631-111	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Objekträger	SuperFrost® Plus	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Objekträgerbox	50 Objekträger	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Optische Versiegelungsfolie	48-Well	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
PCR-Platten	48-Well	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Pinzette, Einmalgebrauch	AP0041	Seidel Medizin (Gautingen, Deutschland)
Pipetboy	n.a.	Integra Biosciences (Biebertal, Deutschland)
Pipettenspitzen, steril	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen, unsteril	10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Präparierbesteck	Pinzetten, Scheren, Skalpelle	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
QIAshredder	QIAshredder	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Reaktionsgefäße, steril	0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße, unsteril	0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten, steril	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Silikoneinsatz	flexiPERM	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Spritzen	1 ml, 10 ml, 50 ml	Braun (Melsungen, Deutschland)
Steriles einmal Skalpell	Nr. 21	pfm medical (Köln, Deutschland)
Transferpipette, steril	3,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturflasche	T-25	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturplatte für adherente Zellen	6 Well	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturschalen	35x10 mm	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

### 2.2.3 Software

Für die Erstellung der Arbeit wurden folgende Programme verwendet: Microsoft Office Professional 2010, GraphPad Prism 9.5.1, Adobe Photoshop 23.2.3, Leica Application Suite

3.7.4.23463, Leica AF 6000 LX, Carl Zeiss Microscopy ZEN 2.1 Release Version 11.0, GeneChip Operating Software 1.4, Affymetrix® Microarray Suite 5.0, NetAffx™ Analysis Center.

## 2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 4 aufgeführt, Fertiglösungen und weitere Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 5 zu finden. Lösungen (Lsg) und Puffer, die gesondert hergestellt wurden und in der Methodik nicht detailliert beschrieben sind, werden in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Kits

Material	Typ	Hersteller
<b>QuantiTect Probe PCR Kit (200)</b>	204343	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<b>DNase I, Amplifikationsstufe</b>	18068015	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
<b>SuperScript™ II Reverse Transcriptase</b>	18064014	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
<b>Zufällige Primer</b>	48190011	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
<b>dNTP-Set (100 mM) Lösung</b>	10297018	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
<b>AllPrep DNA/RNA Mini kit</b>	80204	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<b>Allprep DNA/RNA/miRNA Universal Kit</b>	80224	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<b>ApopTag Fluorescein-In-situ-Apoptose-Detektions-Kit (TUNEL)</b>	S7110	Chemicon (Darmstadt, Deutschland)
<b>Affymetrix Mouse Genome 430A 2.0</b>	900498	Affymetrix (Santa Clara, USA)
<b>RiboAmp RNA Amplification Kit</b>	KIT0201	Arcturus (Sunnyvale, USA)
<b>BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit</b>	ALEXENZ-42655-40	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)

Tabelle 5: Liste aller Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
<b>4',6-Diamidin-2-phenylindol dihydrochlorid (DAPI)</b>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<b>Aceton reinst, 99,7 %</b>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<b>Aluminiumhydroxid</b>	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
<b>AlumInject Fertiglösung</b>	Pierce Chemical (Etten-Leur, Niederlande)
<b>Antibiotische Antimykotische Mischung</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Aqua ad injectabilia</b>	Braun (Melsungen, Deutschland)
<b>Aqua dest.</b>	Braun (Melsungen, Deutschland)
<b>BDNF rekombinant Human</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<b>Calciumdichlorid Hexahydrat</b>	Honeywell Fluka (Seelze, Deutschland)
<b>Diethyldicarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser</b>	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
<b>Di-Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat</b>	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Material	Hersteller
Dulbecco's PBS, steril	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ohne L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-HG	Cell Lines Service (Eppelheim, Deutschland)
Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura (Staufen, Deutschland)
Esel Normalserum	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Esketaminhydrochlorid, 25 mg/ml	Pfizer (Berlin, Deutschland)
Essigsäure, 100 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, 70 %	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol, unvergällt, 100 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, vergällt, 100 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Fluorescein Isothiocyanat-Avidin (FITC-Avidin)	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Formalin, 37 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Gelfoam Gr.2x6x0,7 cm (12 – 7 mm)	Pfizer (Berlin, Deutschland)
Giemsa Azur-Eosin Methylenblaulösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HAES, 6 %	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
Immersionsöl	Leica (Wetzlar, Deutschland)
ImmunoSelect® Antifading Mountin Medium	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
L-Glutamin (50 µl/ml)	Biochrom (Camebridge, Großbritannien)
Lucifer yellow CH, lithium salt	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Monobasisches Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl), 0,9 % für Injektionszwecke	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl), 0,9 %	Braun (Melsungen, Deutschland)
Natriumchlorid, 1 kg	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodechylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nikotin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ovalbumin Grade V	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ovalbumin Grade VI	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Pikrinsäure	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
ProLong Gold	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

Material	Hersteller
Protein Kinase C $\theta$ Pseudosubstrate Inhibitor	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypanblau, 0,1 %	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Trypsin	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Vitracemid (Vitro-Clud )	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Wasser, steril	Braun (Melsungen, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Xylazinhydrochlorid, 2 %	Ceva (Düsseldorf, Deutschland)
Xylol reinst, 1L	Honeywell Fluka (Seelze, Deutschland)
Ziegen Normalserum	Dianova (Hamburg, Deutschland)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 6: Zusammensetzung von Lösungen und Puffern

Lösungs-Name	Zusammensetzung
CaCl <sub>2</sub> Stocklösung (1mg/ $\mu$ l)	Für 1 ml: 100 mg Calciumdichlorid Hexahydrat in 1000 $\mu$ l Aqua ad injectabilia auflösen. Mit 0,22 $\mu$ m Filter filtersterilisieren.
Citrat-Puffer (0,02M, pH 6,0)	Für 1 ml: 2,1 g Zitronensäuremonogenhydrat in 1000 ml Aqua dest. auflösen. Mit NaOH pH auf 6,0 einstellen
DAPI-Lösung (1 $\mu$ g/ml)	Stammlösung (2 ml): 10 mg DAPI in 2 ml Aqua dest. lösen. Lagerung dunkel und bei -20 °C. Gebrauchslösung: Stammlösung 1:5000 in Methanol lösen. Lagerung dunkel und bei 4 °C.
Organtransportmedium	Für 100 ml: 99 ml DMEM-Medium + 1 ml antibiotische antimykotische Mischung
DMEM <sup>++</sup> (HaCaT-Vorkulturmedium)	Für 10 ml: 9,9 ml DMEM-HG + 0,1 ml Penicillin-Streptomycin (1 %)
DMEM <sup>+++</sup> (Organkultumedium)	Für 500 ml: 500 ml DMEM ohne L-Glutamin + 50 ml FBS (Hitze-deaktiviert, filtersterilisiert) + 5 ml L-Glutamin + 5 ml antibiotische antimykotische Mischung
HaCaT-Kulturmedium	Für 13 ml: 12,61 ml DMEM basic + 260 $\mu$ l FBS (2 %) + 130 $\mu$ l Penicillin-Streptomycin (1%). Für 9,8 mM [Ca <sup>2+</sup> ] 22,62 $\mu$ l CaCl <sub>2</sub> -Stocklösung hinzufügen
LANA-Fixierlösung (Paraformaldehyd-Pikrinsäure)	Lösung A: 20 g Paraformaldehyd + 125 ml Aqua dest., Auflösen bei 58 °C. NaOH zugeben bis die Lösung aufklart. 70 ml gesättigte wässrige Pikrinsäure hinzugeben. Lösung filtrieren, mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen. Lösung B: 10,23 g Di-Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat + 2,99 g Natrium-dihydrogenphosphat-Monohydrat. Mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen Lösung A und B im Verhältnis 1:1 mischen, pH bei 6,9
Narkoselösung	Stammlösung (1 ml): 800 $\mu$ l Esketaminhydrochlorid + 200 $\mu$ l Xylazin-hydrochlorid 2 % Gebrauchslösung: Stammlösung 1:3 mit sterilem NaCl 0,9 % verdünnen

Lösungs-Name	Zusammensetzung
<b>Ovalbumin Immunisierungslösung (OVA V)</b>	Für 2 ml: 1 mg OVA V + 2 ml steriles PBS. 100 µl/Maus intradermal injizieren
<b>Ovalbumin Sensibilisierungslösung (OVA VI)</b>	Stammlösung (400 µg/ml): 6000 µg Ovalbumin Grad VI + 15 ml steriles PBS Sensibilisierungslösung (frisch ansetzen): 1,5 ml Ovalbumin Grad IV Stammlösung + 1,5 ml AlumInject Fertiglösung (45 mg/ml) Beide Lösungen über 15 min Suspendieren. 100 µl/Maus s.c. injizieren
<b>Phosphat-gepufferte Saline (PBS)</b>	Für 2 L: 16 g NaCl + 0,4 g Kaliumchlorid + 2,88 g Natriumdihydrogen-phosphat-Monohydrat + 0,48 g monobasisches Kaliumphosphat. In 2 Liter Aqua dest. auflösen und pH-Wert mittels HCl oder NaOH auf 7,4 einstellen
<b>Saccharose-Puffer, 10% (0,1M, pH 6,9)</b>	50 g Saccharose + 6,22 g Di-Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat + 2,06 g Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
<b>Starvation-Medium mit 9,8 mM Calcium</b>	Für 15 ml: 14,92 ml DMEM basic + 75 µl FBS (0,5 %) + 26,3 µl CaCl <sub>2</sub> Stocklösung
<b>Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)</b>	Für 4 L: 3,6 g Tris + 27,4 g Tris Hydrochlorid + 35,12 g NaCl in 4 Liter Aqua dest. auflösen und pH-Wert mittels HCl oder NaOH auf 7,4 einstellen

## 2.2.5 Antikörper

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper (AK) und Antikörperprodukte für die Immunhistochemie (IHC) werden in Tabelle 7 aufgeführt. Von den getesteten und genutzten AK entsprachen die Ergebnisse des anti-Ocl-AK nicht den Berichten der Literatur und wurden als unspezifisch eingestuft. Der getestete anti-phospho-Claudin-AK war für die IHC wiederum nicht etabliert. Färbungen mit verschiedenen Protokollen führten zu keinem nutzbaren Färbeergebnis, sodass mit dieser Methodik keine Aussage zur CLDN-1-Phosphorylierung möglich war. Beide AK werden in den Ergebnissen nicht aufgeführt.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Abkürzungen: HOK= Hautorgankultur, Kan= Kaninchen, Pk= Polyklonal, Prim= Primärantikörper, Sek= Sekundärantikörper

Antikörper	Spezi es	Bestell-Nr.	Hersteller	Koppelun g	Funktio n	Lösung
<b>anti-Claudin 1</b>	Kan, Pk	71-7800	Invitrogen (Camarillo, USA)	keine	Prim	1:50, 1:25 für HOK und HaCaT
<b>anti-Filaggrin</b>	Kan, Pk	ab24584	Abcam (Cambridge, UK)	keine	Prim	1:500, 1:250
<b>anti-Involucrin</b>	Kan, Pk	ab53112	Abcam (Cambridge, UK)	keine	Prim	1:20
<b>anti-Kaninchen Fab Fragment</b>	Esel, Pk	711-007-003	Dianova (Hamburg, Deutschland)	keine	FAB-Fragment	1:100, 1:25 für HaCaT
<b>anti-Kaninchen</b>	Esel, Pk	711-546-152	Dianova (Hamburg, Deutschland)	Alexa Fluor 488	Sek	1:200
<b>anti-Kaninchen</b>	Esel, Pk	711-166-152	Dianova (Hamburg, Deutschland)	Cy3	Sek	1:200
<b>anti-Kaninchen</b>	Ziege, Pk	111-226-047	Dianova (Hamburg, Deutschland)	Cy2	Sek	1:200

Antikörper	Spezi es	Bestell-Nr.	Hersteller	Koppelun g	Funktio n	Lösung
anti-Keratin 14	Kan, Pk	PRB-155P	Covance bzw. HISS Diagnostics (Freiburg i.Br., Deutschland)	keine	Prim	1:1000
anti-Ki-67 (H-300)	Kan, Pk	sc-15402	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)	keine	Prim	1: 100
anti-Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 7	Ziege, Pk	ab110851	Abcam (Cambridge, UK)	keine	Prim	1:200
anti-Occludin	Kan, Pk	71-150, Lot-Nr.: QD21556 1	Thermo Scientific (Rockford, USA)	keine	Prim	1:50, unspez. Färbung
anti-Phospho-Tyr210 Claudin 1	Kan	MBS9384 236, Lot.-Nr. 07/2017	Biozol (Eching, Deutschland)	keine	Prim	1:25/ 1:50, keine Färbung
anti-Ziege	Esel, Pk	705-166-147	Dianova (Hamburg, Deutschland)	Cy3	Sek	1:200
anti-ZO-1	Kan, Pk	61-7300	Invitrogen (Camarillo, USA)	keine	Prim	1:50

## 2.2.6 PCR-Primer

Die Liste der für die Polymerase Kettenreaktion (Real-Time detection PCR, qPCR), verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 8 aufgelistet, diese wurden alle von TIB MolBio (Berlin, Deutschland) bezogen.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer und Sonden der Polymerasen-Kettenreaktion

Gen	GenBank Nr.	Sequenz
Claudin 1	NM_016674.4	Vorwärts: CAgATACAgTgCAAAGTCTTCgACT Rückwärts: gCCAATTACCATCAAggCTCg TaqMan : FAM-CTTgCTgAATCTgAACAgTACTTTgCAggC--BBQ
ZO-1	NM_009386.2	Vorwärts: CTgTCCTgTgAgTCCTTCAg Rückwärts: ggCTCAGCAgAgTTTCACCT TaqMan: FAM-CATACTgTAgTggCTACAgCTCgTggC--BBQ
Occludin	NM_008756.2	Vorwärts: CAggAgATTCCTCTgACCTTgAg TaqMan: FAM-CCTCggTACAgCAgCAATggTAACCTAg--BBQ Rückwärts: ggTggATATTCCTgACCCAgT
nAChRa7	NM_007390	Vorwärts: gCCCTTgATAgCACAgTACTTCg Rückwärts: gATCCTggTCCACTTAggCATTT TaqMan: 6FAM-CAgTggTCgTgACAgTgATTgTgCTgC-BBQ

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 AID-Mausmodell

Die Haltung der Mäuse erfolgte auf Grundlage des Tierschutzgesetzes und gemäß der zu dem Zeitpunkt gültigen Tierschutz-Richtlinie der Charité (Projektnummer G 0075/03), sowie nach Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo, Berlin, Deutschland).

Nach Eintreffen in den Laboren wurden die Mäuse zufällig 6 Versuchsgruppen zugeordnet (Abb. 4): Kontrolle, Stress, AID, AID und Stress (AID<sup>+</sup>), AID<sup>+</sup> mit anti-NGF-AK (aNGF) bzw. anti-BDNF-AK (aBDNF). Es wurden 10 Mäuse pro Gruppe eingeteilt und für eine Woche an die Umgebungsbedingungen gewöhnt. Dabei wurde ein 12-h-Helligkeit/Dunkelheits-Zyklus eingehalten, mit stabiler Raumtemperatur (RT) um 22 – 24 °C, in keimarmer Umgebung und freier Verfügbarkeit von Wasser und Futter.

Nach der Eingewöhnungszeit erfolgte bei den AID-Gruppen die Induktion der Neurodermitis-ähnlichen allergischen Dermatitis [528]. Hierfür erfolgte an den Tagen 1 und 14 die Sensibilisierung mittels s.c. Gabe von frisch angesetzter OVA Grad VI Sensibilisierungs-Lsg (20 µg OVA VI). Als Adjuvanz wurde zur Induktion einer TH<sub>2</sub>-gewichteten Immunreaktion Aluminiumhydroxid (2,25 mg pro Maus und Sensibilisierung) verwendet [136; 600]. Die Provokation der Hautinflammation erfolgte durch eine intradermale Injektion von OVA (50 µg OVA V) an Tag 21 des Tierversuches. Hierfür wurden die Tiere nacheinander mit Narkose-Lsg narkotisiert. Direkt nach Eintreten der Narkose wurde die Rückenhaut rasiert und an zwei Stellen der Rückenseite insgesamt 100 µl der Immunisierungs-Lsg injiziert.

Zur Untersuchung der Auswirkung von Stress wählten wir akustische Reize. Hierfür wurde eine Maulwurfscheuche verwendet, die auf den Käfigen platziert wurde und einen 300-Hz-Ton von 75 dB, in unregelmäßigen Abständen 4 mal die Minute, emittierte. Als Stressdauer wählten wir 24 h, da für diese Dauer eine moderate Stresswirkung vorbeschrieben ist und lokale wie systemische Auswirkungen einer akuten Stressreaktion zu erwarten sind [339]. Der Stresszeitpunkt wurde direkt vor der Ekzeminduktion gewählt.

Die Modulation der NGF- und BDNF-Wirkung erfolgte durch eine intraperitoneale Gabe von neutralisierenden AK. Die Menge des aNGF-AK (anti-NGF Factor 2.5S fraktioniertes Antiserum aus Kaninchen, Sigma, B.Nr. N6655, Lot Nr. 076K6095) wurde anhand vorheriger Publikationen auf 200 µl einer 1:1500 sterilen phosphatgepufferten Kochsalz-Lsg (phosphate-buffered saline, PBS)-verdünnten AK-Lsg festgelegt [539; 542]. Für die Inaktivierung des BDNF wurde die Dosis von 100 µl einer 500 µg/ml aBDNF-Lsg (anti-Human BDNF aus Huhn, Promega, B.Nr. G1641, Lot Nr. 242412) gewählt, die bei OVA-Sensibilisierung bereits untersucht wurde [94]. Beide NT-AK wurden 30 min vor Beginn und direkt nach Beendigung der Stressphase appliziert. 30 min nach der jeweils zweiten AK-Applikation erfolgte die AID-Induktion, sodass ausreichend Zeit zur Entwicklung der funktionellen Aktivität der AK gegeben war.

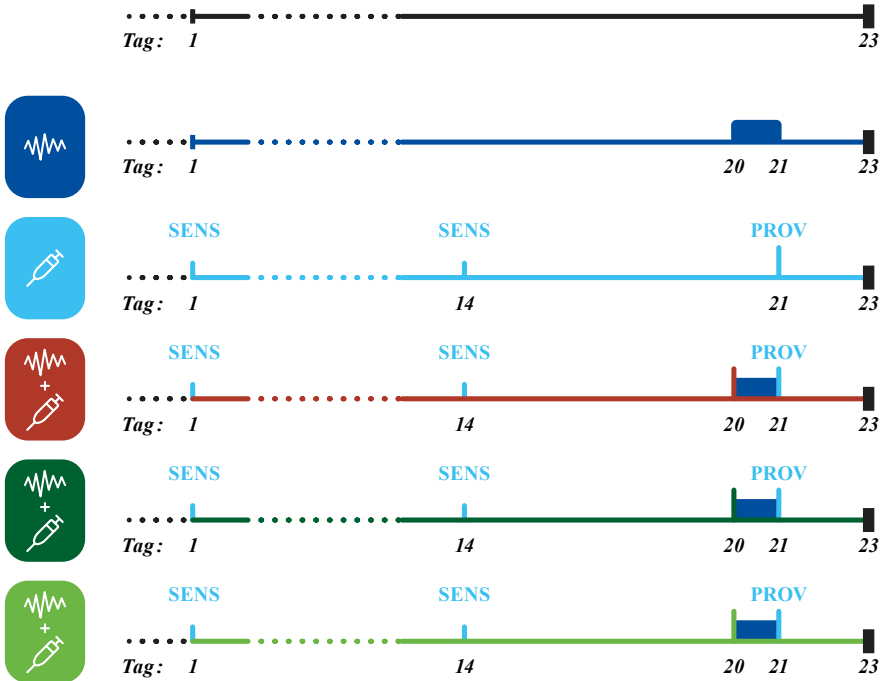


Abb. 4: Graphische Darstellung des *in-vivo* Versuchsaufbaus

Bei der Gruppenzuordnung steht Schwarz für die Kontrollgruppe, Dunkelblau für Stress, Hellblau für die atopischer-Dermatitis-ähnliche allergische Dermatitis (AID), Rot für AID und Stress (AID\*), Dunkelgrün für AID\* mit Antagonisierung des Neurotrophins NGF (aNGF), Hellgrün für AID\* mit Antagonisierung des Neurotrophins BDNF (aBDNF). SENS indiziert die Zeitpunkte der s.c. OVA-Sensibilisierungen an Tag 1 und 14 des Versuchs. PROV steht für die intradermale OVA-Provokation des AID-Ekzems an Tag 21. Dem voraus geht je nach Gruppe eine 24-h-Episode akustischer Stress, wie durch den dunkelblauen Balken dargestellt. Die Gabe neutralisierender anti-Neurotrophin-Antikörper erfolgte jeweils 30 min vor Stressbeginn und direkt nach Stressbeendigung, bzw. 30 min vor Provokation des Ekzems. 48 h nach Provokation wurden die Mäuse getötet und die Proben entnommen.

### 2.3.1.1 TEWL

In der Stressgruppe erfolgte die TEWL-Messung direkt nach Beenden des akustischen Stresses, bei den AID-Gruppen 48 h nach Ekzemindektion. Für die Messung wurden die Tiere nacheinander narkotisiert und anschließend der Wasserverlust im Bereich der zuvor rasierten rechten Rückenhaut für die Dauer von 1 min aufgezeichnet. Dabei wurden durch das Tewameter die Mittelwerte alle 2 s berechnet und ausgegeben. Während der Messungen herrschten standardisierte Umgebungsbedingungen mit einer konstanten relativen Luftfeuchtigkeit (rF) und Temperatur (22 – 24 °C), sowie Vermeidung von direktem Lichteinfall und überflüssiger Luftbewegung.

### 2.3.1.2 Probengewinnung

Direkt nach Beenden der TEWL-Messung wurden die ersten 5 Tiere pro Gruppe per cervicaler Dislokation getötet, mit Gewebeernte innerhalb der ersten 1 – 3 min. Hierfür wurde Rückenhaut mittels sterilen Instrumenten entnommen und für die PCR mit Flüssigstickstoff schockgefroren [310]. Die weiteren 5 Mäuse jeder Gruppe wurden nacheinander mit einer letalen Dosis der Narkose-Lsg getötet. Die Blutleere wurde mittels Injektion von 20 ml einer 6 % HAES-Lsg in den linken Ventrikel erreicht, anschließend wurde die Maus perfusionsfixiert. Hierfür wählten wir 40 ml einer Mischung aus Paraformaldehyd und Pikrinsäure (LANA-Lsg), um die Morphologie der zu untersuchenden Gewebe für die IHC möglichst zu erhalten [542]. Die Rückenhaut wurde nach Perfusionsfixierung entnommen und für 2 h bei RT in einer LANA-Lsg nachfixiert. Über Nacht wurden die Proben in 10 % Saccharosepuffer bei 4 °C zur Kryoprotektion gelagert. Für die IHC wurde die Haut parallel der Wirbelsäule herausgeschnitten und U-förmig mit der Haar-Seite nach innen in das Einbettmedium eingebettet, mit Flüssigstickstoff gefroren und bei – 80 °C gelagert [310; 582].

### 2.3.2 Hautorgankultur

Die Tötung der Mäuse für die HOK erfolgte mittels cervicaler Dislokation. Dafür wurden sie im Vorfeld narkotisiert, der Rücken rasiert, mit 70 % Ethanol und anschließend sterilem PBS gewaschen. Direkt nach Tötung der Tiere erfolgte die Probengewinnung. Unter sterilen Bedingungen wurde die Rückenhaut entnommen und in ein Falcon mit Transportmedium überführt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Biopsieentnahme und weitere Verarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Wir entnahmen 3 mm Stanzbiopsien der Vollhaut, nach bereits etablierten Protokollen und nur aus Bereichen im telogenen Haarstadium [538].

Ein 6-Well-Plate wurde im Vorfeld vorbereitet, mit 2 Gelfoam-Stücken pro Well, in jeweils 5 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), versetzt mit L-Glutamin, fetalem Kälberserum (FBS) und einer antibiotisch-antimykotischen Mischung (DMEM\*\*\*). Auf jedes Gelfoam-Schwämmchen wurden drei Biopsien mit der Dermis nach unten platziert. Sofort danach wurden die 6-Well-Plates in den Brutschrank überführt und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % rF für 24 h inkubiert. Zu Stimulation wurden, nach den ersten 30 min Inkubation, die Stoffe Nikotin (10 µM) [467], BDNF (5 ng/ml) [534], oder eine Kombination der beiden in das Medium jedes Wells zugefügt. Die Ziel-Konzentrationen wurden anhand der Literatur ermittelt, da bei diesen Konzentrationen zelluläre Effekte festgestellt wurden. Auch sollten toxische Effekte beider Substanzen gering gehalten werden. Alle Stimulationen wurden dreimal wiederholt.

Zur *ex-vivo* Testung der Barrierefunktion der Hautproben wurden entweder die Substanzen Lucifer Yellow (LY) oder Biotin eingesetzt. LY ist als Lithiumsalz ein gut wasserlöslicher Fluoreszenzfarbstoff mit geringer molekularer Größe, der sich in Lsg anionisch verhält und in Färbekonzentrationen kaum toxische Aktivität besitzt [293]. LY ist ein etablierter Farbstoff zu Darstellung intakter TJ [280; 621]. Wir applizierten 1 µl einer 0,5 mg/µl LY-Lsg auf

die Oberfläche der Biopsien. Im Vorfeld wurden hierfür 25 mg des LY mit 50 µl Aqua ad injectabilia aufgelöst. Die Inkubationszeit des LY betrug 2 h. Biotin wurde in Form eines Sulfo-N-Hydroxysulfosuccinimide (NHS)-Esters verwendet, da es in dieser Form gut wasserlöslich ist und sich durch Nutzung von Avidin effektiv anfärben lässt [197; 733]. Sulfo-NHS-Biotin ist bereits bei der Barrieretestung der Haut erfolgreich eingesetzt worden, mit Diffusionsstop an den intakten TJ nach Injektion in die Dermis [92; 236; 608]. Zur Barrieretestung beimpften wir die Gelfoams der entsprechenden Biopsien mit 28 µl einer 2 mg/ml Sulfo-NHS-Biotin-Stamm-Lsg. Die weitere Inkubationszeit betrug 30 min.

Nach Beenden der Stimulation und Tracer-Inkubation wurden die Biopsien für die PCR mit 4 °C kaltem PBS gewaschen, in ein Cryo-Röhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die IHC wurden die Proben ebenso in kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit der Dermis nach unten in das Einbettmedium eingebettet und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Beide Probenarten wurden bis zur Weiterverarbeitung bei –80 °C gelagert.

### **2.3.3 HaCaT-Zellkultur**

Die im Einfriermedium bei –80 °C gelagerten HaCaT-Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut und in 15 ml eines vorgewärmten DMEM-Fertigmediums gegeben, das mit 4.5 g/L Glucose, L-Glutamin und 10 % FBS versetzt war (DMEM-HG). Die hierdurch entstehende Suspension wurde für 3 min bei RT und 300 G zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit 10 ml vorgewärmtem DMEM-HG, versetzt mit Penicillin-Streptomycin (DMEM<sup>++</sup>), resuspendiert und mit je 5 ml Zellsuspension auf eine T25-Zellkulturflasche für adhärente Zellen verteilt. Die erste Wachstumsphase der HaCaT-Zellen betrug 3 Tage bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % rF, dann erfolgte die nächste Passage. Aus den T25-Zellkulturflaschen wurde das Medium abgenommen und 2 ml einer vorgewärmten, frisch angesetzten und sterilen 0,05 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lsg in PBS aufgetragen und für 10 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Diese Lsg wurde wiederum abgenommen und 2 ml einer frisch angesetzten, vorgewärmten und sterilen 0,05 % Trypsin- 0,025 % EDTA-Lsg in PBS auf die Zellen gegeben. Die Trypsin-EDTA-Lsg wurde für ca. 3 min auf den Zellen inkubiert, unter mikroskopischer Kontrolle. Sobald die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst waren, beendeten wir die Enzymreaktion durch Zugabe von 8 ml vorgewärmtem DMEM-HG. Es folgte das Überführen der Zellsuspension in ein 1,5 ml fassendes steriles Reaktionsgefäß, sowie die Entnahme von 10 µl Zellsuspension für die Zellzählung. Die Zentrifugation der restlichen Suspension erfolgte bei 300 G für 3 min. Während der Zentrifugation wurden die 10 µl Zellsuspension mit 10 µl 0,1 % Trypanblau versetzt. Davon wurden 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer überführt. In allen 4 Quadranten der Zählkammer wurden die vitalen Zellen gezählt und der Mittelwert hieraus berechnet. Dieser wurde mit der Konstante der Neubauer-Kammer multipliziert (10<sup>4</sup>) und dann verdoppelt, um die Verdünnung mit Trypanblau auszugleichen. Durch die Multiplikation mit dem Volumen der gesamten Zellsuspension ergab sich die Anzahl der Zellen im 1,5 ml Reaktionsgefäß.

Aus dem zentrifugierten Reaktionsgefäß wurde der Überstand abgenommen und vorgewärmtes HaCaT-Kulturmedium zugegeben, sodass eine Konzentration von 200 Zellen/100 µl Suspension erreicht wurde. Die HaCaT-Zellen wurden anschließend in T75-Zellkulturflaschen für adhärente Zellen ausgesät, mit einer Konzentration von  $10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Es erfolgte eine weitere Kultur für 3 Tage, mit regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle.

Am Tag 7 der HaCaT-Kultur erfolgte die Calcium-Differenzierung. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben passiert. Für die neue Aussaat wählten wir eine Zellkulturplatte für adhärente Zellen, mit einer Dichte von ca. 83.300 Zellen/cm<sup>2</sup> Well. Da über 85 % Konfluenz notwendig sind, um eine Differenzierung der HaCaT-Zellen zu erreichen und zu erhalten [168], wurde die Zellkonzentration hoch genug für eine Konfluenz gewählt, sodass nach 72 h Kultur die Bildung intakter TJ induziert werden konnte [372; 462]. Die initiale Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) des HaCaT-Kulturmediums lag bei 1,8 mM, der üblichen  $[Ca^{2+}]_i$  für HaCaT [70; 143], bei der anhand der Literatur nach etwa 3 Tagen Kultur eine geringe Differenzierung erreicht werden kann [70]. Weitere Studien zeigten bessere Differenzierungsergebnisse ab 2,8 mM Calcium [168; 693] bzw. die Bildung von funktionalen TJ bei noch höheren  $[Ca^{2+}]_i$  von 9,8 mM [27], sodass wir uns für den Vergleich von 1,8 mM und 9,8 mM  $[Ca^{2+}]_i$  entschieden. Durch Zugabe einer CaCl<sub>2</sub>-Lsg erhöhten wir die  $[Ca^{2+}]_i$  in Teilen der 6-Well-Plate. Die weitere Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % rF.

Nach weiteren 48 h erfolgte die Stimulation der HaCaT. Hierfür wählten wir aufgrund der optimaleren morphologischen Kriterien die Zellen mit hoher  $[Ca^{2+}]_i$  (9,8 mM). Eine Gruppe von HaCaT-Zellen wurde zur Inhibition der PKC $_{\theta}$  mit einem PKC $_{\theta}$ -Pseudosubstrat-Inhibitor (PKC $_{\theta}$ -PI) 1 h vor Stimulationsbeginn präinkubiert. Hierzu wurde der PKC $_{\theta}$ -PI (sc-3097 von Santa Cruz Biotechnology, Lot Nr. b2115) nach Herstellerangaben rehydriert und nach einem Mediumwechsel in die zu präinkubierenden Wells gegeben, sodass eine Konzentration von 10 µM erreicht wurde. Zu Beginn der Stimulation wurde das Medium aller Wells entfernt und anschließend 4 ml frisch angesetztes und vorgewärmtes Starvation-Medium hinzugegeben (DMEM-Medium mit 0,5 % FBS, mit 9,8 mM  $[Ca^{2+}]_i$ ), um die Proliferationsprozesse zu vermindern und die Differenzierung weiter zu unterstützen. Als Stress-Korrelat wählten wir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 0,1 mM, da in dieser Konzentration ein Effekt auf das cholinerge System der Haut gezeigt wurde [603]. Dazu wurde aus 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über Zugabe von Aqua dest. eine 1 mM-Lsg frisch angesetzt und hiervon 4 µl zum Medium des jeweiligen Wells gegeben. Für die PKC $_{\theta}$ -PI-Gruppen wurde zusätzlich die PKC $_{\theta}$ -PI-Konzentration von 10 µM durch Zugabe des Inhibitors in das Medium erreicht. Anschließende Inkubation für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % rF.

Nach Abschluss der Stimulation wurden die Zellen in den Wells nacheinander mittels Cellscrapper gelöst und mit dem zugehörigen Medium in ein Falcon überführt. Die Falcons wurden bei 300 G für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 1000 µl verworfen. Mit dem verbleibenden Überstand wurden die Zellen resuspendiert und 50 µl für den Cytospin entnommen. Die Zellsuspension wurde über einen flexiPERM Silikoneinsatz auf einen Objektträger (OT) gegeben. Nach 10 min Standzeit bei RT erfolgte die Fixierung der Zellen über Zentrifugation bei 300 G für 3 min. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die OT 5 min

bei RT getrocknet, mit anschließender Entfernung des flexiPERM. Weiteres Trocknen der OT für 20 min bei RT. Fixation mit eiskaltem Aceton für 10 min, dann erneutes Trocknen für 10 min bei RT. Einfrieren der OT bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Färbung.

## 2.4 Datenerhebung und Messmethoden

### 2.4.1 Anfertigung der Gewebeschnitte

Die gefrorenen, eingebetteten Proben wurden auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperiert. Mittels eines Microtoms wurden Schnitte mit  $8\text{ }\mu\text{m}$ ,  $10\text{ }\mu\text{m}$  oder  $14\text{ }\mu\text{m}$  Dicke angefertigt und mit SuperFrost® Plus-OT aufgenommen. Die Schnittfläche der Proben wurde anschließend mit Eindeckmedium versiegelt und die Proben wieder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Gewebeschnitte wurden bei RT unter kontinuierlicher Luftzufuhr für 1 h getrocknet und anschließend entweder direkt für die Färbung verwendet oder für einen späteren Zeitpunkt in OT-Boxen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.4.2 Färbemethoden

#### 2.4.2.1 Giemsa-Färbung

Die OT, die bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert waren, wurden für 30 min getrocknet, bei RT und kontinuierlicher Luftzufuhr. Anschließend wurden sie 5 min in PBS bei RT gewaschen. Wenn nicht perfusionsfixiert, wurden die Schnitte nun für 10 min mit  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton fixiert und anschließend erneut in PBS bei RT gewaschen (3 mal 5 min). Die Giemsa-Lsg wurde 1:10 in PBS verdünnt und die Schnitte darin für 30 min gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest. abgespült und unter mikroskopischer Kontrolle jeweils kurz mit 0,02 % Essigsäure behandelt. Je nach Intensität der Färbung wurde 10 min mit der Giemsa-Lsg nachgefärbt oder nochmals in 0,02 % Essigsäure getaucht, bis die Zellkerne deutlich blau gefärbt waren und das Zytoplasma rosa zur Darstellung kam. Es folgte dann eine Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe, mit Inkubation der Schnitte für jeweils 20 s in 70 %, 95 % und 100 % Ethanol bei RT. Anschließend Fixierung mit Xylol (2 mal 5 min), sowie Eindeckeln mit Vitracemid. Abschließendes Trocknen der OT bei RT für 1 h, danach Lagerung bis zur mikroskopischen Untersuchung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4.2.2 IHC - Färbeprotokolle

OT die bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurden, wurden vor dem Färbevorgang nochmals 1 h bei RT und kontinuierlicher Luftzufuhr getrocknet. Das Gewebe auf den OT wurde knapp mit einem Fettstift umrandet. Pro  $\text{cm}^2$  umrandeter Fläche wurden  $75\text{ }\mu\text{l}$  benötigte Flüssigkeit für die Färbungen berechnet. Nach Ende der Trocknungszeit wurden die Schnitte gewaschen (3 mal 5 min). Als Waschsubstanz und Färbepuffer wurde standardmäßig Tris-gepufferte Kochsalz-Lsg (tris-buffered saline, TBS) verwendet. Lediglich bei den Penetrationstests mit Biotin wurde das aminfreie PBS verwendet. Im Weiteren wird die Färbemethode mit TBS beschrieben. Wenn nicht anders angegeben erfolgte das Waschen für 3 mal 5 min bei RT in TBS. Ab dem ersten Waschschrift wurden die OT in einer Feuchtkammer, die 100 % rF und Lichtschutz ermöglichte, gelagert und inkubiert. Schnitte von Proben, die nicht perfusionsfixiert waren, wurden nach

einem ersten Waschen für 5 min mit  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton fixiert, mit anschließendem Waschschrift.

Um im Gewebe vorhandene AK, die gegen die Spezies des Sekundär-AK gerichtet sind, zu binden und eine unspezifische Färbung zu reduzieren, wurde nach Waschen, Fixation und dem Antigendemaskierungsschritt (s. Kapitel 2.4.2.3) ein Block mit 5 % Normalserum (NS) der Spezies des Sekundär-AK durchgeführt, in TBS. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Nach Abklopfen der Blocklösung wurde der Primär-AK aufgebracht. Verwendet wurden die AK in Tabelle 7, in den angegebenen Konzentrationen. Bei Abweichungen von den Konzentrationen wird im Text oder in den Abbildungen darauf hingewiesen. Um Antigene in der Zellmembran und im Zytoplasma zugänglich zu machen wurde gemeinsam mit dem Primär- und Sekundär-AK das nicht-ionische Tensid Triton<sup>®</sup>-X100 in einer 0,03 % Konzentration zum TBS zugefügt (TBS-T). Zusätzlich wurde 2 % NS der Spezies des Sekundär-AK hinzugegeben. Die Inkubation der Schnitte erfolgte über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 100 % rF. Am Folgetag wurden die OT gewaschen. Der Sekundär-AK wurde in TBS-T mit 2 % NS der AK-Spezies gemischt und auf den Schnitten für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 100 % rF inkubiert. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten unter Lichtschutz. Wir verwendeten die Sekundär-AK aus Tabelle 7 in einer 1:200 Konzentration, wenn nicht anders angegeben. Nach Inkubation des Sekundär-AK erfolgte ein Waschen der OT. Es schloss sich eine Mastzellfärbung mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC)-konjugiertem Avidin in 1:5000 Konzentration in TBS an, für 20 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 100 % rF. Das FITC-Avidin bindet mit hoher Affinität Biotin, das in hohen Konzentrationen in Mastzellgranula vorhanden ist und somit eine geeignete Färbemethode für Mastzellen darstellt [74]. Zusätzlich führten wir dieses Färbeverfahren beim Biotin-Penetrationstest durch, zur Darstellung des penetrierten Biotins. Nach der Inkubation wurden die OT gewaschen. Zuletzt fand eine Färbung der Zellkerne statt, mit einer  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lsg. Die Inkubation erfolgte für 5 min in  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kalter DAPI-Lsg. Dies ergab eine klare, intensive Färbung der Nuclei. Letztes Waschen. Die OT wurden zuletzt mit einem aushärtenden Eindeckmedium eingedeckelt, das die Photobleichung reduziert. Wir verwendeten hierfür ProLong<sup>®</sup> Gold. Im Anschluss wurden die OT für 24 h bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zum Erreichen des Aushärtens aufbewahrt. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Bei den Hautorgankulturen führten wir neben den oben aufgeführten Färbungen auch eine Apoptosen- und Proliferationsanalyse durch. Hierfür wurde eine Doppelfärbung mit „Deoxynucleotidyltransferase (TdT) mediated dUTP nick-end labeling“ (TUNEL) und Ki-67-AK etabliert. Bei der TUNEL-Methode wird eine apoptotisch bedingte DNA-Spaltung sichtbar gemacht, durch eine enzymatische Koppelung von dUTP an 3'-Enden von DNA-Doppelstrangbrüchen, was durch die TdT katalysiert wird. Wir verwendeten hierfür haptenmodifizierte dUTPs, die mit Digoxigenin gekoppelt waren und in einem zweiten Schritt mittels anti-Digoxigenin-AK sichtbar gemacht wurden, die mit einem Fluorophoren konjugiert waren [422; 491]. Die Ki-67-Färbung wiederum nutzt einen Primär-AK gegen das nukleäre Protein Ki-67 [249], das in der G0-Phase von Zellen nicht nachweisbar ist und entsprechend einen gängigen Proliferationsmarker darstellt [610].

Die Schnitte der HOK wurden 10 min bei RT aufgetaut und anschließend mit 10 % Formalin in PBS fixiert bei RT. Waschen für 3 mal 5 min in PBS, anschließende Postfixierung mit 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure in Aqua dest., bei -20 °C für 10 min. Erneutes Waschen für 3 mal 5 min in PBS, dann knappe Umrandung der Schnitte mit Fettstift. Das TUNEL-Kit (ApopTag Fluorescein-In-situ-Apoptose-Detektions-Kit) beinhaltet alle Lsg, sowie die notwendigen Kunststoff-Deckgläschen. Der Equilibrierungspuffer wurde auf die Schnitte aufgebracht, bei RT mit 13 µl pro cm<sup>2</sup> umrandeter Fläche, und für die Inkubationszeit von 5 min mit einem Deckgläschen abgedeckt. In der Zeit wurde das TdT-Reaktionsgemisch angefertigt, mit 70 % Reaktionspuffer und 30 % des TdT-Enzyms. Das Deckgläschen wurde entfernt, die Lsg vom Schnitt abgeklopft und pro Schnitt 10 µl des TdT-Reaktionsgemisches aufgebracht, mit einem neuen Deckgläschen abgedeckt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Lsg wurde nach Entfernen des Deckgläschens erneut abgeklopft und die TdT-Reaktion mit einem vorgewärmten Stopp-Puffer beendet, der aus 2 ml Stopp-/Waschpuffer und 68ml Aqua dest. hergestellt wurde. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei 37 °C. Anschließendes Waschen der Schnitte für 3 mal 5 min in PBS bei RT. Zur Reduktion einer unspezifischen Färbung durch den AK erfolgte ein Block mit 10 % NS der Spezies des Sekundär-AK für 10 min bei RT. Der anti-Ki-67-Primär-AK wurde 1:100 in einer Mischung aus PBS und 2 % des NS der Spezies des Sekundär-AK auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde der Primär-AK 3 mal für 5 min in PBS abgewaschen, dann die Fluorescein-markierten anti-Digoxigenin-AK des TUNEL-Kits aufgebracht, in einer Lsg aus 53 % Blockierungs-Lsg und 47 % Anti-Digoxigenin-Fluorescein. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten unter Lichtschutz. Die Inkubationsdauer betrug 30 min bei RT. Anschließendes Waschen für 3 mal 5 min in PBS. Hiernach Färbung mit dem Sekundär-AK gegen den anti-Ki-67-AK mit 1:200 Verdünnung in PBS und 2 % NS der Sekundär-AK-Spezies, für 1 h bei 37 °C. Erneutes Waschen in PBS für 3 mal 5 min. Zellkernfärbung in 4 °C kalter DAPI-Lsg für 5 min. Abschließendes Waschen in PBS und Eindeckeln in Immunomount. Aushärten des Eindeckmediums bei RT, weitere Lagerung bei -20 °C.

#### 2.4.2.3 Verfahren zur Antigendemaskierung bei perfusionsfixierter Haut

Durch eine Fixierung mit Formaldehyd, Paraformaldehyd und Pikrinsäure, aber auch mit Aceton, kommt es zu einer Denaturierung von Proteinen mit Veränderung der Tertiär- und Quartärstruktur, was die antigenen Bereiche, an die Primär-AK für die IHC binden würden, überdecken kann [194; 472]. Wir etablierten daher einen Schritt zur Antigendemaskierung. Dabei wurde der Effekt einer Hitze-medierten Demaskierung in Citrat-Puffer und der von Natriumdodecylsulfat (SDS) bei RT untersucht [98; 568; 624], auf perfusions- und acetoxifizierte Kryoschnitten.

Für die Citratdemaskierung wurde, nach dem Waschschrift, der OT in Citratpuffer geben und in einer Mikrowelle für 5 min gekocht. Danach wurde der Färbetrog mit frischem Citratpuffer aufgefüllt für 30 min bei RT abgekühlt. Anschließendes Waschen für 3 mal 5 min in TBS, dann weiteres Verfahren nach Protokoll. Durch Blasenbildung beim Kochen in der Mikrowelle lösten sich die perfusionsfixierten Schnitte von den OT, das Verfahren war somit ungeeignet. Als Alternative wurde, nach dem ersten Waschschrift, der OT in Citratpuffer in der

Mikrowelle auf 70 °C aufgewärmt und dann ins vorbereitete Wasserbad gegeben, bis 90 °C Puffertemperatur erreicht waren. Weitere Inkubation für 5 min bei 90 °C. Danach 30 min abkühlen bei RT. Waschen mit TBS und weiteres Verfahren nach Protokoll. Durch die Erhitzung im Wasserbad blieben die Schnitte zwar erhalten, es kam aber zu unspezifischen Färbungen und zur Lyse von Mastzellen.

Für das SDS-Verfahren wurden, nach erstem Waschen, die OT in 1 % SDS-Lsg in TBS für 5 min inkubiert. Erneutes Waschen in frischem TBS für 3 mal 5 min. Weiteres Verfahren nach Protokoll. Hierdurch wurde eine gute Färbequalität unserer AK erreicht, sodass dieses Verfahren weiter angewandt wurde.

#### 2.4.2.4 Doppelfärbungen mit Primärantikörpern aus gleicher Spezies

Aufgrund der gleichen Herkunftspezies einiger Primär-AK etablierten wir für Doppelfärbungen ein eigenes Protokoll. Die getesteten Verfahren werden im Folgenden tabellarisch vorgestellt, exemplarisch mit Nutzung von Primär-AK aus Kaninchen und Sekundär-AK aus Esel. Beiden Varianten geht eine Antigendemaskierung mit 1 % SDS voraus und schließt sich eine Zellkernfärbung mit DAPI an. In beiden Protokollen war die Waschlösung TBS und die Block- und AK-Lösung TBS-T. Die Inkubation erfolgte bei 100 % rF und Lichtschutz.

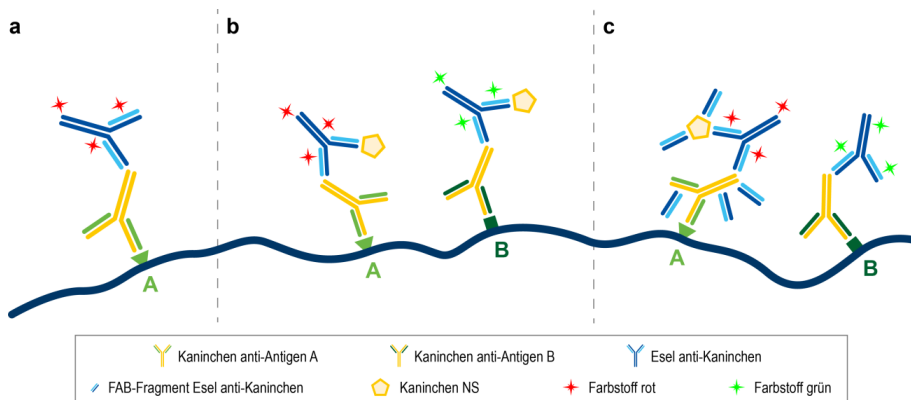


Abb. 5: Antikörper und indirekte immunhistochemische Färbemethoden

(a) stellt beispielhaft die Bindung von Primär-Antikörpern (AK) an ein Zielantigen bei der indirekten IHC-Färbung dar, wo der Sekundär-AK, mit einem Fluorophoren gekoppelt, spezifisch den Primär-AK bindet. (b) und (c) zeigen beispielhaft die Bindung von AK bei Färbemethoden mit zwei primär-AK aus gleicher Herkunftspezies und jeweils unterschiedlichen Sekundär-AK (siehe Tabelle 9 und Tabelle 10).

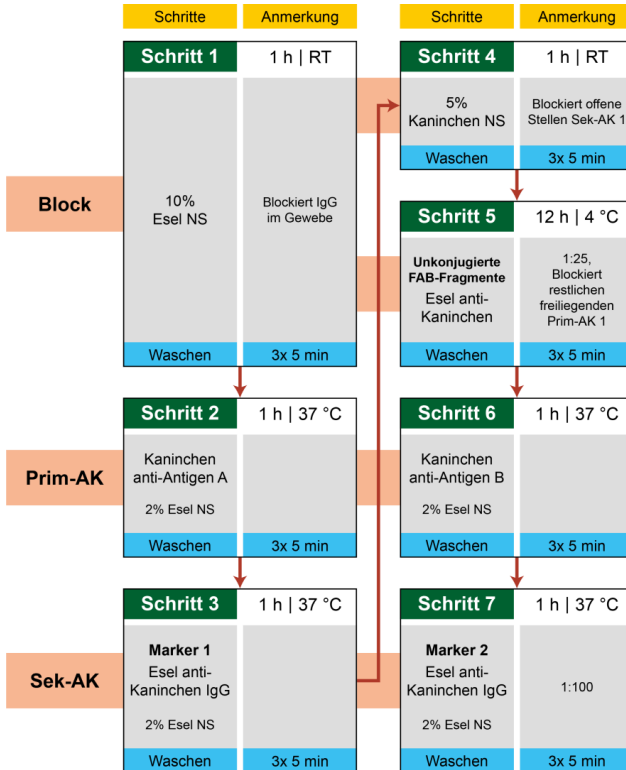
Tabelle 9 stellt ein Protokoll mit Inkubation des zweiten Primär- und Sekundär-AK-Paares im Reaktionsgefäß dar [389] (s. auch Abb. 5b).

Tabelle 9: Färbeprotokoll für Doppelfärbung mit Primärantikörpern aus gleicher Herkunftsspezies

\*Die Präinkubation (Schritt 4a und 4b) erfolgte in Reaktionsgefäßen, die mit 1 % Milchpulver in TBS für 24 h bei -20 °C vorbehandelt waren. Abkürzungen: Prim-AK= Primär-Antikörper; Sek-AK= Sekundär-Antikörper.

	Schritte	Anmerkung	Schritte	Anmerkung	Schritte	Anmerkung
<b>Block</b>	<b>Schritt 1</b>	30 min   RT	<b>Schritt 4</b>	1 h   RT	<b>Schritt 4b*</b>	1,5 h   37 °C
	5% Esel NS Waschen	Blockiert IgG im Gewebe 3x 5 min	5% Kaninchen NS Waschen	Blockiert offene Stellen Sek-AK 1 3x 5 min	5% Kaninchen NS in Reaktionsgefäß zufügen Waschen	Blockiert offene Stellen Sek-AK 2 3x 5 min
<b>Prim-AK</b>	<b>Schritt 2</b>	12 h   4 °C	<b>Schritt 4a*</b>	1,5 h   37 °C	<b>Schritt 5</b>	12 h   RT
	Kaninchen anti-Antigen A 2% Esel NS 0,1% BSA Waschen		Kaninchen anti-Antigen B 2% Esel NS 3% BSA Waschen	Präinkubation mit Marker 2	Anti-Antigen B/Marker 2 - Komplex Waschen	3x 5 min
<b>Sek-AK</b>	<b>Schritt 3</b>	1 h   37 °C	<b>Marker 2</b>	20-fach von Prim-AK 2		
	Marker 1 Esel anti-Kaninchen IgG 2% Esel NS Waschen		Esel anti-Kaninchen IgG			

Tabelle 10: Doppelfärbung mit Primäntikörper aus gleicher Herkunftsspezies und FAB-Blockade des 1. Primäntikörpers



### 2.4.3 Histomorphometrie und Intensitätsmessung

Die histomorphometrische Evaluation erfolgte nach festgelegten Kriterien mittels Fluoreszenz-Mikroskop [310], initial in der Übersicht mit 100-facher Vergrößerung, dann in Detailansicht mit 400-facher Vergrößerung und zuletzt die Evaluation der Färbung der epidermalen Zellschichten in 630-facher Vergrößerung. Bei den Proben des Tierversuches wurde von cranial nach caudal vorgegangen, identifizierbar anhand der Wuchsrichtung der Haare [310]. Für jedes Tier wurden 10 konsekutive mikroskopische Felder (mF) untersucht, welche die Hauptinflammation beinhalteten. Die Anzahl der vitalen Zellschichten wurden anhand der DAPI-Färbung ermittelt, die Zuordnung zu den Zellschichten erfolgte nach morphologischen Kriterien (s. Kapitel 1.1.1). Für jedes Tier wurde die mittlere Anzahl und Zuordnung der kernhaltigen Zellschichten erhoben und über die gesamte Gruppe gemittelt. Es wurden repräsentative Bilder angefertigt. Für die graphische Darstellung wurden zum Teil Einzelbilder aus Z-Stapeln berechnet, um eine Schichtdicken-bedingte Unschärfe auszugleichen. Ausgewählte AK wurden zusätzlich mittels eines Konfokal-Mikroskops

untersucht. Die Färbeintensität wurde optisch anhand einer subjektiven Skala festgestellt, wobei 0 keiner Färbung entsprach, 1 einer Färbung die noch vom Hintergrund zu diskriminieren war, 2 einer moderaten Färbung, 3 einer starken Färbung und 4 einer besonders intensiven Färbung. Zusätzlich erfolgte eine semiautomatisierte Intensitätsmessung. Hierfür wurde aus Schnitten desselben Färbvorgangs in derselben Sitzung und unter identischen Belichtungsbedingungen ein Bild pro Tier angefertigt, bei Inflammationsgruppen im Bereich der Entzündung. Die Belichtungseinstellungen wurden anhand der hellsten Färbung festgelegt, sodass keine Überbelichtung stattfand. Pro Zellschicht der abgebildeten Epidermis wurden 5 Messfenster (Region of interest, ROI) pro Zellschicht in der Leica AF 6000 LX Software festgelegt, manuell anhand anatomischer Kriterien, sodass sie mindestens 2 Zellkerne beinhalten und die dazwischen gelegenen Zellgrenzen mit erfasst waren. Das Programm erfasste in der ROI für jedes Pixel die Helligkeit des ausgewählten Kanals, die bei der gemessenen Farbtiefe von 12 bit pro Kanal entsprechend einer Graustufenskala zwischen 0 und 4095 Punkten zugeordnet wurde. Für jedes ROI berechnete das Programm den Mittelwert der Helligkeit aller erfassten Pixel und gab diesen aus. Aus diesen einzelnen Ergebnissen wurde wiederum für jede Schicht von jedem Tier der Mittelwert berechnet. Die Ergebnisse der einzelnen Tiere (N=5 pro Gruppe) wurden für die statistische Auswertung verwendet. Bei einigen Schnitten lagen Defekte der Epidermis vor, die auf die unterschiedlichen physischen Eigenschaften der Haut im entzündeten Bereich zurückzuführen waren. Sie wurden aus der Intensitätsmessungen ausgeschlossen, teils mit resultierenden N<5 pro Gruppe und somit geringerer statistischer Signifikanz.

Bei den HOK wurden in jeweils 3 Proben pro Gruppe und Untersuchung in der Giemsa-Färbung die Morphe der Epidermis beurteilt und eine automatisierte Dickenmessung durchgeführt, über die Lichtmikroskop-Funktion der Fluoreszenz-Mikroskope nach etablierten Protokollen [529]. Die maximale Dicke wurde als Diameter zwischen BM und SC ausgegeben, gemessen in der Regel in 9 interfollekularen Regionen der Epidermis. Für jede Probe wurde der Mittelwert berechnet. Für die Proliferations- und Apoptoseanalyse wurden an den HOK-Schnitten über die gesamte Probenlänge, entsprechend 3 – 5 mF in 400-facher Vergrößerung, die TUNEL- bzw. Ki67-positiven Zellen in der Epidermis gezählt, wobei die Probenenden aufgrund der Proliferationseffekte ausgespart wurden. Die positiven Zellen wurden als Anzahl pro Gesichtsfeld ausgegeben. Die Ergebnisse aller Proben wurden für jede Intervention gepoolt zur statistischen Analyse weiter verwendet.

Zuletzt wurden in den HOK-Schnitten AK-Färbungen durchgeführt, nach oben aufgeführter Methodik, und die Tracer-Penetration von LY oder Biotin in die Epidermis beurteilt.

## **2.4.4 RNA-Isolation und cDNA-Synthese**

### **2.4.4.1 Probendesintegration und RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des Universal Allprep Kits und den enthaltenen Lsg und Puffern. Die Biopsien wurden noch gefrorenen mittels einer Kugelmühle unter Stickstoffkühlung und mit zwei 7 mm Kugeln aus Edelstahl gemahlen. Gefäße und Kugel wurden mit 70 % Ethanol vor jeder Benutzung gereinigt und anschließend vorgekühlt, sodass

nach 90 s Mahlen bei 25 Hz die Biopsien zu einem feinen, gekühlten Puder desintegriert wurden. Pro 30 mg Probenpulver wurden 600 µl des RLT-Lysepuffers zum Auflösen verwendet. Für die Herstellung des Lysepuffers wurde zuvor dem RLT-Puffer 10 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) pro ml Puffer zugefügt. Die nächsten Arbeitsschritte erfolgten bei RT.

Das Lysat wurde für 3 min bei 13.600 G (13.000 rpm) zentrifugiert, der Überstand dann mit weiteren 600 µl des RLT-β-ME-Puffers auf die in einem Sammelgefäß platzierte QIAshredder Säule überführt. Die Säule wurde bei 13.600 G für 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss daraus wurde zur Aufreinigung auf die Allprep DNA-Mini Spinsäule gegeben und 30 s bei 8000 G (10.000 rpm) zentrifugiert, mit Adsorption der DNA an die Membran der Säule. Der Durchfluss der DNA Spinsäule beinhaltet RNA und miRNA, sowie Proteine. Proteinase K wurde im nächsten Schritt hinzugefügt, zur Elimination von Protein-Verunreinigungen. Dazu wurde 290 µl RNasefreies Wasser mit 10 µl Proteinase K gemischt und dem Durchfluss zugegeben, mit anschließender Inkubation für 10 min bei 55 °C auf einem Heizblock. Danach erfolgte eine Zentrifugierung für 3 min bei 8000 G, zur Sedimentation der Proteinreste. Der Überstand wurde abgenommen, mit 350 µl Ethanol vermischt und 10 min inkubiert. Dann erneute Zugabe von 750 µl Ethanol, Vermischung. Die Lsg wurde zur RNA-Präzipitation in maximal 700-µl-Schritten auf die RNeasy Mini Spinsäule gegeben und jeweils 30 s bei 13.600 G zentrifugiert, mit Binden der RNA an die Silicamembran der Spinsäule. Das Filtrat wurde verworfen. Nach vollständiger Bindung der RNA an die Spinsäule folgten Waschschrte. Zweimal wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säulenmembran pipettiert und die Säule für jeweils 30 s bei 13.600 G zentrifugiert, mit Verwerfen des Filtrates. Fehlgebundene DNA-Reste an der Membran wurden lysiert, mit 70 µl des RDD-Puffers, gemischt mit 10 µl DNase I. Die DNA-Verdauung auf der Spinsäule erfolgte für 15 min. Anschließend wurden 500 µl FRN-Puffer auf die Membran gegeben zur Fällung der DNA-Reste und die Säule für 30 s bei 13.600 G zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nochmals auf die Säule gegeben und bei 13.600 G für 30 s zentrifugiert, der hier entstandene Durchfluss verworfen. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit 500 µl RPE-Puffer, mit Zentrifugieren der Säule bei 13.600 G für 30 s und anschließendem Verwerfen des Durchflusses. Um die Membran von den Puffern zu reinigen wurden 500 µl Ethanol auf die Säule gegeben und bei 13.600 G 2 mal für 2 min zentrifugiert.

Es schloss sich die Eluation der RNA von der Säule an. Die RNA-Säule wurde in einen Sammeltube überführt. Es wurden 40 µl RNase-freies Wasser auf die Säulenmembran gegeben und 1 min bei 8000 G zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die RNA-Säule gegeben und für 1 min bei 13.600 G zentrifugiert. Im Durchfluss, der ca. 35 µl Volumen entsprach, befand sich nun die gelöste RNA.

#### 2.4.4.2 Photometrische RNA-Bestimmung und cDNA-Synthese

Die RNA-Konzentration im Eluat bestimmten wir mit einem NanoDrop Spektrophotometer [238]. Nach Hintergrundabgleich des Spektrometers mit Diethylidcarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser wurde für die Messung 1 µl des frisch aufgeschüttelten RNA-Eluates auf den Messpunkt des Photometers gegeben und dort über die Oberflächenspannung zwischen zwei optischen Fasern positioniert. Über die Xenon-Blitzlampe des Photometers

wurde das Absorptionsspektrum zwischen 190 nm und 840 nm aufgenommen. Aufgrund der Eigenschaft von RNA, im Bereich von 260 nm ein Absorptionsmaximum zu haben, kann mit dem gemessenen Absorptionskoeffizienten bei 260 nm die Konzentration der RNA in der Probe berechnet werden. Im Falle von RNA-Konzentrationen in unserer Lsg von über 4 µg RNA pro 32 µl Eluat wurde dieses mittels DEPC-behandelten Wassers verdünnt.

Für die weitere Verarbeitung der Probe wurde der Thermocycler verwendet. Potenzielle DNA-Reste wurden nach Herstellerprotokoll mittels DNase I (Amplifikationsstufe)-Kits zersetzt. Pro µg RNA wurden 1 µl DNase Reaktionspuffer und 1 µl der 1 U/µl DNase I verwendet, mit Inkubation für 15 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde anschließend mit 1 µl einer 25 mM EDTA-Lsg pro µg RNA gestoppt und das Gemisch für 10 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf Eis verbracht. Die RNA wurde in cDNA transkribiert, mithilfe des SuperScript™ II Reverse Transcriptase-Kits. Hierfür wurden nach Herstellerprotokoll dem Reaktionsgemisch 1 µl zufällige Primer pro µg RNA hinzugegeben, sowie 1 µl 100 mM dNTP Lsg. Das Gemisch wurde für 5 min auf 65 °C erhitzt und sofort wieder auf Eis gekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurden pro µg RNA 4 µl First-Strand Puffer und 2 µl 0.1 M Dithiothreitol (DTT) zugefügt, der Reaktionsansatz gemischt und für 2 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 µl der SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 U/ml) zugegeben, erst 10 min bei 25 °C inkubiert, dann 50 min bei 42 °C. Die Reaktion wurde gestoppt durch Erhitzung auf 70 °C für 15 min. Die gewonnene komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) wurde anschließend bei -20 °C gelagert bis zur Weiterverarbeitung.

#### **2.4.5 Genexpressionsanalyse - Real-Time detection PCR**

In diesem Verfahren wird zur Quantifikation der DNA ein Fluoreszenzfarbstoff zur Amplifikation zugefügt [393]. Während der Primerhybridisierung bindet neben den jeweiligen Vorwärts- und Rückwärts-Primern eine zielspezifische TaqMan-Sonde an den denaturierten DNA-Matrizenstrang. Die TaqMan-Sonde ist am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen, der durch Anwesenheit einer am 3'-Ende gebundenen Fluoreszenz-unterdrückenden Substanz, einem sogenannten Quencher, blockiert wird. In der Elongationsphase schneidet die Polymerase beim Erreichen der Sonde diese von ihrem 5'-Ende her und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigegeben. Jeder PCR-Zyklus setzt eine proportionale Menge Farbstoff zum Amplikon frei, über den mittels Fluoreszenzdetektion auf die Menge der Ziel-DNA geschlossen werden kann.

Für die qPCR verwendeten wir das QuantiTect Probe PCR kit. In Vorbereitung wurde die cDNA, sowie die Reagenzien für das Reaktionsgemisch auf 4 °C gebracht und gemischt, unter sterilen Bedingungen und Lichtschutz. Folgende Zusammensetzung wurde nach Angaben des Herstellers gewählt, um auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl zu gelangen: auf 1 µl cDNA kamen 12,5 µl des MasterMix (im Kit enthalten), 0,5 µl der Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 0,3 µl der TaqMan-Sonde und 10,7 µl DEPC-behandelten Wassers. Mit jedem Reaktionsgemisch wurde ein Well einer 48-Well PCR-Platte bestückt und diese mit optischer Versiegelungsfolie bedeckt. Die spezifischen Primer und TaqMan-Proben sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die Platte

wurde nach einem Mischschritt für 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert, sodass das Reaktionsgemisch im jeweiligen Well blasenfrei gesammelt wurde. Anschließend wurde die PCR gestartet, mit dem Profil nach Herstellerangaben (Tabelle 11).

Tabelle 11: Thermocycler-Profil der qPCRs

Schritt	Zeit	Temperatur	Anmerkung
Initiale PCR-Aktivierung	15 min	95 °C	Aktivierung der Taq-Polymerase, einmaliger Schritt zu Beginn
Denaturierung	15 s	94 °C	50 Wiederholungen
Primer-Hybridisierung und Elongation	60 s	60 °C	50 Wiederholungen

Die gemessene Genexpression wurde normiert. Von dem Schwellenwert-Zyklus (cycle threshold,  $C_T$ ) jedes Transkriptes, wurde die Differenz zur  $C_T$  des Haushaltsgens TATA-Bindeprotein (TBP) berechnet ( $\Delta C_T = C_{T \text{ TBP}} - C_{T \text{ Transkript}}$ ).

Für die Ergebnisse jeder Versuchsgruppe wurde ein gepooltes  $\Delta C_T$  berechnet und die Genexpression als  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  festgelegt, bezogen auf die Kontrollgruppe [386]. Dabei ist  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Gruppe}} - \Delta C_{T \text{ Kontrolle}}$ . Hierdurch wurde der Wert der Genexpression der Kontrollgruppe gleich 1 gesetzt und die Genexpression jeder anderen Gruppe als relative Veränderung zur Kontrolle beschrieben.

## 2.4.6 Microarray

Auf einem Microarray-Chip sind spezifische Gensonden aufgebracht, die komplementär zu den zu untersuchenden Genen sind. Transkripte aus einer Probe werden fluoreszierend markiert und auf dem Array hybridisiert. Über einen Laser kann das Array ausgelesen werden, wobei die Intensität der Farbe eine Aussage über die Konzentration der gebundenen Gentranskripte und somit deren Konzentration in der ursprünglichen Probe ermöglicht. Mit einer nur geringen Probenmenge kann so, über die parallele Analyse vieler Gene, eine umfassendere Aussage über das „Transkriptom“ gemacht werden [434]. Die hier aufgeführte Untersuchung, sowie Teile der gewonnenen Daten, wurde bereits publiziert [542; 583], sodass die Methodik hier nur zusammenfassend beschrieben wird.

Wir testeten die Auswirkung von Stress im Rahmen des in Abschnitt 2.2.1.1 aufgeführten Tierversuches. Hierfür verwendeten wir ein Affymetrix Mouse Genome 430 2.0A Array. Von jeweils drei Mäusen der Kontroll- und Stressgruppe wurde je Maus 90 ng RNA gepoolt und zweifach amplifiziert mit dem RiboAmp RNA Amplifikations-Kit. Die hierdurch entstandene antisense-RNA wurde mithilfe des BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kits mit Biotin angefärbt und insgesamt 10 mg davon auf den Chip hybridisiert, nach Herstellerangaben. Der Chip wurde mittels GeneArray Scanner 3000 über die GeneChip Operating Software 1.4 ausgelesen, die Ergebnisse mit der Affymetrix® Microarray Suite 5.0 weiter analysiert und über das NetAffx™ Analysis Center aufbereitet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse als „Signal Log Ratio“ (SLR) ausgegeben, also als  $\log_2$  des Verhältnisses der beiden Gruppen.

## 2.5 Statistik

Die statistischen Analysen in dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Graphpad Prism 9.5.1 berechnet, wobei für alle Berechnungen der statistischen Signifikanz das Signifikanzniveau auf 5 % festgelegt wurde. Ein  $p < 0,05$  wurde entsprechend als signifikant angesehen. Die Variablen der einzelnen untersuchten Gruppen wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf eine Normalverteilung überprüft. Bei Fehlen einer Normalverteilung wurden einzelne Gruppen mit nicht-parametrischen Verfahren für unabhängige Stichproben untersucht. Für die Untersuchung von statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen erfolgte ein Kruskal-Wallis-Test (KW-T), das berechnete H wurde im Text entsprechend angegeben. Bei einem  $p < 0,05$  erfolgten Einzelvergleiche mit dem Mann-Whitney-U (MWU)-Test, über den die exakten (2-seitigen) Signifikanzen ausgegeben wurden.

Wenn im Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung vorlag, wurde die Varianzhomogenität mit dem Brown-Forsythe-Test (BF-T) weiter untersucht. Bei einem  $p < 0,05$  im BF-T und somit Nachweis einer Heteroskedastizität erfolgte zur Untersuchung von signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen eine Welch-ANOVA. Der kalkulierte W-Wert für die angegebenen Freiheitsgrade von Zähler und Nenner wurde jeweils angegeben, mit dem zugehörigen p-Wert. Bei Nachweis von statistisch signifikanten Unterschieden in der Welch-ANOVA wurden die Gruppen mittels Welch-T-Test für unabhängige Stichproben weiter verglichen und die (2-seitigen) Signifikanzen, sowie der dazu gehörige t-Wert mit Freiheitsgrad, angegeben.

Bei einem  $p > 0,05$  im BF-T und somit Nachweis einer Varianzhomogenität erfolgte für die Gruppenvergleiche eine einfaktorielle ANOVA, jeweils mit Angabe des kalkulierten F für die angegebenen Freiheitsgrade von Zähler und Nenner sowie dem zugehörigen p. Im Falle von signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen erfolgte zur post-hoc Analyse ein Tukey-Test, mit der Angabe der mittleren Differenz der Gruppenergebnisse und des 95%-Konfidenzintervalls (CI).

Im Rahmen der graphischen Aufarbeitung wurden die Mittelwerte der Gruppen mit dem zugehörigen Standardfehler und die Signifikanzen mit „\*“ oder anderen entsprechend gekennzeichneten Symbolen dargestellt sowie die Einordnung des p-Wertes in der Bildbeschreibung eingefügt. Im Fließtext wurden der Mittelwert und die zugehörige Standardabweichung angegeben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Stress führt NGF-Abhängig zu gestörter epidermaler Morphologie und Differenzierung bei allergischer Inflammation

Wir untersuchten die Morphologie der Zellschichten von muriner Rückenhaut und deren epidermale Differenzierung anhand von Gewebeschnitten, in denen die Zellkerne sowie das basale Zytokeratin K14 angefärbt wurden. In der morphometrischen Auswertung imponierte das Stratum basale (SB) in der Kontrollgruppe durch runde Zellkerne und eine intensive K14-Färbung, konzentriert auf die eher kubischen Zellgrenzen. Ein Stratum spinosum (SS) konnte nur in wenigen Bereichen beobachtet werden, mit nur noch geringer K14-Färbung. Das Stratum granulosum (SG) bestand in der Regel aus einer kernhaltigen Schicht mit flacher Kernmorphologie, nahezu frei von einer K14-Färbung. Die Epidermis von Mäusen nach 24 h akustischem Stress unterschied sich in der K14-Färbung morphometrisch nicht von der Kontrollgruppe.

Nach Induktion einer atopischer-Dermatitis-ähnlicher allergischer Dermatitis (AID) verglichen wir die Ausdehnung der Inflammation der Haut und die resultierende Differenzierungsstörung (Abb. 6). Die Anzahl der epidermalen Schichten differierte signifikant (KW-T:  $H=20,3$ ,  $p<0,001$ , Abb. 7a), ebenso die K14-Anfärbung im SG (Welch-ANOVA:  $W[5, 10,42]=5,47$ ,  $p<0,05$ , bei BF-T  $p<0,05$ , Abb. 7b). Über die Veränderung der absoluten Epidermisdicke wurde bereits publiziert [542].

Morphometrisch war in der Haut von AID-Mäusen eine epidermale Inflammation mit Zunahme der epidermalen Zellschichten zu finden (von  $1,5\pm 0,22$  in der Kontrolle auf  $3,1\pm 0,74$  bei AID,  $p<0,01$  im MWU). Im SB waren die KC hochprismatisch und K14<sup>+</sup>. Das SS umfasste im Schnitt 1 – 2 Zellschichten ( $1,38\pm 0,42$ ). K14 ließ sich intensiv an den Zellgrenzen des SS anfärben und zeigte die kubische bis polygonale Form der Zellen im Sinne einer Spongiose (Abb. 6c). Im SG, das 1 – 2 Zellschichten umfasste ( $1,0\pm 0,14$ ), war eine residuell ablassende K14-Färbung festzustellen, signifikant intensiver als in der Kontrollgruppe ( $p<0,05$ ,  $t[4,14]=3,32$ , Abb. 7b), im Sinne einer epidermalen Differenzierungsstörung. Stress zusätzlich zu AID (AID<sup>+</sup>) führte zu einer Zunahme der epidermalen Dicke und Differenzierungsstörung, jedoch mit ähnlicher Anzahl der gesamten Zellschichten ( $3,4\pm 0,6$ ,  $p=0,3$  im Vergleich zu AID), entsprechend ähnlich vielen Zellschichten im SS ( $1,42\pm 0,25$ ) und SG ( $1,1\pm 0,31$ ). Es war keine relevante Veränderung der K14-Färbeintensität im SG festzustellen ( $p=0,8$ ,  $t[7,98]=0,26$ ). In einigen Bereichen der Epidermis lag eine Verhornungsstörung mit Plaque-Bildung und Ulceration vor (Abb. 22 im Anhang), betont bei AID<sup>+</sup>-Mäusen.

Im nächsten Schritt neutralisierten wir während der Stressphase bei AID-Mäusen die Neurotrophine (NT) NGF oder BDNF mittels Antikörper (AK), um deren Rolle in den Stress-assoziierten morphologischen Veränderungen zu untersuchen. Eine Behandlung mit aNGF-AK führte zur Abnahme der Dicke der epidermalen Inflammation, eher die Zellschichten des SS und weniger des SG betreffend (SS  $1,18\pm 0,34$  Zellschichten, SG  $1,04\pm 0,15$  Zellschichten), die

K14-Färbeintensität in SG war dabei nicht relevant verändert ( $p=0,6$  zu AID<sup>+</sup>,  $t[6,8]=0,48$ ). Unter BDNF-Ausschaltung war der Rückgang der Inflammation subtiler, mit weiterhin gestörter SS- ( $1,34\pm 0,32$  Zellschichten) und SG-Architektur ( $1,0\pm 0,3$  Zellschichten), sowie persistierender Differenzierungsstörung (Abb. 6f) mit K14-Persistenz im SG von unveränderter Färbeintensität ( $p=0,9$  zu AID<sup>+</sup>,  $t[7,57]=0,09$ ).

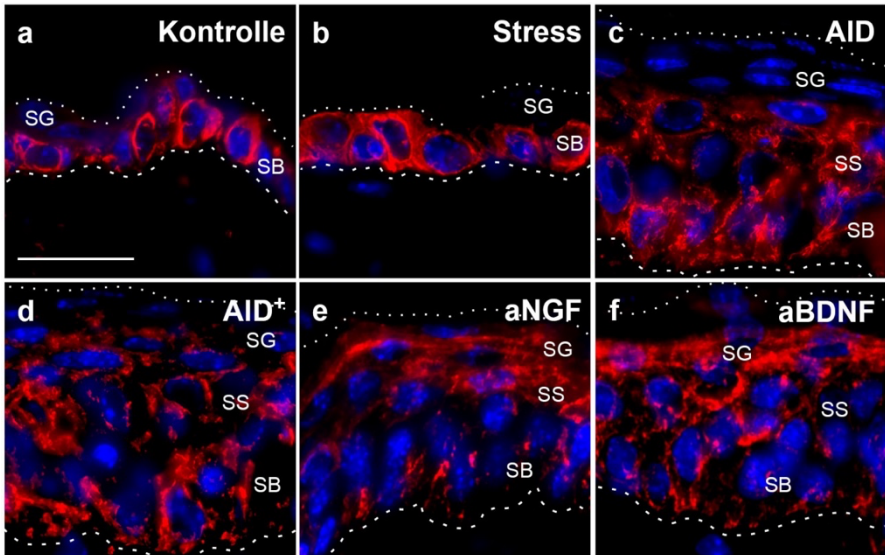


Abb. 6: Gestörte epidermale Differenzierung unter AID, NGF-abhängig durch Stress verschlimmert

Exemplarische Immunfluoreszenzbilder von muriner Rückenhaut mit K14-Färbung zur Darstellung der epidermalen Differenzierung, unter akutischem Stress (b, d - f) und nach Induktion einer atopischer-Dermatitis-ähnlichen allergischen Dermatitis (AID) (c-f). Im Vergleich zur Kontrolle (a) deutlich sichtbares Stratum spinosum (SS) unter AID (c), sowie Persistenz der K14-Färbung im SS und unteren Stratum granulosum (SG). Zusätzlicher Stress zu AID (AID<sup>+</sup>) (d) störte die Differenzierung weiter, mit stärkerer Spongiose und Bruchartefakten im SS. Durch eine Antikörpervermittelte Antagonisierung von NGF bei AID<sup>+</sup> (aNGF, e) kam es zur geringeren Ausdehnung der Epidermisdicke, mit vor allem schmalere SS. Unter Antagonisierung von BDNF bei AID<sup>+</sup>-Tieren (aBDNF, f) war ebenso eine Dickenabnahme festzustellen, allerdings weniger ausgeprägt als bei aNGF. Unter aNGF und aBDNF konzentrierte sich das K14 im unteren und mittleren SG. Rot: anti-K14/Cy3, Blau: DAPI. Die epidermalen Grenzen sind mit gepunkteten Linien markiert. Die Bilder wurden aus Z-Stapeln berechnet, um Unschärfe aufgrund von Schichtdickenartefakten auszugleichen. Balken: 25  $\mu$ m. Weitere Abkürzungen: BDNF= brain-derived neurotrophic factor, K14= Keratin-14, NGF= nerve growth factor, SB= Stratum basale.

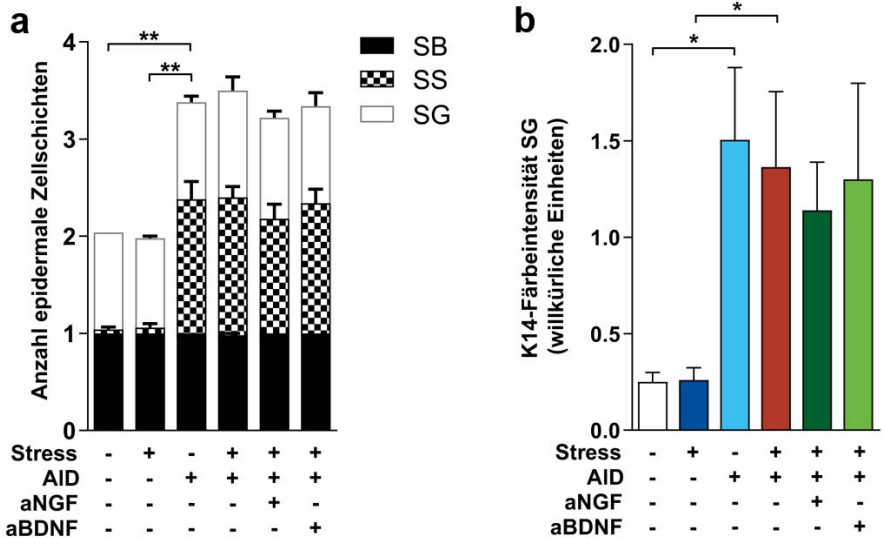


Abb. 7: Differenzierungsstörung unter Inflamationsbedingungen und Stress, ohne signifikante Veränderung durch Modulation der Neurotrophine NGF und BDNF

(a) Darstellung der Zellschichtverteilung in den Inflamationsgruppen im Vergleich zur Kontrolle, mit signifikanter Zunahme der Gesamtzahl der Zellschichten durch die atopischer-Dermatitis-ähnliche allergische Dermatitis (AID). Zusätzlicher Stress zu AID führte zu keinem signifikanten Unterschied der Gesamtzahl der Zellschichten, auch nicht die Antikörper-vermittelte Antagonisierung von NGF (aNGF) bzw. BDNF (aBDNF).  $**p < 0,01$  (MWU) (b) Die subjektive histomorphometrische Intensitätsauswertung der K14-Färbung im Stratum granulosum (SG) zeigte unter Inflamationsbedingungen eine signifikante Zunahme der Färbung, im Sinne einer epidermalen Differenzierungsstörung.  $*p < 0,05$  [ $t(4,14)=3,32$  für Kontrolle,  $t(4,21)=2,789$  für Stress im Welch t-test]. Weitere Abkürzungen: BDNF= brain-derived neurotrophic factor, K14= Keratin-14, NGF= nerve growth factor, SB= Stratum basale, SS= Stratum spinosum.

### 3.2 Stress steigert TJ Moleküle, gegenteiliger und BDNF-abhängiger Effekt bei AID-Inflammation

Zur Beurteilung von Veränderungen der TJ-Marker wurden diese anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen untersucht. Die Verteilung des TJ-Proteins CLDN-1 in der murinen Epidermis zeigte sich konfokal-mikroskopisch in der Kontrollgruppe überwiegend im SG, wo es punkt- bis netzförmig an den Zellgrenzen konzentriert war (Abb. 8a). Auch im SB waren einzelne punktförmige Färbungen an den Zellgrenzen zu erkennen. Zusätzlich fand sich eine homogene zytoplasmatische Färbung, überwiegend im SB. Die Verteilung des Proteins ZO-1 wurde mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie bewertet und war unter Kontrollbedingungen auf die Zellgrenzen des oberen SG konzentriert, mit zusätzlich geringer homogener intrazellulärer Verteilung in allen Zellschichten (Abb. 9a). Eine 24-h-Exposition mit akustischem Stress führte in der murinen Epidermis zu einer Konzentration der CLDN-1-Färbung auf die Zellgrenzen des oberen SG (Abb. 8b). Auch das ZO-1 verhielt sich vergleichbar, mit Konzentration und einer helleren Färbung im oberen SG (Abb. 9b). Nach Induktion der AID-Inflammation war die CLDN-1-Färbung über alle Zellschichten sichtbar, überwiegend an den

Zellgrenzen (Abb. 8c). Insgesamt war die Färbung weniger dicht als in der Kontrollgruppe. Auch ZO-1 war bei AID-Mäusen über mehrere Zellschichten verteilt zu finden (Abb. 9c). Unter zusätzlichem Stress zu AID war die CLDN-1-Färbung noch geringer ausgeprägt (Abb. 8d), während sich ZO-1 überwiegend auf das äußere SG konzentrierte (Abb. 9d). Die Antagonisierung von NGF führte in der Epidermis der gestressten AID-Mäuse zu keiner relevanten Veränderung der CLDN-1-Färbung (Abb. 8e), während ZO-1 vermehrt im SG und oberen SS zu finden war (Abb. 9e). Durch eine BDNF-Ausschaltung in AID<sup>+</sup>-Mäusen zeigte sich die Verteilung von CLDN-1 ähnlich wie bei AID (Abb. 8f), mit scheinbar geringerem Einfluss von Stress auf TJ-Verteilung. Die BDNF-Antagonisierung führte bei ZO-1 im Vergleich zu AID<sup>+</sup> zu einer leichten Zunahme im SG und SS (Abb. 9f).

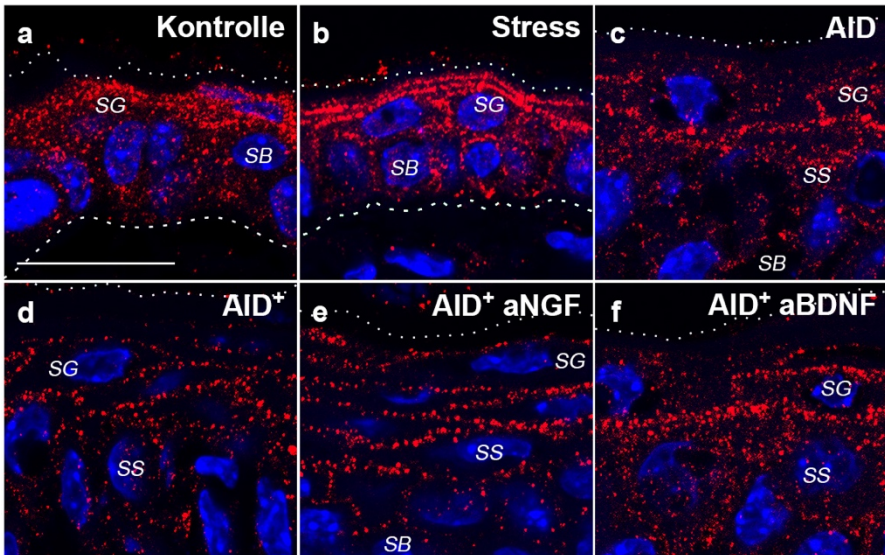


Abb. 8: Akustischer Stress, Inflammation und BDNF veränderten zelluläre CLDN-1 Verteilung

Exemplarische konfokal-mikroskopische Bilder der Epidermis einer Färbung von anti-CLDN-1/Cy3 (rot) und DAPI (blau) auf muriner Rückenhaut. CLDN-1 war unter Kontrollbedingungen (a) überwiegend perizellulär im Stratum granulosum (SG) zu finden. 24 h Stress (b) führte zu einer Konzentration an die Zellgrenzen. Bei atopischer-Dermatitis-ähnlicher allergischer Dermatitis (AID, c) fand sich eine verminderte Färbung im SG, die unter zusätzlichem Stress (AID<sup>+</sup>, d) weiter abnahm. Eine Antikörper-vermittelte Blockade von BDNF (aBDNF, f) führte zu einem ähnlichen Bild wie bei AID, was die Blockade von NGF (aNGF, e) nicht vermochte. Gewebegrenzen sind mit gepunkteten Linien eingezeichnet. Balken: 20  $\mu$ m. Weitere Abkürzungen: BDNF= brain-derived neurotrophic factor, CLDN-1= Claudin-1, NGF= nerve growth factor, SB= Stratum basale, SS= Stratum spinosum.

In nicht-läsionaler Haut war bei den Inflamationsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine veränderte CLDN-1-Verteilung zu sehen, ohne eindeutigen Unterschied zwischen den Interventionsgruppen (Abb. 23 im Anhang). Die ZO-1-Färbung von nicht-läsionalen Bereichen zeigte ein Verteilungsbild ähnlich der Stressgruppe (Abb. 24 im Anhang), auch in Haut von ungestressten AID-Mäusen.

Zur Objektivierung der Beobachtungen wurde die Färbeintensität der Zellschichten gemessen. Bei einigen Schnitten lagen Defekte vor, sodass ein kleineres N in den Messungen resultierte, was in Abb. 10 angegeben ist.

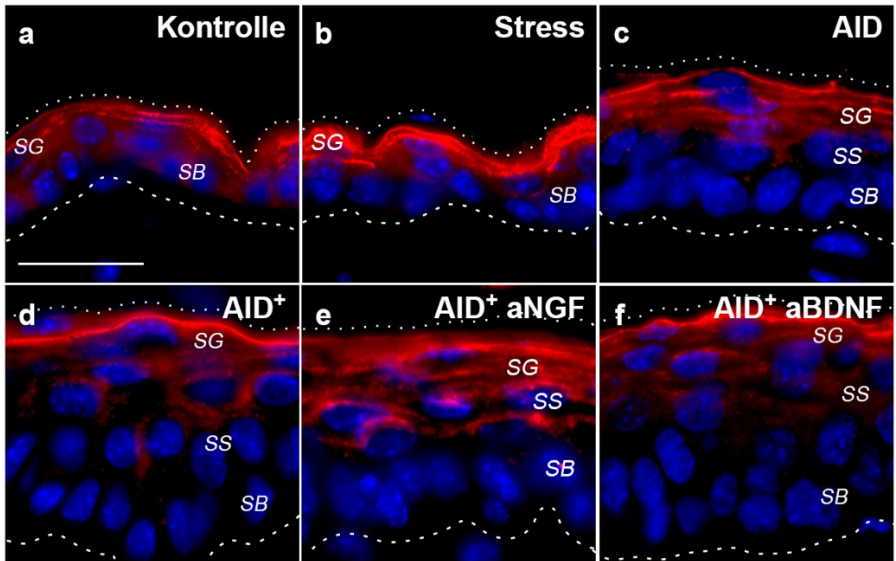


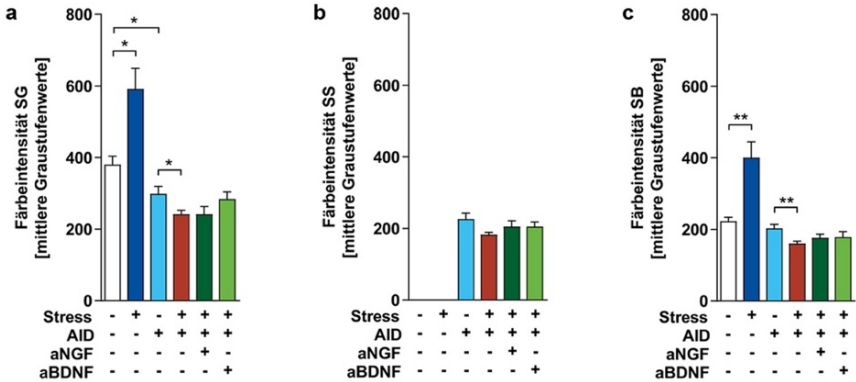
Abb. 9: Einfluss von akustischem Stress auf ZO-1 abhängig von AID-Inflammation und von NGF

Exemplarische fluoreszenz-mikroskopische Bilder mit Färbung von anti-ZO-1/Cy3 (rot) und DAPI (blau) auf muriner Rückenhaut. 24 h Stress (b) führte im Vergleich zur Kontrolle (a) zur Zunahme und Konzentration von ZO-1 an die Zellgrenzen des Stratum granulosum (SG). Unter allergischer Inflammation (AID, c) Verteilung von ZO-1 über mehrere Schichten im SG. Stress zusätzlich zu AID (AID<sup>+</sup>, d) verringerte die ZO-1-Färbung, mit Konzentration auf das obere SG. Die Antagonisierung von NGF mittels Antikörper (aNGF, e) verringerte den Effekt von Stress, während durch BDNF-Ausschaltung (aBDNF, f) allenfalls eine geringe Zunahme von ZO-1 im SG und Stratum spinosum (SS) sichtbar war. Die Grenzen der Epidermis sind mit gepunkteten Linien eingezeichnet. Balken: 25  $\mu$ m. Weitere Abkürzungen: BDNF= brain-derived neurotrophic factor, NGF= nerve growth factor, SB= Stratum basale, ZO-1= Zonula occludens-Protein-1.

Bei der statistischen Analyse der Färbeintensität für CLDN-1 und ZO-1 bestanden für das SG und SB signifikante Unterschiede (KW-T für CLDN-1:  $H_{SG}= 44,8$ ,  $H_{SB}=42,0$ ,  $p$  jeweils  $<0,0001$ , für ZO-1:  $H_{SG}= 54,3$ ,  $H_{SB}=59,3$ ,  $p$  jeweils  $<0,0001$ ), jedoch nicht für das SS (für CLDN-1  $p=0,31$ , für ZO-1  $p=0,08$ ). Im Vergleich zur Kontrolle war unter Stress im SG und SB eine Zunahme der CLDN-1 und ZO-1-Färbeintensität festzustellen ( $p_{SG}<0,05$  bzw.  $p_{SB}<0,01$  für CLDN-1 und  $p_{SG}<0,05$  bzw.  $p_{SB}<0,01$  für ZO-1), während sie im Vergleich unter AID-Inflammation abnahm, außer im SB für CLDN-1 ( $p_{SG}<0,05$  bzw.  $p_{SB}=0,15$  für CLDN-1 und  $p_{SG}<0,0001$  bzw.  $p_{SB}<0,01$  für ZO-1).

Zusätzlicher Stress zur Inflammation führte zur weiteren Abnahme von CLDN-1 im SG und SB ( $p_{SG}<0,05$  bzw.  $p_{SB}<0,01$ ). ZO-1 war unter AID<sup>+</sup>-Bedingungen im SG nicht-signifikant verändert ( $p=0,22$ ), im SB aber weniger intensiv angefärbt ( $p<0,01$ ). Eine Antagonisierung von BDNF führte zu keiner signifikanten Zunahme der Färbeintensität von CLDN-1 im SG ( $p=0,16$ ).

## CLDN-1



## ZO-1

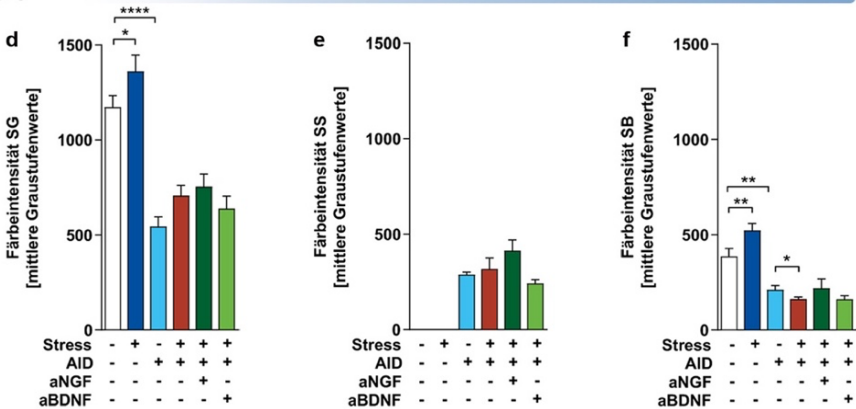


Abb. 10: Färbintensität bestätigte gestörte Verteilung der TJ-Moleküle unter Stress und Inflammation

Intensitätsmessung der TJ-Färbung auf muriner Rückenhaut, aufgeteilt nach Zellschichten. Das Stratum spinosum (SS) war nur in den Inflammationsgruppen auswertbar vorhanden. Akustischer Stress führte bei CLDN-1 und ZO-1 zur Zunahme der Färbintensität im Stratum granulosum (SG) und Stratum basale (SB). Unter allergischer Inflammation (AID) Abnahme der Färbintensität im SG beider TJ-Marker, sowie von ZO-1 im SB. Zusätzlicher Stress (AID<sup>+</sup>) verminderte die CLDN-1-Färbintensität weiter im SG und SB, für ZO-1 nur im SB. Eine antikörpervermittelte Antagonisierung der Neurotrophine NGF (aNGF) oder BDNF (aBDNF) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Färbintensität. Anzahl der Messungen pro Gruppe die von N=5 abweichen für CLDN-1: N<sub>AID</sub> = 2, N<sub>AID+</sub> = 3, N<sub>aNGF</sub> = 2, N<sub>aBDNF</sub> = 3. Für ZO-1: N<sub>AID</sub> = 1, N<sub>AID+</sub> = 4, N<sub>aNGF</sub> = 3, N<sub>aBDNF</sub> = 3. Signifikanzen (MWU): \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*\*p<0,0001. Weitere Abkürzungen: BDNF= brain-derived neurotrophic factor, CLDN-1= Claudin-1, NGF= nerve growth factor, ZO-1= Zonula occludens-Protein-1.

### 3.3 Abnahme der TJ-Marker mRNA-Expression unter Stress und Inflammation, abhängig von Neurotrophinen

Die Genexpression der TJ-Marker wurde mittels qPCR in der Haut untersucht. Signifikante Unterschiede gab es jeweils für CLDN-1 (KW-T H= 19,3,  $p<0,01$ ), ZO-1 (Welch-ANOVA:  $W(5, 9,6)=21,45$  mit  $p<0,0001$  bei BF-T  $p<0,0001$ ) und Ocl (KW-T H=24,1,  $p<0,001$ ).

Die CLDN-1 mRNA war im Vergleich zur Kontrolle in der Stress- und AID-Gruppe signifikant geringer nachzuweisen (0,44-fach  $\pm 0,20$  bzw. 0,45-fach  $\pm 0,18$ ). Stress zusätzlich zu AID verminderte die CLDN-1-Bildung auf ein Minimum (0,04-fach  $\pm 0,02$ ). Eine Antagonisierung beider NT führte zum partiellen aber signifikanten Anstieg der mRNA-Expression, für NGF mehr als für BDNF (0,43-fach  $\pm 0,13$  und 0,26-fach  $\pm 0,12$ ). Die ZO-1-mRNA war durch 24 h akustischen Stress nicht verändert, in der AID-Gruppe jedoch deutlich vermindert (0,30-fach  $\pm 0,14$ , Welch-t-Test zur Kontrolle:  $t(5,181) = 6,140$ ,  $p<0,001$ ), mit weiterer Abnahme unter zusätzlichem Stress (0,04-fach  $\pm 0,03$ , zu AID:  $t(3,913) = 4,448$ ,  $p<0,05$ ). Die Antagonisierung der NT veränderte lediglich die ZO-1-Expression im Falle vom NGF (0,21-fach  $\pm 0,11$ , zu AID<sup>+</sup>:  $t(3,291) = 4,702$ ,  $p<0,05$ ).

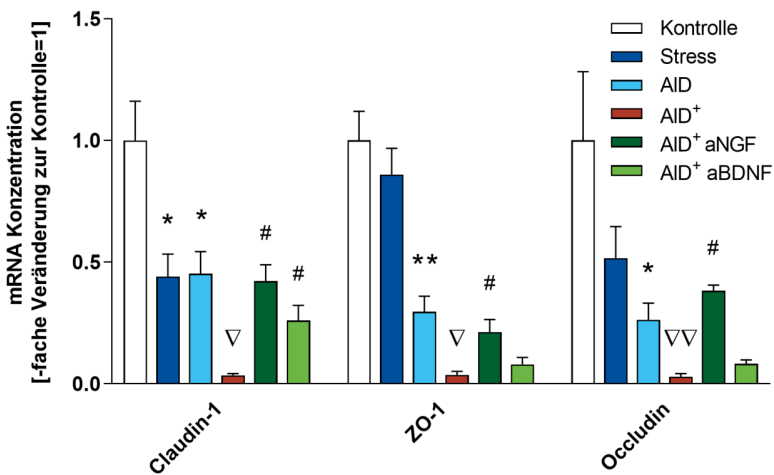


Abb. 11: AID sowie zusätzlicher akustischer Stress verminderte TJ-Expression auf genetischer Ebene, NGF beeinflusste dabei alle TJ-Marker, BDNF nur CLDN-1

Graphische Darstellung von qPCR-Ergebnissen der TJ-Marker aus muriner Vollhaut. Akustischer Stress über 24 h führte zur signifikanten Abnahme der CLDN-1-Expression, während die Induktion einer atopischer-Dermatitis-ähnlichen allergischen Dermatitis (AID) zur Abnahme der mRNA aller 3 TJ-Marker führte, weiter verstärkt durch zusätzlichen akustischen Stress (AID<sup>+</sup>). Die Antagonisierung des Neurotrophins NGF (AID<sup>+</sup> aNGF) milderte den Stress-Effekt unter AID bei allen 3 TJ-Markern ab, während die Antagonisierung des Neurotrophins BDNF (AID<sup>+</sup> aBDNF) nur den Effekt von Stress auf die CLDN-1-mRNA-Expression bei AID-Tieren anteilig behob. Signifikanzen: Zu Kontrolle:\*. Zu AID: ∇. Zu AID<sup>+</sup>: #. Ein Symbol:  $p<0,05$ , zwei Symbole:  $p<0,01$ . Berechnung der Signifikanzen für CLDN-1 und Ocl mit MWU, für ZO-1 mit Welch-t-Test. Weitere Abkürzungen: BDNF= brain-derived neurotrophic factor, CLDN-1= Claudin-1, NGF= nerve growth factor, ZO-1= Zonula occludens-Protein-1.

Die mRNA von Ocl war in der Haut der Stressgruppe nicht signifikant vermindert (0,51-fach,  $p=0,29$ ). AID führte wie bei den anderen TJ-Markern zur signifikanten Reduktion der Ocl-mRNA (0,26-fach,  $\pm 0,15$ ), auch war eine weitere Abnahme unter AID<sup>+</sup> festzustellen (0,03-fache Expression,  $\pm 0,03$ ). In der aNGF-Gruppe war wiederum eine relevante Zunahme der Ocl-mRNA festzustellen (0,38-fach  $\pm 0,05$ ), unter BDNF-Ausschaltung nur tendenziell (0,08-fach  $\pm 0,04$ ,  $p=0,06$  zu AID<sup>+</sup>).

### 3.4 Klinisch gestörte Barriere unter Inflammation, Effekt von Stress teilabhängig von BDNF

Die Barrierefunktion der Haut in Zusammenhang mit den veränderten TJ-Markern wurde über die Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes untersucht, wo sich signifikante Unterschiede zeigten (KW-T  $H=41,0$ ,  $p<0,0001$ ). In der basalen Messung der Kontrollgruppe ließ sich ein Wasserverlust von  $4,7\pm 0,8$  g/m<sup>2</sup>h feststellen, mit nur marginalem Anstieg auf  $6,2\pm 1,8$  g/m<sup>2</sup>h nach 24 h akustischem Stress ( $p=0,11$ ). Unter AID nahm der Wasserverlust signifikant auf  $10,9\pm 1,5$  g/m<sup>2</sup>h zu. Zusätzlicher Stress zur AID führte zu einem Wasserverlust von  $12,1\pm 2,7$  g/m<sup>2</sup>h, ohne Signifikanz zur AID-Gruppe ( $p=0,59$ ). Die Antagonisierung von den NT führte nur für BDNF bei AID<sup>+</sup>-Tieren zu einem Rückgang des Wasserverlustes, auf  $10,0\pm 1,9$  g/m<sup>2</sup>h. Ein Teil dieser Ergebnisse wurde bereits in der Vergangenheit publiziert [54].

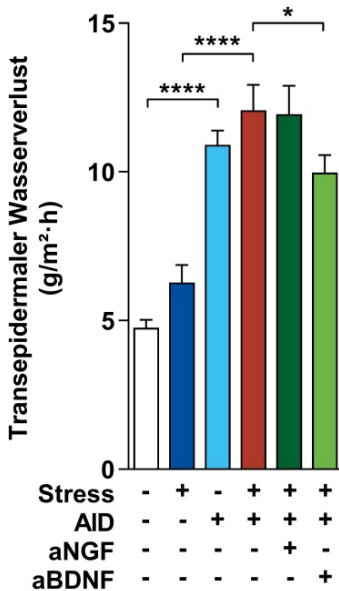


Abb. 12: Klinische Barriestörung unter AID und akustischem Stress, anteilig abhängig von BDNF

Darstellung des Wasserverlustes über murine Haut. Unter atopischer-Dermatitis-ähnlicher allergischer Dermatitis (AID), auch unter zusätzlichem Stress, bestand im Vergleich zur Kontroll- bzw. Stressgruppe eine signifikante Barriestörung mit zunehmendem Wasserverlust. Während eine Antagonisierung des Neurotrophins NGF unter Stress- und Inflamationsbedingungen (aNGF) zu keiner Veränderung der Barriestörung führte, war der Wasserverlust unter Antagonisierung von BDNF (aBDNF) rückläufig. Signifikanzen (MWU): \* $p<0,05$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ ,  $N=10$  pro Gruppe. Weitere Abkürzungen: BDNF= brain-derived neurotrophic factor, NGF= nerve growth factor.

### 3.5 Plastische Veränderungen des nAChR- $\alpha$ 7 unter Stress

Bisher konnten wir feststellen, dass Stress, mit und ohne AID-Entzündung, die Funktion, Lokalisation, Konzentration oder Bildung der TJ-Moleküle beeinflussen kann. Um plastische oder regulatorische Veränderungen des nAChR- $\alpha$ 7 als potenzieller Übermittler bei der Stressreaktion zu analysieren, bewerteten wir die nAChR- $\alpha$ 7-Expression mittels IHC und qPCR in muriner Haut. In der Epidermis ungestresster Mäuse ließ sich nAChR- $\alpha$ 7 überwiegend im oberen SG anfärben (Abb. 13), während 24 h akustischer Stress zu einer Umverteilung des nAChR- $\alpha$ 7 führte, vor allem in den Zellen des SG, mit teils zytoplasmatischer Anfärbung.

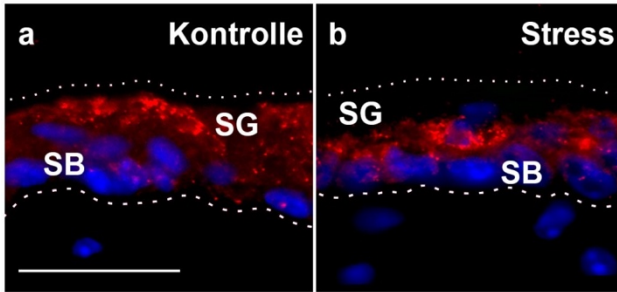
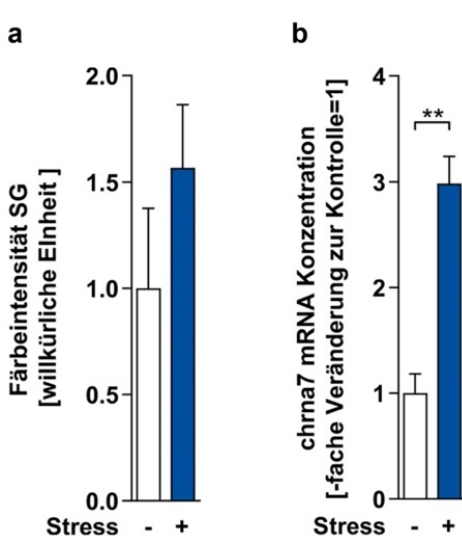


Abb. 13: Umverteilung der nAChR- $\alpha$ 7-Expression in muriner Haut unter akustischem Stress

Exemplarische fluoreszenz-mikroskopische Bilder einer Färbung des nikotinergen  $\alpha$ 7-Acetylcholinrezeptors (nAChR- $\alpha$ 7, rot markiert mit Cy3) auf muriner Rückenhaut, sowie einer Zellkernfärbung mit DAPI (blau). In der Kontrollgruppe (a) war der nAChR- $\alpha$ 7 an der oberen Zellgrenze des Stratum granulosum (SG) zu finden, nur

in wenigen Punkten im Stratum basale (SB). Unter Stressbedingungen nach 24 h akustischem Stress (b) fand sich ein unterschiedliches Expressionsmuster im SG, mit einzelnen zytoplasmatisch gefärbten Zellen, sowie vermehrter Immunlokalisation am SB/SG-Übergang. Die Epithelgrenzen sind mit gepunkteten Linien eingezeichnet. Balken: 25  $\mu$ m.



In der subjektiven Auswertung der Färbintensität war dennoch keine signifikante Zunahme der gesamten Färbung festzustellen ( $t(4,994) = 1,2, p=0,3$ , Abb. 14a). Bei den Ergebnissen der qPCR zeigte sich unter Stress eine relevante Zunahme der CHRNA-7-mRNA (im MWU, Abb. 14b), was bereits publiziert wurde [583].

Abb. 14: Akustischer Stress steigerte die Expression von nAChR- $\alpha$ 7

Die histomorphometrische Auswertung der Farbintensität des Stratum granulosum (SG) in subjektiven Einheiten (a) zeigt keinen signifikanten Anstieg der nAChR- $\alpha$ 7-Färbintensität, während in der qPCR die Expression des CHRNA7-Gens aus Vollhaut signifikant ansteigt (b, aus [583]).  $**p<0,01$  (MWU). Abkürzungen: nAChR- $\alpha$ 7= nikotinerges Acetylcholin-rezeptor  $\alpha$ 7, CHRNA7= cholinergischer Acetylcholin-rezeptor nicotinic alpha 7-subunit Gen.

### 3.5.1 BDNF dysreguliert unter Nikotin-Stress Hauttrophik *ex-vivo* nAChR- $\alpha 7$ -abhängig, marginale TJ-mRNA-Veränderung jedoch unabhängig des nAChR- $\alpha 7$

Die oben beschriebenen Veränderungen des nAChR- $\alpha 7$  könnten einen potenziellen Schritt in der Modulierung der TJ bilden, der möglicherweise auch einen epidermalen Zwischenschritt der BDNF-Wirkung darstellt. Das Zusammenspiel aus nikotinergem Stress, dem nAChR- $\alpha 7$  und BDNF auf die Haut, mit der Frage ob ohne Inflammation eine stabilisierende oder schädigende Wirkung auf die TJ auftritt, wurde weiter untersucht mit einer murinen Hautorgankultur von Wildtyp- und CHRNA7-KO-Mäusen. Die Stimulation der nAChR wurde mit 10  $\mu$ M Nikotin als Stressor bzw. die Modulation mittels 5 ng/ml BDNF durchgeführt, über die Dauer von 24 h. Es erfolgten exemplarische K14-Färbungen der Hautorgankulturen, auch wurden die epidermale Dicke und die Proliferations- und Apoptoserate weiter untersucht. Neben der Beurteilung der Hauttrophik bestimmten wir die mRNA-Expression der TJ-Marker.

In der Epidermis der CHRNA7-KO-Mäuse zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine vermehrte Persistenz von K14 im SS (Abb. 15d), die am ehesten der bekannten Differenzierungsstörung bei Fehlen des nAChR- $\alpha 7$  entspricht. Unter BDNF-Einfluss war diese Differenzierungsstörung in CHRNA7-KO-Haut nicht mehr festzustellen. Als Wildtyp-Haut mit 5 ng/ml BDNF und 10 nM Nikotin behandelt wurde, kam es jedoch zur Störung der epidermalen Differenzierung, mit kubischen KC im SB und K14-Nachweis teils bis ins SG (Abb. 15c). Dieser Effekt schien nAChR- $\alpha 7$ -abhängig zu sein und war in der CHRNA7-KO-Haut nicht sichtbar (Abb. 15f).

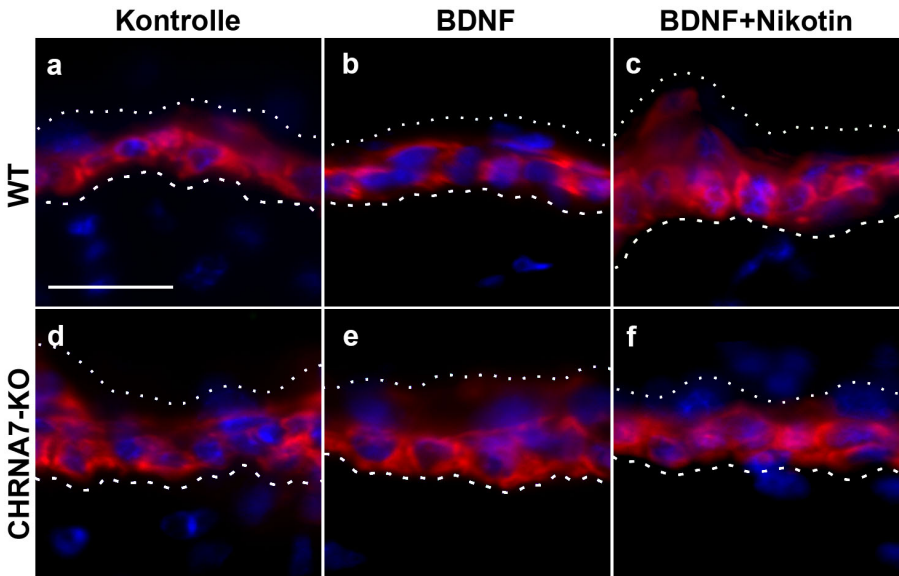


Abb. 15: Der nikotinerge  $\alpha 7$ -Acetylcholinrezeptor vermittelte Differenzierungsstörung unter BDNF-Einwirkung

Exemplarische fluoreszenz-mikroskopische Bilder einer murinen Hautkultur von C57BL/6J-Wildtyp (WT) und CHRNA7-Knock-out (KO)-Mäusen in denen anti-Keratin-14 (K14) /Cy3 (rot), sowie DAPI für die Zellkerne (blau), angefärbt wurde. (a) und (d) stellen die Kontrollbedingungen dar, wobei in KO-Haut eine geringe Störung der epidermalen Differenzierung zu sehen ist, mit Persistieren des basalen Zytokeratins K14 in den oberen Zellschichten. (b) und (e) zeigen eine 24 h Behandlung mit 5 ng/ml BDNF, unter KO-Bedingungen mit gebesselter Differenzierung. Zusätzlich wurden Hautkulturen mit 5 ng/ml BDNF und 10 nM Nikotin behandelt, in (c) und (f). Hierdurch kam es zur gestörten Differenzierung lediglich in WT-Haut (c). Die Grenzen der Epidermis sind mit gepunkteten Linien eingezeichnet. Balken: 25  $\mu$ m. Weitere Abkürzungen: BDNF=brain-derived neurotrophic factor, CHRNA7= cholinergic receptor nicotinic alpha 7-subunit Gen.

Die Ergebnisse der epidermalen Dickenmessung sind in Abb. 16a dargestellt, mit signifikanten Veränderung nur für die Wildtypgruppe (KW-T für WT:  $H=17,05$ ,  $p<0,05$ , für KO:  $H=6,0$ ,  $p=0,65$ ). Im Vergleich zur WT-Kontrolle ( $51\pm 9 \mu\text{m}$ ) lag ein Trend zur Abnahme der epidermalen Dicke unter der Stimulation mit BDNF vor (auf  $46\pm 10 \mu\text{m}$ ,  $p=0,08$ ). Unter CHRNA7-KO-Bedingungen war die epidermale Dicke in der Kontrollgruppe und unter Stimulation mit 5 ng/ml BDNF unverändert ( $51\pm 12 \mu\text{m}$  bei Kontrolle,  $52\pm 7 \mu\text{m}$  unter BDNF mit  $p<0,05$  zu WT BDNF). Eine zeitgleiche Stimulation mit BDNF und Nikotin bewirkte unter WT-Bedingungen das Gegenteil, mit signifikanter Zunahme der epidermalen Dicke ( $62\pm 10 \mu\text{m}$ ,  $p<0,05$  zu WT Kontrolle,  $p<0,01$  zu WT BDNF). Die Dickenzunahme unter BDNF und Nikotin ließ sich im CHRNA7-KO-Gewebe nicht feststellen ( $53\pm 10 \mu\text{m}$ ), wobei der Unterschied zur WT-Gruppe nicht signifikant war ( $p=0,11$ ).

In der Proliferationsanalyse waren bei der Beurteilung der Ki67-positiven Zellen (Abb. 16b) nur sehr wenige Zellen anzufärben, mit bereits großer Streuung innerhalb der Gruppe, sodass keine wegweisenden statistischen Differenzen festzustellen waren (KW-T  $H=3,78$ ,  $p=0,58$ ). In der TUNEL-Färbung lagen ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor (KW-T  $H=8,4$ ,  $p=0,14$ , Abb. 16c), jedoch mit tendenziell mehr TUNEL<sup>+</sup> Zellen in der CHRNA7-KO-Maushaut ( $3,1\pm 3,0$  Zellen/mF gegen  $8,3\pm 9,5$  Zellen/mF). Eine Behandlung der Haut mit BDNF führte in der WT-Haut zu keiner relevanten Änderung der Apoptoserate (Anstieg auf  $6,5\pm 6,3$  Zellen/mF,  $p=0,15$ ), während eine Behandlung von CHRNA7-KO-Haut mit BDNF bzw. zusätzlich Nikotin allenfalls zur tendenziellen Normalisierung der Apoptosen führte (auf  $3,5\pm 2,6$  Zellen/mF bei BDNF-Behandlung,  $p=0,11$  bzw. auf  $2,7\pm 3,2$  Zellen/mF bei BDNF- und Nikotin-Behandlung,  $p=0,09$  zur Kontrolle), was wegen der Streuung der Ergebnisse aber zurückhaltend interpretiert werden sollte.

Zur Beurteilung der TJ-Verteilung färbten wir exemplarische Schnitte der HOK mit anti-CLDN-1- und anti-ZO-1-AK an (s.Abb. 25 im Anhang). Hier zeigte sich bereits in den Kontrollgruppen eine veränderte epitheliale Färbung beider Marker. Daher entschieden wir uns, lediglich die mittelfristige Regulationsebene mit Veränderungen in der Genexpression heranzuziehen (Abb. 17). Hier lagen überwiegend Trends vor, nur bei ZO-1 waren statistisch signifikante Unterschiede festzustellen (für CLDN-1 ANOVA:  $F[5, 12]=2,8$  mit  $p=0,06$  bei BF-T  $p=0,9$ , für ZO-1 ANOVA:  $F[5, 12]=3,53$  mit  $p<0,05$  bei BF-T  $p=0,98$ , sowie für Ocl KW-T:  $H=10,1$  mit  $p=0,18$ ).

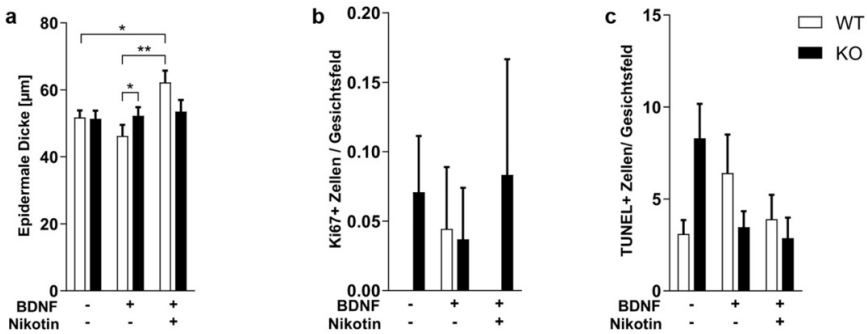


Abb. 16: Zunahme der epidermale Dicke unter nAChR- $\alpha 7$  und BDNF-Einfluss, bei uneinheitlicher Proliferation und Apoptose

Dargestellt sind die Ergebnisse der *ex-vivo* murinen Hautkultur an C57B/6J-Wildtyp (WT) und CHRNA7-KO-Gewebe (KO) unter Kontrollbedingungen, sowie nach 24 h Einwirkungen von 5 ng/ml BDNF, mit und ohne 10 nM Nikotin. Es wurden die epidermale Dicke gemessen (a), die Proliferation anhand Ki67-positiver epidermaler Zellen dargestellt (b) sowie die Anzahl apoptotischen TUNEL-positiven Zellen bestimmt (c). Die BDNF-Einwirkung führte abhängig von der Anwesenheit des nAChR- $\alpha 7$  und zusätzlichem nikotinerger Stress zu unterschiedlichen trophischen Bedingungen, mit Zunahme der epidermalen Dicke unter BDNF- und Nikotin-Stimulation. Bei der Proliferations- und Apoptoserate war lediglich ein Trend zu gesteigerter Apoptose in KO-Kontrollhaut festzustellen, die unter BDNF- und Nikotineinfluss nicht vorlag. Signifikanzen (MWU): \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Weitere Abkürzungen: BDNF= brain-derived neurotrophic factor, CHRNA7= cholinergic receptor nicotinic alpha 7-subunit Gen, nAChR- $\alpha 7$ = nikotinerger Acetylcholin Rezeptor  $\alpha 7$ .

Für CLDN-1 war die mRNA-Expression der Kontrollgruppen ähnlich (1,0-fach  $\pm 0,3$  gegen 0,99-fach  $\pm 0,18$ ), eine Behandlung mit BDNF führte zu keiner signifikanten Veränderung der CLDN-1-mRNA-Expression, mit 1,35-facher Expression in WT ( $\pm 0,17$ ,  $p = 0,77$  zur Kontrolle, -0,34, 95%-CI[-1,2, 0,5]), bzw. 1,22-fach in CHRNA7-KO-Haut ( $\pm 0,23$ ,  $p = 0,9$  zur KO-Kontrolle, -0,23, 95%-CI[-1,1, 0,7]). Eine Behandlung mit BDNF und Nikotin ergab allenfalls einen Trend zur Steigerung der CLDN-1-mRNA, auf 1,66-fach ( $\pm 0,43$ ,  $p = 0,13$  zur Kontrolle, -0,7, 95%-CI[-1,6, 0,2]), im KO-Gewebe auf 1,73-fach ( $\pm 0,49$   $p = 0,1$  zur KO-Kontrolle, -0,7, 95%-CI[-1,6, 0,1]).

Bei ZO-1 bestand bereits in den Kontrollgruppen ein minimaler Unterschied in der mRNA-Expression zwischen WT und KO-Mäusen (1-fach  $\pm 0,2$  gegen 0,73-fach  $\pm 0,09$  in KO,  $p = 0,4$ , 0,27, 95%-CI[-0,19, 0,73]), nicht jedoch unter BDNF-Stimulation (1,12-fache Expression  $\pm 0,15$  bei Wildtyp,  $p = 0,9$ , -0,12, 95%-CI[-0,6, 0,3]) gegen 1,07-fach  $\pm 0,2$ , in KO-Haut,  $p = 0,99$ , 0,05, 95%-CI[-0,4, 0,5]). Eine 24 h Stimulation mit BDNF und Nikotin führte in CHRNA7-KO-Haut zur signifikanten Zunahme auf eine 1,24-fache Expression ( $\pm 0,13$ ,  $p < 0,05$  zur KO-Kontrolle, -0,51, 95%-CI[-0,98, -0,05]), bei WT: 1,2-fache Expression  $\pm 0,21$ ,  $p = 0,7$  zur Kontrolle, -0,19, 95%-CI[-0,66, 0,27]).

Die Ocl-mRNA-Ergebnisse zeigten weder in den Kontroll- noch in den BDNF-Stimulationsgruppen Unterschiede. Eine Stimulation mit BDNF und Nikotin führte, unabhängig vom nAChR- $\alpha 7$ , zu einer vagen aber nicht signifikanten Zunahme der mRNA auf 1,50-fach ( $\pm 0,14$ , Wildtyp,  $p = 0,1$  zur Kontrolle) bzw. 1,68-fach ( $\pm 0,25$ , CHRNA7-KO,  $p = 0,4$  zur CHRNA7-KO Kontrolle).

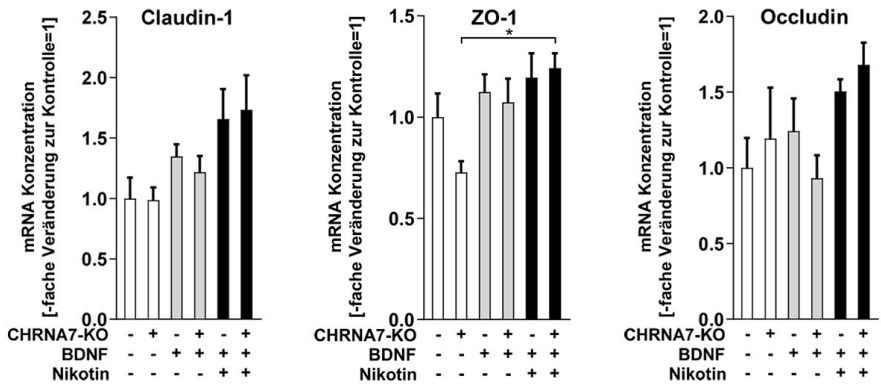


Abb. 17: Zunahme der mRNA-Expression von ZO-1, tendenziell auch Claudin-1 unter BDNF-Einfluss und nikotinerem Stress, unabhängig des nAChR- $\alpha 7$

Die mRNA-Expression von Claudin-1, ZO-1 und Occludin wurde in einer *ex-vivo* Hautkultur von C57BL/6J- Wildtyp- und CHRNA7-KO-Maushaut untersucht, unter Kontrollbedingungen sowie nach 24 h Stimulation mit 5 ng/ml BDNF, mit und ohne 10 nM Nikotin. Die qPCR-Ergebnisse stammen aus Vollhaut und werden als relative Veränderung zur Kontrollgruppe dargestellt, mit N=3 pro Versuchsreihe. \* $p < 0,05$  (-0,51, 95%-CI[-0,98, -0,05]). Abkürzungen: BDNF=brain-derived neurotrophic factor, CHRNA7= cholinergic receptor nicotinic alpha 7-subunit Gen, nAChR- $\alpha 7$ = nikotinerger Acetylcholin Rezeptor  $\alpha 7$ , ZO-1= Zonula occludens-Protein-1.

Für die Testung der funktionellen Barriere erfolgte neben der Stimulation der Hautproben auch eine Inkubation mit den wasserlöslichen Molekülen LY bzw. Sulfo-NHS-Biotin, die Ergebnisse waren jedoch nicht verwertbar. Das LY trat aufgrund der geringen Probengröße von 3 mm in das die Proben umgebende Medium über, sodass hier keine sichere Aussage zur Herkunft von LY in den epidermalen Schichten gemacht werden konnte. Das Sulfo-NHS-Biotin diffundierte bis an die Basalmembran, jedoch nicht oder nur in geringem Maße in die Epidermis (s. Abb. 26 im Anhang), eine Aussage über die TJ-Integrität war hierüber nicht suffizient möglich.

### 3.6 Akustischer Stress verändert das Transkriptom der Haut, auch die Expression von TJ-Regulatoren

Für die Analyse anderer Stress-medieierender Faktoren, die zwischen dem systemischen, akustischen, Stress und den oben dargestellten Effekten auf die TJ-Marker vermitteln, erfolgte die Untersuchung des Transkriptoms in muriner Haut unter Kontrollbedingungen und nach 24 h akustischem Stress. Über einen Teil der Ergebnisse wurde bereits publiziert und es wurde berichtet, dass von den 14.000 untersuchten Genen 272 hoch- und 416 herunterreguliert waren [542; 583]. Die Gene mit veränderter Expression unter Stress wurden mit bekannten TJ-Regulatoren verglichen, unter anderem verschiedenen Kinasen und Phosphatasen. Ein Auszug der Ergebnisse findet sich in Tabelle 12, eine ausführliche Liste im Anhang in Tabelle 13. Die Expression mehrerer Kinasen war durch die systemische Stressreaktion in Vollhaut verändert, am ausgeprägtesten war eine Abnahme der Expression der nPKCs.

Tabelle 12: Auswahl der veränderten Genexpression in muriner Haut durch 24 h akustischen Stress.

Die Microarray-Ergebnisse sind ausgegeben als binärer Logarithmus des Verhältnisses zwischen Expression unter Kontroll- und Stressbedingungen. Ein Wert von +1 entspricht somit einer Verdopplung, -1 einer Halbierung der Expression, ohne Aussage über eine Signifikanz der Ergebnisse. N= 3 pro Gruppe.

Gen	Symbol	log2 der Veränderung in Haut
Interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	-2,559
TNF receptor super family, member 1b = CD120	Tnfrsf1b	-2,576
TNF receptor super family, member 5 = CD40	Tnfrsf5 /Tnf-R5	1,194
Actinin, alpha 1	Actn1	2,078
Dual specificity phosphatase 1	Dusp1	-1,07
Jun oncogene (AP-1 )	Jun	-1,547
Mitogen-activated protein kinase 7	Mapk7	1,491
Protein kinase C, theta	Prkccq	-1,461
Signal transducer and activator of transcription 3	Stat3	1,401
Transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	Trp53inp1	-1,209
Betacellulin, epidermal growth factor family member	Btc	-1,091
Fibroblast growth factor receptor-like 1	Fgfr1	1,063

### 3.7 Methodische Möglichkeit, die epidermale Differenzierung unter zellulärem Stress mit veränderter CLDN-1-Verteilung durch PKC $\theta$ -Mediation, darzustellen

Um eine Methode zu entwickeln, mit welcher der Effekt von Stress auf Gewebe- und Zellebene untersucht werden könnte, wählten wir einen Zellversuch. Durch Anheben der Calciumkonzentration sollte eine epidermale Differenzierung induziert werden, mit gezielter Untersuchung der Stressreaktion im Bereich der TJ, bei exemplarischer Modulation der nPKC $\theta$ . Hierzu verglichen wir HaCaT-Zellen in Passage 11 nach einer 48-h-Kultur unter normaler (1,8 mM) und hoher (9,8 mM) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Abb. 18), bei optisch optimaleren Differenzierungskriterien wurde mit der höheren [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> weiter verfahren. Nach weiteren 24 h Kultivierung der HaCaT-Zellen in einem Medium mit 9,8 mM Calcium und 0,5 % FBS, sowie anteilig zellulärem Stress mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Inhibition der nPKC $\theta$ , wurde INV zur Darstellung der zellulären Differenzierung und CLDN-1 für die TJ-Marker angefärbt, mit folgender konfokal-mikroskopischer Untersuchung. Durch die mechanische Lösung für die Zellernte blieben die HaCaT-Zellen in Fragmenten ihres Zellverbandes erhalten, wenngleich durch die Zentrifugation Zellen und deren Nuclei anteilig verformt wurden.

In der Kontrollgruppe (Abb. 19a) waren INV<sup>-</sup>- und CLDN-1<sup>+</sup>-Zellen zu finden, mit zytoplasmatischem und perizellulärem granulärem Färbemuster.

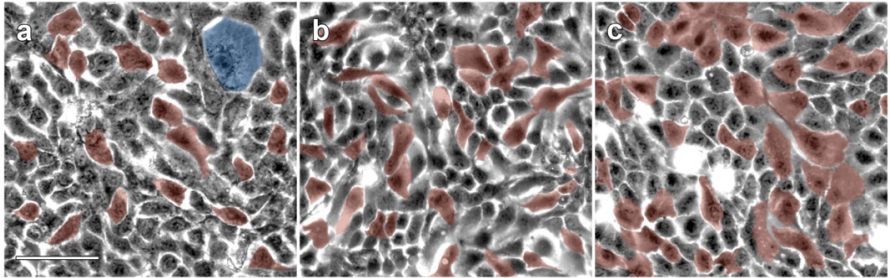


Abb. 18: Vermehrte Differenzierung von HaCaT-Zellen durch Anhebung der Calciumkonzentration

Exemplarische durchlicht-mikroskopische Bilder von HaCaT-Zellen vor der 11. Passage (a) und nach Passage mit anschließender 48-h-Kultur in 1,8 mM (b) und 9,8 mM (c) Calciumkonzentration. (a) zeigt die typischen kleinen, dicht wachsenden kuboiden bis polygonalen Zellen, vereinzelte große polynukleären Zellen und wenige eher kleine Zellen in zweiter Ebene. Nach Passage und 48-h-Kultur (b, c) zeigte sich an mehreren Stellen eine zweite Zellebene mit nunmehr spindelförmigen bis flächigen Zellen, vermehrt bei hoher Calciumkonzentration (c). Artifizielle Einfärbung von spindelförmigen Zellen in zweiter Ebene (rot), sowie einer typischen großen HaCaT-Zelle (blau). Balken: 100  $\mu$ m.

Unter Stress mittels 0,1 mM  $H_2O_2$  fanden sich Zellen mit einer ähnlichen Farbeintensität wie in der Kontrollgruppe, aber vermehrt auch mit teils intensivem perizellulärem INV- und CLDN-1-Färbemuster (Abb. 19b). Eine Antagonisierung der nPKC $\theta$  schien diesen Prozess zu vermindern mit einer Reduktion der CLDN-1-Färbemuster und eher Zellkernnaher INV- und CLDN-1-Färbung (Abb. 19c). Allerdings waren im Vergleich zur Kontrollgruppe auch intensiv INV-angefärbte HaCaT zu finden, wenn auch in geringerer Anzahl als unter reinem  $H_2O_2$ -Stress.

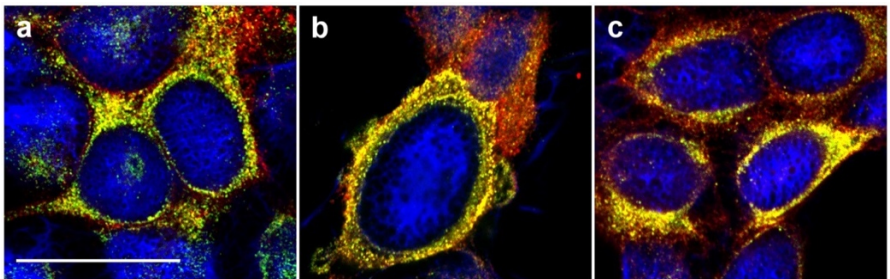


Abb. 19: Kultusbeispiel wie zellulärer Stress mit  $H_2O_2$ , teils nPKC $\theta$ -Abhängig, CLDN-1-Lokalisation an die Zellmembran beschleunigte

Exemplarische konfokal-mikroskopische Aufnahmen der stimulierten HaCaT-Kultur, die unter 9,8 mM  $[Ca^{2+}]$  für 48 h differenziert wurde und anschließend bei gleicher  $[Ca^{2+}]$  für 24 h stimuliert wurde. Dargestellt ist eine Doppelfärbung von anti-CLDN-1/Cy3 (rot) und anti-INV/Alexa Fluor 488 (grün), Zellkernfärbung mit DAPI (blau). (a) stellt die Kontrollgruppe dar (b) zellulären Stress mittels 0,1 mM  $H_2O_2$  und (c) neben  $H_2O_2$  zusätzlich eine nPKC $\theta$ -Hemmung mittels 10  $\mu$ M PKC $\theta$ -PI. Sichtbar ist eine Differenzierung der HaCaT-Zellen mit INV-Nachweis in allen Gruppen, bei (a) und (b) neben zytoplasmatisch auch perizellulär, sowie CLDN-1 in allen Zellen. In allen Bildern sind zusätzlich Anschnitte von weniger differenzierten Zellen abgebildet, mit zytoplasmatischer CLDN-1 Verteilung. Bei Inhibition der nPKC $\theta$  (c) beispielhaft geringerer Übergang von INV und CLDN-1 vom Perinukleärraum an die Zellmembran. Balken: 20  $\mu$ m. Abkürzungen:  $[Ca^{2+}]$ = Calciumkonzentration, CLDN-1= Claudin-1, INV= Involucrin, nPKC $\theta$ = neue Protein kinase C theta, nPKC $\theta$ -PI= nPKC $\theta$ -Pseudosubstrat-Inhibitor.

# 4 Diskussion

## 4.1 Diskussion der Ergebnisse

Das Konzept dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob und wie psychosozialer Stress zu lokalen Reaktionen in der Haut führen kann und wie sich dies auf die Barrierefunktion auswirkt. Außerdem sollte untersucht werden ob eine allergische Inflammation das System der Haut, deren Barriere und die verschiedenen Regulations- und Reaktionsebenen verändern kann und welche Mediatoren, insbesondere von den NT das NGF und BDNF, dabei eine Rolle spielen.

Wir konnten zeigen, dass die Beziehungen zwischen Stress und einer lokalen Reaktion in der Haut komplex und nicht-trivialer Natur sind. Wir konnten zudem zeigen, dass solche Veränderungen auf mehreren Ebenen stattfinden und lokal bis hin zur zellulären Ebene nachweisbar sind. An lokalen Reaktionen konnten wir durch Stress eine Umverteilung und veränderte Genexpression von TJ-Markern und des nAChR- $\alpha 7$  nachweisen. Bei der allergischen Inflammation, der AID, stellten wir sowohl morphologische als auch funktionelle Veränderungen fest, die eine epidermale Differenzierungsstörung, TJ-Verteilungs- und Bildungsstörung und eine funktionelle Barriestörung beinhalten. Diese Veränderungen waren zum Teil sensibel auf Stressoren und deren Modulation, konkret der NT NGF und BDNF. Für darin potenziell involvierte regulatorische Wege haben wir Hinweise. Hierfür untersuchten wir die Rolle des nAChR- $\alpha 7$  in der nikotinergen Stressvermittlung und konnten zeigen, dass der nAChR- $\alpha 7$ , in Kombination mit BDNF, die Trophik der Haut beeinflussen kann. Wir konnten auch zeigen, dass darunter die Genexpression der TJ-Marker nur marginal beeinflusst wurde. Es werden jedoch weitere Studien zur Evaluation der funktionellen Hautbarriere unter BDNF und in Abhängigkeit vom nAChR- $\alpha 7$  notwendig sein, insbesondere zur Übertragbarkeit auf den Menschen. Einen Ansatz für weitere *in-vitro* Untersuchungen von lokalen Stressmediatoren auf die TJ haben wir zudem aufgezeigt.

Es folgt eine detaillierte Analyse der Ergebnisse, mit Beantwortung der im Abschnitt 1.2 gestellten Fragen.

### 4.1.1 Inflammationsassoziierte Differenzierungsstörung unter allergischer Hautentzündung, Rolle von zusätzlichem Stress und Neurotrophen

Bei der allergisch entzündeten Maushaut beobachteten wir eine epidermale Hyperplasie, mit Persistieren basaler Zytokeratine in den suprabasalen Zellschichten. Zusätzlicher Stress zur Inflammation verstärkte die epidermale Hyperplasie (s. Abb. 6), eine begleitende epidermale Dickenzunahme ist dabei bekannt [542]. Die Hyperplasie als Zeichen einer Differenzierungsstörung kann „geregelt“ vonstattengehen, mit erhaltener epidermaler Ordnung (s. Abb. 22c im Anhang) [30], oder dysreguliert mit teils völliger Destruktion der Epidermis (s. Abb. 22d im Anhang), am ehesten einer abortiven epidermalen Hyperplasie entsprechend. Die epidermale Differenzierungsstörung, teils auch die abortive Hyperplasie, wurden mutmaßlich durch Stresseinfluss verstärkt. Über eine zugrunde liegende mögliche

immunologische Ursache wurde bereits publiziert [583]. Zusätzlicher Stress zu AID bewirkte eine verminderte Bildung von IL-10 und dem IL-10-Rezeptor, mit zeitgleicher Zunahme des IL-1-Rezeptors. Die Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  war zwar vermindert, allerdings nicht die Neubildung der TNF-Rezeptoren (TNFR) -1 und -5. Die Ergebnisse sind vereinbar mit einer insgesamt Zunahme der proinflammatorischen Zytokinwirkung durch Stress bei AID. Eine erhöhte Sensibilität für IL-1 $\beta$  über den IL-1-Rezeptor und erhaltene Wirkung des TNF- $\alpha$  über den TNFR-1 passen zur weiteren Störung der epidermalen Differenzierung und zu vermehrtem KC-Zelltod [41; 278; 355].

Von den untersuchten NT ist NGF als funktioneller epithelialer „Wachstumsfaktor“ beschrieben [127; 438; 547]. Erwartungsgemäß bewirkt NGF unter Inflammation eine vermehrte Proliferation von KC im AID-Mausmodell, worüber bereits publiziert wurde [542]. Unter Inflammationsbedingungen hatte sich eine gesteigerte Expression des NGF-Rezeptors TrkA gezeigt, gesteuert durch TH<sub>2</sub>-Zytokine [448]. Akustischer Stress mit und ohne Inflammation hatte zu einer verstärkten Immunlokalisation von NGF in der Haut geführt [542]. Betrachten wir die immunologische Situation in Abhängigkeit von NGF, so hatte die Antagonisierung von NGF bei AID<sup>+</sup> keinen Einfluss auf die IL-4 und IL-5-Neubildung, führte aber zur Reduktion der Eosinophilenzahl [542; 583] sowie zum Anstieg von IL-10-Rezeptor aber auch TNFR1-Bildung [583]. Passend dazu führte die Antagonisierung von NGF unter AID und Stress zum tendenziellen Rückgang der epidermalen Differenzierungsstörung (s. Abb. 6), sowie zur Abnahme der cutanen NGF- und TrkA-Immunlokalisation, mit begleitender Reduktion der epidermalen Hypertrophie [542].

BDNF ist in Zusammenhang mit psychischem und körperlichem Stress vielfach beschrieben (s. Kapitel 1.1.5.1.3), jedoch auch mit dem Hinweis, dass es auch vor negativen Effekten von Stress schützen könnte [442; 450; 586]. In unserem Versuch war die BDNF-Neubildung in der gesamten Haut unter Stress nicht relevant verändert (s. Tabelle 13 im Anhang). In atopisch entzündeter und nicht-läsionaler AD-Haut, sowie in Zellen des lokalen Immun- und Nervensystems wurde BDNF jedoch vermehrt nachgewiesen [276; 284; 544; 584], was zu einer weiteren Triggerung der Inflammation führte [559; 562]. Eine BDNF-bedingte Immunmodulation mit TH<sub>2</sub>-Wichtung der Inflammation ist unter anderem durch eine selektive Immunsuppression TH<sub>1</sub>-typischer Zellen erklärbar [57; 319; 503]. Stress führt bei Patienten mit AD und anderen atopischen Erkrankungen auch mutmaßlich zu höheren BDNF-Konzentrationen im Blutstrom [338; 358]. Eine Stress-assoziierte Hochregulation des BDNF, lokal wie systemisch, mit eher schädigendem Effekt auf die Haut ist somit anzunehmen.

Die Antagonisierung von BDNF führte in unserem Versuch zu nur marginaler Veränderung in der Trophik und Differenzierungsstörung der Haut (s. Abb. 6 und Abb. 7), wobei bekannt ist, dass BDNF bei Mäusen die Trophik der Epidermis beeinflussen kann [79]. Eine unter Inflammation und bei Mäusen geringere Wirkung als „Epithelotrophin“ ist in unserem Versuch anzunehmen. Aufgrund der unterschiedlichen Rezeptorausstattung bleibt jedoch die Auswirkung von BDNF auf die Differenzierung humaner Epidermis, mit und ohne allergische Inflammation, noch zu zeigen.

#### 4.1.2 Die Wirkung von Stress auf die TJ und deren Funktion ist abhängig von einer AID-Inflammation. Sind Neurotrophine dabei “The good, the bad or the ugly”?

Unsere Ergebnisse zeigen, dass systemischer Stress zu einer Mobilität und Umverteilung der TJ-Marker CLDN-1 und ZO-1 führte, wobei vor allem auf die zelluläre CLDN-1-Lokalisation der inflammatorische Kontext einen gegenteiligen Effekt hatte.

Die Lokalisation von CLDN-1 und ZO-1 unter Kontrollbedingungen entsprachen dabei den bekannten Verteilungsmustern [92; 93; 371; 372; 658]. Die Immunlokalisation von OcI wurde wegen methodischer Schwierigkeiten nicht untersucht. Unter Stress-Einwirkung kam es zur Zunahme der CLDN-1- und ZO-1-Konzentration im oberen SG, sowie einer Betonung beider Moleküle an der Zellmembran. Auch war CLDN-1 in einzelnen Zellkernen des SG zu finden (s. Abb. 21 im Anhang). Über den Phosphorylierungsgrad und somit die Funktionalität der CLDN-1-TJ war jedoch keine spezifische Aussage möglich. Statt einer dichteren Barriere durch die TJ-Umverteilung war die Hautbarriere tendenziell eher weniger dicht. Dies passt zu Ergebnissen anderer Gruppen, wo dieser Effekt nAChR- $\alpha 7$ -vermittelt beobachtet wurde [154]. Je nach Stress-Art ist auch beim Menschen ein gleichbleibender, tendenziell oder auch signifikant zunehmender Wasserverlust über die Haut festzustellen [17; 234; 426]. Möglicherweise hängt die resultierende Barrierefunktion der Haut von der Schwere und Dauer des Stressors ab – und von den daraus resultierenden proinflammatorischen Zytokinen. Ein akuter, heftiger Stress könnte zur Stärkung der Barriere führen, ein prolongierter Stressor, beispielsweise über Aktivierung der TNF- $\alpha$ -Achse [685], zur Schwächung der Barriere. Ebenso kann die Verteilung der TJ-Marker neben einem direkten Stress-Effekt auch eine Reaktion auf die Barriestörung sein. Solch ein „Wiederherstellungsversuch“ könnte mit einer Kinase-vermittelten gesteigerten TJ-Aktivierung und -Nutzung vereinbar sein [261; 307; 444; 461].

In der murinen Haut ging die allergische Inflammation der AID-Gruppe einher mit Veränderungen der TJ-Marker (s. Abb. 8 - Abb. 10), sowie mit einer manifesten Barriestörung (s. Abb. 12). Die bei einer Inflammation gestörte Hautbarriere ist für die AD bekannt [362; 725]. Ebenso ist eine verminderte CLDN-1-Konzentration, wie wir sie in der AID im SG festgestellt haben (Abb. 8 und Abb. 10), bei der AD im SG und in tieferen Zellschichten bereits beschrieben [54; 56; 205; 279]. Diese Reduktion von CLDN-1 kann unter anderem TH<sub>2</sub>-zytokinbedingt sein [50; 662], was jedoch den Kontext eines dysregulierten lokalen Systems erfordert [54]. Eine Reduktion von CLDN-1 ist *in-vitro* bereits in der Lage, eine Inflammation auszulösen [56], als potenzieller Feedback-Mechanismus aus Barriestörung und Inflammation. Eine begleitende verminderte ZO-1-Konzentration im SG bei AID ging mit einer Verteilung von ZO-1 über mehrere Zellschichten einher. Unsere Ergebnisse stehen damit im Gegensatz zu anderen Mausmodellen [327], decken sich aber mit Berichten zur AD beim Menschen [724; 730] und beim Hund [364], was eine Reduktion der CLDN-1-Lokalisation an die Zellmembran aggravieren oder sogar herbeiführen könnte.

Zusätzlicher Stress zu AID führte zur weiteren CLDN-1-Abnahme im SG und SB (s. Abb. 8 und Abb. 10), ohne bei der Barrierefunktion eine signifikante zusätzliche Störung zu erzeugen (s. Abb. 12). ZO-1 war, trotz einer Reduktion im SB, im SG umverteilt in die oberen

Zellschichten (s. Abb. 9 und Abb. 10). Dies könnte Zeichen einer optimierten Funktionalität der verbleibenden TJ sein, beispielsweise vermittelt über bisher nicht untersuchte Signalkaskaden [261] oder über Nutzung alternativer Claudine [91; 221; 683], um einen weiteren Barriereverlust zu kompensieren.

Bei Untersuchung der Rolle der Neurotrophine auf die Stress- und Inflammationsbedingte Umverteilung der TJ-Marker, führte die Antagonisierung von NGF zur geringeren Störung in der ZO-1-Verteilung und -Immunaktivität in der gesamten Epidermis (s. Abb. 9, Abb. 10), ohne die von CLDN-1 relevant zu bessern (s. Abb. 8, Abb. 10), bei unverändert gestörter Barrierefunktion (s. Abb. 12). Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass die Expression von IL-1 $\beta$  und IL-1-Rezeptor 1 unter aNGF anstiegen [583], was sich auf die TJ-Bildung und -Funktion in vielen Geweben negativ auswirken kann [16; 149; 175]. Die Antagonisierung von BDNF führte in unserem Versuch trotz anhaltender Differenzierungsstörung (s. Abb. 6 und Abb. 7) zu einer gebesserten CLDN-1-Verteilung (s. Abb. 8), einer tendenziell zunehmenden Immunlokalisation im SG (s. Abb. 10) sowie zu einer Besserung der Barrierefunktion (s. Abb. 12). BDNF wirkt unter Stress und Inflammation somit nicht protektiv sondern schädigend auf die lokale Homöostase, was an der bekannt gesteigerten Haut- und Rezeptorkonzentration unter atopischer Inflammation, mit potenziell inflammationsverstärkender Funktion, hängen könnte [559; 584]. Stress zusätzlich zu allergischer Inflammation könnte die Dysregulation des BDNF-Systems weiter verstärken. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es sich beim Menschen um keinen rein epidermalen Prozess handelt, sondern das gesamte System der Haut involviert ist, da KC keinen funktionalen TrkB exprimieren und der p75NTR nur im SB exprimiert wird [675].

Auch nicht-läsionale AD-Haut zeigt eine dysregulierte Differenzierung [647] mit Barriestörung [68; 362] und einer veränderten Expression von CLDN-1, sowohl beim Menschen als auch in murinen Modellen [48; 54; 279]. Passend hierzu konnte in der nicht-läsionalen Haut unseres *in-vivo* Versuches eine gestörte CLDN-1-Verteilung festgestellt werden (Abb. 23 im Anhang), was für ZO-1 nicht so eindrücklich war (Abb. 24). Systemischer Stress hatte in nicht-läsionaler AID-Haut aber nicht den Effekt auf CLDN-1 wie in gesunder Haut. Es ist somit davon auszugehen, dass durch eine „statische immunologische Dysregulation“ auch bei AID Stress-Mediatoren unterschiedlich wirken, abhängig von lokalen Inflammationsbedingungen.

Zusammengefasst ist der Effekt von NT auf die Barrierefunktion und TJ-Verteilung abhängig von der Inflammationssituation. Während NGF sich vor allem auf die Trophik auswirkt und somit auch das ZO-1 beeinflusst, spielt BDNF unter Inflammationsbedingungen vor allem eine Rolle für CLDN-1 und dessen Funktion. Eine weiterhin gestörte Verteilung von CLDN-1 in nicht-läsionaler AID<sup>+</sup>-Haut, auch unter Antagonisierung von NGF oder BDNF (s. Abb. 23 im Anhang), unterstreicht aber, dass weitaus komplexere Mechanismen die TJ regulieren.

Zum Verständnis der stress- und immunbedingten Veränderung der Hautbarriere als Treiber einer Inflammation wären in Zukunft neben der Exploration der TH<sub>2</sub>-typischen Zytokine und Zellen auch die TH<sub>17</sub>- und TH<sub>22</sub>-Achse von Interesse, da diese sich auch auf die TJ-Marker auswirken [730] und in der Pathogenese der AD und ihrer Barriestörung eine Rolle spielen

[288; 423]. Passend hierzu konnten bereits Erfolge mit einer anti-IL-22-Antikörpertherapie bei schwerer AD erzielt werden [286].

#### **4.1.3 Regulatorische Genexpression führt zur Abnahme von TJ-Markern unter Stress und Inflammation, CLDN-1 dabei auch abhängig von BDNF**

Während ein System (z.B. eine Zelle oder ein Gewebe) sich im Gleichgewicht befindet, kann über die spezifische Genexpression eine Aussage über die relative Menge des hierdurch kodierten Proteins gemacht werden [101]. Nach Phasenübergang eines Systems folgt die Anpassung der Proteinkonzentration erst nachträglich, durch Anpassung der zugehörigen Genexpression [421]. Bei Betrachtung der Immunlokalisation von Proteinen sehen wir somit die kurzfristigen Änderungen des Systems, während die mRNA-Analyse mittelfristige Veränderungen darstellt. Diese beiden Regulationsebenen werden in dieser Arbeit daher gesondert aufgeführt.

Die mittels qPCR dargestellte TJ-Expression zeigte unter Stressbedingungen eine signifikante Abnahme der CLDN-1 mRNA, was im Gegensatz zur „akuten“ Stressreaktion mit Zunahme der CLDN-1-Aktivität steht. Die allergische Inflammation führte zu einer signifikanten Abnahme der mRNA aller 3 TJ-Marker, wie bei CLDN-1 und ZO-1 auch auf Proteinebene im SG festgestellt wurde und wie in anderen Mausmodellen bereits gezeigt wurde [488]. Auch in Läsionen einer Hapten-induzierten Dermatitis wurde eine Reduktion der mRNA von CLDN-1 und Ocl bereits beschrieben [721]. Während unter reinen Stressbedingungen noch Kompensationsmechanismen bestanden, scheint unter AID eine manifeste, stabile Dysregulation des Systems eingetreten zu sein, mit konkordanter Verminderung der TJ-Marker auf Protein- und Genexpressionsniveau. Zusätzlicher Stress zu Inflammation verstärkte bei uns die mRNA-Abnahme, passend zu den Proteinveränderungen. Die weitere Aggravation in der Expression der TJ-Marker mag an der stressbedingten Zunahme der Differenzierungsstörung mit verzögerter Reifung der KC liegen, da eine NGF-Ausschaltung mit Besserung der Differenzierung auch zur Zunahme der mRNA aller 3 TJ-Marker in der Haut führte (s. Abb. 11). Die CLDN-1-Neubildung scheint hierbei wiederum auch mit der Wirkung von BDNF auf die lokalen Systeme assoziiert zu sein, da eine Antagonisierung von BDNF zur Zunahme der CLDN-1-mRNA führte (s. Abb. 11). Ein Grund könnte sein, dass es unter aBDNF zu keiner Zunahme der CLDN-1-supprimierenden IL-1 $\beta$ -Achse kam wie unter aNGF [583], sicherlich sind jedoch weitere lokale Faktoren beteiligt. Alleine die Zunahme der CLDN-1-mRNA könnte dabei potenziell die gebesserte Barrierefunktion und Inflammation beeinflussen [56]. Nicht zuletzt können auch andere TJ-tragenden Strukturen der Haut die mRNA-Veränderungen beeinflussen, wie beispielsweise Haarfollikel [90].

#### **4.1.4 Der nAChR- $\alpha$ 7 als potenzieller Stressmediator, abhängig von allergischer Inflammation und Neurotrophinen**

Eine potente Modulation der cutanen Inflammation, die zu einer Barriestörung, Umverteilung und verminderter Neubildung von CLDN-1 führen kann, ist über das NNCS

möglich. Insbesondere der nAChR- $\alpha 7$  hat antiinflammatorische Eigenschaften und Einfluss auf viele Stellglieder des Immunsystems (s. 1.1.5.2.3).

Eine akute Stressreaktion ging im Mausmodell mit einer Erhöhung von ACh in der Haut einher [563], in unserem Versuch nahm zusätzlich die nAChR- $\alpha 7$ -Konzentration in einzelnen Zellen des SG zu (s. Abb. 13). Gleichermaßen stieg die mRNA von nAChR- $\alpha 7$  und die des Liganden SLURP-1 in der murinen Vollhaut an [583]. Hierdurch könnte ein homöostatischer antiinflammatorischer und barriestabilisierender Effekt entstehen, aber auch Stress in das SG vermittelt werden. Bei seiner Auswirkung auf die TJ wurde der nAChR- $\alpha 7$  bereits als potenziell schützend beschrieben [147], wurde aber auch für eine durch prolongierten Stress induzierte Barriestörung verantwortlich gemacht [154], mit zeitabhängigem biphasischen Effekt.

Bei der atopischen Inflammation liegt eine Dysregulation des cutanen cholinergen Systems vor (s. Kapitel 1.1.6.2). Zusätzlicher Stress in unserem AID-Modell führte in der Haut zur Zunahme der ACh-Konzentration, sowie zur Zunahme muskarinerger Rezeptoren [583], was einen proinflammatorischen Effekt unterstützen könnte. Zeitgleich konnte aber auch eine Zunahme der mRNA des nAChR- $\alpha 7$  beobachtet werden. Eine Antagonisierung von NGF bewirkte einen Rückgang der zuvor gesteigerten mRNA des M<sub>3</sub>-AChR, aber auch der mRNA des nAChR- $\alpha 7$  [583]. Die Zunahme an SLURP-1-mRNA mit folgender vermehrter Verfügbarkeit könnte hierbei über Modulation der verbleibenden nAChR- $\alpha 7$  den Rückgang der Inflammation unterstützen, was sich mit der beobachteten gebesserten epidermalen Differenzierung vereinbaren lässt. Die Antagonisierung von BDNF führte unter AID- und Stress-Bedingungen zur Besserung der zuvor pathologisch erhöhten ACh-Konzentration [583], was zur Stabilisierung des Systems führen könnte und mit der gebesserten Barrierefunktion vereinbar ist.

Der nAChR- $\alpha 7$  scheint somit an Stressachsen in der Epidermis beteiligt zu sein, als Stressmediator oder homöostatischer Faktor. Um dieser These nachzugehen, wurde die Wirkung von nAChR- $\alpha 7$  und BDNF auf die TJ *ex-vivo* weiter getestet. Unter Kontrollbedingungen schien der nAChR- $\alpha 7$  dabei wichtig für die geregelte Differenzierung zu sein (s. Abb. 15), mit bereits beschriebener Retentionshyperkeratose unter KO-Bedingungen [154] und tendenziell vermehrter Apoptose, wahrscheinlich durch verminderte schützende Regulatoren [34]. Diese Fehlregulation scheint unter BDNF-Wirkung tendenziell gebessert (s. Abb. 15 und Abb. 16), was möglicherweise über andere ACh-Rezeptoren vermittelt sein könnte, die unter  $\alpha 7$ -KO-Bedingungen bereits kompensatorisch verändert sind um die terminale Differenzierung zu ermöglichen [33].

BDNF als vorbeschriebenes „Epithelotrophin“ muriner Haut führte in der Wildtyp-Maushaut zu einer mild veränderten Differenzierung (s. Abb. 15 und Abb. 16). Betrachten wir zusätzlich die TJ-Expression, so fand passend dazu unter BDNF-Einfluss auch eine tendenzielle Zunahme der CLDN-1- und ZO-1-mRNA statt. Nikotinerger Stress führte bei zeitgleicher BDNF-Einwirkung zu einer potenziell nAChR- $\alpha 7$ -abhängigen Hypertrophie und Differenzierungsstörung der Epidermis. Dies könnte Folge einer Barriestörung sein. Eine

prolongierte Aktivierung der nAChR- $\alpha 7$  kann im normalen cutanen System zu einer epidermalen Barriestörung führen [154]. BDNF könnte im Sinne eines „Two-Hit“-Modells die Barriestörung im dysregulierten System aggravieren und somit die Differenzierung weiter stören. Aufgrund der methodischen Schwierigkeiten ist in unserem Versuch aber keine Aussage zur Integrität der resultierenden epidermalen Barriere möglich, hier werden weitere Studien nötig sein, auch zur Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen.

Eine tendenziell weiter zunehmende mRNA aller 3 TJ-Marker unter Nikotin- und BDNF-Einfluss (s. Abb. 17) war unabhängig vom nAChR- $\alpha 7$ . Dies lässt vermuten, dass der nAChR- $\alpha 7$  zwar potenziell die Barrierefunktion, aber nicht die mittelfristige Regulation der TJ-mRNA-Expression beeinflusst. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte jedoch berücksichtigt werden, dass bereits unter Kontrollbedingungen gestörte TJ-Verteilung vorlag (s. Abb. 25 im Anhang), im Sinne eines kulturbedingten epidermalen Stresses. Ein Wegfall der Innervierung und des neurocutanen Einflusses könnte dabei ebenso eine Rolle spielen. Zusätzlich könnten Wundheilungsprozesse der Biopsieränder eine proinflammatorische Auswirkung auf das cutane System gehabt haben, was den Einfluss von BDNF modulieren könnte.

Zusammengefasst könnte der nAChR- $\alpha 7$ , obwohl als Homöostasefaktor bekannt, bei lokaler Inflammation oder prolongierter Aktivität eine Rolle in der lokalen Dysregulation der epidermalen Differenzierung und Barriere spielen, potenziell aggraviert durch BDNF.

#### **4.1.5 Transkriptom zeigt unter akustischem Stress mehrere Muster an Veränderungen in Richtung der TJ**

Da für die beobachteten Veränderungen an den TJ lokale regulatorische Faktoren zu erwarten sind, wurden mögliche Vermittler der Stressreaktion in der Haut untersucht. Um das regulatorische Bild zu vervollständigen, analysierten wir das Transkriptom der Haut nach 24 h akustischem Stress und verglichen die Veränderungen der exprimierten Gene mit Proteinen und Enzymen, bei denen ein Einfluss auf TJ oder die Barrierefunktion in verschiedenen Geweben bekannt ist. Die Analyse dient der Hypothesenfindung und bietet einen Ansatz für weitere Studien.

Von Kinasen und Phosphatasen, die sich auf die Integrität der TJ und deren Verteilung und Expression auswirken können, war eine Reduktion der nPKC $\epsilon$ -mRNA auf ca. 36 % am relevantesten. Diese Kinase ist im Darmepithel an zytoskeletalen Veränderungen und der Aktivierung von Claudin-TJ beteiligt [39; 40], dabei ist sie an Plasmamembranen mit TJ assoziiert zu finden [189]. Die nPKC $\epsilon$  kann in allergischen Reaktionen wichtig für eine T-Zell-Aktivierung sein [20], eine TH $_2$ -T-Zell-Antwort vermitteln aber auch zur vermehrten Bildung von T $_{reg}$  führen [430]. Die Verbindung von TJ mit atopischer Inflammation und Stress wäre demnach hierüber denkbar. Eine Reduktion des Enzymes könnte die nach verlängertem Stress auftretende Barriestörung ebenso mit erklären.

Zusätzlich lag eine 2,8-fache Steigerung der MAP-Kinase 7 (MAPK-7, auch ERK5 genannt) vor, die durch Stress- und Wachstumsfaktoren aktiviert wird und sich auf KC-Proliferation, -Mobilität und Wundheilung auswirken kann [32; 112; 261]. Im Hinblick auf die TJ

ist eine durch die MAPK-7 bedingte Translokation von ZO-1 und Occludin bekannt [590], sodass auch hier ein Einfluss auf die Barrierefunktion möglich ist. Von den getesteten Binde- und Interaktionspartnern der TJ war das  $\alpha$ 1-Actinin, das einen Einfluss auf die Stabilität von KC und Haut hat [292], am prominentesten gesteigert. Die Expression anderer Faktoren wie  $\alpha$ -Catenin, Connexin 43 oder E-Cadherin waren mit einem SLR unter  $\pm 1$  deutlich weniger verändert und scheinen somit weniger Kandidaten der mittelfristigen Stressvermittlung zu sein.

Bei den Zytokinen und Zytokinrezeptoren fanden wir eine gesteigerte mRNA-Expression der TNFR5-(CD40)-mRNA, sowie eine Reduktion von TNFR1 und IL-13-Rezeptor- $\alpha$ 1. Diese Ergebnisse wurden bereits als mögliche Bahnung einer TH<sub>2</sub>-Immunantwort interpretiert [581], die über eine nikotinerge Aktivierung erfolgt sein könnte [6]. Auf Ebene der KC stellt diese Konstellation einen möglichen Schutzversuch dar. Im Darm-Modell war eine geringere IL-13-Wirkung [689] und eine Reduktion der TNFR1-vermittelten TJ-Störung [185] mit einer Verbesserung der Barriere verbunden.

Wir könnten die Ergebnisse des „Crosstalks“ in der Haut unter Stress, zusammen mit den beobachteten morphologischen und funktionellen Veränderungen, wie folgt interpretieren: Auf einer Seite steht eine Auslenkung pro Barriestörung, mit einer verminderten TJ-Bildung und Dysregulation funktioneller Kinasen. Auf der anderen Seite stehen mögliche stabilisierende Veränderungen, unter anderem der Zytokinrezeptoren, bei denen das nikotinerge System eine Rolle spielen kann.

#### **4.1.6 Ausblicke in künftige Methoden für die Frage nach „Bystander oder Mittelsmann“ – Stress, nPKC $\theta$ und Tight Junctions im Zellmodell**

Neben den bekannten Stressachsen (s. Kapitel 1.1.5), die sich direkt auf die KC in der Epidermis auswirken können, ist für einige Mediatoren wie das BDNF der Signalweg zu den KC des SG noch unbekannt. Die stressbedingte Aktivierung von Kinasen-Systemen könnte wesentlich für die Veränderung in der Lokalisation und Funktionalität der TJ sein. Hierfür wurde ein Zellmodell etabliert, um beispielhaft einen Kinasen-Einfluss zu demonstrieren und Ansatz für künftige Studien zu geben.

Um den direkten Effekt einer Inhibition der nPKC $\theta$  auf KC zu untersuchen, blockierten wir sie an HaCaT-Zellen während der Differenzierung und Bildung von TJ. Anhand der INV- und CLDN-1-Expression waren nach 72 h Kultur unter hoher (9,8 mM) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> HaCaT mit einem differenzierten Phänotyp [84] zu finden. Funktionell entsprechen die HaCaT mit teils zytoplasmatischem, teils perizellulärem INV- und CLDN-1-Färbemuster am ehesten KC im oberen SS bzw. unteren SG [191]. Unter oxidativem Stress mit 0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war der Transport von INV und CLDN-1 Richtung Zellmembran beschleunigt, was neben einer gesteigerten Differenzierung auch einer kompensatorischen zellulären Stressreaktion entsprechen könnte. Eine Studie mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress konnte nach 6 h eine Abnahme und nach 48 h eine Zunahme der CLDN-1 Konzentration an den HaCaT-Zellgrenzen verzeichnen [444]. Mit den TJ-Veränderungen ging dabei eine Abnahme des transepidermalen Widerstandes und eine Zunahme von parazellulärem LY-Influx einher, die sich nach 48 h wieder normalisierte und von

CLDN-1 und dessen Phosphorylierung abhängig war. Diese CLDN-1-Phosphorylierung konnte durch unselektive Aktivierung von PKCs oder Inhibition der Protein-Phosphatase 2A unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress erhalten werden, ebenso die Dichtigkeit der Barriere nach 6 h [444]. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Blockade der nPKC $\theta$  die Wiederherstellung der TJ nach einer Störung durch oxidativen Stress verzögert, was auch mit Ergebnissen mit Ocl an Caco-2-Zellen korreliert [39].

Mittels unserer Methodik könnten somit weitere Untersuchungen zur Stressmediation am Zellmodell erfolgen um den Einfluss auf TJ zu testen, die nPKC $\theta$  könnte hierfür ein attraktiver Kandidat sein. Auch wäre die Kombination mit TH<sub>2</sub>-Zytokinen zur Modulation einer gestörten inflammatorischen Umgebung von Interesse [363], was Licht auf die frühe inflammatorische Situation bei AD werfen könnte.

## 4.2 Stärken und Schwächen der Studie

Ein Aspekt dieser interdisziplinären Arbeit war, die Auswirkung von Stress auf die Haut bis hinunter auf molekulare Ebene zu untersuchen. Alleine die modernen immunologischen Erkenntnisse sind jedoch viel zu umfassend und unterliegen einer rapiden Entwicklung, so dass eine umfassende Darstellung und Analyse der zugehörigen immunologischen Situation nicht zielführend wäre. Wir haben uns entsprechend auf ein paar wesentliche Teilaspekte konzentriert und versucht, diese mit möglichst einfachen Mitteln zu ergründen. Funktionelle Gesichtspunkte dienten dabei als Grundlage und Orientierungspunkte. Dafür haben wir Einschränkungen in der Aussagekraft und methodisch-technische Schwierigkeiten bewusst in Kauf genommen.

### 4.2.1 Tiere und Proben

Wir wählten für unsere primäre Fragestellung einen murinen *in-vivo* Versuch, um den ausgeübten Stress zu standardisieren und so die spezifische Auswirkung auf eine allergisch entzündete Haut zu untersuchen, was am Menschen in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Durch die Wahl der „subchronischen“ Stressdauer sollten anteilig beide Effekte dargestellt werden: Die Auswirkung eines akuten Stressors auf die Proteinebene und die beginnende Dysregulation der Genexpression unter chronischem Stress. Für die Modulation der NT entschieden wir uns zur Antagonisierung mittels spezifischer AK und nicht zur siRNA, um die primär extrazelluläre Wirkungsweise als Mediator zu unterbinden, ohne die intrazelluläre Funktion allzu sehr zu beeinträchtigen. Die Dosis wurde so gewählt, dass das Risiko der Neurotoxizität gering gehalten wurde. BDNF- oder NGF-KO-Mausmodelle werden mit schweren neurologischen Defiziten geboren oder sind nicht überlebensfähig [151; 203], entsprechend ungeeignet für unsere Fragestellung, ebenso wenig wie Modelle mit phänotypischem Knockout [588], die Verhaltensauffälligkeiten zeigen.

Viele Erkenntnisse zur Immunologie der Haut stammen aus Versuchen mit Mäusen [459]. Dennoch liegen einige Unterschiede in der cutanen Immunreaktion zwischen Menschen und Mäusen vor [305; 315]. Da Labormäuse überwiegend unter pathogenfreien Bedingungen

gehalten werden (SPF) und in eher jungem Alter untersucht werden, besitzen sie mehr naive T-Zellen und DETC in ihrer Haut [459], im Gegensatz zu Mäusen aus konventionellem Tierhandel und entsprechendem Antigenkontakt, mit deutlich mehr  $\alpha\beta$ -T-Zellen und  $T_{MC}$  [58]. Es wurde postuliert, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen als „primitiver“ Teil der adaptiven Immunantwort mit zunehmender Reifung der Haut durch spezifischere  $\alpha\beta$ -T-Zellen ersetzt werden, die cutane Immunantwort von Labormäusen sei eher ähnlich der eines menschlichen Neugeborenen [315], was grundsätzlich bei Interpretation muriner Versuche zur Haut berücksichtigt werden sollte.

#### **4.2.2 Fixier- und Antigendemaskierungs-Verfahren**

Die Gewebefixierung für die IHC erfolgte mit Aceton oder mit einer Mischung aus Paraformaldehyd und Pikrinsäure, was jeweils zur Zerstörungen von Epitopen für AK führen kann [707]. Die Erstellung der Formaldehyd-Lsg aus Paraformaldehyd fixiert möglicherweise schonender [606]. Ein Hinzufügen von Pikrinsäure bessert das Fixationsergebnis und kann helfen Zellmembranen zu stabilisieren [194]. Andere Verfahren nutzen Essigsäure-basierte Agenzien, die teilweise keine Quervernetzungen bilden, was jedoch andere Nachteile mit sich bringt [472]. Um die Epitope der Primär-AK wieder herzustellen war eine Antigendemaskierung notwendig. Das Verfahren mit Citratpuffer war für die empfindlichen Gefrierschnitte nicht geeignet. Für widerstandsfähigere Paraffinschnitte kann es jedoch ein mögliches Verfahren sein. SDS führte letztendlich zu zufriedenstellenden Ergebnissen.

#### **4.2.3 Untersuchte Marker**

Wir wählten die Immunlokalisation der epidermalen Marker mittels IHC, um so Aussagen über die Verteilung im Gewebe und in den Zellen der Epidermis zu treffen. Über die Messung der Färbeintensität konnten wir zudem semiquantitative Aussagen über die Proteinkonzentration treffen, was über Western Blot in der Zellschicht-Spezifität nicht möglich gewesen wäre. Für alle 3 TJ-Marker nutzten wir polyklonale AK, um eine effektivere Färbung trotz der potenziell veränderten Tertiärstruktur der Proteine zu ermöglichen. Bei CLDN-1 konnten wir, am ehesten durch die SDS- und Triton-X-Behandlung, ein Anfärben auch im Zellkern darstellen (s. Abb. 21 im Anhang). Im Gegensatz dazu blieb eine anti-phospho-CLDN-1-Färbung ohne Erfolg. Auch bei Ocl-Färbungen in der IHC sind unspezifische Färbungen häufig [92]. Bei komparativen Untersuchungen sollten entsprechend möglichst AK derselben Charge verwendet werden. Dieses Ziel der Vergleichbarkeit führte auch dazu, dass wir eine Doppelfärbung mit Primär-AK aus der gleichen Herkunftspezies etablierten. Das Verfahren, offene Stellen des ersten Primär-AK mit unkonjugiertem FAB-Fragment zu blockieren, stellte sich für unsere Fragestellung als zufriedenstellend heraus (s. Abb. 21 im Anhang). Je nach Fragestellung könnte auch der erste Primär-AK über ein unkonjugiertes FAB-Fragment auf eine andere Spezies „umgelabelt“ werden [331].

Da für die Intensitätsmessungen Bilder von mit identischen Schnitt- und Färbebedingungen genutzt wurden, führten die fixationsbedingen Artefakte zu einer verminderten Anzahl an nutzbaren Proben, was die Aussagekraft reduzierte.

#### **4.2.4 Besonderheiten der Analyse mittels qPCR und Microarray**

Die qPCR- und Microarray-Ergebnisse wurden aus Vollhaut gewonnen, mit optimierter Gewebeerarbeitung, um den Trend des Gesamtsystems darzustellen und um die Ergebnisse in mehrere Projekte im Sinne des Tierschutzes integrieren zu können [542; 581; 583]. Eine sichere Zuordnung der mRNA-Expressionsveränderung zur Epidermis ist nicht möglich. Subtilere Veränderungen, systemische Differenzen zwischen Epidermis und Dermis oder Unterschiede zwischen einzelnen Zellgruppen werden durch diese Probenart vernachlässigt. Für eine differenzierte Untersuchung der Epidermis stehen Methoden zur Schichtauftrennung (wie z.B. Laser-capture Mikrodisektion [532], eine Behandlung mit Ammonium-Thiozyanat [141] oder Thermolysin-Trypsin [669]) zur Verfügung, mit jedoch möglicher Kompromittierung der Signalwege. Neue diagnostische Möglichkeiten eröffnen gezielte Gewebeanalysen mit „spatial Transcriptomics“ [549]. Letztlich werden künftig auch systemtheoretische Netzwerk-Analysen, möglicherweise bis hinunter auf Netzwerke in einzelnen Zellen, zielführend sein [296; 648].

Für das Microarray wurde zudem von 3 Mäusen RNA gepoolt und amplifiziert. Für jedes Gen erfolgte eine Match-Mismatch-Analyse. Die hier verwendeten Ergebnisse zeigten darin eine große Differenz, sodass dieses Gen sehr wahrscheinlich in beiden Gruppen vorhanden war. Über die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen beiden Gruppen wird jedoch keine Aussage getätigt.

#### **4.2.5 Penetrations- und Barrieretests**

Für die Bestimmung des Wasserverlustes über die Haut sind TEWL-Messung als nicht-invasive Methode etabliert und standardisiert [550]. Die Ergebnisse stehen theoretisch für die Funktion der Barriere von innen nach außen und umgekehrt [92]. Ein Anstieg des Wasserverlustes ist ein Hinweis auf eine klinische Barrierestörung, dabei wird jedoch keine Aussage über das Barriereverhalten gegenüber größeren Stoffen getroffen. Die Permeabilität z.B. der Claudin-TJ ist hierfür selektiver [679].

Für die *ex-vivo* Barrieretests wählten wir die Stoffe LY und Sulfo-NHS-Biotin. Beide scheinen jedoch für die murine Haut und eine Probengröße von 3 mm nicht geeignet zu sein. Die Diffusion des negativ geladenen EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin in die Epidermis war sehr gering (s. Abb. 26 im Anhang). Es wurde bereits gezeigt, dass anionische Tracer die BM bei Ratten nur in geringerer Menge passieren [348], wobei die negative Ladung der BM [95] wahrscheinlich zur Passagebehinderung führte. Publikationen zeigen eine nachweisbare Diffusion des gleichen 556 Da großen Biotin-Tracers in die Maus-Epidermis, wobei ein nachvollziehbarer Übertritt in die Epidermis, nach einer dermalen Injektion, nur nach Desmoglein-1-Verdauung sichtbar war [721].

#### **4.2.6 Zellkultur**

Wir wählten die HaCaT-Kultur aufgrund der robusten, langlebigen Zellart und der Tatsache, dass mit entsprechendem Einfluss alle Differenzierungsstufen epidermaler Zellen

entstehen können [84]. Ab einer 1,4 mM  $[Ca^{2+}]_i$  beginnen die Zellen zu differenzieren [83; 84]. Unter der deutlich erhöhten  $[Ca^{2+}]_i$  von 9,8 mM, unterstützt durch einen Serum-Entzug in den letzten 24 h Kultur zur Unterdrückung einer weiteren zellulären Proliferation, war nach 72 h Kulturdauer eine sichtbare Differenzierung der Zellen zu erreichen. Zusätzlich könnte durch eine Absenkung der Kultur-Temperatur noch eine Verbesserung der Differenzierung erreicht werden [70]. Die Stimulation der Zellen oder die Modulation von PKCs scheint an dieser Zellkultur gut möglich. Die Zellernte mittels einer mechanischen Lösung bringt zudem den Vorteil, dass die Zellen in Fragmenten des Verbandes untersucht werden können sowie zusätzlich das umgebende Medium untersucht werden kann. Alternativ wäre ein Wachstum der HaCaT auf OT möglich, mit Erhalt der kompletten Integrität [444].

### 4.3 Bedeutung der Studie

Die Herangehensweise dieser Arbeit war eine Aufteilung von zellulären und interzellulären Interaktionen in Subsysteme, die als funktionelle Einheiten untersucht wurden. Dies ist ein effektives Konzept, um komplexe Systeme zu beobachten und darzustellen [403]. Das Konzept ist dennoch artifiziell, da die Übergänge zwischen den Systemen fließend sind. Diese systemische Betrachtung von Stress und atopischer Inflammation hat uns gezeigt, dass Prozesse, die zwischen der vermeintlichen Ursache der Dysregulation (z.B. psychisches Erleben, Verhalten, Stress-Situation) und einer lokalen Antwort (z.B. Barrierefunktion) vermitteln, verschiedene metabolische, hormonelle und immunologische Komponenten beinhalten, die eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege nutzen, deren individuelle Betrachtung nicht unbedingt zielführend ist und nicht sicher eine belastbare Interpretation zulässt.

Eine Theorie dieser Arbeit ist, dass eine Barriestörung im Körper in der Epidermis Teil einer Auslenkung der „homöostatischen Immunität“ ist [126]. Was den Einfluss von Stress auf die Barriere und TJ angeht, so scheint dieser auf funktioneller Ebene protektiv, auf regulatorischer Ebene aber störend. Die resultierende TJ-Funktion wird demnach geschützt oder gestört, abhängig von der lokalen Inflammationssituation und der „lokalen Resilienz“. Diese lokale Resilienz beinhaltet das NNCS und das NT-System, sowie eine Fülle weiterer Einflussfaktoren.

In einer regulären Reaktion auf einen inflammatorischen Reiz, wie z.B. bei einem eindringenden Pathogen, verstärken TH-gewichtete Immunreaktionen sich selbst, teils durch Hemmung anderer TH-Subgruppen über eine negative Rückkopplung [701]. Wäre diese Immunantwort aber nicht in ein komplexes Netzwerk immunologischer Signalwege eingebunden, käme es durch jede Immunaktivierung zum Überschießen einer spezifischen Antwort. Durch die vielfachen Reaktions- und Rückkopplungs-mechanismen sind immunologische Prozesse niemals linear-eindeutig und somit schwer vorherzusagen [108; 695], ganz entsprechend des Modells der nicht-trivialen Maschine oder der Chaostheorie [155]. Trotz der erschwerten Vorhersagbarkeit scheint eine Inflammationsreaktion, unabhängig von der auslösenden Ursache, distinkten Reaktionschemata zu entsprechen, die teils genomisch nachweisbar sind [417; 618]. Eine immunologische Auslenkung, ist systemisch „gewollt“ und

notwendig, um die Robustheit und Allostasefähigkeit des Organismus sicherzustellen [402; 640]. Durch externe und interne Einflüsse kommt es somit zu Phasenübergängen, mit Folge von teilweise schädigenden, aber stabilen Zuständen. Diese Bildung distinkter stabiler Situationen könnte beispielsweise über Phosphorylierungen an verschiedenen Stellgliedern des Netzwerkes erreicht werden [317]. Dass eine immunologisch erkrankte Haut dabei ein stabiles System bildet, das sogar einwandernde Immunzellen regelrecht „erzieht“, wurde bereits bei Erkrankungen wie dem cutanen Lupus erythematodes gezeigt [62].

Das neurocutane System und die NT sind bei der immunologischen Situation potenziell stabilisierende Faktoren [182] und somit auch mögliche Inflammationstreiber. Die BDNF-Wirkung kann also Teil eines Barriere-Homöostase-Mechanismus sein, dessen Wirkung unter Inflammation eine Phasenumkehr durchläuft – von schützend vor negativen Stress-Effekten zur inflammatorischen Exazerbation. Dies unterliegt möglicherweise dem cholinergen Einfluss. Bei der Übertragung auf den Menschen sollte berücksichtigt werden, dass die individuelle Resilienz sowohl vom Befinden als auch vom Lebenswandel des Einzelnen beeinflusst ist [174], also in ein größeres regulatives Schema eingebettet ist.

## 4.4 Abschließende Ausblicke

Ein Aspekt dieser Arbeit war es, zu zeigen, dass das Verständnis komplexer Reaktionsmuster gelegentlich eine bessere Interpretation ermöglicht, als die lineare Betrachtung einzelner Faktoren. In Bezug auf das Immunsystem kann das Erkennen solcher Muster das Verständnis einer Immunreaktion verbessern. Die Analyse der Bedingungen, die zu einer Phasenumkehr, einem linearen Verhalten oder einem exponentiellen Verlauf führen, kann die Vorhersagbarkeit beispielsweise einer Stressreaktion oder einer chronischen Erkrankung erhöhen.

Die Frage wäre dann, welches die Kriterien und „Benchmarks“ sind, die nicht nur das immunologische „Muster“ festlegen, sondern auch therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen. In der Sepsis-Diagnostik, aber auch bei Autoimmunerkrankungen, sind Reaktions-„Cluster“ des Immunsystems bekannt [220; 601]. Diese Erkenntnisse sind aufgrund ihrer Komplexität nicht selten das Ergebnis von „Machine Learning“ [446] und können dazu dienen, Vorhersagen über Krankheitsverlauf oder Therapieansprechen zu treffen [666; 667]. „Omic“-Analysen mit angeschlossenem Machine Learning können genutzt werden, um weitere immunologische Reaktionsmuster aufzudecken [138; 176], und zwar auf verschiedenen regulatorischen Ebenen. Im Falle der AD gibt es Ansätze, wie über eine Ermittlung der Reaktions-Subtypen oder der individuellen Reaktionsmuster eine Vorhersagen über den weiteren Verlauf der Erkrankung oder ein Therapieansprechen möglich sein könnte [211]. Somit bieten diese Konzepte einen Ansatz für eine personalisierte Medizin [662]. Entsprechend dieser Arbeit wären NT, das NNCS, deren Interaktion und die genutzten Signalwege Kandidaten, die in einem solchen Konzept eine Rolle spielen könnten.

Interventionen, deren Ziel es ist, die adaptive Funktion des Immunsystems zu verbessern und Fehlfunktionen der Immunantwort zu korrigieren, sind potenzielle

therapeutische Herangehensweisen für Autoimmunerkrankungen [479]. Einige Verfahren versuchen bereits die „Neubahnung“ eines inflammatorischen Gleichgewichtes [241]. Nicht zuletzt kann die immunologische Mustererkennung zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze führen [526; 717] sowie die Vorhersage von Arzneimittelreaktionen verbessern [337]. Über die Analyse der dynamischen Interaktionen komplexer Informationssysteme des Körpers schafft es die Forschung möglicherweise, in Zukunft gelegentlich den Deckel der „Black Box“ anzuheben, um einen detaillierten Blick auf die zugrunde liegenden Mechanismen zu werfen.

## 5 Schlussfolgerung

Wir konnten zeigen, dass systemischer oder zellulärer Stress einen Einfluss auf die Menge, Bildung oder Verteilung von TJ-Markern besitzt. Im Falle der atopischen Inflammation lag eine TJ-Dysregulation und -Funktionsstörung vor, die auch jenseits der inflammatorischen Läsionen persistierte und auf eine regulatorische Störung des cutanen Systems hinweist. Durch zusätzlichen Stress wurde die TJ-Fehlverteilung aggraviert, wobei Hinweise für kompensatorische Mechanismen auf die TJ-Funktion bestehen. Durch die Ausschaltung des NT NGF konnte die Inflammation reduziert und ein Teil der TJ-Beeinträchtigung unter AID und Stress behoben werden. Die CLDN-1-Störung und konsekutiv die Barrierefunktion konnten durch eine Antagonisierung von BDNF gebessert werden. Inflammation und Barrierefunktion scheinen somit teilweise unabhängig reguliert zu sein, wobei NT hierbei eine Rolle spielen. Vermittelt und verstärkt wird die Wirkung der NT potenziell durch das cholinerge System in der Haut, wobei der Einfluss des nAChR- $\alpha 7$  auf die TJ-Funktionalität unklar bleibt. Ein Teil der Stresswirkung in der Epidermis wird möglicherweise durch die nPKC $\epsilon$  und ihre Signalwege vermittelt, die sich in ein Cluster cutaner Stressreaktionen einreihet. Die Aufdeckung solcher Reaktionscluster und der Einfluss von NT auf die stressbedingte Dysregulation bei einer inflammatorischen Barriestörung, wie im Rahmen der AD, könnte Ansätze für eine personalisierte Therapie in der Zukunft bieten.

## 6 Zusammenfassung

Die Haut des Menschen stellt eine schützende Barriere zur Umwelt dar. Für die Hautfunktion ist neben der autonomen Kontrolle der Homöostase auch die Konnektivität wichtig. Durch die Integration der Haut in systemische Kommunikationswege werden Auswirkungen von psychosozialen Stress in die Haut übermittelt und bewirken eine Vielzahl von Effekten. Ziel dieser Arbeit war es, zu zeigen, dass systemischer Stress sich auf die TJ auswirkt, die relevante Teile der Barrierefunktion übernehmen. Außerdem sollte der Einfluss von Stress bei einer bereits gestörten Barrierefunktion im Rahmen einer atopischen Hautinflammation untersucht werden. Die unterschiedlichen Regulationsebenen sollten dabei analysiert werden, sowie der Einfluss der NT NGF und BDNF. Zusätzlich sollte die Involvierung des nAChR- $\alpha 7$  vom NNCS der Haut beleuchtet werden. Hierfür nutzten wir ein etabliertes murines Modell mit AID, akustischem Stress und NT-Modulation mittels neutralisierender AK. Wir untersuchten die Immunlokalisation der TJ-Marker CLDN-1 und ZO-1, sowie die TJ-mRNA-Expression. Die Funktion des nAChR- $\alpha 7$  und dessen Einfluss in Kombination mit BDNF auf die Hauttrophik und TJ-Marker wurde *ex-vivo* dargestellt. Die Stressreaktion der Haut wurde über Analyse des Transkriptoms untersucht und resultierende Erkenntnisse beispielhaft an HaCaT-Zellen vertieft.

Wir konnten zeigen, dass akustischer Stress sich auf die Verteilung und Expression der TJ-Marker auswirkt. Unter AID-Inflammation lag eine TJ-Dysfunktion mit einer klinischen Barriereförderung vor, wobei zusätzlicher Stress die Situation zu aggravieren schien. Die stressbedingt verstärkte Differenzierungsstörung konnte durch aNGF gebessert werden, während sich unter aBDNF die CLDN-1-Ausprägung und Barrierefunktion anteilig erholte. Die Störung der epidermalen Differenzierung involvierte potenziell das NNCS, insbesondere den nAChR- $\alpha 7$ . Ob dieser sich auf die Barrierefunktion auswirkt, ist jedoch noch unklar und müsste weiter untersucht werden.

Bei der Stressvermittlung in die Haut sind anhand der Transkriptom-Analyse mehrere Vermittlungsachsen beteiligt, die individuell unterschiedlich betroffen sein können. Die abschließende HaCaT-Kultur zeigte die nPKC $\epsilon$  als einen potenziellen Kandidaten auf, der zwischen Stress und TJ-Funktion vermittelt.

Eine systemtheoretische Analyse der Stressreaktions-Muster und die daraus resultierende Immunmodulation und ihr Einfluss auf die Barrierefunktion könnte in Zukunft genutzt werden, um eine personalisierte Medizin zu ermöglichen.

## 7 Summary

The skin serves as a protective barrier, guarding the organism against the environment. It is broadly connected to the regulatory systems of the body. These communication and stress axes are essential regulatory factors for the skin's homeostasis. Of equal importance is the autonomic function of the skin to cope with internal and external stressors. Here, we hypothesized that stress can disrupt the skin's barrier function with consequences for inflammatory diseases like AD and that NT and the NNCS play a role in this process. We assessed epidermal structure and expression of the closure proteins, the TJ, in healthy mice and in mice with AID exposed to noise stress, following established protocols. Stressed AID mice were treated with BDNF- or NGF-neutralizing antibodies. In addition, skin organ cultures of WT and CHRNA7-KO mice were treated with BDNF with and without nicotine to address the function of the NNCS and the nAChR- $\alpha 7$ . For the pathway analysis from perceived stress to TJ function, we performed a microarray analysis of the transcriptome. With an exemplary HaCaT cell culture, we demonstrated a possible future analysis method for stress mediators on TJ markers.

By immunofluorescence and qPCR, we found disturbed TJ expression patterns in mice exposed to noise stress. AID was characterized by epidermal hyperplasia and altered TJ markers, in combination with a functionally disturbed skin barrier. When AID mice were exposed to noise stress, the AID related TJ dysregulation was enhanced. Treatment with NGF neutralizing antibodies partially reversed the disturbed differentiation, whereas BDNF antagonization partially rescued the CLDN-1 and barrier properties. Organ cultured skin revealed that the NNCS, while under additional BDNF stress, can promote differentiation disturbance via the nAChR- $\alpha 7$ . The involvement of the nAChR- $\alpha 7$  in the skin's barrier function under BDNF remains to be investigated. Regarding the different axes that can promote stress to the skin's TJ, we found a cluster of activated pathways. HaCaT cell culture indicates that the nPKC $\epsilon$  may play a bridging role to the TJ of the skin.

A systems biology approach can contribute to understanding the skin's immune system. The detection of different stress clusters with associated skin barrier changes can reveal insights about the underlying mechanisms and help stratificate individuals for a personalized treatment.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>: Calcium-Konzentration; **aBDNF**: anti-BDNF-Antikörper; **Abb**: Abbildung; **ACh**: Acetylcholin; **AChE**: Acetylcholinesterase; **ACTH**: Adrenocortikotropes Hormon; **AD**: atopische Dermatitis; **AJ** –Adherens Junctions; **AK**: Antikörper; **AID**: atopic Dermatitis-like allergic Dermatitis; **AID\***: AID mit zusätzlicher Stresseinwirkung; **Alum**: Aluminiumhydroxid; **AMP**: antimikrobiell wirksame Peptide; **aNGF**: anti-NGF-Antikörper; **APC**: Antigenpräsentierende Zellen; **BF-T**: Brown-Forsythe Test; **BM**: Basalmembran; **cdNA**: Komplementäre DNA; **cGRP**: Calcitonin gene-related peptide; **ChAT**: Cholinazetyltransferase; **CHRNA**: cholinergic receptor nicotinic alpha subunit; **CI**: Konfidenzintervall; **CLDN-1**: Claudin-1; **C<sub>T</sub>**: Cycle threshold, Schwellenwert-Zyklus; **DAPI**: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; **DC**: dendritische Zellen; **DDP**: deep dermal Plexus; **DEPC**: Diethylidicarbonat; **DETC**: dendritische epidermale T-Zellen; **DMEM**: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; **DTT**: Dithiothreitol; **EDTA**: Ethylendiamintetraessigsäure; **FBS**: fetal bovine Serum, fetales Kälberserum; **FITC**: Fluorescein Isothiocyanat; **FLG**: Filaggrin; **HHN**: Hypothalamus- Hypophysen-Nebennieren-Achse; **HOK**: Hautorgankultur; **IFN**: Interferon; **IHC**: Immunhistochemie; **IL**: Interleukin; **ILC**: natürliche lymphoide Zellen/ innate lymphoid cells; **INV**: Involucrin; **K14**: Keratin 14; **KC**: Keratinozyt; **KO**: Knock-out; **KW-T**: Kruskal-Wallis-Test; **LANA**: Fixierlösung aus Pikrinsäure und Paraformaldehyd; **LB**: Lamellarkörperchen; **LC**: Langerhanszellen; **Lsg**: Lösung; **LY**: Lucifer Yellow; **mAChR**: muskarinerge Acetylcholin Rezeptoren; **MAPK**: MAP-Kinase; **mF**: mikroskopische Felder; **MHC**: major Histokompatibilitäts-Komplex; **MWU**: Mann-Whitney-U-Test; **nAChR**: nikotinerge Acetylcholin Rezeptoren; **NaCl**: Natriumchlorid; **NaOH**: Natriumhydroxid; **NHS**: N-Hydroxysulfosuccinimide; **NNCS**: nicht-neuronales cholinerges System; **NS**: Normalserum; **nPKC**: neue PKC; **NT**: Neurotrophine; **Ocl**: Occludin; **OT**: Objektträger; **OVA**: Ovalbumin; **PBS**: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, phosphate-buffered saline; **PCR**: Polymerasen Kettenreaktion; **PKC**: Proteinkinase C; **PKC<sub>ε</sub>-PI**: PKC<sub>ε</sub>-Pseudosubstrat-Inhibitor; **qPCR**: Real-Time detection PCR; **rF**: relative Luftfeuchtigkeit; **ROI**: Region of interest; **RT**: Raumtemperatur; **SB**: Stratum basale; **SEP**: subepidermaler Plexus; **SLR**: signal log ratio; **SLURP**: secreted mammalian Ly-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related proteins; **SPF**: specific pathogen free; **SS**: Stratum spinosum; **TBP**: TATA-Bindeprotein; **TBS**: Tris-gepufferte Kochsalzlösung/ tris-buffered saline; **TBS-T**: Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,03 % Triton®-X100; **TCR**: T-Zell-Rezeptor; **TdT**: Deoxynucleotidyltransferase; **TEWL**: transepidermal water loss; **TJ**: tight Junctions; **T<sub>MC</sub>**: T-Gedächtniszellen; **TNF**: Tumor-Nekrosefaktor; **TNFR**: Tumor necrosis Factor Rezeptor; **T<sub>reg</sub>**: T-regulatorische Zellen; **Trk**: Tyrosin Kinase; **TUNEL**: deoxynucleotidyltransferase mediated dUTP nick-end labelling; **ZNS**: zentrales Nervensystem; **ZO-1**: Zonula occludens-Protein-1; **β-ME**: β-Mercaptoethanol

# 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Haut.....	4
Abb. 2: Schematische Zeichnung einer trivialen und nicht-trivialen Maschine .....	18
Abb. 3: Adaptive Immunantwort der Haut und Differenzierung von Lymphozyten.....	26
Abb. 4: Graphische Darstellung des <i>in-vivo</i> Versuchsaufbaus .....	48
Abb. 5: Antikörper und indirekte immunhistochemische Färbemethoden.....	55
Abb. 6: Gestörte epidermale Differenzierung unter AID, NGF-abhängig durch Stress verschlimmert.....	64
Abb. 7: Differenzierungsstörung unter Inflammationsbedingungen und Stress, ohne signifikante Veränderung durch Modulation der Neurotrophine NGF und BDNF .....	65
Abb. 8: Akustischer Stress, Inflammation und BDNF veränderten zelluläre CLDN-1 Verteilung .....	66
Abb. 9: Einfluss von akustischem Stress auf ZO-1 abhängig von AID-Inflammation und von NGF.....	67
Abb. 10: Färbintensität bestätigte gestörte Verteilung der TJ-Moleküle unter Stress und Inflammation.....	68
Abb. 11: AID sowie zusätzlicher akustischer Stress verminderte TJ-Expression auf genetischer Ebene, NGF beeinflusste dabei alle TJ-Marker, BDNF nur CLDN-1 .....	69
Abb. 12: Klinische Barrierestörung unter AID und akustischem Stress, anteilig abhängig von BDNF.....	70
Abb. 13: Umverteilung der nAChR- $\alpha$ 7-Expression in muriner Haut unter akustischem Stress	71
Abb. 14: Akustischer Stress steigerte die Expression von nAChR- $\alpha$ 7 .....	71
Abb. 15: Der nikotinerge $\alpha$ 7-Acetylcholinrezeptor vermittelte Differenzierungsstörung unter BDNF-Einwirkung.....	72
Abb. 16: Zunahme der epidermale Dicke unter nAChR- $\alpha$ 7 und BDNF-Einfluss, bei uneinheitlicher Proliferation und Apoptose.....	74
Abb. 17: Zunahme der mRNA-Expression von ZO-1, tendenziell auch Claudin-1 unter BDNF-Einfluss und nikotinerem Stress, unabhängig des nAChR- $\alpha$ 7 .....	75
Abb. 18: Vermehrte Differenzierung von HaCaT-Zellen durch Anhebung der Calciumkonzentration.....	77
Abb. 19: Kultusbeispiel wie zellulärer Stress mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , teils nPKC $\theta$ -Abhängig, CLDN-1-Lokalisation an die Zellmembran beschleunigte .....	77

Abb. 20: Methodikentwicklung für immunhistochemische Färbung mit Primärantikörpern aus gleicher Herkunftspezies .....	LV
Abb. 21: Kolo-kalisation von Claudin-1 und ZO-1 unter Kontrollbedingungen und Stress .....	LVI
Abb. 22: Epidermale Inflammation, assoziierte Hyperplasie und deren Dysregulation .....	LVII
Abb. 23: Claudin-1 in nicht-läsionaler muriner Rücken-haut bei allergischer Inflammation ...	LVIII
Abb. 24: ZO-1-Verteilung in nicht-läsionaler Haut bei allergischer Inflammation .....	LVIII
Abb. 25: Kompromittierte TJ-Verteilungen unter Organkultur-Bedingungen .....	LIX
Abb. 26: Biotin-Diffusionsversuch an muriner Hautorgankultur .....	LIX

# 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: $\alpha\beta$ -Effektor-T-Zellen und ihre Funktion .....	9
Tabelle 2: Liste der verwendeten Laborinstrumente .....	39
Tabelle 3: Auflistung aller Labormaterialien .....	40
Tabelle 4: Verwendete Kits .....	42
Tabelle 5: Liste aller Verbrauchsmaterialien .....	42
Tabelle 6: Zusammensetzung von Lösungen und Puffern.....	44
Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen.....	45
Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer und Sonden der Polymerasen-Kettenreaktion .....	46
Tabelle 9: Färbeprotokoll für Doppelfärbung mit Primärantikörpern aus gleicher Herkunftspezies.....	56
Tabelle 10: Doppelfärbung mit Primärantikörper aus gleicher Herkunftspezies und FAB- Blockade des 1. Primärantikörpers .....	57
Tabelle 11: Thermocycler-Profil der qPCRs.....	61
Tabelle 12: Auswahl der veränderten Genexpression in muriner Haut durch 24 h akustischen Stress. ....	76
Tabelle 13: Auswahl aus der Transkriptomveränderung in muriner Rückenhaut durch akustischen Stress im Vergleich zu Kontrollbedingungen .....	LX

# 11 Literaturverzeichnis

1. Abdallah, F., Mijouin, L., Pichon, C., 2017. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators of inflammation* 2017. doi: 10.1155/2017/5095293.
2. Aberg, K.M., Radek, K.A., Choi, E.-H., Kim, D.-K., Demerjian, M., Hupe, M., Kerbleski, J., Gallo, R.L., Ganz, T., Mauro, T., Feingold, K.R., Elias, P.M., 2007. Psychological stress downregulates epidermal antimicrobial peptide expression and increases severity of cutaneous infections in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3339–3349. doi: 10.1172/JCI31726.
3. Abhishek, S., Palamadai Krishnan, S., 2016. Epidermal Differentiation Complex: A Review on Its Epigenetic Regulation and Potential Drug Targets. *Cell Journal (Yakhteh)* 18, 1–6. doi: 10.22074/cellj.2016.3980.
4. Agarwal, S.K., Marshall, G.D., 2001. Stress effects on immunity and its application to clinical immunology. *Clin Exp Allergy* 31, 25–31. doi: 10.1111/j.1365-2222.2001.01005.x.
5. Ahn, B.K., Jeong, S.K., Lee, S.H., 2007. Role of PKC-delta as a signal mediator in epidermal barrier homeostasis. *Arch Dermatol Res* 299, 53–57. doi: 10.1007/s00403-007-0738-9.
6. Aicher, A., Heeschen, C., Mohaupt, M., Cooke, J.P., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2003. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions. *Circulation* 107, 604–611. doi: 10.1161/01.cir.0000047279.42427.6d.
7. Aida Maranduca, M., Liliana Hurjui, L., Constantin Branisteanu, D., Nicolae Serban, D., Elena Branisteanu, D., Dima, N., Lacramioara Serban, I., 2020. Skin - a vast organ with immunological function (Review). *Experimental and therapeutic medicine* 20, 18–23. doi: 10.3892/etm.2020.8619.
8. Akat, E., Yenmiş, M., Pombal, M.A., Molist, P., Megías, M., Arman, S., Veselý, M., Anderson, R., Ayaz, D., 2022. Comparison of vertebrate skin structure at class level: A review. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 305, 3543–3608. doi: 10.1002/ar.24908.
9. Albanesi, C., Scarponi, C., Sebastiani, S., Cavani, A., Federici, M., Sozzani, S., Girolomoni, G., 2001. A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases. *Journal of Leukocyte Biology* 70, 617–623. doi: 10.1189/jlb.70.4.617.
10. Alexopoulos, A., Chrousos, G.P., 2016. Stress-related skin disorders. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 17, 295–304. doi: 10.1007/s11154-016-9367-y.
11. Alleva, E., Santucci, D., 2001. Psychosocial vs. “physical” stress situations in rodents and humans. *Physiol Behav* 73, 313–320. doi: 10.1016/S0031-9384(01)00498-X.
12. Alleva, E., Francia, N., 2009. Psychiatric vulnerability: suggestions from animal models and role of neurotrophins. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 33, 525–536. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.09.004.
13. Aloe, L., Alleva, E., Böhm, A., Levi-Montalcini, R., 1986. Aggressive behavior induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6184–6187. doi: 10.1073/pnas.83.16.6184.
14. Aloe, L., Bracci-Laudiero, L., Alleva, E., Lambiase, A., Micera, A., Tirassa, P., 1994. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10440–10444. doi: 10.1073/pnas.91.22.10440.

15. Aloe, L., Alleva, E., Fiore, M., 2002. Stress and nerve growth factor: findings in animal models and humans. *Pharmacol Biochem Behav* 73, 159–166. doi: 10.1016/s0091-3057(02)00757-8.
16. Al-Sadi, R., Ye, D., Said, H.M., Ma, T.Y., 2011. Cellular and molecular mechanism of interleukin-1 $\beta$  modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *Journal of cellular and molecular medicine* 15, 970–982. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01065.x.
17. Altemus, M., Rao, B., Dhabhar, F.S., Ding, W., Granstein, R.D., 2001. Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. *J Invest Dermatol* 117, 309–317. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01373.x.
18. Anand, P., 1995. Nerve growth factor regulates nociception in human health and disease. *British journal of anaesthesia* 75, 201–208. doi: 10.1093/bja/75.2.201.
19. Anderson, J.M., van Itallie, C.M., 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a002584. doi: 10.1101/cshperspect.a002584.
20. Anderson, K., Fitzgerald, M., Dupont, M., Wang, T., Paz, N., Dorsch, M., Healy, A., Xu, Y., Ocaín, T., Schopf, L., Jaffee, B., Picarella, D., 2006. Mice deficient in PKC  $\theta$  demonstrate impaired in vivo T cell activation and protection from T cell-mediated inflammatory diseases. *Autoimmunity* 39, 469–478. doi: 10.1080/08916930600907954.
21. Angeli, D., Ferrell, J.E., Sontag, E.D., 2004. Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 1822–1827. doi: 10.1073/pnas.0308265100.
22. Ansel, K.M., Djuretic, I., Tanasa, B., Rao, A., 2006. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annual review of immunology* 24, 607–656. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115821.
23. Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Stadecker, M.J., Gause, W.C., 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature reviews. Immunology* 7, 975–987. doi: 10.1038/nri2199.
24. Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.M.C., Finlay, B.B., 2010. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 156, 2271–2282. doi: 10.1099/mic.0.038794-0.
25. Aon, M.A., Lloyd, D., Saks, V., 2013. From Physiology, Genomes, Systems, and Self-Organization to Systems Biology: The Historical Roots of a Twenty-First Century Approach to Complexity. In: Aon, M.A., Saks, V., Schlattner, U. (Eds.) *Systems Biology of Metabolic and Signaling Networks. Energy, Mass and Information Transfer*, vol. 16. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 3–17. doi: 10.1007/978-3-642-38505-6\_1.
26. Aon, M.A., 2014. Complex Systems Biology of Networks: The Riddle and the Challenge. In: *Systems Biology of Metabolic and Signaling Networks*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 19–35. doi: 10.1007/978-3-642-38505-6\_2.
27. Aono, S., Hirai, Y., 2008. Phosphorylation of claudin-4 is required for tight junction formation in a human keratinocyte cell line. *Exp Cell Res* 314, 3326–3339. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.08.012.
28. Arck, P., Paus, R., 2006. From the brain-skin connection: the neuroendocrine-immune misalliance of stress and itch. *Neuroimmunomodulation* 13, 347–356. doi: 10.1159/000104863.
29. Arck, P.C., Slominski, A., Theoharides, T.C., Peters, E.M.J., Paus, R., 2006. Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. *J Invest Dermatol* 126, 1697–1704. doi: 10.1038/sj.jid.5700104.

30. Argyris, T.S., 1981. The regulation of epidermal hyperplastic growth. *Critical reviews in toxicology* 9, 151–200. doi: 10.3109/10408448109059564.
31. Arndt, J., Smith, N., Tausk, F., 2008. Stress and atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 8, 312–317. doi: 10.1007/s11882-008-0050-6.
32. Arnoux, V., Nassour, M., L'Helgoualc'h, A., Hipskind, R.A., Savagner, P., 2008. Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Mol Biol Cell* 19, 4738–4749. doi: 10.1091/mbc.E07-10-1078.
33. Arredondo, J., Nguyen, V.T., Chernyavsky, A.I., Bercovich, D., Orr-Urtreger, A., Kummer, W., Lips, K., Vetter, D.E., Grando, S.A., 2002. Central role of alpha7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium. *J Cell Biol* 159, 325–336. doi: 10.1083/jcb.200206096.
34. Arredondo, J., Nguyen, V.T., Chernyavsky, A.I., Bercovich, D., Orr-Urtreger, A., Vetter, D.E., Grando, S.A., 2003. Functional role of alpha7 nicotinic receptor in physiological control of cutaneous homeostasis. *Life Sci* 72, 2063–2067. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00084-5.
35. Avitsur, R., Stark, J.L., Sheridan, J.F., 2001. Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. *Hormones and behavior* 39, 247–257. doi: 10.1006/hbeh.2001.1653.
36. Baek, J.H., Lee, S.E., Choi, K.J., Choi, E.H., Lee, S.H., 2013. Acute modulations in stratum corneum permeability barrier function affect claudin expression and epidermal tight junction function via changes of epidermal calcium gradient. *Yonsei medical journal* 54, 523–528. doi: 10.3349/ymj.2013.54.2.523.
37. Balda, M.S., Matter, K., 2009. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1788, 761–767. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.11.024.
38. Bal, V., McIndoe, A., Denton, G., Hudson, D., Lombardi, G., Lamb, J., Lechler, R., 1990. Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. *European journal of immunology* 20, 1893–1897. doi: 10.1002/eji.1830200904.
39. Banan, A., Zhang, L.J., Shaikh, M., Fields, J.Z., Farhadi, A., Keshavarzian, A., 2004. Theta-isoform of PKC is required for alterations in cytoskeletal dynamics and barrier permeability in intestinal epithelium: a novel function for PKC-theta. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C218-34. doi: 10.1152/ajpcell.00575.2003.
40. Banan, A., Zhang, L.J., Shaikh, M., Fields, J.Z., Choudhary, S., Forsyth, C.B., Farhadi, A., Keshavarzian, A., 2005.  $\theta$  Isoform of Protein Kinase C Alters Barrier Function in Intestinal Epithelium through Modulation of Distinct Claudin Isotypes: A Novel Mechanism for Regulation of Permeability. *J Pharmacol Exp Ther* 313, 962–982. doi: 10.1124/jpet.104.083428.
41. Banno, T., Gazel, A., Blumenberg, M., 2004. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem* 279, 32633–32642. doi: 10.1074/jbc.M400642200.
42. Bao, L., Alexander, J.B., Zhang, H., Shen, K., Chan, L.S., 2016. Interleukin-4 Downregulation of Involucrin Expression in Human Epidermal Keratinocytes Involves Stat6 Sequestration of the Coactivator CREB-Binding Protein. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 36, 374–381. doi: 10.1089/jir.2015.0056.
43. Bao, L., Mohan, G.C., Alexander, J.B., Doo, C., Shen, K., Bao, J., Chan, L.S., 2017. A molecular mechanism for IL-4 suppression of loricrin transcription in epidermal keratinocytes: Implication for atopic dermatitis pathogenesis. *Innate immunity* 23, 641–647. doi: 10.1177/1753425917732823.

44. Baquero, F., Saralegui, C., Marcos-Mencía, D., Ballestero, L., Vañó-Galván, S., Moreno-Arrones, Ó.M., Del Campo, R., 2021. Epidermis as a Platform for Bacterial Transmission. *Front. Immunol.* 12, 774018. doi: 10.3389/fimmu.2021.774018.
45. Barilla, S., Felix, K., Jorizzo, J.L., 2017. Stressors in Atopic Dermatitis. *Advances in experimental medicine and biology* 1027, 71–77. doi: 10.1007/978-3-319-64804-0\_7.
46. Baroni, A., Buommino, E., Gregorio, V. de, Ruocco, E., Ruocco, V., Wolf, R., 2012. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol* 30, 257–262. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.08.007.
47. Barrett, C.L., Herring, C.D., Reed, J.L., Palsson, B.O., 2005. The global transcriptional regulatory network for metabolism in *Escherichia coli* exhibits few dominant functional states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 19103–19108. doi: 10.1073/pnas.0505231102.
48. Bäsler, K., Brandner, J.M., 2017. Tight junctions in skin inflammation. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 469, 3–14. doi: 10.1007/s00424-016-1903-9.
49. Basso, L., Serhan, N., Tauber, M., Gaudenzio, N., 2019. Peripheral neurons: Master regulators of skin and mucosal immune response. *Eur. J. Immunol.* 49, 1984–1997. doi: 10.1002/eji.201848027.
50. Batista, D I S, Perez, L., Orfali, R.L., Zaniboni, M.C., Samorano, L.P., Pereira, N.V., Sotto, M.N., Ishizaki, A.S., Oliveira, L M S, Sato, M.N., Aoki, V., 2014. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* doi: 10.1111/jdv.12753.
51. Becskei, A., Séraphin, B., Serrano, L., 2001. Positive feedback in eukaryotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion. *The EMBO journal* 20, 2528–2535. doi: 10.1093/emboj/20.10.2528.
52. Begliuomini, S., Lenzi, E., Ninni, F., Casarosa, E., Merlini, S., Pluchino, N., Valentino, V., Luisi, S., Luisi, M., Genazzani, A.R., 2008. Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm. *Journal of Endocrinology* 197, 429–435. doi: 10.1677/JOE-07-0376.
53. Belkaid, Y., Tamoutounour, S., 2016. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nature reviews. Immunology* 16, 353–366. doi: 10.1038/nri.2016.48.
54. Benedetto, A. de, Rafaels, N.M., McGirt, L.Y., Ivanov, A.I., Georas, S.N., Cheadle, C., Berger, A.E., Zhang, K., Vidyasagar, S., Yoshida, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L.C., Hanifin, J.M., Gallo, R.L., Novak, N., Weidinger, S., Beaty, T.H., Leung, D.Y.M., Barnes, K.C., Beck, L.A., 2011. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 127, 773. doi: 10.1016/j.jaci.2010.10.018.
55. Benoist, C., Mathis, D., 2012. Treg cells, life history, and diversity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a007021. doi: 10.1101/cshperspect.a007021.
56. Bergmann, S., Buenau, B. von, Vidal-Y-Sy, S., Haftek, M., Wladykowski, E., Houdek, P., Lezius, S., Duplan, H., Bäsler, K., Dähnhardt-Pfeiffer, S., Gorzelanny, C., Schneider, S.W., Rodriguez, E., Stölzl, D., Weidinger, S., Brandner, J.M., 2020. Claudin-1 decrease impacts epidermal barrier function in atopic dermatitis lesions dose-dependently. *Scientific reports* 10, 2024. doi: 10.1038/s41598-020-58718-9.
57. Besser, M., Wank, R., 1999. Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J Immunol* 162, 6303–6306. doi: 10.4049/jimmunol.162.11.6303.

58. Beura, L.K., Hamilton, S.E., Bi, K., Schenkel, J.M., Odumade, O.A., Casey, K.A., Thompson, E.A., Fraser, K.A., Rosato, P.C., Filali-Mouhim, A., Sekaly, R.P., Jenkins, M.K., Vezys, V., Haining, W.N., Jameson, S.C., Masopust, D., 2016. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature* 532, 512–516. doi: 10.1038/nature17655.
59. Bieber, T., D'Erme, A.M., Akdis, C.A., Traidl-Hoffmann, C., Lauener, R., Schäppi, G., Schmid-Grendelmeier, P., 2017. Clinical phenotypes and endophenotypes of atopic dermatitis: Where are we, and where should we go? *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, S58-S64. doi: 10.1016/j.jaci.2017.01.008.
60. Bikle, D.D., Pillai, S., 1993. Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation. *Endocrine reviews* 14, 3–19. doi: 10.1210/edrv-14-1-3.
61. Bikle, D.D., Xie, Z., Tu, C.-L., 2012. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert review of endocrinology & metabolism* 7, 461–472. doi: 10.1586/eem.12.34.
62. Billi, A.C., Ma, F., Plazyo, O., Gharaee-Kermani, M., Wasikowski, R., Hile, G.A., Xing, X., Yee, C.M., Rizvi, S.M., Maz, M.P., Berthier, C.C., Wen, F., Tsoi, L.C., Pellegrini, M., Modlin, R.L., Gudjonsson, J.E., Kahlenberg, J.M., 2022. Nonlesional lupus skin contributes to inflammatory education of myeloid cells and primes for cutaneous inflammation. *Science translational medicine* 14, eabn2263. doi: 10.1126/scitranslmed.abn2263.
63. Bin, L., Kim, B.E., Brauweiler, A., Goleva, E., Streib, J., Ji, Y., Schlievert, P.M., Leung, D.Y.M., 2012. *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin modulates skin host response to viral infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 130, 683-691.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2012.06.019.
64. Bitschar, K., Wolz, C., Krismer, B., Peschel, A., Schitteck, B., 2017. Keratinocytes as sensors and central players in the immune defense against *Staphylococcus aureus* in the skin. *Journal of Dermatological Science* 87, 215–220. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.06.003.
65. Blais, M., Lévesque, P., Bellenfant, S., Berthod, F., 2013. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and glial-derived neurotrophic factor enhance angiogenesis in a tissue-engineered in vitro model. *Tissue engineering. Part A* 19, 1655–1664. doi: 10.1089/ten.tea.2012.0745.
66. Bonefeld, C.M., Geisler, C., 2016. The role of innate lymphoid cells in healthy and inflamed skin. *Immunology letters* 179, 25–28. doi: 10.1016/j.imlet.2016.01.005.
67. Bonini, S., Rasi, G., Bracci-Laudiero, M.L., Procoli, A., Aloe, L., 2003. Nerve growth factor: Neurotrophin or cytokine? *Int Arch Allergy Immunol* 131, 80–84. doi: 10.1159/000070922.
68. Boralevi, F., Hubiche, T., Léauté-Labrèze, C., Saubusse, E., Fayon, M., Roul, S., Maurice-Tison, S., Taïeb, A., 2008. Epicutaneous aeroallergen sensitization in atopic dermatitis infants - determining the role of epidermal barrier impairment. *Allergy* 63, 205–210. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01556.x.
69. Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462. doi: 10.1038/35013070.
70. Borowiec, A.-S., Delcourt, P., Dewailly, E., Bidaux, G., 2013. Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control. *PLoS one* 8, e77507. doi: 10.1371/journal.pone.0077507.
71. Bos, J.D., Kapsenberg, M.L., 1986. The skin immune system Its cellular constituents and their interactions. *Immunology Today* 7, 235–240. doi: 10.1016/0167-5699(86)90111-8.

72. Bosko, C.A., 2019. Skin Barrier Insights: From Bricks and Mortar to Molecules and Microbes. *Journal of drugs in dermatology* : JDD 18, s63-67.
73. Bosmans, G., Shimizu Bassi, G., Florens, M., Gonzalez-Dominguez, E., Matteoli, G., Boeckxstaens, G.E., 2017. Cholinergic Modulation of Type 2 Immune Responses. *Frontiers in Immunology* 8, 1873. doi: 10.3389/fimmu.2017.01873.
74. Botchkarev, V.A., Eichmuller, S., Peters, E.M., Pietsch, P., Johansson, O., Maurer, M., Paus, R., 1997. A simple immunofluorescence technique for simultaneous visualization of mast cells and nerve fibers reveals selectivity and hair cycle--dependent changes in mast cell--nerve fiber contacts in murine skin. *Arch Dermatol Res* 289, 292--302. doi: 10.1007/s004030050195.
75. Botchkarev, V.A., Eichmuller, S., Johansson, O., Paus, R., 1997. Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J Comp Neurol* 386, 379--395. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19970929)386:3<379:AID-CNE4>3.0.CO;2-Z.
76. Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Lommatzsch, M., Peters, E.M., Lewin, G.R., Subramaniam, A., Braun, A., Renz, H., Paus, R., 1998. BDNF overexpression induces differential increases among subsets of sympathetic innervation in murine back skin. *Eur J Neurosci* 10, 3276--3283. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00365.x.
77. Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Welker, P., Metz, M., Lewin, G.R., Subramaniam, A., Bulfone-Paus, S., Hagen, E., Braun, A., Lommatzsch, M., Renz, H., Paus, A.R., 1999. A new role for neurotrophins: involvement of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4 in hair cycle control. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, 395--410. doi: 10.1096/fasebj.13.2.395.
78. Botchkarev, V.A., Metz, M., Botchkareva, N.V., Welker, P., Lommatzsch, M., Renz, H., Paus, R., 1999. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 act as "epitheliotrophins" in murine skin 79, 557--572.
79. Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Peters, E.M., Paus, R., 2004. Epithelial growth control by neurotrophins: leads and lessons from the hair follicle. *Prog Brain Res* 146, 493--513. doi: 10.1016/S0079-6123(03)46031-7.
80. Botchkarev, V.A., Yaar, M., Peters, E.M.J., Raychaudhuri, S.P., Botchkareva, N.V., Marconi, A., Raychaudhuri, S.K., Paus, R., Pincelli, C., 2006. Neurotrophins in skin biology and pathology. *J Invest Dermatol* 126, 1719--1727. doi: 10.1038/sj.jid.5700270.
81. Botchkarev, V.A., 2017. The Molecular Revolution in Cutaneous Biology: Chromosomal Territories, Higher-Order Chromatin Remodeling, and the Control of Gene Expression in Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 137, e93-e99. doi: 10.1016/j.jid.2016.04.040.
82. Bothwell, M., 1997. Neurotrophin function in skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2, 27--30. doi: 10.1038/jidsymp.1997.7.
83. Boukamp, P., Tilgen, W., Dzarlieva, R.T., Breitkreutz, D., Haag, D., Riehl, R.K., Bohnert, A., Fusenig, N.E., 1982. Phenotypic and genotypic characteristics of a cell line from a squamous cell carcinoma of human skin. *Journal of the National Cancer Institute* 68, 415--427. doi: 10.1093/jnci/68.3.415.
84. Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E., 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761--771. doi: 10.1083/jcb.106.3.761.
85. Boulais, N., Misery, L., 2008. The epidermis: a sensory tissue. *European journal of dermatology* : EJD 18, 119--127. doi: 10.1684/ejd.2008.0348.

86. Bouwstra, J.A., Graaff, A. de, Gooris, G.S., Nijse, J., Wiechers, J.W., van Aelst, A.C., 2003. Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *J Invest Dermatol* 120, 750–758. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12128.x.
87. Bowden, P.E., Quinlan, R.A., Breitreutz, D., Fusenig, N.E., 1984. Proteolytic modification of acidic and basic keratins during terminal differentiation of mouse and human epidermis. *European journal of biochemistry* 142, 29–36. doi: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08246.x.
88. Bragulla, H.H., Homberger, D.G., 2009. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy* 214, 516–559. doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x.
89. Brandner, J.M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W.W., Moll, I., 2002. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 81, 253–263. doi: 10.1078/0171-9335-00244.
90. Brandner, J.M., McIntyre, M., Kief, S., Wladykowski, E., Moll, I., 2003. Expression and localization of tight junction-associated proteins in human hair follicles. *Arch Dermatol Res* 295, 211–221. doi: 10.1007/s00403-003-0418-3.
91. Brandner, J.M., 2009. Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *Eur J Pharm Biopharm* 72, 289–294. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.08.007.
92. Brandner, J.M., Zorn-Kruppa, M., Yoshida, T., Moll, I., Beck, L.A., Benedetto, A. de, 2015. Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue barriers* 3, e974451. doi: 10.4161/21688370.2014.974451.
93. Brandner, J.M., 2016. Importance of Tight Junctions in Relation to Skin Barrier Function. *Curr Probl Dermatol* 49, 27–37. doi: 10.1159/000441541.
94. Braun, A., Lommatzsch, M., Neuhaus-Steinmetz, U., Quarcoo, D., Glaab, T., McGregor, G.P., Fischer, A., Renz, H., 2004. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to neuronal dysfunction in a model of allergic airway inflammation. *Br J Pharmacol* 141, 431–440. doi: 10.1038/sj.bjp.0705638.
95. Breitreutz, D., Mirancea, N., Nischt, R., 2009. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem Cell Biol* 132, 1–10. doi: 10.1007/s00418-009-0586-0.
96. Brodin, P., Davis, M.M., 2017. Human immune system variation. *Nature reviews. Immunology* 17, 21–29. doi: 10.1038/nri.2016.125.
97. Bronzetti, E., Ciriaco, E., Germanà, G., Vega, J.A., 1995. Immunohistochemical localization of neurotrophin receptor proteins in human skin. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia* 100 Suppl 1, 565–571.
98. Brown, D., Lydon, J., McLaughlin, M., Stuart-Tilley, A., Tyszkowski, R., Alper, S., 1996. Antigen retrieval in cryostat tissue sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS). *Histochem Cell Biol* 105, 261–267. doi: 10.1007/BF01463929.
99. Brunner, P.M., 2019. Early immunologic changes during the onset of atopic dermatitis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 123, 152–157. doi: 10.1016/j.ana.2019.03.033.
100. Brüßow, H., 2016. Turning the inside out: the microbiology of atopic dermatitis. *Environmental microbiology* 18, 2089–2102. doi: 10.1111/1462-2920.13050.

101. Buccitelli, C., Selbach, M., 2020. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature reviews. Genetics* 21, 630–644. doi: 10.1038/s41576-020-0258-4.
102. Bukhari, S., Mertz, A.F., Naik, S., 2019. Eavesdropping on the conversation between immune cells and the skin epithelium. *International Immunology* 31, 415–422. doi: 10.1093/intimm/dxy088.
103. Bullens, D.M.A., Kasran, A., Dilissen, E., Swert, K. de, Coorevits, L., van Snick, J., Ceuppens, J.L., 2011. In vivo maturation of T(H) cells in relation to atopy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 234–237.e7. doi: 10.1016/j.jaci.2011.02.033.
104. Buselli, R., Veltri, A., Baldanzi, S., Marino, R., Bonotti, A., Chiumiento, M., Girardi, M., Pellegrini, L., Guglielmi, G., Dell'Osso, L., Cristaudo, A., 2019. Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and serum cortisol levels in a sample of workers exposed to occupational stress and suffering from Adjustment Disorders. *Brain Behav* 9, e01298. doi: 10.1002/brb3.1298.
105. Buske-Kirschbaum, A., Geiben, A., Hellhammer, D., 2001. Psychobiological aspects of atopic dermatitis: an overview. *Psychother Psychosom* 70, 6–16. doi: 10.1159/000056219.
106. Buske-Kirschbaum, A., Geiben, A., Hollig, H., Morschhauser, E., Hellhammer, D., 2002. Altered responsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic adrenomedullary system to stress in patients with atopic dermatitis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87, 4245–4251. doi: 10.1210/jc.2001-010872.
107. Buske-Kirschbaum, A., Ebrecht, M., Hellhammer, D.H., 2010. Blunted HPA axis responsiveness to stress in atopic patients is associated with the acuity and severeness of allergic inflammation. *Brain Behav Immun* 24, 1347–1353. doi: 10.1016/j.bbi.2010.06.013.
108. Callard, R., George, A.J., Stark, J., 1999. Cytokines, chaos, and complexity. *Immunity* 11, 507–513. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80125-9.
109. Cangkrama, M., Ting, S.B., Darido, C., 2013. Stem cells behind the barrier. *International journal of molecular sciences* 14, 13670–13686. doi: 10.3390/ijms140713670.
110. Cannon, W.B., 1929. *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage*. Appleton, Oxford, England, 404 pp.
111. Cannon, W.B., 1929. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9, 399–431. doi: 10.1152/physrev.1929.9.3.399.
112. Cargnello, M., Roux, P.P., 2011. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 75, 50–83. doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
113. Carter, N.A., Vasconcellos, R., Rosser, E.C., Tulone, C., Muñoz-Suano, A., Kamanaka, M., Ehrenstein, M.R., Flavell, R.A., Mauri, C., 2011. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J. Immunol.* 186, 5569–5579. doi: 10.4049/jimmunol.1100284.
114. Cartwright, M., Mikheev, A.M., Heinrich, G., 1994. Expression of neurotrophin genes in human fibroblasts: Differential regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *International Journal of Developmental Neuroscience* 12, 685–693. doi: 10.1016/0736-5748(94)90048-5.
115. Castrén, E., Vöikar, V., Rantamäki, T., 2007. Role of neurotrophic factors in depression. *Current Opinion in Pharmacology* 7, 18–21. doi: 10.1016/j.coph.2006.08.009.

116. Celebi Sozener, Z., Ozdel Ozturk, B., Cerci, P., Turk, M., Gorgulu Akin, B., Akdis, M., Altiner, S., Ozbey, U., Ogulur, I., Mitamura, Y., Yilmaz, I., Nadeau, K., Ozdemir, C., Mungan, D., Akdis, C.A., 2022. Epithelial barrier hypothesis: Effect of the external exposome on the microbiome and epithelial barriers in allergic disease. *Allergy* 77, 1418–1449. doi: 10.1111/all.15240.
117. Cella, M., Miller, H., Song, C., 2014. Beyond NK cells: the expanding universe of innate lymphoid cells. *Frontiers in Immunology* 5, 282. doi: 10.3389/fimmu.2014.00282.
118. Cevikbas, F., Steinhoff, A., Homey, B., Steinhoff, M., 2007. Neuroimmune interactions in allergic skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7, 365–373. doi: 10.1097/ACI.0b013e3282a644d2.
119. Chacón-Fernández, P., Säuberli, K., Colzani, M., Moreau, T., Ghevaert, C., Barde, Y.-A., 2016. Brain-derived Neurotrophic Factor in Megakaryocytes. *J Biol Chem* 291, 9872–9881. doi: 10.1074/jbc.M116.720029.
120. Chajra, H., 2016. Cutaneous Opioid Receptors and Stress Responses: Molecular Interactions and Opportunities for Therapeutic Intervention. In: Wondrak, G.T. (Ed.) *Skin Stress Response Pathways. Environmental Factors and Molecular Opportunities*. Springer International Publishing, Cham, pp. 265–280. doi: 10.1007/978-3-319-43157-4\_13.
121. Chapman, C. Richard, Tuckett, R.P., Song, C.W., 2008. Pain and Stress in a Systems Perspective: Reciprocal Neural, Endocrine, and Immune Interactions. *The Journal of Pain* 9, 122–145. doi: 10.1016/j.jpain.2007.09.006.
122. Chapman, C. Richard, 2010. Painful Multi-Symptom Disorders: A Systems Perspective. In: Kruger, L., Light, A.R. (Eds.) *Frontiers in Neuroscience : Translational Pain Research: From Mouse to Man*, Boca Raton (FL).
123. Chateau, Y., Misery, L., 2004. Connections between nerve endings and epidermal cells: are they synapses? *Exp Dermatol* 13, 2–4. doi: 10.1111/j.0906-6705.2004.00158.x.
124. Chen, X., Gianferante, D., Hanlin, L., Fiksdal, A., Breines, J.G., Thoma, M.V., Rohleder, N., 2017. HPA-Axis and Inflammatory Reactivity to Acute Stress is Related with Basal HPA-Axis Activity. *Psychoneuroendocrinology* 78, 168–176. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.01.035.
125. Chen, Y., Lyga, J., 2014. Brain-skin connection: stress, inflammation and skin aging. *Inflamm Allergy Drug Targets* 13, 177–190. doi: 10.2174/1871528113666140522104422.
126. Chen, Y.E., Fischbach, M.A., Belkaid, Y., 2018. Skin microbiota-host interactions. *Nature* 553, 427–436. doi: 10.1038/nature25177.
127. Chéret, J., Lebonvallet, N., Carré, J.-L., Misery, L., Le Gall-Ianotto, C., 2013. Role of neuropeptides, neurotrophins, and neurohormones in skin wound healing. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 21, 772–788. doi: 10.1111/wrr.12101.
128. Chernyavsky, A.I., Marchenko, S., Phillips, C., Grando, S.A., 2012. Auto/paracrine nicotinic peptides participate in cutaneous stress response to wounding. *Dermatoendocrinol* 4, 324–330. doi: 10.4161/derm.22594.
129. Chernyavsky, A.I., Kalantari-Dehaghi, M., Phillips, C., Marchenko, S., Grando, S.A., 2012. Novel cholinergic peptides SLURP-1 and -2 regulate epithelialization of cutaneous and oral wounds. *Wound Repair Regen* 20, 103–113. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00753.x.
130. Chieosilapatham, P., Kiatsurayanon, C., Umehara, Y., Trujillo-Paez, J.V., Peng, G., Yue, H., Nguyen, L.T.H., Niyonsaba, F., 2021. Keratinocytes: innate immune cells in atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Immunology* 204, 296–309. doi: 10.1111/cei.13575.

131. Chiu, I.M., Hehn, C.A. von, Woolf, C.J., 2012. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. *Nature neuroscience* 15, 1063–1067. doi: 10.1038/nn.3144.
132. Choe, S.J., Kim, D., Kim, E.J., Ahn, J.-S., Choi, E.-J., Son, E.D., Lee, T.R., Choi, E.H., 2018. Psychological Stress Deteriorates Skin Barrier Function by Activating 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 and the HPA Axis. *Scientific reports* 8, 6334. doi: 10.1038/s41598-018-24653-z.
133. Cho, H., Kim, J., Kim, S., Son, Y.H., Lee, N., Jung, S.H., 2012. The concentrations of serum, plasma and platelet BDNF are all increased by treadmill VO<sub>2</sub>max performance in healthy college men. *Neurosci Lett* 519, 78–83. doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.025.
134. Choi, E.-H., Brown, B.E., Crumrine, D., Chang, S., Man, M.-Q., Elias, P.M., Feingold, K.R., 2005. Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity. *J Invest Dermatol* 124, 587–595. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23589.x.
135. Choi, E.-H., Demerjian, M., Crumrine, D., Brown, B.E., Mauro, T., Elias, P.M., Feingold, K.R., 2006. Glucocorticoid blockade reverses psychological stress-induced abnormalities in epidermal structure and function. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 291, R1657-62. doi: 10.1152/ajpregu.00010.2006.
136. Cho, S.H., Strickland, I., Tomkinson, A., Fehringer, A.P., Gelfand, E.W., Leung, D.Y., 2001. Preferential binding of *Staphylococcus aureus* to skin sites of Th2-mediated inflammation in a murine model. *J Invest Dermatol* 116, 658–663. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01331.x.
137. Chrousos, G.P., 2000. The stress response and immune function: clinical implications. The 1999 Novera H. Spector Lecture. *Ann N Y Acad Sci* 917, 38–67. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05371.x.
138. Chu, X., Zhang, B., Koeken, V.A.C.M., Gupta, M.K., Li, Y., 2021. Multi-Omics Approaches in Immunological Research. *Frontiers in Immunology* 12, 668045. doi: 10.3389/fimmu.2021.668045.
139. Cirulli, F., Alleva, E., 2009. The NGF saga: from animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30, 379–395. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.05.002.
140. Clark, R.A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N.K., Yamanaka, K.-I., Dowgiert, R.K., Kupper, T.S., 2006. The vast majority of CLA<sup>+</sup> T cells are resident in normal skin. *J Immunol* 176, 4431–4439. doi: 10.4049/jimmunol.176.7.4431.
141. Clemmensen, A., Thomassen, M., Clemmensen, O., Tan, Q., Kruse, T.A., Petersen, T.K., Andersen, F., Andersen, K.E., 2009. Extraction of high-quality epidermal RNA after ammonium thiocyanate-induced dermo-epidermal separation of 4 mm human skin biopsies. *Exp Dermatol* 18, 979–984. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00921.x.
142. Cogen, A.L., Nizet, V., Gallo, R.L., 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol* 158, 442–455. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x.
143. Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P.A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D., Dell'Agli, M., 2017. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of inflammation* 2017, 7435621. doi: 10.1155/2017/7435621.
144. Constant, S.L., Bottomly, K., 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell responses: the alternative approaches. *Annual review of immunology* 15, 297–322. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.297.

145. Cordero, M.I., Moser, D.A., Manini, A., Suardi, F., Sancho-Rossignol, A., Torrasi, R., Rossier, M.F., Ansermet, F., Dayer, A.G., Rusconi-Serpa, S., Schechter, D.S., 2017. Effects of interpersonal violence-related post-traumatic stress disorder (PTSD) on mother and child diurnal cortisol rhythm and cortisol reactivity to a laboratory stressor involving separation. *Hormones and behavior* 90, 15–24. doi: 10.1016/j.yhbeh.2017.02.007.
146. Cortez, V.S., Robinette, M.L., Colonna, M., 2015. Innate lymphoid cells: new insights into function and development. *Current opinion in immunology* 32, 71–77. doi: 10.1016/j.coi.2015.01.004.
147. Costantini, T.W., Krzyzaniak, M., Cheadle, G.A., Putnam, J.G., Hageny, A.-M., Lopez, N., Eliceiri, B.P., Bansal, V., Coimbra, R., 2012. Targeting  $\alpha$ -7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric nervous system: a cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn injury. *The American journal of pathology* 181, 478–486. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.04.005.
148. Coulombe, P.A., Kopan, R., Fuchs, E., 1989. Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: Insights into complex programs of differentiation. *The Journal of Cell Biology* 109, 2295–2312. doi: 10.1083/jcb.109.5.2295.
149. Coyne, C.B., Vanhook, M.K., Gambling, T.M., Carson, J.L., Boucher, R.C., Johnson, L.G., 2002. Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell* 13, 3218–3234. doi: 10.1091/mbc.E02-03-0134.
150. Crawford, M., Dagnino, L., 2017. Scaffolding proteins in the development and maintenance of the epidermal permeability barrier. *Tissue barriers* 5, e1341969. doi: 10.1080/21688370.2017.1341969.
151. Crowley, C., Spencer, S.D., Nishimura, M.C., Chen, K.S., Pitts-Meek, S., Armanin, M.P., Ling, L.H., McMahon, S.B., Shelton, D.L., Levinson, A.D., Phillips, H.S., 1994. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76, 1001–1011. doi: 10.1016/0092-8674(94)90378-6.
152. Cruz, M.S., Diamond, A., Russell, A., Jameson, J.M., 2018. Human  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T Cells in Skin Immunity and Disease. *Frontiers in Immunology* 9, 1304. doi: 10.3389/fimmu.2018.01304.
153. Curtis, B.J., Radek, K.A., 2012. Cholinergic regulation of keratinocyte innate immunity and permeability barrier integrity: new perspectives in epidermal immunity and disease. *J Invest Dermatol* 132, 28–42. doi: 10.1038/jid.2011.264.
154. Curtis, B.J., Plichta, J.K., Blatt, H., Droho, S., Griffin, T.M., Radek, K.A., 2012. Nicotinic acetylcholine receptor stimulation impairs epidermal permeability barrier function and recovery and modulates cornified envelope proteins. *Life Sci* 91, 1070–1076. doi: 10.1016/j.lfs.2012.08.020.
155. Dalglish, A., 1999. The relevance of non-linear mathematics (chaos theory) to the treatment of cancer, the role of the immune response and the potential for vaccines. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 92, 347–359. doi: 10.1093/qjmed/92.6.347.
156. Dallos, A., Kiss, M., Polyánka, H., Dobozy, A., Kemény, L., Husz, S., 2006. Effects of the neuropeptides substance P, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide and galanin on the production of nerve growth factor and inflammatory cytokines in cultured human keratinocytes. *Neuropeptides* 40, 251–263. doi: 10.1016/j.npep.2006.06.002.
157. Darsow, U., Ring, J., 2001. Neuroimmune interactions in the skin. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 1, 435–439. doi: 10.1097/01.all.0000011057.09816.61.

158. Das, P., Mounika, P., Yellurkar, M.L., Prasanna, V.S., Sarkar, S., Velayutham, R., Arumugam, S., 2022. Keratinocytes: An Enigmatic Factor in Atopic Dermatitis. *Cells* 11. doi: 10.3390/cells11101683.
159. Dave, N.D., Xiang, L., Rehm, K.E., Marshall, G.D., 2011. Stress and Allergic Diseases. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 31, 55–68. doi: 10.1016/j.iac.2010.09.009.
160. Davis, M.M., 2008. A prescription for human immunology. *Immunity* 29, 835–838. doi: 10.1016/j.immuni.2008.12.003.
161. Deckers, J., Hammad, H., Hoste, E., 2018. Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease. *Frontiers in Immunology* 9, 93. doi: 10.3389/fimmu.2018.00093.
162. DeMorrow, S., 2018. Role of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Health and Disease. *International journal of molecular sciences* 19. doi: 10.3390/ijms19040986.
163. Denda, M., Tsuchiya, T., Elias, P.M., Feingold, K.R., 2000. Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, 72.
164. Denda, M., Denda, S., Tsutsumi, M., Goto, M., Kumamoto, J., Nakatani, M., Takei, K., Kitahata, H., Nakata, S., Sawabu, Y., Kobayashi, Y., Nagayama, M., 2014. Frontiers in epidermal barrier homeostasis—an approach to mathematical modelling of epidermal calcium dynamics. *Experimental dermatology* 23, 79–82. doi: 10.1111/exd.12302.
165. Denning, M.F., 2004. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1141–1146. doi: 10.1016/j.biocel.2003.12.004.
166. Deo, P.N., Deshmukh, R., 2018. Pathophysiology of keratinization. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP* 22, 86–91. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_195\_16.
167. DeYoung, C.G., 2015. Cybernetic Big Five Theory. *Journal of Research in Personality* 56, 33–58. doi: 10.1016/j.jrp.2014.07.004.
168. Deyrieux, A.F., Wilson, V.G., 2007. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology* 54, 77–83. doi: 10.1007/s10616-007-9076-1.
169. Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 1997. Acute Stress Enhances while Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity in Vivo: A Potential Role for Leukocyte Trafficking. *Brain, Behavior, and Immunity* 11, 286–306. doi: 10.1006/brbi.1997.0508.
170. Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1059–1064. doi: 10.1073/pnas.96.3.1059.
171. Dhabhar, F.S., 2003. Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function. *Ann N Y Acad Sci* 992, 205–217. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03151.x.
172. Dhabhar, F.S., Malarkey, W.B., Neri, E., McEwen, B.S., 2012. Stress-induced redistribution of immune cells—from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones—Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1345–1368. doi: 10.1016/j.psychneuen.2012.05.008.
173. Dhabhar, F.S., 2013. Psychological stress and immunoprotection versus immunopathology in the skin. *Clin Dermatol* 31, 18–30. doi: 10.1016/j.clindermatol.2011.11.003.

174. Dhabhar, F.S., 2018. The short-term stress response - Mother nature's mechanism for enhancing protection and performance under conditions of threat, challenge, and opportunity. *Frontiers in Neuroendocrinology* 49, 175–192. doi: 10.1016/j.yfrne.2018.03.004.
175. Dhawan, S., Hiemstra, I.H., Verseijden, C., Hilbers, F.W., Te Velde, A A, Willemsen, L E M, Stap, J., den Haan, J M, de Jonge, W J, 2015. Cholinergic receptor activation on epithelia protects against cytokine-induced barrier dysfunction. *Acta Physiol (Oxf)* 213, 846–859. doi: 10.1111/apha.12469.
176. Dhillon, B.K., Smith, M., Baghela, A., Lee, A.H.Y., Hancock, R.E.W., 2020. Systems Biology Approaches to Understanding the Human Immune System. *Frontiers in Immunology* 11, 1683. doi: 10.3389/fimmu.2020.01683.
177. Di Marco, E., Marchisio, P.C., Bondanza, S., Franzi, A.T., Cancedda, R., Luca, M. de, 1991. Growth-regulated synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor by human keratinocytes. *J Biol Chem* 266, 21718–21722. doi: 10.1016/S0021-9258(18)54695-0.
178. Diefenbach, A., Colonna, M., Koyasu, S., 2014. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity* 41, 354–365. doi: 10.1016/j.immuni.2014.09.005.
179. Dietert, R.R., 2011. Fractal immunology and immune patterning: potential tools for immune protection and optimization. *Journal of immunotoxicology* 8, 101–110. doi: 10.3109/1547691X.2011.559951.
180. Doebel, T., Voisin, B., Nagao, K., 2017. Langerhans Cells - The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends in Immunology* 38, 817–828. doi: 10.1016/j.it.2017.06.008.
181. Dominguez-Huttinger, E., Christodoulides, P., Miyauchi, K., Irvine, A.D., Okada-Hatakeyama, M., Kubo, M., Tanaka, R.J., 2017. Mathematical modeling of atopic dermatitis reveals "double-switch" mechanisms underlying 4 common disease phenotypes. *The Journal of allergy and clinical immunology* 139, 1861-1872.e7. doi: 10.1016/j.jaci.2016.10.026.
182. Donnerer, J., Schuligoi, R., Stein, C., 1992. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: Evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* 49, 693–698. doi: 10.1016/0306-4522(92)90237-V.
183. Doyle, F.J., Stelling, J., 2006. Systems interface biology. *Journal of the Royal Society Interface* 3, 603–616. doi: 10.1098/rsif.2006.0143.
184. Dragsten, P.R., Blumenthal, R., Handler, J.S., 1981. Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature* 294, 718–722. doi: 10.1038/294718a0.
185. Droessler, L., Cornelius, V., Markov, A.G., Amasheh, S., 2021. Tumor Necrosis Factor Alpha Effects on the Porcine Intestinal Epithelial Barrier Include Enhanced Expression of TNF Receptor 1. *IJMS* 22. doi: 10.3390/ijms22168746.
186. Duan, H., Yuan, Y., Zhang, L., Qin, S., Zhang, K., Buchanan, T.W., Wu, J., 2013. Chronic stress exposure decreases the cortisol awakening response in healthy young men. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 16, 630–637. doi: 10.3109/10253890.2013.840579.
187. Dudeck, A., Köberle, M., Goldmann, O., Meyer, N., Dudeck, J., Lemmens, S., Rohde, M., Roldán, N.G., Dietze-Schwonberg, K., Orinska, Z., Medina, E., Hendrix, S., Metz, M., Zenclussen, A.C., Stebut, E. von, Biedermann, T., 2019. Mast cells as protectors of health. *J. Allergy Clin. Immunol.* 144, S4-S18. doi: 10.1016/j.jaci.2018.10.054.
188. Dupuy, P., Heslan, M., Fraitag, S., Hercend, T., Dubertret, L., Bagot, M., 1990. T-cell receptor-gamma/delta bearing lymphocytes in normal and inflammatory human skin. *J Invest Dermatol* 94, 764–768. doi: 10.1111/1523-1747.ep12874626.

189. Eckert, J.J., McCallum, A., Mears, A., Rumsby, M.G., Cameron, I.T., Fleming, T.P., 2004. Specific PKC isoforms regulate blastocoel formation during mouse preimplantation development. *Developmental biology* 274, 384–401. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.07.027.
190. Eckert, R.L., 1989. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev* 69, 1316–1346. doi: 10.1152/physrev.1989.69.4.1316.
191. Eckert, R.L., Crish, J.F., Robinson, N.A., 1997. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev* 77, 397–424. doi: 10.1152/physrev.1997.77.2.397.
192. Eckhart, L., Tschachler, E., 2018. Control of cell death-associated danger signals during cornification prevents autoinflammation of the skin. *Exp Dermatol* 27, 884–891. doi: 10.1111/exd.13700.
193. Egawa, G., Kabashima, K., 2016. Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: Essential topics to prevent the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 138, 350-358.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.002.
194. Eldred, W.D., Zucker, C., Karten, H.J., Yazulla, S., 1983. Comparison of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 31, 285–292. doi: 10.1177/31.2.6339606.
195. Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., 2000. Neuroendocrine regulation of IL-12 and TNF-alpha/IL-10 balance. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 917, 94–105. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05374.x.
196. Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., 2002. Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 966, 290–303. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04229.x.
197. Elia, G., 2008. Biotinylation reagents for the study of cell surface proteins. *Proteomics* 8, 4012–4024. doi: 10.1002/pmic.200800097.
198. Elias, P.M., 1981. Lipids and the epidermal permeability barrier. *Arch Dermatol Res* 270, 95–117. doi: 10.1007/BF00417155.
199. Elias, P.M., Menon, G.K., 1991. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Advances in lipid research* 24, 1–26. doi: 10.1016/b978-0-12-024924-4.50005-5.
200. Elias, P.M., 2005. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 125, 183–200. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23668.x.
201. Elias, P.M., 2017. The how, why and clinical importance of stratum corneum acidification. *Exp Dermatol* 26, 999–1003. doi: 10.1111/exd.13329.
202. Elsholz, F., Harteneck, C., Muller, W., Friedland, K., 2014. Calcium--a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *European journal of dermatology* : EJD 24, 650–661. doi: 10.1684/ejd.2014.2452.
203. Ernfors, P., Lee, K.F., Jaenisch, R., 1994. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368, 147–150. doi: 10.1038/368147a0.
204. Ertle, C.M., Rommel, F.R., Tumala, S., Moriwaki, Y., Klein, J., Kruse, J., Gieler, U., Peters, E.M.J., 2021. New Pathways for the Skin's Stress Response: The Cholinergic Neuropeptide SLURP-1 Can Activate Mast Cells and Alter Cytokine Production in Mice. *Front. Immunol.* 12, 631881. doi: 10.3389/fimmu.2021.631881.
205. Esaki, H., Ewald, D.A., Ungar, B., Rozenblit, M., Zheng, X., Xu, H., Estrada, Y.D., Peng, X., Mitsui, H., Litman, T., Suárez-Fariñas, M., Krueger, J.G., Guttman-Yassky, E., 2015.

- Identification of novel immune and barrier genes in atopic dermatitis by means of laser capture microdissection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 153–163. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.037.
206. Eskandari, F., Webster, J.I., Sternberg, E.M., 2003. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 5, 1–15. doi: 10.1186/ar1002.
207. Eyerich, K., Pennino, D., Scarponi, C., Foerster, S., Nasorri, F., Behrendt, H., Ring, J., Traidl-Hoffmann, C., Albanesi, C., Cavani, A., 2009. IL-17 in atopic eczema: linking allergen-specific adaptive and microbial-triggered innate immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 59-66.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2008.10.031.
208. Eyerich, K., Dimartino, V., Cavani, A., 2017. IL-17 and IL-22 in immunity: Driving protection and pathology. *Eur. J. Immunol.* 47, 607–614. doi: 10.1002/eji.201646723.
209. Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S.R., Schmidt-Weber, C.B., Cavani, A., 2009. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The Journal of clinical investigation* 119, 3573–3585. doi: 10.1172/JCI40202.
210. Eyerich, S., Eyerich, K., Traidl-Hoffmann, C., Biedermann, T., 2018. Cutaneous Barriers and Skin Immunity: Differentiating A Connected Network. *Trends in Immunology* 39, 315–327. doi: 10.1016/j.it.2018.02.004.
211. Facheris, P., Jeffery, J., Del Duca, E., Guttman-Yassky, E., 2023. The translational revolution in atopic dermatitis: the paradigm shift from pathogenesis to treatment. *Cellular & molecular immunology.* doi: 10.1038/s41423-023-00992-4.
212. Fantini, F., Pincelli, C., Romualdi, P., Donatini, A., Giannetti, A., 1992. Substance P levels are decreased in lesional skin of atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 1, 127–128. doi: 10.1111/j.1600-0625.1992.tb00003.x.
213. Farage, M.A., Bowtell, P., Katsarou, A., 2010. Identifying patients likely to have atopic dermatitis: development of a pilot algorithm. *Am J Clin Dermatol* 11, 211–215. doi: 10.2165/11530100-000000000-00000.
214. Farshori, P., Kachar, B., 1999. Redistribution and phosphorylation of occludin during opening and resealing of tight junctions in cultured epithelial cells. *J Membr Biol* 170, 147–156. doi: 10.1007/s002329900544.
215. Fedosejevs, C.S., Schneider, M.F., 2022. Sharp, localized phase transitions in single neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119. doi: 10.1073/pnas.2117521119.
216. Feingold, K.R., 2009. The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin. *Journal of lipid research* 50 Suppl, S417-22. doi: 10.1194/jlr.R800039-JLR200.
217. Fell, D.A., Wagner, A., 2000. The small world of metabolism. *Nature biotechnology* 18, 1121–1122. doi: 10.1038/81025.
218. Fernandes, C.C., Pinto-Duarte, A., Ribeiro, J.A., Sebastiao, A.M., 2008. Postsynaptic action of brain-derived neurotrophic factor attenuates alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 28, 5611–5618. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5378-07.2008.
219. Ferrell, J.E., Xiong, W., 2001. Bistability in cell signaling: How to make continuous processes discontinuous, and reversible processes irreversible. *Chaos (Woodbury, N.Y.)* 11, 227–236. doi: 10.1063/1.1349894.
220. Figgitt, W.A., Monaghan, K., Ng, M., Alhamdoosh, M., Maraskovsky, E., Wilson, N.J., Hoi, A.Y., Morand, E.F., Mackay, F., 2019. Machine learning applied to whole-blood RNA-sequencing data uncovers distinct subsets of patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical & translational immunology* 8, e01093. doi: 10.1002/cti2.1093.

221. Findley, M.K., Koval, M., 2009. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life* 61, 431–437. doi: 10.1002/iub.175.
222. Foerster, H. von, 2003. Perception of the Future and the Future of Perception. In: Foerster, H. von (Ed.) *Understanding Understanding. Essays on Cybernetics and Cognition*. Springer New York, pp. 199–210. doi: 10.1007/0-387-21722-3\_7.
223. Foerster, H. von, Schmidt, S.J., Köck, W.K. (Eds.), 2006. *Wissen und Gewissen: Versuch einer Brücke*, 1st ed. Suhrkamp, Frankfurt am Main, 396 pp. ISBN: 3518284762.
224. Foerster, H. von, Pörksen, B., 2013. *Wahrheit ist die Erfindung eines Lügners: Gespräche für Skeptiker*, 10th ed. Carl-Auer-Systeme-Verl., Heidelberg, 167 pp. ISBN: 9783896706461.
225. Fölster-Holst, R., Papakonstantinou, E., Rüdrieh, U., Buchner, M., Pite, H., Gehring, M., Kapp, A., Weidinger, S., Raap, U., 2016. Childhood atopic dermatitis-Brain-derived neurotrophic factor correlates with serum eosinophil cationic protein and disease severity. *Allergy* 71, 1062–1065. doi: 10.1111/all.12916.
226. Freeman, M., 2000. Feedback control of intercellular signalling in development. *Nature* 408, 313–319. doi: 10.1038/35042500.
227. Fuchs, E., 2016. *Epithelial Skin Biology: Three Decades of Developmental Biology, a Hundred Questions Answered and a Thousand New Ones to Address*. Current topics in developmental biology 116, 357–374. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.11.033.
228. Fucile, S., 2004. Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35, 1–8.
229. Fujii, M., 2020. Current Understanding of Pathophysiological Mechanisms of Atopic Dermatitis: Interactions among Skin Barrier Dysfunction, Immune Abnormalities and Pruritus. *Biological & pharmaceutical bulletin* 43, 12–19. doi: 10.1248/bpb.b19-00088.
230. Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., Kawashima, K., 2017. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. *Frontiers in Immunology* 8, 1085. doi: 10.3389/fimmu.2017.01085.
231. Fujii, Y.X., Fujigaya, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., Kasahara, T., Grando, S.A., Kawashima, K., 2007. Enhanced serum antigen-specific IgG1 and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit gene knockout mice. *J Neuroimmunol* 189, 69–74. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.07.003.
232. Fujimura, H., Altar, C., Chen, R., Nakamura, T., Nakahashi, T., Kambayashi, J., Sun, B., Tandon, N., 2002. Brain-derived Neurotrophic Factor Is Stored in Human Platelets and Released by Agonist Stimulation. *Thromb Haemost* 87, 728–734. doi: 10.1055/s-0037-1613072.
233. Fujita, H., 2013. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci* 72, 3–8. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.028.
234. Fukuda, S., Baba, S., Akasaka, T., 2015. Psychological stress has the potential to cause a decline in the epidermal permeability barrier function of the horny layer. *International Journal of Cosmetic Science* 37, 63–69. doi: 10.1111/ics.12169.
235. Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., Tsukita, S., 1998. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143, 391–401. doi: 10.1083/jcb.143.2.391.
236. Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., Tsukita, S., 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of Cell Biology* 156, 1099–1111. doi: 10.1083/jcb.200110122.

237. Galitovskiy, V., Qian, J., Chernyavsky, A.I., Marchenko, S., Gindi, V., Edwards, R.A., Grando, S.A., 2011. Cytokine-induced alterations of  $\alpha 7$  nicotinic receptor in colonic CD4 T cells mediate dichotomous response to nicotine in murine models of Th1/Th17- versus Th2-mediated colitis. *J. Immunol.* 187, 2677–2687. doi: 10.4049/jimmunol.1002711.
238. Gallagher, S.R., Desjardins, P.R., 2007. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in human genetics Appendix 3, Appendix 3D.* doi: 10.1002/0471142905.hga03ds53.
239. Galzi, J.L., Revah, F., Bessis, A., Changeux, J.P., 1991. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. *Annual review of pharmacology and toxicology* 31, 37–72. doi: 10.1146/annurev.pa.31.040191.000345.
240. Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N.S., Othlinghaus, N., Brockmeyer, N.H., Altmeyer, P., Kreuter, A., 2008. Differential mRNA expression of antimicrobial peptides and proteins in atopic dermatitis as compared to psoriasis vulgaris and healthy skin. *Int Arch Allergy Immunol* 147, 17–24. doi: 10.1159/000128582.
241. Gambichler, T., Steinbrecht, K., Chatzipantazi, M., Scheel, C.H., Stranzenbach, R., Schmitz, L., Susok, L., 2021. Impact of Extracorporeal Photopheresis on Blood Parameters of Atopic Dermatitis Patients. *Dermatitis : contact, atopic, occupational, drug.* doi: 10.1097/DER.0000000000000835.
242. Ganz, T., 2003. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 710–720. doi: 10.1038/nri1180.
243. Garg, A., Chren, M.M., Sands, L.P., Matsui, M.S., Marenus, K.D., Feingold, K.R., Elias, P.M., 2001. Psychological stress perturbs epidermal permeability barrier homeostasis: implications for the pathogenesis of stress-associated skin disorders. *Archives of dermatology* 137, 53–59. doi: 10.1001/archderm.137.1.53.
244. Gaspar, N.K., Aidé, M.K., 2016. Atopic dermatitis: Allergic dermatitis or neuroimmune dermatitis?\*. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 91, 479–488. doi: 10.1590/abd1806-4841.20164211.
245. Gebhardt, T., Whitney, P.G., Zaid, A., Mackay, L.K., Brooks, A.G., Heath, W.R., Carbone, F.R., Mueller, S.N., 2011. Different patterns of peripheral migration by memory CD4+ and CD8+ T cells. *Nature* 477, 216–219. doi: 10.1038/nature10339.
246. Gell-Mann, M., 1995. *The Quark and the Jaguar: Adventures in the Simple and the Complex.* St. Martin's Publishing Group. ISBN: 9780805072532.
247. Gell-Mann, M., 2003. Chapter 4 - Regularities and Randomness: Evolving Schemata in Science and the Arts. In: Casti, J.L., Karlquist, A. (Eds.) *Art and complexity*, 1st ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 47–58. doi: 10.1016/B978-044450944-4/50005-0.
248. Georas, S.N., Rezaee, F., 2014. Epithelial barrier function: at the front line of asthma immunology and allergic airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 134, 509–520. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.049.
249. Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., Stein, H., 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer* 31, 13–20. doi: 10.1002/ijc.2910310104.
250. Germain, R.N., 2001. The art of the probable: system control in the adaptive immune system. *Science (New York, N.Y.)* 293, 240–245. doi: 10.1126/science.1062946.
251. Gershenson, C., 2007. *Design and Control of Self-organizing Systems.* Coplit ArXives, Brüssel. ISBN: 0983117233.

252. Giannetti, A., Fantini, F., Cimitan, A., Pincelli, C., 1992. Vasoactive intestinal polypeptide and substance P in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl* 176, 90–92.
253. Gibon, J., Barker, P.A., 2017. Neurotrophins and Proneurotrophins: Focus on Synaptic Activity and Plasticity in the Brain. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 23, 587–604. doi: 10.1177/1073858417697037.
254. Glanville, R., 1982. Inside every white box there are two black boxes trying to get out. *Syst. Res.* 27, 1–11. doi: 10.1002/bs.3830270102.
255. Glaser, R., MacCallum, R.C., Laskowski, B.F., Malarkey, W.B., Sheridan, J.F., Kiecolt-Glaser, J.K., 2001. Evidence for a Shift in the Th-1 to Th-2 Cytokine Response Associated With Chronic Stress and Aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 56, M477-M482. doi: 10.1093/gerona/56.8.M477.
256. Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J.K., 2005. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature reviews. Immunology* 5, 243–251. doi: 10.1038/nri1571.
257. Goetzl, E.J., Sreedharan, S.P., 1992. Mediators of communication and adaptation in the neuroendocrine and immune systems. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6, 2646–2652. doi: 10.1096/fasebj.6.9.1612288.
258. Goldbeter, A., 2018. Dissipative structures in biological systems: bistability, oscillations, spatial patterns and waves. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* 376. doi: 10.1098/rsta.2017.0376.
259. Goldstein, D.S., McEwen, B., 2002. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 5, 55–58. doi: 10.1080/102538902900012345.
260. Goldstein, D.S., Kopin, I.J., 2007. Evolution of concepts of stress. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 10, 109–120. doi: 10.1080/10253890701288935.
261. Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R., Chamorro, D., 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1778, 729–756. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.018.
262. González-Mariscal, L., Raya-Sandino, A., González-González, L., Hernández-Guzmán, C., 2018. Relationship between G proteins coupled receptors and tight junctions. *Tissue barriers* 6, e1414015. doi: 10.1080/21688370.2017.1414015.
263. Grabe, N., Pommerencke, T., Müller, D., Huber, S., Neuber, K., Dickhaus, H., 2006. Modelling epidermal homeostasis as an approach for clinical bioinformatics. *Studies in health technology and informatics* 124, 105–110.
264. Grando, S.A., Kist, D.A., Qi, M., Dahl, M.V., 1993. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J Invest Dermatol* 101, 32–36. doi: 10.1111/1523-1747.ep12358588.
265. Grando, S.A., Horton, R.M., Pereira, E.F., Diethelm-Okita, B.M., George, P.M., Albuquerque, E.X., Conti-Fine, B.M., 1995. A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 105, 774–781. doi: 10.1111/1523-1747.ep12325606.
266. Grando, S.A., Zelickson, B.D., Kist, D.A., Weinshenker, D., Bigliardi, P.L., Wendelschafer-Crabb, G., Kennedy, W.R., Dahl, M.V., 1995. Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: immunolocalization and partial characterization. *J Invest Dermatol* 104, 95–100. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613582.

267. Grando, S.A., Horton, R.M., Mauro, T.M., Kist, D.A., Lee, T.X., Dahl, M.V., 1996. Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol* 107, 412–418. doi: 10.1111/1523-1747.ep12363399.
268. Grando, S.A., 1997. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2, 41–48. doi: 10.1038/jidsymp.1997.10.
269. Grando, S.A., Pittelkow, M.R., Schallreuter, K.U., 2006. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol* 126, 1948–1965. doi: 10.1038/sj.jid.5700151.
270. Grando, S.A., 2006. Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp Dermatol* 15, 265–282. doi: 10.1111/j.0906-6705.2006.00410.x.
271. Grando, S.A., 2012. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on keratinocyte functions. *Handb Exp Pharmacol*, 429–450. doi: 10.1007/978-3-642-23274-9\_18.
272. Grewe, M., Vogelsang, K., Ruzicka, T., Stege, H., Krutmann, J., 2000. Neurotrophin-4 production by human epidermal keratinocytes: increased expression in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 114, 1108–1112. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00974.x.
273. Grice, E.A., Kong, H.H., Renaud, G., Young, A.C., Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Wolfsberg, T.G., Turner, M.L., Segre, J.A., 2008. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Research* 18, 1043–1050. doi: 10.1101/gr.075549.107.
274. Groneberg, D.A., Serowka, F., Peckenschneider, N., Artuc, M., Grützkau, A., Fischer, A., Henz, B.M., Welker, P., 2005. Gene expression and regulation of nerve growth factor in atopic dermatitis mast cells and the human mast cell line-1. *J Neuroimmunol* 161, 87–92. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.12.019.
275. Groneberg, D.A., Bester, C., Grützkau, A., Serowka, F., Fischer, A., Henz, B.M., Welker, P., 2005. Mast cells and vasculature in atopic dermatitis—potential stimulus of neoangiogenesis. *Allergy* 60, 90–97. doi: 10.1111/j.1398-9995.2004.00628.x.
276. Groneberg, D.A., Fischer, T.C., Peckenschneider, N., Noga, O., Dinh, Q.T., Welte, T., Welker, P., 2007. Cell type-specific regulation of brain-derived neurotrophic factor in states of allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 37, 1386–1391. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02790.x.
277. Gross, F., Metzner, G., Behn, U., 2011. Mathematical modeling of allergy and specific immunotherapy: Th1-Th2-Treg interactions. *Journal of theoretical biology* 269, 70–78. doi: 10.1016/j.jtbi.2010.10.013.
278. Groves, R.W., Rauschmayr, T., Nakamura, K., Sarkar, S., Williams, I.R., Kupper, T.S., 1996. Inflammatory and hyperproliferative skin disease in mice that express elevated levels of the IL-1 receptor (type I) on epidermal keratinocytes. Evidence that IL-1-inducible secondary cytokines produced by keratinocytes in vivo can cause skin disease. *J Clin Invest* 98, 336–344. doi: 10.1172/JCI118797.
279. Gruber, R., Börnchen, C., Rose, K., Daubmann, A., Volksdorf, T., Wladykowski, E., Vidal-Y-Sy, S., Peters, E.M., Danso, M., Bouwstra, J.A., Hennies, H.C., Moll, I., Schmuth, M., Brandner, J.M., 2015. Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. *The American journal of pathology* 185, 2777–2789. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.06.021.
280. Guan, Y., Watson, A.J.M., Marchiando, A.M., Bradford, E., Le Shen, Turner, J.R., Montrose, M.H., 2011. Redistribution of the tight junction protein ZO-1 during physiological shedding of mouse intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, 14. doi: 10.1152/ajpcell.00270.2010.

281. Guenin-Mace, L., Konieczny, P., Naik, S., 2022. Immune-Epithelial Cross Talk in Regeneration and Repair. *Annual review of immunology*. doi: 10.1146/annurev-immunol-101721-062818.
282. Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A., Citi, S., 2008. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta* 1778, 601–613. doi: 10.1016/j.bbame.2007.09.032.
283. Gunathilake, R., 2015. The Human Epidermal Antimicrobial Barrier: Current Knowledge, Clinical Relevance and Therapeutic Implications. *Recent patents on anti-infective drug discovery* 10, 84–97. doi: 10.2174/1574891x10666150623093446.
284. Guseva, D., Rüdrieh, U., Kotnik, N., Gehring, M., Patsinakidis, N., Agelopoulos, K., Ständer, S., Homey, B., Kapp, A., Gibbs, B.F., Ponimaskin, E., Raap, U., 2020. Neuronal branching of sensory neurons is associated with BDNF-positive eosinophils in atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 50, 577–584. doi: 10.1111/cea.13560.
285. Gutermuth, J., Ollert, M., Ring, J., Behrendt, H., Jakob, T., 2004. Mouse models of atopic eczema critically evaluated. *Int Arch Allergy Immunol* 135, 262–276. doi: 10.1159/000082099.
286. Guttman-Yassky, E., Brunner, P.M., Neumann, A.U., Khattri, S., Pavel, A.B., Malik, K., Singer, G.K., Baum, D., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Rose, S., Jim On, S., Li, X., Fuentes-Duculan, J., Estrada, Y., Garcet, S., Traidl-Hoffmann, C., Krueger, J.G., Lebwohl, M.G., 2018. Efficacy and safety of fezakinumab (an IL-22 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by conventional treatments: A randomized, double-blind, phase 2a trial. *J Am Acad Dermatol* 78, 872-881.e6. doi: 10.1016/j.jaad.2018.01.016.
287. Hachem, J.P., 2006. The two compartment model of the stratum corneum: biochemical aspects and pathophysiological implications. *Verh K Acad Geneesk Belg* 68, 287–317.
288. Haddad, E.-B., Cyr, S.L., Arima, K., McDonald, R.A., Levit, N.A., Nestle, F.O., 2022. Current and Emerging Strategies to Inhibit Type 2 Inflammation in Atopic Dermatitis. *Dermatology and therapy*. doi: 10.1007/s13555-022-00737-7.
289. Hadjiconstantinou, M., McGuire, L., Duchemin, A.-M., Laskowski, B., Kiecolt-Glaser, J., Glaser, R., 2001. Changes in plasma nerve growth factor levels in older adults associated with chronic stress. *J Neuroimmunol* 116, 102–106. doi: 10.1016/S0165-5728(01)00278-8.
290. Hajam, E.Y., Panikulam, P., Chu, C.-C., Jayaprakash, H., Majumdar, A., Jamora, C., 2022. The expanding impact of T-regs in the skin. *Front. Immunol.* 13, 983700. doi: 10.3389/fimmu.2022.983700.
291. Hall, J.M.F., Cruser, D., Podawiltz, A., Mummert, D.I., Jones, H., Mummert, M.E., 2012. Psychological Stress and the Cutaneous Immune Response: Roles of the HPA Axis and the Sympathetic Nervous System in Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Dermatol Res Pract* 2012, 403908. doi: 10.1155/2012/403908.
292. Hamill, K.J., Hiroyasu, S., Colburn, Z.T., Ventrella, R.V., Hopkinson, S.B., Skalli, O., Jones, J.C.R., 2015. Alpha actinin-1 regulates cell-matrix adhesion organization in keratinocytes: consequences for skin cell motility. *The Journal of investigative dermatology* 135, 1043–1052. doi: 10.1038/jid.2014.505.
293. Hanani, M., 2012. Lucifer yellow - an angel rather than the devil. *Journal of cellular and molecular medicine* 16, 22–31. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01378.x.
294. Hänel, K.H., Cornelissen, C., Lüscher, B., Baron, J.M., 2013. Cytokines and the skin barrier. *IJMS* 14, 6720–6745. doi: 10.3390/ijms14046720.

295. Haniffa, M., Gunawan, M., Jardine, L., 2015. Human skin dendritic cells in health and disease. *Journal of Dermatological Science* 77, 85–92. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.08.012.
296. Hao, S., Yan, K.-K., Ding, L., Qian, C., Chi, H., Yu, J., 2020. Network Approaches for Dissecting the Immune System. *iScience* 23, 101354. doi: 10.1016/j.isci.2020.101354.
297. Hara, T., Miyazaki, M., Hakuno, F., Takahashi, S., Chida, K., 2011. PKC $\zeta$  promotes a proliferation to differentiation switch in keratinocytes via upregulation of p27Kip1 mRNA through suppression of JNK/c-Jun signaling under stress conditions. *Cell death & disease* 2, e157. doi: 10.1038/cddis.2011.40.
298. Harb, H., González-de-la-Vara, M., Thalheimer, L., Klein, U., Renz, H., Rose, M., Kruse, J., Potaczek, D.P., Peters, E.M.J., 2017. Assessment of Brain Derived Neurotrophic Factor in hair to study stress responses: A pilot investigation. *Psychoneuroendocrinology* 86, 134–143. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.09.007.
299. Harder, J., Schröder, J.-M., Gläser, R., 2013. The skin surface as antimicrobial barrier: present concepts and future outlooks. *Exp Dermatol* 22, 1–5. doi: 10.1111/exd.12046.
300. Harhaj, N.S., Antonetti, D.A., 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 1206–1237. doi: 10.1016/j.biocel.2003.08.007.
301. Harvima, I.T., Nilsson, G., Naukkarinen, A., 2010. Role of mast cells and sensory nerves in skin inflammation. *G Ital Dermatol Venereol* 145, 195–204.
302. Hasan, M.Z., Kitamura, M., Kawai, M., Ohira, M., Mori, K., Shoji, S., Takagi, K., Tsukamoto, K., Kawai, Y., Inoue, A., 2019. Transcriptional profiling of lactic acid treated reconstructed human epidermis reveals pathways underlying stinging and itch. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 57, 164–173. doi: 10.1016/j.tiv.2019.03.005.
303. Hashimoto, K., 1971. Intercellular spaces of the human epidermis as demonstrated with lanthanum. *J Invest Dermatol* 57, 17–31. doi: 10.1111/1523-1747.ep12292052.
304. Hassan, M., Kjos, M., Nes, I.F., Diep, D.B., Lotfipour, F., 2012. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of applied microbiology* 113, 723–736. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x.
305. Havran, W.L., Jameson, J.M., 2010. Epidermal T cells and wound healing. *J. Immunol.* 184, 5423–5428. doi: 10.4049/jimmunol.0902733.
306. Haykin, H., Rolls, A., 2021. The neuroimmune response during stress: A physiological perspective. *Immunity* 54, 1933–1947. doi: 10.1016/j.immuni.2021.08.023.
307. Helfrich, I., Schmitz, A., Zigrino, P., Michels, C., Haase, I., Le Bivic, A., Leitges, M., Niessen, C.M., 2007. Role of aPKC isoforms and their binding partners Par3 and Par6 in epidermal barrier formation. *J Invest Dermatol* 127, 782–791. doi: 10.1038/sj.jid.5700621.
308. Helfrich, I., Schmitz, A., Zigrino, P., Michels, C., Haase, I., Le Bivic, A., Leitges, M., Niessen, C.M., 2007. Role of aPKC isoforms and their binding partners Par3 and Par6 in epidermal barrier formation. *J Invest Dermatol* 127, 782–791. doi: 10.1038/sj.jid.5700621.
309. Hendrix, S., Peters, E.M.J., 2007. Neuronal plasticity and neuroregeneration in the skin -- the role of inflammation. *J Neuroimmunol* 184, 113–126. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.11.020.
310. Hendrix, S., Picker, B., Liezmann, C., Peters, E.M.J., 2008. Skin and hair follicle innervation in experimental models: A guide for the exact and reproducible evaluation of neuronal plasticity. *Exp Dermatol* 17, 214–227. doi: 10.1111/j.1600-0625.2007.00653.x.

311. Heylighen, F., 2009. Complexity and Self-organization. In: Bates, M.J., Maack, M.N. (Eds.) *Encyclopedia of Library and Information Science*, 3rd. edition. Taylor and Francis, United States. doi: 10.1201/9780203757635.
312. Hillarp, N., 1959. *The Construction and Functional Organization of the Autonomic Innervation Apparatus*. Almqvist & Wiksell.
313. Hilliges, M., Wang, L., Johansson, O., 1995. Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. *J Invest Dermatol* 104, 134–137. doi: 10.1111/1523-1747.ep12613631.
314. Hill, M.W., Berg, J.H., Mackenzie, I.C., 1981. Quantitative evaluation of regional differences between epithelia in the adult mouse. *Archives of oral biology* 26, 1063–1067.
315. Ho, A.W., Kupper, T.S., 2019. T cells and the skin: from protective immunity to inflammatory skin disorders. *Nature reviews. Immunology* 19, 490–502. doi: 10.1038/s41577-019-0162-3.
316. Hoffjan, S., Parwez, Q., Petrasch-Parwez, E., Stemmler, S., 2009. Variation in the BDNF and NGFB genes in German atopic dermatitis patients. *Molecular and cellular probes* 23, 35–38. doi: 10.1016/j.mcp.2008.10.005.
317. Holstein, K., Flockerzi, D., Conradi, C., 2013. Multistationarity in sequential distributed multisite phosphorylation networks. *Bulletin of mathematical biology* 75, 2028–2058. doi: 10.1007/s11538-013-9878-6.
318. Hone, A.J., McIntosh, J.M., 2023. Nicotinic acetylcholine receptors: Therapeutic targets for novel ligands to treat pain and inflammation. *Pharmacological research* 190, 106715. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106715.
319. Honeyman, J.F., 2016. Psychoneuroimmunology and the Skin. *Acta Derm Venereol* 96, 38–46. doi: 10.2340/00015555-2376.
320. Hon, K.-L.E., Lam, M.-C.A., Wong, K.-Y., Leung, T.-F., Ng, P.-C., 2007. Pathophysiology of nocturnal scratching in childhood atopic dermatitis: the role of brain-derived neurotrophic factor and substance P. *Br J Dermatol* 157, 922–925. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08149.x.
321. Horigome, K., Pryor, J.C., Bullock, E.D., Johnson, E.M., 1993. Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. *J Biol Chem* 268, 14881–14887.
322. Hosoi, J., Murphy, G.F., Egan, C.L., Lerner, E.A., Grabbe, S., Asahina, A., Granstein, R.D., 1993. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 363, 159–163. doi: 10.1038/363159a0.
323. Huh, J.R., Veiga-Fernandes, H., 2020. Neuroimmune circuits in inter-organ communication. *Nature reviews. Immunology* 20, 217–228. doi: 10.1038/s41577-019-0247-z.
324. Hulme, E.C., 1990. Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 44, 39–54.
325. Humbert, P., 2003. Functional consequences of cutaneous lipid perturbation. *Pathol Biol (Paris)* 51, 271–274. doi: 10.1016/s0369-8114(03)00073-7.
326. Hunter, H J A, Momen, S.E., Kleyn, C.E., 2015. The impact of psychosocial stress on healthy skin. *Clin Exp Dermatol*. doi: 10.1111/ced.12582.
327. Hu, X.Q., Tang, Y., Ju, Y., Zhang, X.Y., Yan, J.J., Wang, C.M., Yang, Y., Zhu, C., Tang, Z.X., Zhou, Y., Yu, G., 2021. Scratching damages tight junctions through the Akt-claudin 1 axis in atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 46, 74–81. doi: 10.1111/ced.14380.

328. Ishida-Yamamoto, A., Igawa, S., Kishibe, M., 2018. Molecular basis of the skin barrier structures revealed by electron microscopy. *Exp Dermatol* 27, 841–846. doi: 10.1111/exd.13674.
329. Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., Tsukita, S., 1997. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 138, 181–192. doi: 10.1083/jcb.138.1.181.
330. Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology* 16, 343–353. doi: 10.1038/ni.3123.
331. Jackson ImmunoResearch, 2023. Labeling Primary Antibodies From Same Host Species. Accessed 13 August 2023.
332. Jadali, Z., 2019. Th9 Cells as a New Player in Inflammatory Skin Disorders. *IJAAL*. doi: 10.18502/ijaai.v18i2.915.
333. Jänig, W., Häbler, H.-J., 2003. Neurophysiological analysis of target-related sympathetic pathways—from animal to human: similarities and differences. *Acta physiologica Scandinavica* 177, 255–274. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01088.x.
334. Jarvikallio, A., Harvima, I.T., Naukkarinen, A., 2003. Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. *Arch Dermatol Res* 295, 2–7. doi: 10.1007/s00403-002-0378-z.
335. Jiang, Y., Lu, S., 2014. Three-dimensional insights into dermal tissue as a cue for cellular behavior. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* 40, 191–199. doi: 10.1016/j.burns.2013.09.015.
336. Jiang, Y., Tsoi, L.C., Billi, A.C., Ward, N.L., Harms, P.W., Zeng, C., Maverakis, E., Kahlenberg, J.M., Gudjonsson, J.E., 2020. Cytokines: the diverse contribution of keratinocytes to immune responses in skin. *JCI Insight* 5. doi: 10.1172/jci.insight.142067.
337. Jing, Y., Liu, J., Ye, Y., Pan, L., Deng, H., Wang, Y., Yang, Y., Diao, L., Lin, S.H., Mills, G.B., Zhuang, G., Xue, X., Han, L., 2020. Multi-omics prediction of immune-related adverse events during checkpoint immunotherapy. *Nat Commun* 11, 4946. doi: 10.1038/s41467-020-18742-9.
338. Joachim, R.A., Noga, O., Sagach, V., Hanf, G., Fliege, H., Kocalevent, R.D., Peters, E.M., Klapp, B.F., 2008. Correlation between immune and neuronal parameters and stress perception in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 38, 283–290. doi: 10.1111/j.1365-2222.2007.02899.x.
339. Joachim, R.A., Handjiski, B., Blois, S.M., Hagen, E., Paus, R., Arck, P.C., 2008. Stress-induced neurogenic inflammation in murine skin skews dendritic cells towards maturation and migration: key role of intercellular adhesion molecule-1/leukocyte function-associated antigen interactions. *Am J Pathol* 173, 1379–1388. doi: 10.2353/ajpath.2008.080105.
340. Jockers-Scherübl, M.C., Zubraegel, D., Baer, T., Linden, M., Danker-Hopfe, H., Schulte-Herbrüggen, O., Neu, P., Hellweg, R., 2007. Nerve growth factor serum concentrations rise after successful cognitive-behavioural therapy of generalized anxiety disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 31, 200–204. doi: 10.1016/j.pnpbp.2006.09.006.
341. Jozic, I., Stojadinovic, O., Kirsner, R.S., Tomic-Canic, M., 2014. Stressing the steroids in skin: Paradox or fine-tuning? *J Invest Dermatol* 134, 2869–2872. doi: 10.1038/jid.2014.363.
342. Jozic, I., Stojadinovic, O., Kirsner, R.S.F., Tomic-Canic, M., 2015. Skin under the (Spot)-Light: Cross-Talk with the Central Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis. *J Invest Dermatol* 135, 1469–1471. doi: 10.1038/jid.2015.56.

343. Juster, R.-P., Russell, J.J., Almeida, D., Picard, M., 2016. Allostatic load and comorbidities: A mitochondrial, epigenetic, and evolutionary perspective. *Development and psychopathology* 28, 1117–1146. doi: 10.1017/S0954579416000730.
344. Kabata, H., Artis, D., 2019. Neuro-immune crosstalk and allergic inflammation. *The Journal of clinical investigation* 130, 1475–1482. doi: 10.1172/JCI124609.
345. Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., Tsukita, S., Tsukita, S., 2008. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell* 19, 2465–2475. doi: 10.1091/mbc.e07-12-1215.
346. Kawashima, K., Fujii, T., 2003. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci* 72, 2101–2109. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00068-7.
347. Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., Misawa, H., 2012. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci* 91, 1027–1032. doi: 10.1016/j.lfs.2012.05.006.
348. Kazama, T., Yaoita, E., Ito, M., Sato, Y., 1988. Charge-selective permeability of dermo-epidermal junction: tracer studies with cationic and anionic ferritins. *J Invest Dermatol* 91, 560–565. doi: 10.1111/1523-1747.ep12476939.
349. Kelly, M.J., Breathnach, C., Tracey, K.J., Donnelly, S.C., 2022. Manipulation of the inflammatory reflex as a therapeutic strategy. *Cell reports. Medicine* 3, 100696. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100696.
350. Kelso, J.A.S., 1997. *Dynamic patterns: The self-organization of brain and behavior*, 1st ed. MIT Press, Cambridge, Mass., 334 pp. ISBN: 0262112000.
351. Kemeny, M.E., Laudenslager, M.L., 1999. Introduction beyond stress: the role of individual difference factors in psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun* 13, 73–75. doi: 10.1006/brbi.1999.0562.
352. Kemeny, M.E., Schedlowski, M., 2007. Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: a stepwise progression. *Brain, Behavior, and Immunity* 21, 1009–1018. doi: 10.1016/j.bbi.2007.07.010.
353. Kemter, A.M., Nagler, C.R., 2019. Influences on allergic mechanisms through gut, lung, and skin microbiome exposures. *The Journal of clinical investigation* 129, 1483–1492. doi: 10.1172/JCI124610.
354. Kerstan, A., Leverkus, M., Trautmann, A., 2009. Effector pathways during eczematous dermatitis: where inflammation meets cell death. *Exp Dermatol* 18, 893–899. doi: 10.1111/j.1600-0625.2009.00919.x.
355. Kerstan, A., Brouwer, E.-B., Trautmann, A., 2011. Decisive role of tumor necrosis factor- $\alpha$  for spongiosis formation in acute eczematous dermatitis. *Archives of dermatological research* 303, 651–658. doi: 10.1007/s00403-011-1149-5.
356. Kezios, K.L., Suglia, S.F., Doyle, D.M., Susser, E., Bradwin, G., Cirillo, P., Cohn, B., Link, B., Factor-Litvak, P., 2022. Comparing different operationalizations of allostatic load measured in mid-life and their patterning by race and cumulative life course socioeconomic status. *Psychoneuroendocrinology* 139, 105689. doi: 10.1016/j.psyneuen.2022.105689.
357. Kimata, H., 2003. Enhancement of allergic skin wheal responses in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome by playing video games or by a frequently ringing mobile phone. *Eur J Clin Invest* 33, 513–517. doi: 10.1046/j.1365-2362.2003.01177.x.

358. Kimata, H., 2003. Kissing reduces allergic skin wheal responses and plasma neurotrophin levels. *Physiol Behav* 80, 395–398. doi: 10.1016/j.physbeh.2003.09.004.
359. Kim, B.E., Leung, D.Y., Boguniewicz, M., Howell, M.D., 2008. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 126, 332–337. doi: 10.1016/j.clim.2007.11.006.
360. Kim, B.E., Leung, D.Y., 2018. Significance of Skin Barrier Dysfunction in Atopic Dermatitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 10, 207–215. doi: 10.4168/aaair.2018.10.3.207.
361. Kim, B.S., Wojno, Elia D Tait, Artis, D., 2013. Innate lymphoid cells and allergic inflammation. *Autoimmunity \* Allergy and hypersensitivity* 25, 738–744. doi: 10.1016/j.coi.2013.07.013.
362. Kim, D.-W., Park, J.-Y., Na, G.-Y., Lee, S.-J., Lee, W.-J., 2006. Correlation of clinical features and skin barrier function in adolescent and adult patients with atopic dermatitis. *Int J Dermatol* 45, 698–701. doi: 10.1111/j.1365-4632.2005.02644.x.
363. Kim, H.J., Baek, J., Lee, J.R., Roh, J.Y., Jung, Y., 2018. Optimization of Cytokine Milieu to Reproduce Atopic Dermatitis-related Gene Expression in HaCaT Keratinocyte Cell Line. *Immune network* 18, e9. doi: 10.4110/in.2018.18.e9.
364. Kim, H.-J., Cronin, M., Ahrens, K., Papastavros, V., Santoro, D., Marsella, R., 2016. A comparative study of epidermal tight junction proteins in a dog model of atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 27, 40-e11. doi: 10.1111/vde.12276.
365. Kim, J.E., Kim, H.S., 2019. Microbiome of the Skin and Gut in Atopic Dermatitis (AD): Understanding the Pathophysiology and Finding Novel Management Strategies. *Journal of clinical medicine* 8. doi: 10.3390/jcm8040444.
366. Kim, P.S., Levy, D., Lee, P.P., 2009. Modeling and simulation of the immune system as a self-regulating network. *Methods in enzymology* 467, 79–109. doi: 10.1016/S0076-6879(09)67004-X.
367. Kindt, F., Wiegand, S., Niemeier, V., Kupfer, J., Loser, C., Nilles, M., Kurzen, H., Kummer, W., Gieler, U., Haberberger, R.V., 2008. Reduced expression of nicotinic alpha subunits 3, 7, 9 and 10 in lesional and nonlesional atopic dermatitis skin but enhanced expression of alpha subunits 3 and 5 in mast cells. *Br J Dermatol* 159, 847–857. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08774.x.
368. King, R.M., Wilson, G.V., 1991. Use of a diary technique to investigate psychosomatic relations in atopic dermatitis. *Journal of Psychosomatic Research* 35, 697–706. doi: 10.1016/0022-3999(91)90120-D.
369. Kirschner, N., Houdek, P., Fromm, M., Moll, I., Brandner, J.M., 2010. Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol* 89, 839–842. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.07.010.
370. Kirschner, N., Haftek, M., Niessen, C.M., Behne, M.J., Furuse, M., Moll, I., Brandner, J.M., 2011. CD44 regulates tight-junction assembly and barrier function. *J Invest Dermatol* 131, 932–943. doi: 10.1038/jid.2010.390.
371. Kirschner, N., Brandner, J.M., 2012. Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1257, 158–166. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06554.x.
372. Kirschner, N., Rosenthal, R., Gunzel, D., Moll, I., Brandner, J.M., 2012. Tight junctions and differentiation--a chicken or the egg question? *Exp Dermatol* 21, 171–175. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01431.x.

373. Kirschner, N., Rosenthal, R., Furuse, M., Moll, I., Fromm, M., Brandner, J.M., 2013. Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 133, 1161–1169. doi: 10.1038/jid.2012.507.
374. Klein, A.B., Williamson, R., Santini, M.A., Clemmensen, C., Elstrup, A., Rios, M., Knudsen, G.M., Aznar, S., 2011. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int. J. Neuropsychopharm.* 14, 347–353. doi: 10.1017/S1461145710000738.
375. Kleyn, C.E., Schneider, L., Saraceno, R., Mantovani, C., Richards, H.L., Fortune, D.G., Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Terenghi, G., Kimber, I., Griffiths, C.E.M., 2008. The effects of acute social stress on epidermal Langerhans' cell frequency and expression of cutaneous neuropeptides. *J Invest Dermatol* 128, 1273–1279. doi: 10.1038/sj.jid.5701144.
376. Kobayashi, T., Glatz, M., Horiuchi, K., Kawasaki, H., Akiyama, H., Kaplan, D.H., Kong, H.H., Amagai, M., Nagao, K., 2015. Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity* 42, 756–766. doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.014.
377. Kobayashi, T., Ricardo-Gonzalez, R.R., Moro, K., 2020. Skin-Resident Innate Lymphoid Cells - Cutaneous Innate Guardians and Regulators. *Trends in Immunology* 41, 100–112. doi: 10.1016/j.it.2019.12.004.
378. Kong, K.F., Altman, A., 2013. In and out of the bull's eye: PKCs in the immunological synapse. *Trends in Immunology* 34, 234–242. doi: 10.1016/j.it.2013.01.002.
379. Kopan, R., Fuchs, E., 1989. A new look into an old problem: Keratins as tools to investigate determination, morphogenesis, and differentiation in skin. *Genes & development* 3, 1–15. doi: 10.1101/gad.3.1.1.
380. Korolj, A., Wu, H.-T., Radisic, M., 2019. A healthy dose of chaos: Using fractal frameworks for engineering higher-fidelity biomedical systems. *Biomaterials* 219, 119363. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119363.
381. Korotaevskiy, A.A., Hanin, L.G., Khanin, M.A., 2009. Non-linear dynamics of the complement system activation. *Mathematical biosciences* 222, 127–143. doi: 10.1016/j.mbs.2009.10.003.
382. Korte, S.M., Koolhaas, J.M., Wingfield, J.C., McEwen, B.S., 2005. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29, 3–38. doi: 10.1016/j.neubiorev.2004.08.009.
383. Korting, H.C., Hübner, K., Greiner, K., Hamm, G., Braun-Falco, O., 1990. Differences in the skin surface pH and bacterial microflora due to the long-term application of synthetic detergent preparations of pH 5.5 and pH 7.0. Results of a crossover trial in healthy volunteers. *Acta Derm Venereol* 70, 429–431. doi: 10.2340/000155570429431.
384. Koster, M.I., Roop, D.R., 2007. Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annual review of cell and developmental biology* 23, 93–113. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123357.
385. Kourtzelis, I., Hajishengallis, G., Chavakis, T., 2020. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Frontiers in Immunology* 11, 553. doi: 10.3389/fimmu.2020.00553.
386. Kozera, B., Rapacz, M., 2013. Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics* 54, 391–406. doi: 10.1007/s13353-013-0173-x.
387. Krause, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J., Blasig, I.E., 2008. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 1778, 631–645. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.10.018.

388. Krempski, J.W., Dant, C., Nadeau, K.C., 2020. The Origins of Allergy from a Systems Approach. *Annals of allergy, asthma & immunology* : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology. doi: 10.1016/j.anai.2020.07.013.
389. Kroeber, S., Schomerus, C., Korf, H.W., 1998. A specific and sensitive double-immunofluorescence method for the demonstration of S-antigen and serotonin in trout and rat pinealocytes by means of primary antibodies from the same donor species. *Histochem Cell Biol* 109, 309–317. doi: 10.1007/s004180050231.
390. Kröger, C., Loschke, F., Schwarz, N., Windoffer, R., Leube, R.E., Magin, T.M., 2013. Keratins control intercellular adhesion involving PKC- $\alpha$ -mediated desmoplakin phosphorylation. *J Cell Biol* 201, 681–692. doi: 10.1083/jcb.201208162.
391. Krzyszczyk, P., Schloss, R., Palmer, A., Berthiaume, F., 2018. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in physiology* 9, 419. doi: 10.3389/fphys.2018.00419.
392. Kubanov, A.A., Katunina, O.R., Chikin, V.V., 2015. Expression of Neuropeptides, Neurotrophins, and Neurotransmitters in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Bulletin of experimental biology and medicine* 159, 318–322. doi: 10.1007/s10517-015-2951-4.
393. Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* 27, 95–125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
394. Kumamoto, J.-I., Nakatani, M., Tsutsumi, M., Goto, M., Denda, S., Takei, K., Denda, M., 2014. Coculture system of keratinocytes and dorsal-root-ganglion-derived cells for screening neurotrophic factors involved in guidance of neuronal axon growth in the skin. *Experimental dermatology* 23, 58–60. doi: 10.1111/exd.12288.
395. Kurzen, H., Schallreuter, K.U., 2004. Novel aspects in cutaneous biology of acetylcholine synthesis and acetylcholine receptors. *Exp Dermatol* 13 Suppl 4, 27–30. doi: 10.1111/j.1600-0625.2004.00258.x.
396. Kurzen, H., Berger, H., Jäger, C., Hartschuh, W., Näher, H., Gratchev, A., Goerd, S., Deichmann, M., 2004. Phenotypical and molecular profiling of the extraneuronal cholinergic system of the skin. *J. Invest. Dermatol.* 123, 937–949. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23425.x.
397. Kurzen, H., 2004. The extraneuronal cholinergic system of the skin. Basic facts and clinical relevance. *Hautarzt* 55, 453–459. doi: 10.1007/s00105-004-0724-5.
398. Kurzen, H., Henrich, C., Booken, D., Poenitz, N., Gratchev, A., Klemke, C.-D., Engstner, M., Goerd, S., Maas-Szabowski, N., 2006. Functional characterization of the epidermal cholinergic system in vitro. *J Invest Dermatol* 126, 2458–2472. doi: 10.1038/sj.jid.5700443.
399. Kurzen, H., Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., Kawashima, K., Grando, S.A., 2007. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39, 125–135. doi: 10.1055/s-2007-961816.
400. Kurzen, H., Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., Kawashima, K., Grando, S.A., 2007. The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39, 125–135. doi: 10.1055/s-2007-961816.
401. Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A.L., Wu, Z.-R., Hooper, L.V., Schmidt, R.R., Aulock, S. von, Radek, K.A., Huang, C.-M., Ryan, A.F., Gallo, R.L., 2009. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nature medicine* 15, 1377–1382. doi: 10.1038/nm.2062.

402. Lander, A.D., 2004. A Calculus of Purpose. *PLoS Biology* 2. doi: 10.1371/journal.pbio.0020164.
403. Lauffenburger, D.A., 2000. Cell signaling pathways as control modules: Complexity for simplicity? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5031–5033.
404. Le Nguyen, H.T., Trujillo-Paez, J.V., Umehara, Y., Yue, H., Peng, G., Kiatsurayanon, C., Chieosilapatham, P., Song, P., Okumura, K., Ogawa, H., Ikeda, S., Niyonsaba, F., 2020. Role of Antimicrobial Peptides in Skin Barrier Repair in Individuals with Atopic Dermatitis. *IJMS* 21. doi: 10.3390/ijms21207607.
405. Le Shen, Weber, C.R., Turner, J.R., 2008. The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol* 181, 683–695. doi: 10.1083/jcb.200711165.
406. Lee, C.-H., Chuang, H.-Y., Shih, C.-C., Jong, S.-B., Chang, C.-H., Yu, H.-S., 2006. Transepidermal water loss, serum IgE and beta-endorphin as important and independent biological markers for development of itch intensity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 154, 1100–1107. doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07191.x.
407. Lee, R.S., Sawa, A., 2014. Environmental stressors and epigenetic control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroendocrinology* 100, 278–287. doi: 10.1159/000369585.
408. Lee, S.W., 2019. A Copernican Approach to Brain Advancement: The Paradigm of Allostatic Orchestration. *Frontiers in Human Neuroscience* 13, 129. doi: 10.3389/fnhum.2019.00129.
409. LeMaster, A.M., Krimm, R.F., Davis, B.M., Noel, T., Forbes, M.E., Johnson, J.E., Albers, K.M., 1999. Overexpression of brain-derived neurotrophic factor enhances sensory innervation and selectively increases neuron number. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 5919–5931. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-14-05919.1999.
410. Leon, A., Buriani, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L., Levi-Montalcini, R., 1994. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3739–3743. doi: 10.1073/pnas.91.9.3739.
411. León, B., Ballesteros-Tato, A., Lund, F.E., 2014. Dendritic cells and B cells: unexpected partners in Th2 development. *J. Immunol.* 193, 1531–1537. doi: 10.4049/jimmunol.1400149.
412. Leung, D.Y.M., Bieber, T., 2003. Atopic dermatitis. *Lancet* 361, 151–160. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12193-9.
413. Leung, D.Y.M., 2013. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 62, 151–161. doi: 10.2332/allergolint.13-RAI-0564.
414. Levi, B., Benish, M., Goldfarb, Y., Sorski, L., Melamed, R., Rosenne, E., Ben-Eliyahu, S., 2011. Continuous stress disrupts immunostimulatory effects of IL-12. *Brain Behav Immun* 25, 727–735. doi: 10.1016/j.bbi.2011.01.014.
415. Lewin, G.R., Barde, Y.A., 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annual review of neuroscience* 19, 289–317. doi: 10.1146/annurev.ne.19.030196.001445.
416. Lewin, G.R., Carter, B.D. (Eds.), 2014. *Neurotrophic Factors*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l., 520 pp. ISBN: 9783642451065.

417. Liefferinckx, C., Grève, Z. de, Toubeau, J.-F., Perée, H., Quertinmont, E., Tafciu, V., Minsart, C., Rahmouni, S., Georges, M., Vallée, F., Franchimont, D., 2021. New approach to determine the healthy immune variations by combining clustering methods. *Scientific reports* 11, 8917. doi: 10.1038/s41598-021-88272-x.
418. Lima Giacobbo, B., Doorduyn, J., Klein, H.C., Dierckx, R.A.J.O., Bromberg, E., Vries, E.F.J. de, 2019. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. *Molecular neurobiology* 56, 3295–3312. doi: 10.1007/s12035-018-1283-6.
419. Lin, T.-K., Man, M.-Q., Santiago, J.-L., Scharschmidt, T.C., Hupe, M., Martin-Ezquerria, G., Youm, J.-K., Zhai, Y., Trullas, C., Feingold, K.R., Elias, P.M., 2014. Paradoxical benefits of psychological stress in inflammatory dermatoses models are glucocorticoid mediated. *J Invest Dermatol* 134, 2890–2897. doi: 10.1038/jid.2014.265.
420. Linz, R., Puhlmann, L.M.C., Apostolakou, F., Mantzou, E., Papassotiropoulos, I., Chrousos, G.P., Engert, V., Singer, T., 2019. Acute psychosocial stress increases serum BDNF levels: an antagonistic relation to cortisol but no group differences after mental training. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology. doi: 10.1038/s41386-019-0391-y.
421. Liu, Y., Beyer, A., Aebersold, R., 2016. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 165, 535–550. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.014.
422. Li, X., James, W.M., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., 1995. Application of biotin, digoxigenin or fluorescein conjugated deoxynucleotides to label DNA strand breaks for analysis of cell proliferation and apoptosis using flow cytometry. *Biotechnic & histochemistry* : official publication of the Biological Stain Commission 70, 234–242. doi: 10.3109/10520299509108200.
423. Lou, H., Lu, J., Choi, E.B., Oh, M.H., Jeong, M., Barmettler, S., Zhu, Z., Zheng, T., 2017. Expression of IL-22 in the Skin Causes Th2-Biased Immunity, Epidermal Barrier Dysfunction, and Pruritus via Stimulating Epithelial Th2 Cytokines and the GRP Pathway. *J. Immunol.* 198, 2543–2555. doi: 10.4049/jimmunol.1600126.
424. Lu, B., Nagappan, G., Lu, Y., 2014. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol* 220, 223–250. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5\_9.
425. Luger, T., Amagai, M., Dreno, B., Dagnelie, M.-A., Liao, W., Kabashima, K., Schikowski, T., Proksch, E., Elias, P.M., Simon, M., Simpson, E., Grinich, E., Schmuth, M., 2021. Atopic dermatitis: Role of the skin barrier, environment, microbiome, and therapeutic agents. *J Dermatol Sci* 102, 142–157. doi: 10.1016/j.jdermsci.2021.04.007.
426. Maarouf, M., Maarouf, C.L., Yosipovitch, G., Shi, V.Y., 2019. The impact of stress on epidermal barrier function: an evidence-based review. *Br J Dermatol.* doi: 10.1111/bjd.17605.
427. Mackay, L.K., Stock, A.T., Ma, J.Z., Jones, C.M., Kent, S.J., Mueller, S.N., Heath, W.R., Carbone, F.R., Gebhardt, T., 2012. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 7037–7042. doi: 10.1073/pnas.1202288109.
428. MacLeod, A.S., Hemmers, S., Garijo, O., Chabod, M., Mowen, K., Witherden, D.A., Havran, W.L., 2013. Dendritic epidermal T cells regulate skin antimicrobial barrier function. *The Journal of clinical investigation* 123, 4364–4374. doi: 10.1172/JCI170064.
429. Madison, K.C., 2003. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121, 231–241. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12359.x.
430. Madouri, F., Chenuet, P., Beuraud, C., Fauconnier, L., Marchiol, T., Rouxel, N., Ledru, A., Gallerand, M., Lombardi, V., Mascarell, L., Marquant, Q., Apetoh, L., Erard, F., Le Bert, M., Trovero, F., Quesniaux, V.F.J., Ryffel, B., Togbe, D., 2017. Protein kinase C $\theta$  controls type 2

- innate lymphoid cell and TH2 responses to house dust mite allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 139, 1650–1666. doi: 10.1016/j.jaci.2016.08.044.
431. Maes, M., Song, C., Lin, A., Jongh, R. de, van Gastel, A., Kenis, G., Bosmans, E., Meester, I. de, Benoy, I., Neels, H., Demedts, P., Janca, A., Scharpé, S., Smith, R.S., 1998. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 10, 313–318. doi: 10.1006/cyto.1997.0290.
432. Magin, T.M., Vijayaraj, P., Leube, R.E., 2007. Structural and regulatory functions of keratins. *Exp Cell Res* 313, 2021–2032. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.03.005.
433. Ma, L., Xue, H.-B., Guan, X.-H., Shu, C.-M., Zhang, J.-H., Yu, J., 2014. Possible pathogenic role of T helper type 9 cells and interleukin (IL)-9 in atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Immunology* 175, 25–31. doi: 10.1111/cei.12198.
434. Malone, J.H., Oliver, B., 2011. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC biology* 9, 34. doi: 10.1186/1741-7007-9-34.
435. Mandelbrot, B.B., 1983. *The fractal geometry of nature*. W. H. Freeman and Company, New York, 468 pp. ISBN: 0716711869.
436. Mansfield, K., Naik, S., 2020. Unraveling Immune-Epithelial Interactions in Skin Homeostasis and Injury. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 93, 133–143.
437. Manti, S., Brown, P., Perez, M.K., Piedimonte, G., 2017. The Role of Neurotrophins in Inflammation and Allergy. *Vitamins and hormones* 104, 313–341. doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.010.
438. Marconi, A., Vaschieri, C., Zanoli, S., Giannetti, A., Pincelli, C., 1999. Nerve growth factor protects human keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis. *J Invest Dermatol* 113, 920–927. doi: 10.1046/j.1523-1747.1999.00773.x.
439. Marconi, A., Terracina, M., Fila, C., Franchi, J., Bonte, F., Romagnoli, G., Maurelli, R., Failla, C.M., Dumas, M., Pincelli, C., 2003. Expression and function of neurotrophins and their receptors in cultured human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 121, 1515–1521. doi: 10.1111/j.1523-1747.2003.12624.x.
440. Marek-Jozefowicz, L., Czajkowski, R., Borkowska, A., Nedoszytko, B., Żmijewski, M.A., Cubala, W.J., Slominski, A.T., 2022. The Brain-Skin Axis in Psoriasis-Psychological, Psychiatric, Hormonal, and Dermatological Aspects. *IJMS* 23. doi: 10.3390/ijms23020669.
441. Mariotti, A., 2015. The effects of chronic stress on health: new insights into the molecular mechanisms of brain-body communication. *Future science OA* 1, FSO23. doi: 10.4155/fso.15.21.
442. Marosi, K., Mattson, M.P., 2014. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25, 89–98. doi: 10.1016/j.tem.2013.10.006.
443. Marsland, A.L., Walsh, C., Lockwood, K., John-Henderson, N.A., 2017. The effects of acute psychological stress on circulating and stimulated inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun* 64, 208–219. doi: 10.1016/j.bbi.2017.01.011.
444. Marunaka, K., Kobayashi, M., Shu, S., Matsunaga, T., Ikari, A., 2019. Brazilian Green Propolis Rescues Oxidative Stress-Induced Mislocalization of Claudin-1 in Human Keratinocyte-Derived HaCaT Cells. *IJMS* 20. doi: 10.3390/ijms20163869.
445. Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Fujii, T., 2021. Regulation of Immune Functions by Non-Neuronal Acetylcholine (ACh) via Muscarinic and Nicotinic ACh Receptors. *IJMS* 22. doi: 10.3390/ijms22136818.

446. Maslove, D.M., Wong, H.R., 2014. Gene expression profiling in sepsis: timing, tissue, and translational considerations. *Trends in molecular medicine* 20, 204–213. doi: 10.1016/j.molmed.2014.01.006.
447. Massey, K.A., Zago, W.M., Berg, D.K., 2006. BDNF up-regulates alpha7 nicotinic acetylcholine receptor levels on subpopulations of hippocampal interneurons. *Molecular and cellular neurosciences* 33, 381–388. doi: 10.1016/j.mcn.2006.08.011.
448. Matsumura, S., Terao, M., Murota, H., Katayama, I., 2015. Th2 cytokines enhance TrkA expression, upregulate proliferation, and downregulate differentiation of keratinocytes. *Journal of Dermatological Science* 78, 215–223. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.02.021.
449. Matter, K., Balda, M.S., 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 225–236. doi: 10.1038/nrm1055.
450. Mattson, M.P., 2012. Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell metabolism* 16, 706–722. doi: 10.1016/j.cmet.2012.08.012.
451. Matzinger, P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 12, 991–1045. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.005015.
452. McEwen, B.S., Seeman, T., 1999. Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 896, 30–47. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb08103.x.
453. McInnes, I.B., Gravalles, E.M., 2021. Immune-mediated inflammatory disease therapeutics: past, present and future. *Nature reviews. Immunology* 21, 680–686. doi: 10.1038/s41577-021-00603-1.
454. Meaney, M.J., Szyf, M., 2005. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 7, 103–123. doi: 10.31887/DCNS.2005.7.2/mmeaney.
455. Mehta, D., Granstein, R.D., 2019. Immunoregulatory Effects of Neuropeptides on Endothelial Cells: Relevance to Dermatological Disorders. *Dermatology* 235, 175–186. doi: 10.1159/000496538.
456. Menon, G.K., Grayson, S., Elias, P.M., 1985. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol* 84, 508–512. doi: 10.1111/1523-1747.ep12273485.
457. Menon, G.K., Feingold, K.R., Elias, P.M., 1992. Lamellar body secretory response to barrier disruption. *J Invest Dermatol* 98, 279–289. doi: 10.1111/1523-1747.ep12497866.
458. Menon, G.K., Kligman, A.M., 2009. Barrier functions of human skin: a holistic view. *Skin Pharmacol Physiol* 22, 178–189. doi: 10.1159/000231523.
459. Mestas, J., Hughes, C.C.W., 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172, 2731–2738. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731.
460. Meštrović-Štefekov, J., Novak-Bilić, G., Kuna, M., Pap, N., Lugović-Mihić, L., 2018. Psychological Stress in Patients with Atopic Dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat* 26, 297–303.
461. Meyer, T.N., Schwesinger, C., Ye, J., Denker, B.M., Nigam, S.K., 2001. Reassembly of the tight junction after oxidative stress depends on tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 276, 22048–22055. doi: 10.1074/jbc.M011477200.

462. Micallef, L., Belaubre, F., Pinon, A., Jayat-Vignoles, C., Delage, C., Charveron, M., Simon, A., 2009. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol* 18, 143–151. doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00775.x.
463. Mihm Jr., Martin C., SOTER, N.A., Dvorak, H.F., Austen, K.F., 1976. THE STRUCTURE OF NORMAL SKIN AND THE MORPHOLOGY OF ATOPIC ECZEMA. *J Invest Dermatol* 67, 305–312. doi: 10.1111/1523-1747.ep12514346.
464. Miller, G.E., Chen, E., Zhou, E.S., 2007. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychological bulletin* 133, 25–45. doi: 10.1037/0033-2909.133.1.25.
465. Miller, L.S., Modlin, R.L., 2007. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *J Invest Dermatol* 127, 262–263. doi: 10.1038/sj.jid.5700559.
466. Misery, L., 2011. Atopic dermatitis and the nervous system. *Clinical reviews in allergy & immunology* 41, 259–266. doi: 10.1007/s12016-010-8225-z.
467. Mishra, N.C., Rir-sima-ah, J., Boyd, R.T., Singh, S.P., Gundavarapu, S., Langley, R.J., Razani-Boroujerdi, S., Sopori, M.L., 2010. Nicotine inhibits Fc epsilon RI-induced cysteinyl leukotrienes and cytokine production without affecting mast cell degranulation through alpha 7/alpha 9/alpha 10-nicotinic receptors. *J. Immunol.* 185, 588–596. doi: 10.4049/jimmunol.0902227.
468. Mitchell, M., 2006. Complex systems: Network thinking. *Artificial Intelligence* 170, 1194–1212. doi: 10.1016/j.artint.2006.10.002.
469. Miyagaki, T., Sugaya, M., 2015. Recent advances in atopic dermatitis and psoriasis: Genetic background, barrier function, and therapeutic targets. *Journal of Dermatological Science* 78, 89–94. doi: 10.1016/j.jdermsci.2015.02.010.
470. Mizawa, M., Yamaguchi, M., Ueda, C., Makino, T., Shimizu, T., 2013. Stress evaluation in adult patients with atopic dermatitis using salivary cortisol. *BioMed research international* 2013, 138027. doi: 10.1155/2013/138027.
471. Möbus, L., Rodriguez, E., Harder, I., Stölzl, D., Boraczynski, N., Gerdes, S., Kleinheinz, A., Abraham, S., Heratizadeh, A., Handrick, C., Haufe, E., Werfel, T., Schmitt, J., Weidinger, S., 2020. Atopic dermatitis displays stable and dynamic skin transcriptome signatures. *J. Allergy Clin. Immunol.* doi: 10.1016/j.jaci.2020.06.012.
472. Moelans, C.B., Hoeve, N. ter, van Ginkel, J.-W., Kate, F.J. ten, van Diest, P.J., 2011. Formaldehyde substitute fixatives. Analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis. *American journal of clinical pathology* 136, 548–556. doi: 10.1309/AJCPHH1B0COCBGOM.
473. Mollanazar, N.K., Smith, P.K., Yosipovitch, G., 2016. Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis: Getting the Itch Out? *Clinical reviews in allergy & immunology* 51, 263–292. doi: 10.1007/s12016-015-8488-5.
474. Moriwaki, Y., Yoshikawa, K., Fukuda, H., Fujii, Y.X., Misawa, H., Kawashima, K., 2007. Immune system expression of SLURP-1 and SLURP-2, two endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Life Sci* 80, 2365–2368. doi: 10.1016/j.lfs.2006.12.028.
475. Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology* 8, 958–969. doi: 10.1038/nri2448.
476. Moyle, M., Cevikbas, F., Harden, J.L., Guttman-Yassky, E., 2019. Understanding the immune landscape in atopic dermatitis: The era of biologics and emerging therapeutic approaches. *Experimental dermatology* 28, 756–768. doi: 10.1111/exd.13911.

477. Mraz, V., Geisler, C., Bonefeld, C.M., 2020. Dendritic Epidermal T Cells in Allergic Contact Dermatitis. *Frontiers in Immunology* 11, 874. doi: 10.3389/fimmu.2020.00874.
478. Muller, E.J., Williamson, L., Kolly, C., Suter, M.M., 2008. Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? *J Invest Dermatol* 128, 501–516. doi: 10.1038/sj.jid.5701248.
479. Municio, C., Criado, G., 2020. Therapies Targeting Trained Immune Cells in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology* 11, 631743. doi: 10.3389/fimmu.2020.631743.
480. Muresan, Z., Paul, D.L., Goodenough, D.A., 2000. Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Mol Biol Cell* 11, 627–634. doi: 10.1091/mbc.11.2.627.
481. Murray, D.R., Prabhu, S.D., Chandrasekar, B., 2000. Chronic beta-adrenergic stimulation induces myocardial proinflammatory cytokine expression. *Circulation* 101, 2338–2341. doi: 10.1161/01.cir.101.20.2338.
482. Muthu, K., Deng, J., Gamelli, R., Shankar, R., Jones, S.B., 2005. Adrenergic modulation of cytokine release in bone marrow progenitor-derived macrophage following polymicrobial sepsis. *J Neuroimmunol* 158, 50–57. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.08.003.
483. Nadal, E. de, Ammerer, G., Posas, F., 2011. Controlling gene expression in response to stress. *Nature reviews. Genetics* 12, 833–845. doi: 10.1038/nrg3055.
484. Naert, G., Zussy, C., van Tran Ba, C., Chevallier, N., Tang, Y.-P., Maurice, T., Givalois, L., 2015. Involvement of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *Journal of neuroendocrinology* 27, 850–860. doi: 10.1111/jne.12324.
485. Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M.J., Salcedo, R., Kastentmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., Spencer, S., Hall, J.A., Dzutsev, A., Kong, H., Campbell, D.J., Trinchieri, G., Segre, J.A., Belkaid, Y., 2012. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science (New York, N.Y.)* 337, 1115–1119. doi: 10.1126/science.1225152.
486. Naik, S., Bouladoux, N., Linehan, J.L., Han, S.-J., Harrison, O.J., Wilhelm, C., Conlan, S., Himmelfarb, S., Byrd, A.L., Deming, C., Quinones, M., Brenchley, J.M., Kong, H.H., Tussiwand, R., Murphy, K.M., Merad, M., Segre, J.A., Belkaid, Y., 2015. Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. *Nature* 520, 104–108. doi: 10.1038/nature14052.
487. Naik, S., 2022. One Size Does Not Fit All: Diversifying Immune Function in the Skin. *J. Immunol.* 208, 227–234. doi: 10.4049/jimmunol.2100758.
488. Na, K., Lkhagva-Yondon, E., Kim, M., Lim, Y.-R., Shin, E., Lee, C.-K., Jeon, M.-S., 2020. Oral treatment with Aloe polysaccharide ameliorates ovalbumin-induced atopic dermatitis by restoring tight junctions in skin. *Scandinavian journal of immunology* 91, e12856. doi: 10.1111/sji.12856.
489. Ndoye, A., Buchli, R., Greenberg, B., Nguyen, V.T., Zia, S., Rodriguez, J.G., Webber, R.J., Lawry, M.A., Grando, S.A., 1998. Identification and mapping of keratinocyte muscarinic acetylcholine receptor subtypes in human epidermis. *J Invest Dermatol* 111, 410–416. doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00299.x.
490. Nedoszytko, B., Reszka, E., Gutowska-Owsiak, D., Trzeciak, M., Lange, M., Jarczak, J., Niedoszytko, M., Jablonska, E., Romantowski, J., Strapagiel, D., Skokowski, J., Siekierzycka, A., Nowicki, R.J., Dobrucki, I.T., Zaryczńska, A., Kalinowski, L., 2020. Genetic and Epigenetic Aspects of Atopic Dermatitis. *International journal of molecular sciences* 21. doi: 10.3390/ijms21186484.

491. Negoescu, A., Lorimier, P., Labat-Moleur, F., Drouet, C., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C., Brambilla, E., 1996. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 44, 959–968. doi: 10.1177/44.9.8773561.
492. Nemes, Z., Steinert, P.M., 1999. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Experimental & molecular medicine* 31, 5–19. doi: 10.1038/emm.1999.2.
493. Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., Nickoloff, B.J., 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 9, 679–691. doi: 10.1038/nri2622.
494. Nguyen, V.T., Ndoye, A., Hall, L.L., Zia, S., Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Kist, D.A., Zelickson, B.D., Lawry, M.A., Grando, S.A., 2001. Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. *J Cell Sci* 114, 1189–1204.
495. Nickoloff, B.J., Turka, L.A., 1994. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunology Today* 15, 464–469. doi: 10.1016/0167-5699(94)90190-2.
496. Niebuhr, M., Scharonow, H., Gathmann, M., Mamerow, D., Werfel, T., 2010. Staphylococcal exotoxins are strong inducers of IL-22: A potential role in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 1176–83.e4. doi: 10.1016/j.jaci.2010.07.041.
497. Nie, J., Fu, X., Han, W., 2013. Microenvironment-dependent homeostasis and differentiation of epidermal basal undifferentiated keratinocytes and their clinical applications in skin repair. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27, 531–535. doi: 10.1111/j.1468-3083.2012.04704.x.
498. Nielsen, M.M., Witherden, D.A., Havran, W.L., 2017.  $\gamma\delta$  T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nature reviews. Immunology* 17, 733–745. doi: 10.1038/nri.2017.101.
499. Niessen, C.M., 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127, 2525–2532. doi: 10.1038/sj.jid.5700865.
500. Nilsson, G., Forsberg-Nilsson, K., Xiang, Z., Hallböök, F., Nilsson, K., Metcalfe, D.D., 1997. Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *European journal of immunology* 27, 2295–2301. doi: 10.1002/eji.1830270925.
501. Nockher, W.A., Renz, H., 2003. Neurotrophins in inflammatory lung diseases: modulators of cell differentiation and neuroimmune interactions. *Cytokine & growth factor reviews* 14, 559–578. doi: 10.1016/S1359-6101(03)00071-6.
502. Nockher, W.A., Renz, H., 2005. Neurotrophins in clinical diagnostics: pathophysiology and laboratory investigation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 352, 49–74. doi: 10.1016/j.cccn.2004.10.002.
503. Nockher, W.A., Renz, H., 2006. Neurotrophins and asthma: novel insight into neuroimmune interaction. *J Allergy Clin Immunol* 117, 67–71. doi: 10.1016/j.jaci.2005.08.029.
504. Nockher, W.A., Renz, H., 2006. Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *J Allergy Clin Immunol* 117, 583–589. doi: 10.1016/j.jaci.2005.11.049.
505. Noelle, R.J., Nowak, E.C., 2010. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nature reviews. Immunology* 10, 683–687. doi: 10.1038/nri2848.
506. Nomura, T., Kabashima, K., Miyachi, Y., 2014. The panoply of  $\alpha\beta$ T cells in the skin. *Journal of Dermatological Science* 76, 3–9. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.07.010.

507. Nomura, T., Yoshida-Amano, Y., Yoshida, K., Fujii, A., Tanahashi, M., Sugiyama, Y., Iwata, K., Murase, T., 2017. Relationships between transepidermal water loss, cutaneous microcirculatory function and autonomic nervous activity. *International Journal of Cosmetic Science* 39, 275–283. doi: 10.1111/ics.12373.
508. Noti, M., 2018. New perspectives on the initiation of allergic immune responses at barrier sites. *Current opinion in immunology* 54, 130–136. doi: 10.1016/j.coi.2018.07.001.
509. Obi, I.E., McPherson, K.C., Pollock, J.S., 2019. Childhood adversity and mechanistic links to hypertension risk in adulthood. *Br J Pharmacol* 176, 1932–1950. doi: 10.1111/bph.14576.
510. Ockenga, W., Kühne, S., Bocksberger, S., Banning, A., Tikkanen, R., 2014. Epidermal growth factor receptor transactivation is required for mitogen-activated protein kinase activation by muscarinic acetylcholine receptors in HaCaT keratinocytes. *IJMS* 15, 21433–21454. doi: 10.3390/ijms151121433.
511. Ofek, K., Soreq, H., 2013. Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. *Chemico-biological interactions* 203, 113–119. doi: 10.1016/j.cbi.2012.07.007.
512. Oh, S.H., Bae, B.G., Park, C.O., Noh, J.Y., Park, I.H., Wu, W.H., Lee, K.H., 2010. Association of stress with symptoms of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 90, 582–588. doi: 10.2340/00015555-0933.
513. Oleszycka, E., Kwiecien, K., Kwiecinska, P., Morytko, A., Pocalun, N., Camacho, M., Brzoza, P., Zabel, B.A., Cichy, J., 2022. Soluble mediators in the function of the epidermal-immune-neuro unit in the skin. *Front. Immunol.* 13, 1003970. doi: 10.3389/fimmu.2022.1003970.
514. Olofsson, P.S., Rosas-Ballina, M., Levine, Y.A., Tracey, K.J., 2012. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunological reviews* 248, 188–204. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01138.x.
515. O'Neill, C.A., Garrod, D., 2011. Tight junction proteins and the epidermis. *Exp Dermatol* 20, 88–91. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01206.x.
516. Orfali, R.L., Zaniboni, M.C., Aoki, V., 2017. Profile of skin barrier proteins and cytokines in adults with atopic dermatitis. *G Ital Dermatol Venereol* 152, 140–147. doi: 10.23736/S0392-0488.16.05533-4.
517. Orion, E., Wolf, R., 2012. Psychological stress and epidermal barrier function. *Clin Dermatol* 30, 280–285. doi: 10.1016/j.cindermatol.2011.08.014.
518. Orr-Urtreger, A., Goldner, F.M., Saeki, M., Lorenzo, I., Goldberg, L., Biasi, M. de, Dani, J.A., Patrick, J.W., Beaudet, A.L., 1997. Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 9165–9171. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-23-09165.1997.
519. Osborne-Hereford, A.V., Rogers, S.W., Gahring, L.C., 2008. Neuronal nicotinic alpha7 receptors modulate inflammatory cytokine production in the skin following ultraviolet radiation. *J Neuroimmunol* 193, 130–139. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.10.029.
520. Otten, U., Baumann, J.B., Girard, J., 1979. Stimulation of the pituitary-adrenocortical axis by nerve growth factor. *Nature* 282, 413–414. doi: 10.1038/282413a0.
521. Pacheco, R., Contreras, F., Prado, C., 2012. Cells, Molecules and Mechanisms Involved in the Neuro-Immune Interaction. In: *Cell Interaction*. InTech. doi: 10.5772/48367.

522. Papanthanasoglou, E.D.E., Miltiadous, P., Karanikola, M.N., 2015. May BDNF Be Implicated in the Exercise-Mediated Regulation of Inflammation? Critical Review and Synthesis of Evidence. *Biological Research For Nursing* 17, 521–539. doi: 10.1177/1099800414555411.
523. Pasparakis, M., Haase, I., Nestle, F.O., 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 14, 289–301. doi: 10.1038/nri3646.
524. Passeron, T., Krutmann, J., Andersen, M.L., Katta, R., Zouboulis, C.C., 2020. Clinical and biological impact of the exposome on the skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 34 Suppl 4, 4–25. doi: 10.1111/jdv.16614.
525. Passeron, T., Zouboulis, C.C., Tan, J., Andersen, M.L., Katta, R., Lyu, X., Aguilar, L., Kerob, D., Morita, A., Krutmann, J., Peters, E.M.J., 2021. Adult skin acute stress responses to short-term environmental and internal aggression from exposome factors. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. doi: 10.1111/jdv.17432.
526. Patrick, M.T., Raja, K., Miller, K., Sotzen, J., Gudjonsson, J.E., Elder, J.T., Tsoi, L.C., 2019. Drug Repurposing Prediction for Immune-Mediated Cutaneous Diseases using a Word-Embedding-Based Machine Learning Approach. *J Invest Dermatol* 139, 683–691. doi: 10.1016/j.jid.2018.09.018.
527. Paus, R., Theoharides, T.C., Arck, P.C., 2006. Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'. *Trends in Immunology* 27, 32–39. doi: 10.1016/j.it.2005.10.002.
528. Pavlovic, S., Daniltchenko, M., Tobin, D.J., Hagen, E., Hunt, S.P., Klapp, B.F., Arck, P.C., Peters, E.M.J., 2008. Further exploring the brain-skin connection: stress worsens dermatitis via substance P-dependent neurogenic inflammation in mice. *J Invest Dermatol* 128, 434–446. doi: 10.1038/sj.jid.5701079.
529. Pavlovic, S., Liezmann, C., Blois, S.M., Joachim, R., Kruse, J., Romani, N., Klapp, B.F., Peters, E.M.J., 2011. Substance P Is a Key Mediator of Stress-Induced Protection from Allergic Sensitization via Modified Antigen Presentation. *The Journal of Immunology* 186, 848–855. doi: 10.4049/jimmunol.0903878.
530. Pavlov, V.A., Wang, H., Czura, C.J., Friedman, S.G., Tracey, K.J., 2003. The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation. *Molecular Medicine* 9, 125–134.
531. Pavlov, V.A., Tracey, K.J., 2005. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun* 19, 493–499. doi: 10.1016/j.bbi.2005.03.015.
532. Percoco, G., Bénard, M., Ramdani, Y., Lati, E., Lefevre, L., Driouch, A., Follet-Gueye, M.-L., 2012. Isolation of human epidermal layers by laser capture microdissection: application to the analysis of gene expression by quantitative real-time PCR. *Exp Dermatol* 21, 531–534. doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01509.x.
533. Petecchia, L., Sabatini, F., Usai, C., Caci, E., Varesio, L., Rossi, G.A., 2012. Cytokines induce tight junction disassembly in airway cells via an EGFR-dependent MAPK/ERK1/2-pathway. *Lab Invest* 92, 1140–1148. doi: 10.1038/labinvest.2012.67.
534. Peters, Eva M J, Hansen, M.G., Overall, R.W., Nakamura, M., Pertile, P., Klapp, B.F., Arck, P.C., Paus, R., 2005. Control of human hair growth by neurotrophins: brain-derived neurotrophic factor inhibits hair shaft elongation, induces catagen, and stimulates follicular transforming growth factor beta2 expression. *J Invest Dermatol* 124, 675–685. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23648.x.
535. Peters, Eva M J, 2012. The neuroendocrine-immune connection regulates chronic inflammatory disease in allergy. *Chemical immunology and allergy* 98, 240–252. doi: 10.1159/000336527.

536. Peters, Eva M J, Liezmann, C., Klapp, B.F., Kruse, J., 2012. The neuroimmune connection interferes with tissue regeneration and chronic inflammatory disease in the skin. *Ann N Y Acad Sci* 1262, 118–126. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06647.x.
537. Peters, Eva Milena Johanne, Michenko, A., Kupfer, J., Kummer, W., Wiegand, S., Niemeier, V., Potekaev, N., Lvov, A., Gieler, U., 2014. Mental stress in atopic dermatitis–neuronal plasticity and the cholinergic system are affected in atopic dermatitis and in response to acute experimental mental stress in a randomized controlled pilot study. *PLoS One* 9, e113552. doi: 10.1371/journal.pone.0113552.
538. Peters, E.M., Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Tobin, D.J., Paus, R., 2001. Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides. *The Journal of investigative dermatology* 116, 236–245. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01232.x.
539. Peters, E.M.J., Handjiski, B., Kuhlmei, A., Hagen, E., Bielas, H., Braun, A., Klapp, B.F., Paus, R., Arck, P.C., 2004. Neurogenic Inflammation in Stress-Induced Termination of Murine Hair Growth Is Promoted by Nerve Growth Factor. *The American journal of pathology* 165, 259–271. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63294-4.
540. Peters, E.M.J., Ericson, M.E., Hosoi, J., Seiffert, K., Hordinsky, M.K., Ansel, J.C., Paus, R., Scholzen, T.E., 2006. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol* 126, 1937–1947. doi: 10.1038/sj.jid.5700429.
541. Peters, E.M.J., Raap, U., Welker, P., Tanaka, A., Matsuda, H., Pavlovic-Masnicosa, S., Hendrix, S., Pincelli, C., 2007. Neurotrophins act as neuroendocrine regulators of skin homeostasis in health and disease. *Horm Metab Res* 39, 110–124. doi: 10.1055/s-2007-961812.
542. Peters, E.M.J., Liezmann, C., Spatz, K., Daniltchenko, M., Joachim, R., Gimenez-Rivera, A., Hendrix, S., Botchkarev, V.A., Brandner, J.M., Klapp, B.F., 2011. Nerve growth factor partially recovers inflamed skin from stress-induced worsening in allergic inflammation. *J Invest Dermatol* 131, 735–743. doi: 10.1038/jid.2010.317.
543. Peters, E.M.J., 2016. Stressed skin?—a molecular psychosomatic update on stress-causes and effects in dermatologic diseases. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 14, 233-52; quiz 253. doi: 10.1111/ddg.12957.
544. Phillips, T.M., Wellner, E.F., 2009. Chip-based immunoaffinity CE: application to the measurement of brain-derived neurotrophic factor in skin biopsies. *Electrophoresis* 30, 2307–2312. doi: 10.1002/elps.200900095.
545. Piipponen, M., Li, D., Landén, N.X., 2020. The Immune Functions of Keratinocytes in Skin Wound Healing. *IJMS* 21. doi: 10.3390/ijms21228790.
546. Pincelli, C., Sevigani, C., Manfredini, R., Grande, A., Fantini, F., Bracci-Laudiero, L., Aloe, L., Ferrari, S., Cossarizza, A., Giannetti, A., 1994. Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 103, 13–18. doi: 10.1111/1523-1747.ep12388914.
547. Pincelli, C., Yaar, M., 1997. Nerve growth factor: its significance in cutaneous biology. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2, 31–36. doi: 10.1038/jidsymp.1997.8.
548. Pincelli, C., Marconi, A., 2000. Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 22, 71–79. doi: 10.1016/S0923-1811(99)00065-1.
549. Piñeiro, A.J., Houser, A.E., Ji, A.L., 2022. Research Techniques Made Simple: Spatial Transcriptomics. *J Invest Dermatol* 142, 993-1001.e1. doi: 10.1016/j.jid.2021.12.014.

550. Pinnagoda, J., Tupker, R.A., Agner, T., Serup, J., 1990. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 22, 164–178. doi: 10.1111/j.1600-0536.1990.tb01553.x.
551. Pisarchik, A.N., Hramov, A.E. (Eds.), 2022. Multistability in physical and living systems: Characterization and applications. Springer, Cham, Switzerland. ISBN: 978-3-030-98395-6.
552. Pondeljnak, N., Lugović-Mihčić, L., 2020. Stress-induced Interaction of Skin Immune Cells, Hormones, and Neurotransmitters. *Clinical therapeutics* 42, 757–770. doi: 10.1016/j.clinthera.2020.03.008.
553. Pongratz, G., Straub, R.H., 2014. The sympathetic nervous response in inflammation. *Arthritis Res Ther* 16, 504. doi: 10.1186/s13075-014-0504-2.
554. Proksch, E., Folster-Holst, R., Jensen, J.-M., 2006. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J Dermatol Sci* 43, 159–169. doi: 10.1016/j.jdermsci.2006.06.003.
555. Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.-M., 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17, 1063–1072. doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
556. Pummi, K., Malminen, M., Aho, H., Karvonen, S.L., Peltonen, J., Peltonen, S., 2001. Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol* 117, 1050–1058. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01493.x.
557. Qian, J., Galitovskiy, V., Chernyavsky, A.I., Marchenko, S., Grando, S.A., 2011. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naïve CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. *Genes and immunity* 12, 222–230. doi: 10.1038/gene.2010.72.
558. Raap, U., Werfel, T., Jaeger, B., Schmid-Ott, G., 2003. Atopische Dermatitis und psychischer Stress. *Hautarzt* 54, 925–929. doi: 10.1007/s00105-003-0609-z.
559. Raap, U., Goltz, C., Deneka, N., Bruder, M., Renz, H., Kapp, A., Wedi, B., 2005. Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 115, 1268–1275. doi: 10.1016/j.jaci.2005.02.007.
560. Raap, U., Kapp, A., 2005. Neuroimmunological findings in allergic skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5, 419–424. doi: 10.1097/01.all.0000183111.78558.4d.
561. Raap, U., Werfel, T., Goltz, C., Deneka, N., Langer, K., Bruder, M., Kapp, A., Schmid-Ott, G., Wedi, B., 2006. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with disease severity in the intrinsic type of atopic dermatitis. *Allergy* 61, 1416–1418. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01210.x.
562. Raap, U., Deneka, N., Bruder, M., Kapp, A., Wedi, B., 2008. Differential up-regulation of neurotrophin receptors and functional activity of neurotrophins on peripheral blood eosinophils of patients with allergic rhinitis, atopic dermatitis and nonatopic subjects. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38, 1493–1498. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.03035.x.
563. Radek, K.A., Elias, P.M., Taupenot, L., Mahata, S.K., O'Connor, D.T., Gallo, R.L., 2010. Neuroendocrine nicotinic receptor activation increases susceptibility to bacterial infections by suppressing antimicrobial peptide production. *Cell Host & Microbe* 7, 277–289. doi: 10.1016/j.chom.2010.03.009.

564. Radka, S.F., Hoist, P.A., Fritsche, M., Altar, C.A., 1996. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res* 709, 122–130. doi: 10.1016/0006-8993(95)01321-0.
565. Raison, C.L., Miller, A.H., 2003. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *The American journal of psychiatry* 160, 1554–1565. doi: 10.1176/appi.ajp.160.9.1554.
566. Raison, C.L., Capuron, L., Miller, A.H., 2006. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology* 27, 24–31. doi: 10.1016/j.it.2005.11.006.
567. Ramms, L., Fabris, G., Windoffer, R., Schwarz, N., Springer, R., Zhou, C., Lazar, J., Stiefel, S., Hersch, N., Schnakenberg, U., Magin, T.M., Leube, R.E., Merkel, R., Hoffmann, B., 2013. Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18513–18518. doi: 10.1073/pnas.1313491110.
568. Ramos-Vara, J.A., 2017. Principles and Methods of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1641, 115–128. doi: 10.1007/978-1-4939-7172-5\_5.
569. Rapin, N., Mosekilde, E., Lund, O., 2011. Bistability in autoimmune diseases. *Autoimmunity* 44, 256–260. doi: 10.3109/08916934.2010.523233.
570. Rassner, U., Feingold, K.R., Crumrine, D.A., Elias, P.M., 1999. Coordinate assembly of lipids and enzyme proteins into epidermal lamellar bodies. *Tissue & cell* 31, 489–498. doi: 10.1054/tice.1999.0050.
571. Reich, A., Wojcik-Maciejowicz, A., Slominski, A.T., 2010. Stress and the skin. *G Ital Dermatol Venereol* 145, 213–219.
572. Richmond, J.M., Strassner, J.P., Essien, K.I., Harris, J.E., 2019. T-cell positioning by chemokines in autoimmune skin diseases. *Immunological reviews* 289, 186–204. doi: 10.1111/imr.12762.
573. Rittié, L., 2016. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal of cell communication and signaling* 10, 103–120. doi: 10.1007/s12079-016-0330-1.
574. Roediger, B., Kyle, R., Yip, K.H., Sumaria, N., Guy, T.V., Kim, B.S., Mitchell, A.J., Tay, S.S., Jain, R., Forbes-Blom, E., Chen, X., Tong, P.L., Bolton, H.A., Artis, D., Paul, W.E., Fazekas de St Groth, B., Grimbaldston, M.A., Le Gros, G., Weninger, W., 2013. Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nature immunology* 14, 564–573. doi: 10.1038/ni.2584.
575. Roesner, L.M., Werfel, T., 2019. Autoimmunity (or Not) in Atopic Dermatitis. *Front. Immunol.* 10, 2128. doi: 10.3389/fimmu.2019.02128.
576. Roggenkamp, D., Kopnick, S., Stab, F., Wenck, H., Schmelz, M., Neufang, G., 2013. Epidermal nerve fibers modulate keratinocyte growth via neuropeptide signaling in an innervated skin model. *J Invest Dermatol* 133, 1620–1628. doi: 10.1038/jid.2012.464.
577. Rohleder, N., Wolf, J.M., Kirschbaum, C., 2003. Glucocorticoid sensitivity in humans: interindividual differences and acute stress effects. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 6, 207–222. doi: 10.1080/1025389031000153658.
578. Rohleder, N., Wolf, J.M., Wolf, O.T., 2010. Glucocorticoid sensitivity of cognitive and inflammatory processes in depression and posttraumatic stress disorder. *Psychophysiological Biomarkers of Health* 35, 104–114. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.12.003.
579. Rohleder, N., 2012. Acute and chronic stress induced changes in sensitivity of peripheral inflammatory pathways to the signals of multiple stress systems --2011 Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology* 37, 307–316. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.12.015.

580. Romani, L., 2008. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Medical mycology* 46, 515–529. doi: 10.1080/13693780801971450.
581. Rommel, F.R., Raghavan, B., Tumala, S., Gieler, U., Peters, E.M., 2013. Stress alters cytokine profile of the skin: prospective links to stress-induced NNCS regulation in skin. *Autonomic Neuroscience* 177, 64–65. doi: 10.1016/j.autneu.2013.05.143.
582. Rommel, F.R., Raghavan, B., Paddenberg, R., Kummer, W., Tumala, S., Lochnit, G., Gieler, U., Peters, E.M.J., 2015. Suitability of Nicotinic Acetylcholine Receptor  $\alpha 7$  and Muscarinic Acetylcholine Receptor 3 Antibodies for Immune Detection: Evaluation in Murine Skin. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 63, 329–339. doi: 10.1369/0022155415575028.
583. Rommel, F.R., 2015. Über den Einfluss von Stress und Entzündung auf das non-neuronale cholinerge System und die Mastzellen der Haut. Dissertation, Gießen. ISBN: 9783835964709.
584. Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S.W., Bunnett, N.W., Steinhoff, M., 2006. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiological reviews* 86, 1309–1379. doi: 10.1152/physrev.00026.2005.
585. Rosenfeld, R.D., Zeni, L., Haniu, M., Talvenheimo, J., Radka, S.F., Bennett, L., Miller, J.A., Welcher, A.A., 1995. Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. *Protein expression and purification* 6, 465–471. doi: 10.1006/prev.1995.1062.
586. Rothman, S.M., Mattson, M.P., 2013. Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan. *Neuroscience* 239, 228–240. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.014.
587. Rowden, G., 1975. Ultrastructural studies of keratinized epithelia of the mouse. III. Determination of the volumes of nuclei and cytoplasm of cells in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 64, 1–3. doi: 10.1111/1523-1747.ep12540840.
588. Ruberti, F., Capsoni, S., Comparini, A., Di Daniel, E., Franzot, J., Gonfloni, S., Rossi, G., Berardi, N., Cattaneo, A., 2000. Phenotypic Knockout of Nerve Growth Factor in Adult Transgenic Mice Reveals Severe Deficits in Basal Forebrain Cholinergic Neurons, Cell Death in the Spleen, and Skeletal Muscle Dystrophy. *J Neurosci* 20, 2589–2601. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-07-02589.2000.
589. Rübsam, M., Broussard, J.A., Wickström, S.A., Nekrasova, O., Green, K.J., Niessen, C.M., 2018. Adherens Junctions and Desmosomes Coordinate Mechanics and Signaling to Orchestrate Tissue Morphogenesis and Function: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10. doi: 10.1101/cshperspect.a029207.
590. Ruiz Castro, P.A., Yepiskoposyan, H., Gubian, S., Calvino-Martin, F., Kogel, U., Renggli, K., Peitsch, M.C., Hoeng, J., Talikka, M., 2021. Systems biology approach highlights mechanistic differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Scientific reports* 11, 11519. doi: 10.1038/s41598-021-91124-3.
591. Saito, A., Tanaka, H., Usuda, H., Shibata, T., Higashi, S., Yamashita, H., Inagaki, N., Nagai, H., 2011. Characterization of skin inflammation induced by repeated exposure of toluene, xylene, and formaldehyde in mice. *Environmental toxicology* 26, 224–232. doi: 10.1002/tox.20547.
592. Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S., 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11, 4131–4142. doi: 10.1091/mbc.11.12.4131.

593. Sakaguchi, S., Vignali, D.A.A., Rudensky, A.Y., Niec, R.E., Waldmann, H., 2013. The plasticity and stability of regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology* 13, 461–467. doi: 10.1038/nri3464.
594. Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Tsukita, S., 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 137, 1393–1401. doi: 10.1083/jcb.137.6.1393.
595. Salimi, M., Barlow, J.L., Saunders, S.P., Xue, L., Gutowska-Owsiak, D., Wang, X., Huang, L.-C., Johnson, D., Scanlon, S.T., McKenzie, A.N.J., Fallon, P.G., Ogg, G.S., 2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *The Journal of Experimental Medicine* 210, 2939–2950. doi: 10.1084/jem.20130351.
596. Sanchez Rodriguez, R., Pauli, M.L., Neuhaus, I.M., Yu, S.S., Arron, S.T., Harris, H.W., Yang, S.H.-Y., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Krow-Lucal, E., MacKenzie, T.C., Johnson, D.S., Meyer, E.H., Löhr, A., Hsu, A., Koo, J., Liao, W., Gupta, R., Debbaneh, M.G., Butler, D., Huynh, M., Levin, E.C., Leon, A., Hoffman, W.Y., McGrath, M.H., Alvarado, M.D., Ludwig, C.H., Truong, H.-A., Maurano, M.M., Gratz, I.K., Abbas, A.K., Rosenblum, M.D., 2014. Memory regulatory T cells reside in human skin. *The Journal of clinical investigation* 124, 1027–1036. doi: 10.1172/JCI72932.
597. Santambrogio, L., Benedetti, M., Chao, M.V., Muzaffar, R., Kulig, K., Gabellini, N., Hochwald, G., 1994. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J Immunol* 153, 4488–4495.
598. Sasaki, H., Matsui, C., Furuse, K., Mimori-Kiyosue, Y., Furuse, M., Tsukita, S., 2003. Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3971–3976. doi: 10.1073/pnas.0630649100.
599. Sato, Y., Ogawa, E., Okuyama, R., 2020. Role of Innate Immune Cells in Psoriasis. *IJMS* 21. doi: 10.3390/ijms21186604.
600. Sawada, K., Nagai, H., Basaki, Y., Yamaya, H., Ikizawa, K., Watanabe, M., Kojima, M., Matsuura, N., Kiniwa, M., 1997. The expression of murine cutaneous late phase reaction requires both IgE antibodies and CD4 T cells. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 27, 225–231.
601. Schaack, D., Siegler, B.H., Tamulyte, S., Weigand, M.A., Uhle, F., 2018. The immunosuppressive face of sepsis early on intensive care unit-A large-scale microarray meta-analysis. *PloS one* 13, e0198555. doi: 10.1371/journal.pone.0198555.
602. Schaerli, P., Ebert, L., Willimann, K., Blaser, A., Roos, R.S., Loetscher, P., Moser, B., 2004. A Skin-selective Homing Mechanism for Human Immune Surveillance T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 199, 1265–1275. doi: 10.1084/jem.20032177.
603. Schallreuter, K.U., Elwary, Souna MA, Gibbons, Nicholas C J, Rokos, H., Wood, J.M., 2004. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H2O2: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 502–508. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.082.
604. Scharschmidt, T.C., Vasquez, K.S., Truong, H.-A., Gearty, S.V., Pauli, M.L., Nosbaum, A., Gratz, I.K., Otto, M., Moon, J.J., Liese, J., Abbas, A.K., Fischbach, M.A., Rosenblum, M.D., 2015. A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Immunity* 43, 1011–1021. doi: 10.1016/j.immuni.2015.10.016.
605. Schlapbach, C., Gehad, A., Yang, C., Watanabe, R., Guenova, E., Teague, J.E., Campbell, L., Yawalkar, N., Kupper, T.S., Clark, R.A., 2014. Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. *Science translational medicine* 6, 219ra8. doi: 10.1126/scitranslmed.3007828.

606. Schmid, I., Uittenbogaart, C.H., Giorgi, J.V., 1991. A gentle fixation and permeabilization method for combined cell surface and intracellular staining with improved precision in DNA quantification. *Cytometry* 12, 279–285. doi: 10.1002/cyto.990120312.
607. Schmidt-Weber, C.B., Blaser, K., 2004. Immunological mechanisms in specific immunotherapy. *Springer seminars in immunopathology* 25, 377–390. doi: 10.1007/s00281-003-0147-x.
608. Schmitz, A., Lazić, E., Koumaki, D., Kuonen, F., Verykiou, S., Rüksam, M., 2015. Assessing the in vivo epidermal barrier in mice: dye penetration assays. *J Invest Dermatol* 135, 1–4. doi: 10.1038/jid.2014.495.
609. Schneeberger, E.E., Lynch, R.D., 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, 28. doi: 10.1152/ajpcell.00558.2003.
610. Scholzen, T., Gerdes, J., 2000. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311–322. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311:AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
611. Scott, A., 1962. Acetylcholine in normal and diseased skin. *Br J Dermatol* 74, 317–322. doi: 10.1111/j.1365-2133.1962.tb13518.x.
612. Seguchi, T., Cui, C.Y., Kusuda, S., Takahashi, M., Aisu, K., Tezuka, T., 1996. Decreased expression of filaggrin in atopic skin. *Arch Dermatol Res* 288, 442–446.
613. Seidenari, S., Giusti, G., 1995. Objective assessment of the skin of children affected by atopic dermatitis: a study of pH, capacitance and TEWL in eczematous and clinically uninvolved skin. *Acta Derm Venereol* 75, 429–433. doi: 10.2340/0001555575429433.
614. Selye, H., 1975. Stress and distress. *Comprehensive therapy* 1, 9–13.
615. Selye, H., 1976. Stress without Distress. In: Serban, G. (Ed.) *Psychopathology of Human Adaptation*. Springer US, Boston, MA, s.l., pp. 137–146. doi: 10.1007/978-1-4684-2238-2\_9.
616. Selye, H., 1998. A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 10, 230–231.
617. Seneschal, J., Clark, R.A., Gehad, A., Baecher-Allan, C.M., Kupper, T.S., 2012. Human epidermal Langerhans cells maintain immune homeostasis in skin by activating skin resident regulatory T cells. *Immunity* 36, 873–884. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.018.
618. Seok, J., Warren, H.S., Cuenca, A.G., Mindrinos, M.N., Baker, H.V., Xu, W., Richards, D.R., McDonald-Smith, G.P., Gao, H., Hennessy, L., Finnerty, C.C., López, C.M., Honari, S., Moore, E.E., Minei, J.P., Cuschieri, J., Bankey, P.E., Johnson, J.L., Sperry, J., Nathens, A.B., Billiar, T.R., West, M.A., Jeschke, M.G., Klein, M.B., Gamelli, R.L., Gibran, N.S., Brownstein, B.H., Miller-Graziano, C., Calvano, S.E., Mason, P.H., Cobb, J.P., Rahme, L.G., Lowry, S.F., Maier, R.V., Moldawer, L.L., Herndon, D.N., Davis, R.W., Xiao, W., Tompkins, R.G., 2013. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 3507–3512. doi: 10.1073/pnas.1222878110.
619. Shaker, M., Murray, R.G.P., Mann, J.A., 2018. The ins and outs of an 'outside-in' view of allergies: Atopic dermatitis and allergy prevention. *Current opinion in pediatrics* 30, 576–581. doi: 10.1097/MOP.0000000000000646.
620. Sharma, A., Rudra, D., 2018. Emerging Functions of Regulatory T Cells in Tissue Homeostasis. *Frontiers in Immunology* 9, 883. doi: 10.3389/fimmu.2018.00883.
621. Sharma, B., Luhach, K., Kulkarni, G.T., 2018. In vitro and in vivo models of BBB to evaluate brain targeting drug delivery. In: Gao, H., Gao, X. (Eds.) *Brain Targeted Drug Delivery*

Systems. A Focus on Nanotechnology and Nanoparticulates. Elsevier Science & Technology, San Diego, pp. 53–101. doi: 10.1016/B978-0-12-814001-7.00004-4.

622. Sharma, V., 2009. Deterministic chaos and fractal complexity in the dynamics of cardiovascular behavior: perspectives on a new frontier. *The open cardiovascular medicine journal* 3, 110–123. doi: 10.2174/1874192400903010110.

623. Sheth, P., Basuroy, S., Li, C., Naren, A.P., Rao, R.K., 2003. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. *J Biol Chem* 278, 49239–49245. doi: 10.1074/jbc.M305654200.

624. Shi, S.R., Chaiwun, B., Young, L., Cote, R.J., Taylor, C.R., 1993. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 41, 1599–1604. doi: 10.1177/41.11.7691930.

625. Siebenhaar, F., Magerl, M., Peters, E.M.J., Hendrix, S., Metz, M., Maurer, M., 2008. Mast cell-driven skin inflammation is impaired in the absence of sensory nerves. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 955–961. doi: 10.1016/j.jaci.2007.11.013.

626. Siiskonen, H., Harvima, I., 2019. Mast Cells and Sensory Nerves Contribute to Neurogenic Inflammation and Pruritus in Chronic Skin Inflammation. *Frontiers in cellular neuroscience* 13, 422. doi: 10.3389/fncel.2019.00422.

627. Sikandar, S., Minett, M.S., Millet, Q., Santana-Varela, S., Lau, J., Wood, J.N., Zhao, J., 2018. Brain-derived neurotrophic factor derived from sensory neurons plays a critical role in chronic pain. *Brain* 141, 1028–1039. doi: 10.1093/brain/awy009.

628. Simpson, C.L., Patel, D.M., Green, K.J., 2011. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 565–580. doi: 10.1038/nrm3175.

629. Sisto, A., Vicinanza, F., Campanozzi, L.L., Ricci, G., Tartaglino, D., Tambone, V., 2019. Towards a Transversal Definition of Psychological Resilience: A Literature Review. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 55. doi: 10.3390/medicina55110745.

630. Sjo, A., Magnusson, K.-E., Peterson, K.H., 2010. Protein kinase C activation has distinct effects on the localization, phosphorylation and detergent solubility of the claudin protein family in tight and leaky epithelial cells. *J Membr Biol* 236, 181–189. doi: 10.1007/s00232-010-9289-7.

631. Slominski, A., 2005. Neuroendocrine system of the skin. *Dermatology* 211, 199–208. doi: 10.1159/000087012.

632. Slominski, A., Wortsman, J., Tuckey, R.C., Paus, R., 2007. Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Molecular and cellular endocrinology* 265-266, 143–149. doi: 10.1016/j.mce.2006.12.012.

633. Slominski, A.T., Botchkarev, V., Choudhry, M., Fazal, N., Fechner, K., Furkert, J., Krause, E., Roloff, B., Sayeed, M., Wei, E., Zbytek, B., Zipper, J., Wortsman, J., Paus, R., 1999. Cutaneous expression of CRH and CRH-R. Is there a "skin stress response system?". *Ann N Y Acad Sci* 885, 287–311. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb08686.x.

634. Slominski, A.T., Zmijewski, M.A., Skobowiat, C., Zbytek, B., Slominski, R.M., Steketee, J.D., 2012. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 212, 1–115. doi: 10.1007/978-3-642-19683-6\_1.

635. Slominski, A.T., Slominski, R.M., Raman, C., Chen, J.Y., Athar, M., Elmets, C., 2022. Neuroendocrine signaling in the skin with a special focus on the epidermal neuropeptides.

- American journal of physiology. Cell physiology 323, C1757-C1776. doi: 10.1152/ajpcell.00147.2022.
636. Snider, W.D., Johnson, E.M., 1989. Neurotrophic molecules. *Annals of neurology* 26, 489–506. doi: 10.1002/ana.410260402.
637. Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., Smith, K., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Menon, S., McClanahan, T., Waal-Malefyt Rd, R. de, Bazan, F., Kastelein, R.A., Liu, Y.-J., 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature immunology* 3, 673–680. doi: 10.1038/ni805.
638. Stegemann, A., Böhm, M., 2020. Targeting the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor-A novel road towards the future treatment of skin diseases. *Exp Dermatol* 29, 924–931. doi: 10.1111/exd.14173.
639. Steinhoff, M., Ständer, S., Seeliger, S., Ansel, J.C., Schmelz, M., Luger, T., 2003. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol* 139, 1479–1488. doi: 10.1001/archderm.139.11.1479.
640. Stelling, J., Sauer, U., Szallasi, Z., Doyle III, Francis J., Doyle, J., 2004. Robustness of Cellular Functions. *Cell* 118, 675–685. doi: 10.1016/j.cell.2004.09.008.
641. Sterling, P., Eyer, J., 1988. Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In: S. Fisher J. Reason (Ed.) *Handbook of life stress, cognition and health*. John Wiley & Sons, Oxford, England, pp. 629–649.
642. Stockinger, B., Veldhoen, M., 2007. Differentiation and function of Th17 T cells. *Autoimmunity \* Allergy and hypersensitivity* 19, 281–286. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.005.
643. Stojadinovic, O., Lee, B., Vouthounis, C., Vukelic, S., Pastar, I., Blumenberg, M., Brem, H., Tomic-Canic, M., 2007. Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. *J Biol Chem* 282, 4021–4034. doi: 10.1074/jbc.M606262200.
644. Strid, J., Strobel, S., 2005. Skin barrier dysfunction and systemic sensitization to allergens through the skin. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 531–541. doi: 10.2174/156801005774322199.
645. Strid, J., Tigelaar, R.E., Hayday, A.C., 2009. Skin immune surveillance by T cells--a new order? *Seminars in Immunology* 21, 110–120. doi: 10.1016/j.smim.2009.03.002.
646. Suarez, A.L., Feramisco, J.D., Koo, J., Steinhoff, M., 2012. Psychoneuroimmunology of psychological stress and atopic dermatitis: pathophysiologic and therapeutic updates. *Acta Derm Venereol* 92, 7–15. doi: 10.2340/00015555-1188.
647. Suárez-Fariñas, M., Tintle, S.J., Shemer, A., Chiricozzi, A., Nograles, K., Cardinale, I., Duan, S., Bowcock, A.M., Krueger, J.G., Guttman-Yassky, E., 2011. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 954-64.e1-4. doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1124.
648. Subramanian, N., Torabi-Parizi, P., Gottschalk, R.A., Germain, R.N., Dutta, B., 2015. Network representations of immune system complexity. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 7, 13–38. doi: 10.1002/wsbm.1288.
649. Sugawara, T., Iwamoto, N., Akashi, M., Kojima, T., Hisatsune, J., Sugai, M., Furuse, M., 2013. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *J Dermatol Sci* 70, 12–18. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.01.002.

650. Sugita, K., Kabashima, K., 2020. Tight junctions in the development of asthma, chronic rhinosinusitis, atopic dermatitis, eosinophilic esophagitis, and inflammatory bowel diseases. *Journal of Leukocyte Biology* 107, 749–762. doi: 10.1002/JLB.5MR0120-230R.
651. Suter, M.M., Schulze, K., Bergman, W., Welle, M., Roosje, P., Muller, E.J., 2009. The keratinocyte in epidermal renewal and defence. *Vet Dermatol* 20, 515–532. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00819.x.
652. Sutton, C.E., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Brereton, C.F., Lavelle, E.C., Mills, K.H.G., 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31, 331–341. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.001.
653. Suwanpradid, J., Holcomb, Z.E., MacLeod, A.S., 2017. Emerging Skin T-Cell Functions in Response to Environmental Insults. *J Invest Dermatol* 137, 288–294. doi: 10.1016/j.jid.2016.08.013.
654. Takahashi, S., Ishida, A., Kubo, A., Kawasaki, H., Ochiai, S., Nakayama, M., Koseki, H., Amagai, M., Okada, T., 2019. Homeostatic pruning and activity of epidermal nerves are dysregulated in barrier-impaired skin during chronic itch development. *Scientific reports* 9, 8625. doi: 10.1038/s41598-019-44866-0.
655. Talagas, M., 2023. Anatomical contacts between sensory neurons and epidermal cells: an unrecognized anatomical network for neuro-immuno-cutaneous crosstalk. *Br. J. Dermatol.* 188, 176–185. doi: 10.1093/bjd/ljac066.
656. Tamari, M., Ver Heul, A.M., Kim, B.S., 2021. Immunosenescence: Neuroimmune Cross Talk in the Skin. *Annual review of immunology* 39, 369–393. doi: 10.1146/annurev-immunol-101719-113805.
657. Tarassova, O., Ekblom, M.M., Moberg, M., Lövdén, M., Nilsson, J., 2020. Peripheral BDNF Response to Physical and Cognitive Exercise and Its Association With Cardiorespiratory Fitness in Healthy Older Adults. *Frontiers in physiology* 11, 1080. doi: 10.3389/fphys.2020.01080.
658. Tebbe, B., Mankertz, J., Schwarz, C., Amasheh, S., Fromm, M., Assaf, C., Schultz-Ehrenburg, U., Sánchez Ruderish, H., Schulzke, J.-D., Orfanos, C.E., 2002. Tight junction proteins: a novel class of integral membrane proteins. Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 294, 14–18. doi: 10.1007/s00403-001-0290-y.
659. Teresiak-Mikołajczak, E., Czarnecka-Operacz, M., Jenerowicz, D., Silny, W., 2013. Neurogenic markers of the inflammatory process in atopic dermatitis: relation to the severity and pruritus. *Postępy dermatologii i alergologii* 30, 286–292. doi: 10.5114/pdia.2013.38357.
660. Thelen, F., Witherden, D.A., 2020. Get in Touch With Dendritic Epithelial T Cells! *Frontiers in Immunology* 11, 1656. doi: 10.3389/fimmu.2020.01656.
661. Thomas, R., Kaufman, M., 2001. Multistationarity, the basis of cell differentiation and memory. I. Structural conditions of multistationarity and other nontrivial behavior. *Chaos (Woodbury, N.Y.)* 11, 170–179. doi: 10.1063/1.1350439.
662. Thyssen, J.P., Rinnov, M.R., Vestergaard, C., 2020. Disease Mechanisms in Atopic Dermatitis: A Review of Aetiological Factors. *Acta Derm Venereol* 100, adv00162. doi: 10.2340/00015555-3512.
663. Tokumasu, R., Tamura, A., Tsukita, S., 2017. Time- and dose-dependent claudin contribution to biological functions: Lessons from claudin-1 in skin. *Tissue barriers* 5, e1336194. doi: 10.1080/21688370.2017.1336194.

664. Tominaga, M., Takamori, K., 2014. Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: therapeutic implications. *J Dermatol* 41, 205–212. doi: 10.1111/1346-8138.12317.
665. Torchinsky, M.B., Garaude, J., Martin, A.P., Blander, J.M., 2009. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation. *Nature* 458, 78–82. doi: 10.1038/nature07781.
666. Toro-Domínguez, D., Alarcón-Riquelme, M.E., 2021. Precision medicine in autoimmune diseases: fact or fiction. *Rheumatology (Oxford, England)* 60, 3977–3985. doi: 10.1093/rheumatology/keab448.
667. Toro-Domínguez, D., Martorell-Marugán, J., Martínez-Bueno, M., López-Domínguez, R., Carnero-Montoro, E., Barturen, G., Goldman, D., Petri, M., Carmona-Sáez, P., Alarcón-Riquelme, M.E., 2022. Scoring personalized molecular portraits identify Systemic Lupus Erythematosus subtypes and predict individualized drug responses, symptomatology and disease progression. *Briefings in bioinformatics* 23. doi: 10.1093/bib/bbac332.
668. Torres, T., Ferreira, E.O., Gonçalves, M., Mendes-Bastos, P., Selores, M., Filipe, P., 2019. Update on Atopic Dermatitis. *Acta medica portuguesa* 32, 606–613. doi: 10.20344/amp.11963.
669. Toulza, E., Mattiuzzo, N.R., Galliano, M.-F., Jonca, N., Dossat, C., Jacob, D., Daruvar, A. de, Wincker, P., Serre, G., Guerrin, M., 2007. Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome biology* 8, R107. doi: 10.1186/gb-2007-8-6-r107.
670. Toyoda, M., Nakamura, M., Makino, T., Hino, T., Kagoura, M., Morohashi, M., 2002. Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 147, 71–79. doi: 10.1046/j.1365-2133.2002.04803.x.
671. Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature* 420, 853–859. doi: 10.1038/nature01321.
672. Trautmann, A., Akdis, M., Klunker, S., Blaser, K., Akdis, C.A., 2001. Role of apoptosis in atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 124, 230–232. doi: 10.1159/000053720.
673. Tron, V.A., Coughlin, M.D., Jang, D.E., Stanisz, J., Sauder, D.N., 1990. Expression and modulation of nerve growth factor in murine keratinocytes (PAM 212). *J Clin Invest* 85, 1085–1089. doi: 10.1172/JCI114539.
674. Truzzi, F., Marconi, A., Pincelli, C., 2011. Neurotrophins in healthy and diseased skin. *Dermatoendocrinol* 3, 32–36. doi: 10.4161/derm.3.1.14661.
675. Truzzi, F., Marconi, A., Atzei, P., Panza, M.C., Lotti, R., Dallaglio, K., Tiberio, R., Palazzo, E., Vaschieri, C., Pincelli, C., 2011. p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. *Cell Death Differ* 18, 948–958. doi: 10.1038/cdd.2010.162.
676. Tsuchisaka, A., Furumura, M., Hashimoto, T., 2014. Cytokine regulation during epidermal differentiation and barrier formation. *J Invest Dermatol* 134, 1194–1196. doi: 10.1038/jid.2014.15.
677. Tsukita, S., Furuse, M., 1999. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends in Cell Biology* 9, 268–273. doi: 10.1016/S0962-8924(99)01578-0.
678. Tsukita, S., Yamazaki, Y., Katsuno, T., Tamura, A., 2008. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27, 6930–6938. doi: 10.1038/onc.2008.344.

679. Tsukita, S., Tanaka, H., Tamura, A., 2019. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends in biochemical sciences* 44, 141–152. doi: 10.1016/j.tibs.2018.09.008.
680. Tu, C.-L., Bikle, D.D., 2013. Role of the calcium-sensing receptor in calcium regulation of epidermal differentiation and function. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 27, 415–427. doi: 10.1016/j.beem.2013.03.002.
681. Tuckermann, J.P., Reichardt, H.M., Arribas, R., Richter, K.H., Schütz, G., Angel, P., 1999. The DNA Binding-Independent Function of the Glucocorticoid Receptor Mediates Repression of Ap-1-Dependent Genes in Skin. *J Cell Biol* 147, 1365–1370. doi: 10.1083/jcb.147.7.1365.
682. Tunggal, J.A., Helfrich, I., Schmitz, A., Schwarz, H., Gunzel, D., Fromm, M., Kemler, R., Krieg, T., Niessen, C.M., 2005. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J* 24, 1146–1156. doi: 10.1038/sj.emboj.7600605.
683. Turksen, K., Troy, T.-C., 2004. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 117, 2435–2447. doi: 10.1242/jcs.01235.
684. Turner, J. R. Angle, J. M. Black, E. D. Joyal, J. L. Sacks, D. B. Madara, J. L., 1999. PKC-dependent regulation of transepithelial resistance: roles of MLC and MLC kinase. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 277, C554-C562. doi: 10.1152/ajpcell.1999.277.3.C554.
685. Turner, J.R., Buschmann, M.M., Romero-Calvo, I., Sailer, A., Le Shen, 2014. The role of molecular remodeling in differential regulation of tight junction permeability. *Seminars in cell & developmental biology* 36, 204–212. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.022.
686. Tyson, J.J., Chen, K.C., Novak, B., 2003. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol* 15, 221–231. doi: 10.1016/s0955-0674(03)00017-6.
687. Tyson, J.J., Novák, B., 2015. Models in biology: lessons from modeling regulation of the eukaryotic cell cycle. *BMC biology* 13, 46. doi: 10.1186/s12915-015-0158-9.
688. Uberti, F., Bardelli, C., Morsanuto, V., Ghirlanda, S., Cochis, A., Molinari, C., 2017. Stimulation of the Nonneuronal Cholinergic System by Highly Diluted Acetylcholine in Keratinocytes. *Cells Tissues Organs* 203, 215–230. doi: 10.1159/000451023.
689. Ulzii, D., Kido-Nakahara, M., Nakahara, T., Tsuji, G., Furue, K., Hashimoto-Hachiya, A., Furue, M., 2019. Scratching Counteracts IL-13 Signaling by Upregulating the Decoy Receptor IL-13R $\alpha$ 2 in Keratinocytes. *IJMS* 20. doi: 10.3390/ijms20133324.
690. Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., Tsukita, S., 2006. ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell* 126, 741–754. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.043.
691. Uren, R.T., Turnley, A.M., 2014. Regulation of neurotrophin receptor (Trk) signaling: suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) is a new player. *Frontiers in molecular neuroscience* 7, 39. doi: 10.3389/fnmol.2014.00039.
692. Vallés, A.S., Barrantes, F.J., 2012. Chaperoning  $\alpha$ 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochim Biophys Acta* 1818, 718–729. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.10.012.
693. van Wilson, G., 2014. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol* 1195, 33–41. doi: 10.1007/7651\_2013\_42.
694. Varela, F.J., 1993. *The embodied mind: Cognitive science and human experience*, 1st ed. MIT Press, Cambridge, Mass, 308 pp. ISBN: 9780262285476.

695. Varusai, T.M., Kolch, W., Kholodenko, B.N., Nguyen, L.K., 2015. Protein-protein interactions generate hidden feedback and feed-forward loops to trigger bistable switches, oscillations and biphasic dose-responses. *Molecular bioSystems* 11, 2750–2762. doi: 10.1039/c5mb00385g.
696. Vega, J.A., García-Suárez, O., Hannestad, J., Pérez-Pérez, M., Germanà, A., 2003. Neurotrophins and the immune system. *Journal of Anatomy* 203, 1–19. doi: 10.1046/j.1469-7580.2003.00203.x.
697. Villanova, F., Flutter, B., Tosi, I., Grys, K., Sreeneebus, H., Perera, G.K., Chapman, A., Smith, C.H., Di Meglio, P., Nestle, F.O., 2014. Characterization of innate lymphoid cells in human skin and blood demonstrates increase of NKp44+ ILC3 in psoriasis. *J Invest Dermatol* 134, 984–991. doi: 10.1038/jid.2013.477.
698. Voisin, T., Bouvier, A., Chiu, I.M., 2017. Neuro-immune interactions in allergic diseases: novel targets for therapeutics. *International Immunology* 29, 247–261. doi: 10.1093/intimm/dxx040.
699. Walsh, J.J., Tschakovsky, M.E., 2018. Exercise and circulating BDNF: Mechanisms of release and implications for the design of exercise interventions. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 43, 1095–1104. doi: 10.1139/apnm-2018-0192.
700. Wang, D., Zhou, R., Yao, Y., Zhu, X., Yin, Y., Zhao, G., Dong, N., Sheng, Z., 2010. Stimulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by nicotine increases suppressive capacity of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells in mice in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 335, 553–561. doi: 10.1124/jpet.110.169961.
701. Wang, L.-F., Chen, J.-S., Hsu, C.-J., Liu, C.-Y., Yu, J.-S., Miaw, S.-C., 2009. Antigen-driven bystander effect accelerates epicutaneous sensitization with a new protein allergen. *J Biomed Sci* 16, 28. doi: 10.1186/1423-0127-16-28.
702. Warner, R.R., Stone, K.J., Boissy, Y.L., 2003. Hydration disrupts human stratum corneum ultrastructure. *J Invest Dermatol* 120, 275–284. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12046.x.
703. Watanabe, R., Gehad, A., Yang, C., Scott, L.L., Teague, J.E., Schlapbach, C., Elco, C.P., Huang, V., Matos, T.R., Kupper, T.S., Clark, R.A., 2015. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. *Science translational medicine* 7, 279ra39. doi: 10.1126/scitranslmed.3010302.
704. Waxenbaum, J.A., Reddy, V., Varacallo, M., 2023. *StatPearls: Anatomy, Autonomic Nervous System*, Treasure Island (FL).
705. Webster Marketon, J.I., Glaser, R., 2008. Stress hormones and immune function. *Cellular Immunology* 252, 16–26. doi: 10.1016/j.cellimm.2007.09.006.
706. Werfel, T., Aberer, W., Ahrens, F., Augustin, M., Biedermann, T., Diepgen, T., Fölster-Holst, R., Gieler, U., Heratizadeh, A., Kahle, J., Kapp, A., Nast, A., Nemat, K., Ott, H., Przybilla, B., Roecken, M., Schlaeger, M., Schmid-Grendelmeier, P., Schmitt, J., Schwennesen, T., Staab, D., Worm, M., 2016. Leitlinie Neurodermitis atopisches Ekzem; atopische Dermatitis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 14, e1-75. doi: 10.1111/ddg.12884.
707. Werner, M., Chott, A., Fabiano, A., Battifora, H., 2000. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American Journal of Surgical Pathology* 24, 1016–1019. doi: 10.1097/0000478-200007000-00014.

708. Wessler, I., Reinheimer, T., Kilbinger, H., Bittinger, F., Kirkpatrick, C.J., Saloga, J., Knop, J., 2003. Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. *Life Sci* 72, 2169–2172. doi: 10.1016/s0024-3205(03)00079-1.
709. Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., 2008. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 154, 1558–1571. doi: 10.1038/bjp.2008.185.
710. Wheelock, M.J., Johnson, K.R., 2003. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annual review of cell and developmental biology* 19, 207–235. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.011102.111135.
711. Williams, I.R., Kupper, T.S., 1996. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life sciences* 58, 1485–1507. doi: 10.1016/0024-3205(96)00042-2.
712. Wolk, K., Sabat, R., 2006. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine & growth factor reviews* 17, 367–380. doi: 10.1016/j.cytogfr.2006.09.001.
713. Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J.-C., Wong, J.K., 2016. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol* 25, 92–98. doi: 10.1111/exd.12832.
714. Wright, R.J., Cohen, R.T., Cohen, S., 2005. The impact of stress on the development and expression of atopy. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 5, 23–29. doi: 10.1097/00130832-200502000-00006.
715. Xiang, Z., Nilsson, G., 2000. IgE receptor-mediated release of nerve growth factor by mast cells. *Clin Exp Allergy* 30, 1379–1386. doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00906.x.
716. Yamada, M., Miyakawa, T., Duttaray, A., Yamanaka, A., Moriguchi, T., Makita, R., Ogawa, M., Chou, C.J., Xia, B., Crawley, J.N., Felder, C.C., Deng, C.X., Wess, J., 2001. Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean. *Nature* 410, 207–212. doi: 10.1038/35065604.
717. Yan, Q., 2012. The role of psychoneuroimmunology in personalized and systems medicine. *Methods Mol Biol* 934, 3–19. doi: 10.1007/978-1-62703-071-7\_1.
718. Yan, Q., 2012. Translational implications of inflammatory biomarkers and cytokine networks in psychoneuroimmunology. *Methods Mol Biol* 934, 105–120. doi: 10.1007/978-1-62703-071-7\_6.
719. Yao, W., Tepper, R.S., Kaplan, M.H., 2011. Predisposition to the development of IL-9-secreting T cells in atopic infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 1357-1360.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2011.06.019.
720. Yehuda, R., Lehrner, A., 2018. Intergenerational transmission of trauma effects: Putative role of epigenetic mechanisms. *World Psychiatry* 17, 243–257. doi: 10.1002/wps.20568.
721. Yokouchi, M., Kubo, A., Kawasaki, H., Yoshida, K., Ishii, K., Furuse, M., Amagai, M., 2015. Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. *J Dermatol Sci* 77, 28–36. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.11.007.
722. Yokouchi, M., Kubo, A., 2018. Maintenance of tight junction barrier integrity in cell turnover and skin diseases. *Exp Dermatol* 27, 876–883. doi: 10.1111/exd.13742.
723. Yoshida, K., Yokouchi, M., Nagao, K., Ishii, K., Amagai, M., Kubo, A., 2013. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *J Dermatol Sci* 71, 89–99. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.04.021.

724. Yoshida, K., Kubo, A., Fujita, H., Yokouchi, M., Ishii, K., Kawasaki, H., Nomura, T., Shimizu, H., Kouyama, K., Ebihara, T., Nagao, K., Amagai, M., 2014. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134, 856–864. doi: 10.1016/j.jaci.2014.08.001.
725. Yoshida, T., Beck, L.A., Benedetto, A. de, 2022. Skin barrier defects in atopic dermatitis: From old idea to new opportunity. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 71, 3–13. doi: 10.1016/j.alit.2021.11.006.
726. Yousef, H., Alhajj, M., Sharma, S., 2022. StatPearls: Anatomy, Skin (Integument), Epidermis.
727. Yuki, T., Haratake, A., Koishikawa, H., Morita, K., Miyachi, Y., Inoue, S., 2007. Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Exp Dermatol* 16, 324–330. doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00539.x.
728. Yuki, T., Yoshida, H., Akazawa, Y., Komiya, A., Sugiyama, Y., Inoue, S., 2011. Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187, 3230–3237. doi: 10.4049/jimmunol.1100058.
729. Yuki, T., Komiya, A., Kusaka, A., Kuze, T., Sugiyama, Y., Inoue, S., 2013. Impaired tight junctions obstruct stratum corneum formation by altering polar lipid and profilaggrin processing. *Journal of Dermatological Science* 69, 148–158. doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.11.595.
730. Yuki, T., Tobiishi, M., Kusaka-Kikushima, A., Ota, Y., Tokura, Y., 2016. Impaired Tight Junctions in Atopic Dermatitis Skin and in a Skin-Equivalent Model Treated with Interleukin-17. *PLoS One* 11, e0161759. doi: 10.1371/journal.pone.0161759.
731. Zaba, L.C., Krueger, J.G., Lowes, M.A., 2009. Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol* 129, 302–308. doi: 10.1038/jid.2008.225.
732. Zeidler, R., Albermann, K., Lang, S., 2007. Nicotine and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12, 1927–1943. doi: 10.1007/s10495-007-0102-8.
733. Zhang, K., Liu, G., Goldys, E.M., 2018. Robust immunosensing system based on biotin-streptavidin coupling for spatially localized femtogram mL<sup>-1</sup> level detection of interleukin-6. *Biosensors & bioelectronics* 102, 80–86. doi: 10.1016/j.bios.2017.11.023.
734. Zollner, T., Renz, H., Asadullah, K. (Eds.), 2005. *Animal Models of T Cell-Mediated Skin Diseases*. Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-540-21067-2.

## 12 Anhang

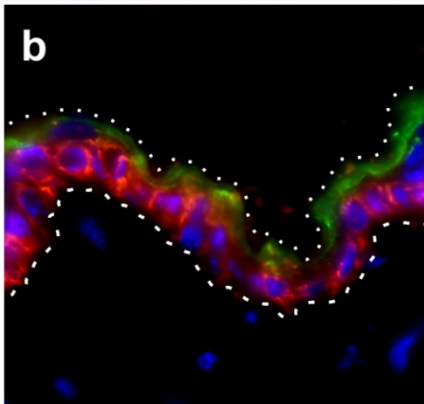
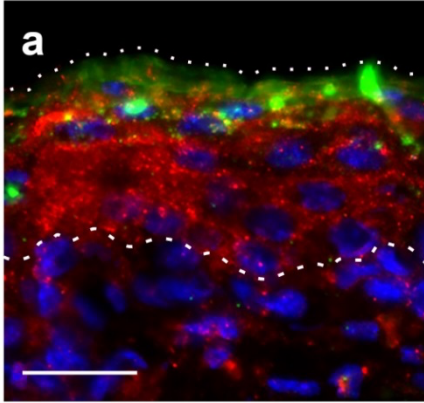


Abb. 20: Methodikentwicklung für immunhistochemische Färbung mit Primärantikörpern aus gleicher Herkunftspezies

(a) anti-Claudin-1 (1:25) mit Sekundär-Antikörper (AK) Cy3 wurden jeweils über 12 h bei 4 °C inkubiert, auf entzündeter muriner Rückenhaut. Zweites Primär-Sekundär-AK-Paar war anti-Filaggrin (FLG) (1:250) mit Cy2, die vor Auftragen auf den Schnitt 1,5 h bei 37 °C im Milchpulver-behandelten Reaktionsgefäß gemeinsam inkubiert wurden und auf dem Objektträger weitere 12 h inkubiert wurden.

(b) anti-Keratin-14 (K14) (1:1000) wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert, auf muriner Rückenhaut, Sekundär-AK Cy3 (1:100) wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Unkonjugiertes FAB-Fragment 1:100 über 1 h bei 37 °C, dann anti-ZO-1 (1:50) für 12 h bei 4 °C. Zweiter Sekundär-AK war Alexa Fluor 488 (1:100) für 1 h bei 37 °C.

Bei der Methode (a) war eine nur minimale FLG-Färbung im oberen Stratum granulosum (SG) festzustellen, mit vielen großen Verunreinigungen und Fehlfärbungen. Bei Methode (b) zeigte sich eine scharfe Diskrimination zwischen dem roten K14 im Stratum basale und dem grünen ZO-1 im SG. Gewebegrenzen der Epidermis sind mit gepunkteten Strichen eingezeichnet. Balken: 25 µm. Weitere Abkürzungen: ZO-1= Zonula occludens-Protein-1

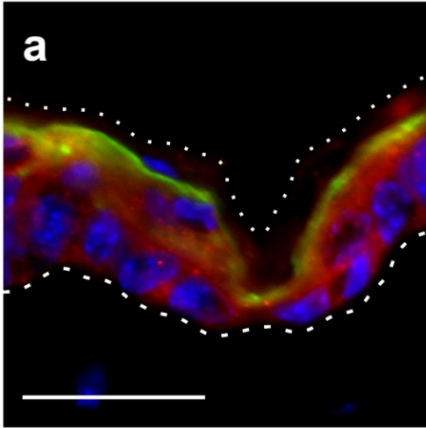
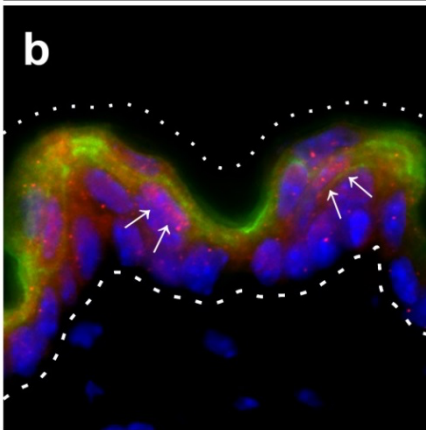


Abb. 21: Kolokalisation von Claudin-1 und ZO-1 unter Kontrollbedingungen und Stress

Exemplarische fluoreszenz-mikroskopische Bilder einer Doppelfärbung mit Primärantikörper gleicher Herkunftsspezies, hier anti-Claudin (CLDN)-1 (1:50, rot markiert mit Cy3 in 1:100) und anti-ZO-1 (1:50, grün markiert mit Alexa Fluor 488 in 1:100). Mit Pfeilen ist die nukleäre Zellfärbung von CLDN-1 unter Stressbedingungen markiert. Die Grenzen der Epidermis sind mit gepunkteten Linien markiert. Balken: 25  $\mu$ m. Weitere Abkürzungen: ZO-1= Zonula occludens-Protein 1

Inkubationsbedingungen anti-CLDN-1: 1 h bei 37 °C, Cy3: 1 h bei 37 °C, 5 % Kaninchenserum: 30 min Raumtemperatur, Blockade der restlichen Kaninchen-IgG Stellen mit unkonjugiertem FAB-Fragment (Esel gegen Kaninchen, 1:100) 1 h bei 37 °C, anti-ZO-1: 1 h bei 37 °C, Alexa Fluor 488: 1 h bei 37 °C.



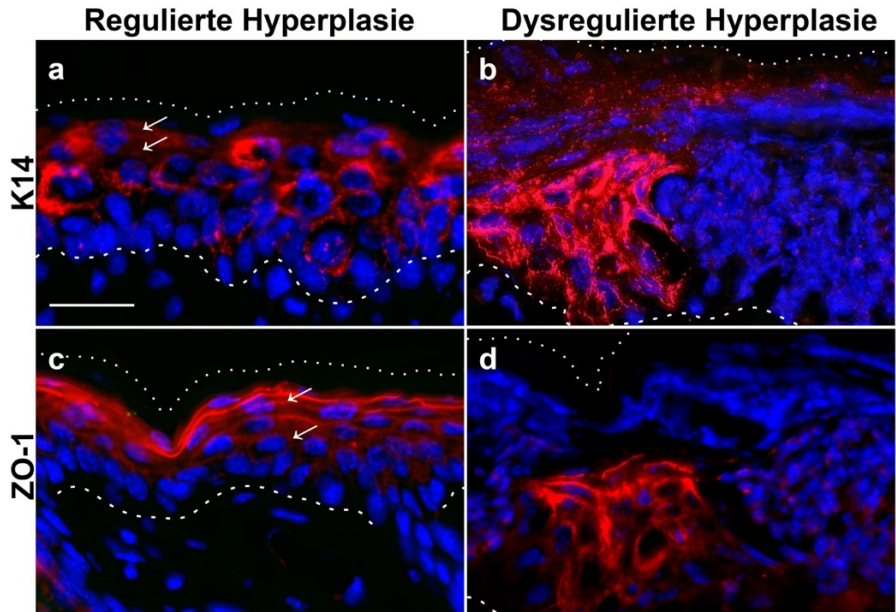


Abb. 22: Epidermale Inflammation, assoziierte Hyperplasie und deren Dysregulation

Exemplarische fluoreszenz-mikroskopische Bilder einer Keratin-14 (K14)/Cy3 (rot in a, b) und ZO-1/Cy3 (rot in c, d) Färbung, Zellkernfärbung mit DAPI (blau). In (a) und (c) sichtbare Epithelsäule mit „Stacking“ der Keratinozyten (Pfeile) als Beispiel der geregelten Hyperplasie in atopischer-Dermatitis-ähnlicher allergischer Dermatitis (AID). In (b) und (d) dargestellte abortive Hyperplasie mit epidermaler Ulzeration bei AID und zusätzlich 24 h akustischem Stress. Epithelgrenzen sind mit gepunkteten Linien dargestellt. Die K14-Bilder wurden aus Z-Stapeln berechnet. Balken: 25  $\mu$ m. Weitere Abkürzungen: ZO-1= Zonula occludens-Protein-1

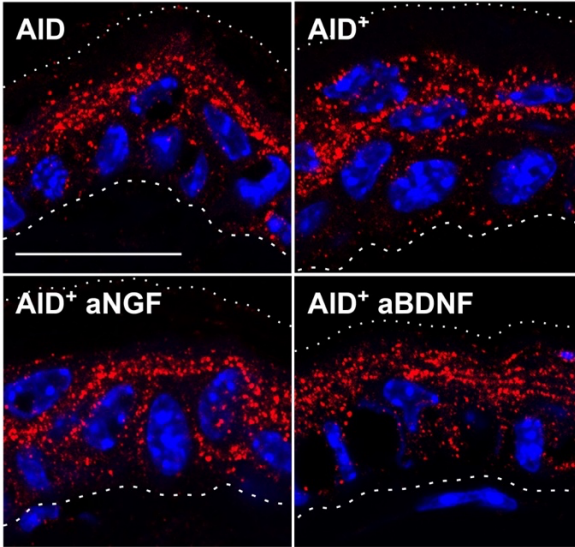


Abb. 23: Claudin-1 in nicht-läsionaler muriner Rückenhaut bei allergischer Inflammation

Exemplarische konfokalmikroskopische Bilder von nicht-läsionaler Haut mit allergischer Inflammation (AID), mit zusätzlich 24 h akutischem Stress (AID<sup>+</sup>) und Modulation der Neurotrophine NGF (aNGF) oder BDNF (aBDNF) zeigten zwischen den Gruppen keine eindeutigen Unterschiede, allerdings differierte die CLDN-1-Verteilung zu gesunder Haut oder zu Haut von gestressten Mäusen. Rot: anti-CLDN-1/Cy3, Blau: Zellkerne/ DAPI. Die Grenzen der Epidermis sind mit gestrichelten Linien demonstriert. Balken: 20 µm. Abkürzungen BDNF= brain-derived neurotrophic factor, CLDN-1= Claudin-1, NGF= nerve growth factor

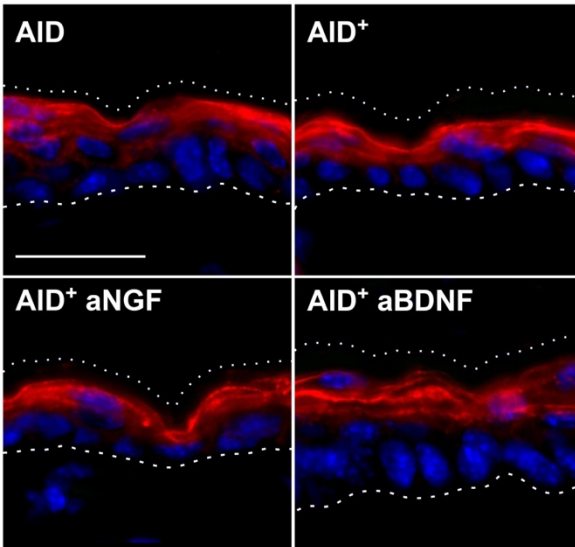


Abb. 24: ZO-1-Verteilung in nicht-läsionaler Haut bei allergischer Inflammation

Fluoreszenz-mikroskopische Bilder einer anti-ZO-1 (rot, Cy3) und Zellkern (blau, DAPI)-Doppelfärbung. Es sind nicht-entzündete Bereiche der Haut der murinen Inflammationsgruppen dargestellt. Die ZO-1-Färbung ist beschränkt auf das Stratum granulosum, mit geringer intra- und intensiverer perizellulärer Färbung. Die epidermalen Grenzen sind mit gepunkteten Linien dargestellt. Balken: 25 µm. Abkürzungen AID= atopische dermatitis-ähnliche allergische Dermatitis, AID<sup>+</sup>= AID und Stress, aBDNF= antagonistischer brain-derived neurotrophic factor, aNGF= antagonistischer nerve growth factor, ZO-1= Zonula occludens-Protein-1

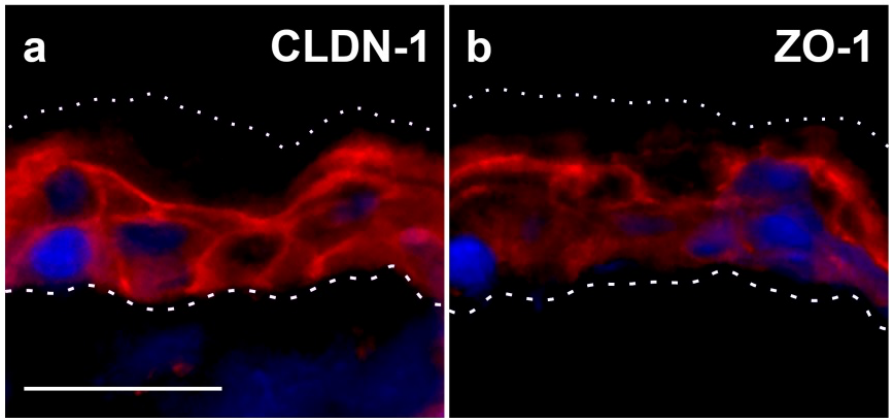


Abb. 25: Kompromittierte TJ-Verteilungen unter Organkultur-Bedingungen

Exemplarische fluoreszenz-mikroskopische Bilder von muriner Hautorgankultur unter Kontrollbedingungen. Anfärbung mit anti-Claudin (CLDN)-1/Cy3 (rot in a) und anti-ZO-1/Cy3 (rot in b), Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Es zeigte sich im Vergleich zu vitaler Maushaut eine veränderte Immunlokalisation der TJ-Marker, mit vermehrter Anwesenheit bereits ab dem Stratum basale. Epidermale Grenzen sind mit gepunkteten Linien eingezeichnet. Balken: 25  $\mu$ m. Abkürzungen: ZO-1= Zonula occludens-Protein-1

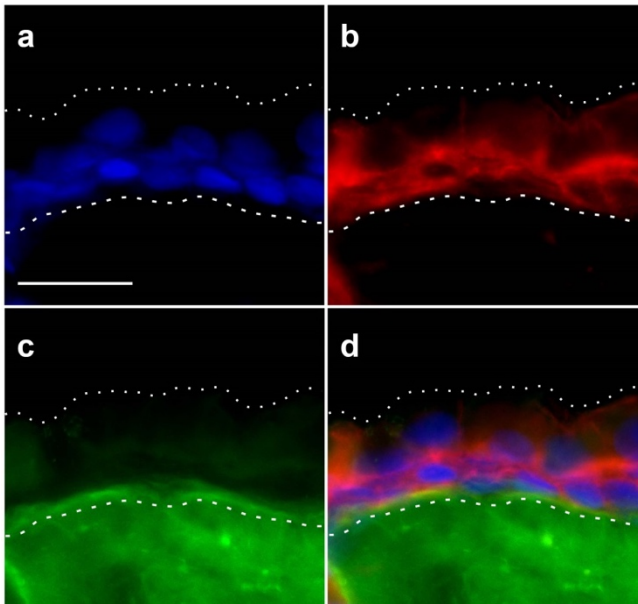


Abb. 26: Biotin-Diffusionsversuch an muriner Hautorgankultur

Exemplarische fluoreszenz-mikroskopische Bilder der murinen Hautorgankultur mit Biotin-Penetrationstest, hier auf CHRNA7-KO-Haut die mit 5 ng/ml BDNF stimuliert wurde. In (a) ist die Zellkernfärbung mit DAPI dargestellt, in (b) anti-CLDN-1 mit Cy3 angefärbt (rot), in (c) ist das Sulfo-NHS-Biotin mit FTIC-Avidin angefärbt (grün). (d) ist die Überlagerung der Bilder. Ein anfärbarer Übertritt des Biotin-Tracers über die Basalmembran ließ sich nicht feststellen. Zusätzlich bestand eine (kulturbedingte) gestörte CLDN-1-Verteilung, mit Konzentration auf das Stratum basale und dem Übergang zum Stratum granulosum. Epidermale Grenzen sind mit gepunkteten Linien markiert.

Balken: 25  $\mu$ m. Abkürzungen: BDNF= Brain derived neurotrophic factor, CHRNA= cholinergic receptor nicotinic alpha subunit, CLDN-1= Claudin-1.

Tabelle 13: Auswahl aus der Transkriptomveränderung in muriner Rückenhaut durch akustischen Stress im Vergleich zu Kontrollbedingungen

Gen	Symbol	log <sub>2</sub> der Veränderung in Haut
<b>Zytokine und -Rezeptoren</b>		
Defensin beta 1	Defb1	-0,516
Brain derived neurotrophic factor	Bdnf	-0,016
High mobility group box 1	Hmgb1	-0,606
Interleukin 1 beta	Il1b	-0,140
Interleukin 10	Il10	-0,052
Interleukin 10 receptor, beta	Il10rb	0,598
Interleukin 10-related T cell-derived inducible factor beta (IL-22b )	Il1t1b	-5,129
Interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	-2,559
Interleukin 13 receptor, alpha 2	Il13ra2	-0,437
Interleukin 17	Il17	0,140
Interleukin 20	Il20	-0,397
Interleukin 33	9230117N1 ORik	0,119
Interleukin 6	Il6	0,168
Tachykinin precursor 1 (incl Substance P)	Tac1	2,716
TNF receptor super family, member 1b = CD120	Tnfrsf1b	-2,576
TNF receptor super family, member 5 = CD40	Tnfrsf5 /Tnf-R5	1,194
Toll-like receptor 2	tlr2	0,764
Toll-like receptor 4	tlr4	-0,348
<b>TJ-Interaktion</b>		
Actinin alpha 2	Actn2	-0,810
Actinin alpha 3	Actn3	-0,527
Actinin alpha 4	Actn4	0,521
Actinin, alpha 1	Actn1	2,078
Claudin 10	Cldn10	-0,200
Claudin 11	Cldn11	-0,127
Claudin 15	Cldn15	0,017
Claudin 5	Cldn5	-0,680
Claudin 8	Cldn8	-0,924
Connexin 43= gap junction protein alpha 1	Gja1	-0,232
Cortactin	Ctnn	0,155
E-cadherin = Cadherin 1	Cdh1	0,351
Flightless I homolog (Drosophila)	Fliih	0,947
Tight junction protein 1 (ZO-1)	Tjp1	-0,230
Tight junction protein 2 (ZO-2)	Tjp2	-0,380
Tight junction protein 3 (ZO-3)	Tjp3	-0,252
<b>Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, Signalwege</b>		
Betacellulin, epidermal growth factor family member	Btc	-1,091
Epidermal growth factor	Egf	-0,678

<b>Gen</b>	<b>Symbol</b>	<b>log<sub>2</sub> der Veränderung in Haut</b>
Epidermal growth factor receptor	Egfr	0,873
Fibroblast growth factor 7 (kgf)	Fgf7	0,012
Fibroblast growth factor receptor 1	Fgfr1	0,695
Fibroblast growth factor receptor 2	Fgfr2	0,139
Fibroblast growth factor receptor-like 1	Fgfrl1	1,063
Forkhead box P3	Foxp3	0,601
Insulin-like growth factor 1	Igf1	0,221
Insulin-like growth factor I receptor	Igf1r	0,552
Jun oncogene (AP-1)	Jun	-1,547
Myeloid differentiation primary response gene 88	Myd88	-0,048
Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105 (NFκB)	Nfkb1	0,819
Signal transducer and activator of transcription 3	Stat3	1,401
Transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	Trp53inp1	-1,209
<b>Kinasen und Phosphatasen</b>		
Casein kinase II, alpha 1 polypeptide	Csnk2a1	-0,142
Casein kinase II, alpha 2, polypeptide	Csnk2a2	-0,473
Casein kinase II, beta subunit	Csnk2b	0,685
Dual specificity phosphatase 1	Dusp1	-1,070
Glycogen synthase kinase 3 beta	Gsk3b	0,533
Mmitogen activated protein kinase 1	Mapk1	0,085
Mitogen activated protein kinase 14 (p38)	Mapk14	0,387
Mitogen activated protein kinase 3	Mapk3	0,701
Mitogen activated protein kinase 8 (JNK)	Mapk8	1,608
Mitogen activated protein kinase 9 (JNK2)	Mapk9	0,328
Mitogen-activated protein kinase 12	Mapk12	-0,714
Mitogen-activated protein kinase 6	Mapk6	0,086
Mitogen-activated protein kinase 7	Mapk7	1,491
Myosin, light polypeptide kinase	Mylk	0,324
Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 4, p150	Pik3r4	0,291
Phosphatidylinositol 3 kinase, regulatory subunit, polypeptide 4, p150	Pik3r4	0,291
Phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, alpha polypeptide	Pik3c2a	-0,252
Phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, gamma polypeptide	Pik3c2g	-0,068
Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	Pik3ca	-0,353
Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)	Pik3r1	-0,165
Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta)	Pik3r2	0,742
Protease, serine, 8 (prostasin)	Prss8	0,288
Protein kinase C, Alpha	Prkca	0,263

<b>Gen</b>	<b>Symbol</b>	<b>log<sub>2</sub> der Veränderung in Haut</b>
Protein kinase C, Delta	Prkcd	0,321
Protein kinase C, eta	Prkch	0,746
Protein kinase C, iota	Prkci	0,189
Protein kinase C, theta	Prkcq	-1,461
Protein kinase C, Zeta	Prkcz	0,163
Protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha (PKA)	Prkaca	0,003
Protein phosphatase 2 regulatory subunit B, alpha	PPP2R2A	-0,908
Ras homolog family member A	Rhoa	0,371
RAS related protein 1b	Rap1b	0,226
RAS-related protein-1a	Rap1a	-0,052
Rho-associated coiled-coil forming kinase 1	Rock1	1,052
Rho-associated coiled-coil forming kinase 2	Rock2	-0,023

# 13 Publikationsverzeichnis

## Poster

L. H. Ivanovas, F. R. Rommel, S. Tumala, S. Laux, J. Kruse, J. M. Brandner, E. M. J. Peters: "Stress affects skin barrier function", 41. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, 2014, Köln

L. H. Ivanovas, F. R. Rommel, S. Tumala, J. M. Brandner, J. Kruse, U. Gieler, E. M.J. Peters: „Stress and the skin's barrier function: a role for the NNCS?“ 4th International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine, 2014, Giessen

L. H. Ivanovas, F. R. Rommel, S. Tumala, J. M. Brandner, J. Kruse, U. Gieler, E. M.J. Peters: „Inflammation and stress: the epidermal tight junctions under attack“, 13th Annual European Epidermal Barrier Research Network Meeting, 2015, Rotterdam

## Vorträge

L. H. Ivanovas, F. R. Rommel, S. Tumala, S. Laux, J. Kruse, J. M. Brandner, E. M. J. Peters: „Dünne Haut durch Stress? Epidermale Barriere und Tight Junctions bei allergischer Hautentzündung und Stress“ Deutscher Kongress für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie, 2014, Berlin

L. H. Ivanovas, F. R. Rommel, S. Tumala, J. M. Brandner, J. Kruse, U. Gieler, E. M.J. Peters: "Thee NNCS and the epidermal barrier under attack: the epidermal barrier and tight junctions in allergic skin inflammation" 5th International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine, 2015, Giessen

L. H. Ivanovas, F. R. Rommel, S. Tumala, J. M. Brandner, J. Kruse, U. Gieler, E. M.J. Peters: „Inflammation and stress: the epidermal tight junctions under attack“, 13th Annual European Epidermal Barrier Research Network Meeting, 2015, Rotterdam

# 14 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort/ Datum

---

Unterschrift

## 15 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an die Arbeitsgruppe für Psychoneuroimmunologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Peters, sowie den involvierten MitarbeiterInnen und ForscherInnen. Danke, dass ich dieses Thema überlassen und begleitet bekommen habe. Neben Prof. Peters möchte ich insbesondere Susanne Tumala und Frank Rommel danken, für die Begleitung, Beratung, Aufmunterung und Hinterfragung an richtiger Stelle und dafür, mir zu helfen, das richtige Maß an Ordnung zu finden.

Ebenso möchte ich mich bei den kooperierenden Arbeitsgruppen bedanken, wie der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Kummer, von Prof. Dr. Linn und von Prof. Dr. del Rey, ohne deren Unterstützung wesentliche Aspekte der Arbeit nicht möglich gewesen wären. Prof. Dr. Brandner möchte ich für die fachliche Beratung danken, die den Einblick in die Welt der Barrieren ermöglicht hat.

Der Justus-Liebig-Universität danke ich für die Unterstützung im Rahmen des Graduiertenprogrammes, sowie Prof. Brück für die Möglichkeit nebenberuflich zu Forschen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie. Danke an meinen Vater für die fachlichen Gespräche, zahlreichen Ideen, Korrekturen der Arbeit und die Einarbeitung in die systemtheoretischen Grundsätze. Danke an meine Schwester Elisabeth für die Erstellung der Graphiken und die damit verbundene mühsame Auseinandersetzung mit uns Forschern. Und natürlich besonderen Dank an meinen Mann Hartmut, für die vielen Stunden mit Unterstützung, Toleranz und Humor, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Zahlreiche weitere Menschen haben mich während der Dauer meiner Promotion begleitet und unterstützt. Auch wenn nicht alle persönlich genannt werden, möchte ich mich auch bei Euch bzw. Ihnen bedanken.