Expression und physiologische Funktion des Arylhydrokarbonrezeptors in Zellen der murinen Epidermis

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephanie Marleen Esther Kadow

aus Neuss

Düsseldorf, April 2011

Aus dem IUF-Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatterin: Prof. Charlotte Esser

2. Berichterstatter: Prof. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung:

Gehe in deiner Arbeit auf, nicht unter.
Jacques Tati, 1908 - 1982, französischer Schauspieler

Meiner Familie und

Stefan gewidmet

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN III

ZUSAMMENFASSUNG V

SUMMARY VI

1 EINLEITUNG 1

1.1 Der Arylhydrokarbon Rezeptor 2
1.1.1 Liganden des AhR 4
1.1.2 Klassische synthetische AhR-Liganden 5
1.1.3 Natürliche AhR-Liganden 6
1.1.4 Endogene AhR- Liganden 6

1.2 Das Immunsystem 7
1.2.1 AhR und Immunsystem 9

1.3 Aufbau und Immunsystem der Haut – Zelltypen und Funktionen 10
1.3.1 Epidermale γδ T-Zellen 12
1.3.2 Langerhans Zellen 14
1.3.3 Melanozyten 16
1.3.4 Keratinozyten 17

1.4 Modelle zur Untersuchung des AhR 18
1.4.1 Überaktivierung des AhR mit TCDD 18
1.4.2 AhR- defiziente Mausmodelle 19
1.4.3 Modell der allergischen Kontakthypersensitivitäts-Reaktion 19

1.5 Fragestellung 22

2 ERGEBNISSE 23

I. The Aryl hydrocarbon receptor is a necessary factor for invariant γδ T cell homeostasis in the skin 25

II. Langerhans Cell Maturation and Contact Hypersensitivity are impaired in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Mice 28

III. The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Ultraviolet B Radiation Induced Skin Tanning 31

IV. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs stable establishment of oral tolerance in mice 33

V. Small molecules as friends and foes of the immune system 35

3 DISKUSSION 38

3.1 Die Rolle des AhR für Funktion und Homöostase epidermaler Zellen 38
3.1.1 Der AhR wird in epidermalen γδ T-Zellen konstitutiv exprimiert 38
3.1.2 Epidermale γδ T-Zellen sind in AhR-KO Tieren sifgnifikant reduziert 39
3.1.3 Die Homöostase epidermaler γδ T-Zellen wird durch intrinsische Faktoren AhR-abhängig reguliert 41
3.1.4 Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit wird AhR-abhängig induziert und vermittelt so den Einfluss auf die DETZ-Proliferation 42
3.1.5 Der AhR nimmt Einfluss auf die γδ T-Zell-/LZ-Interaktion 44
3.1.6 AhR und Langerhans Zellen – „klassischer" Signalweg oder „alternative" Funktion? 46
3.1.7 Indolamin- 2,3-Dioxygenase 1 und 2 werden in LZ und BM-DZ AhR-abhängig reguliert 48
3.1.8 AhR-Defizienz inhibiert die Kontakt-Hypersensitivitäts-Reaktion 49
3.1.9 Der AhR reguliert die UV-induzierte Melanozytenproliferation 52
3.1.10 Ausblicke 56

3.2 Die Rolle des AhR im Darm-assoziierten Immunsystem – Auswirkungen auf die orale Toleranz 58

4 REFERENZEN 63

ANHANG A: VERÖFFENTLICHUNGEN 77

ANHANG B: UNVERÖFFENTLICHTE ERGEBNISSE I

B.1. Einfluss der AhR-Defizienz auf die *in vitro* induzierte LZ-Emigration II

B.2. Die Rolle des AhR bei der FITC-induzierte CHS-Reaktion III
B.2.1 Die CHS-Reaktion ist konventionellen AhR-KO Mäusen supprimiert III
B.2.2. Die CHS-Reaktion in konditionalen K5AhR-KO Tieren ist mit dem WT vergleichbar VI
B.2.3. Einfluss einer AhR-Aktivierung mit TCDD auf die FITC vermittelte CHS-Reaktion VII

B.3. AhR-abhängige Induktion von *Ido1* und *Ido2* VIII
B.3.1 Der AhR hat keinen Einfluss auf die TLR Expression oder nachgeschaltete LPS oder IFNγ induzierte Signalwege IX
B.3.2. *Ido2*, nicht aber *Ido1* verfügt über funktionelle DREs XII

B.4. Funktionalität des AhR in epidermale γδ T-Zellen XIV

DANKSAGUNG XV

ERKLÄRUNG XVI

Verwendete Abkürzungen

AhR	Arylhydrokarbonrezeptor
AhRR	AhR Repressor
Aip	AhR interagierendes Protein
APZ	Antigen präsentierende Zelle
ARNT	AhR nukleärer Translokator
bHLH	basic-Helix-Loop-Helix
CD	*engl*. Cluster of Differentiation
CHS	Kontakt-Hypersensitivität (engl. contacthypersensitivity)
ConA	Concavalin A
CSF	*engl.* Colonie stimulating factor
CYP	Cytochrom P450
dDZ	dermale dendritische Zelle
DETZ	dendritische epidermale T-Zelle
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	ß-3,4-Dihydroxyphenylalanin
DRE	Dioxin-responsive Elemente
dsRNS	doppelsträngige RNS
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
eZ	epidermale Zelle
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
HAK	Halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe
Hif1	Hypoxia-induzierbarer-Faktor 1
Hsp90	Hitzeschock Protein 90
Ido	Indolamine- 2,3-Dioxygenase
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFNγ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IGF	*engl.* Insulinlike growth factor
IL	Interleukin

MIP	Makrophagen inflammatorisches Protein
KGF	*engl.* Keratinocyte growth factor
KO	Knock out
LD	Letale Dosis
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Langerhans Zelle
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Abkürzung *engl.* Major Histocompatibility Complex)
MLN	mesenterialer Lymphknoten
MZ	Melanozyt
OT	orale Toleranz
OVA	Ovalbumin
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAS	Per-Arnt-Sim
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. polymerase-chain-reaction)
RNS	Ribonucleinsäure
SCF	*engl.* Stem cell factor
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
ssRNS	einzelsträngige RNS (*engl.* singlestranded RNS)
TCDD	2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo - p - Dioxin
TDO	Tryptophan-1,2-dioxigenase
TGF	*engl.* Tumor-growth-factor
Th1	T-Helferzelle Typ1
Th2	T-Helferzelle Typ2
Th17	IL-17 produzierende T-Zelle
TLR	*engl.* Toll-like-receptor
TNF	Tumornekrosesfaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
UVB	Ultraviolett B
WT	Wildtyp (hier: C57BL/6 Mäuse)
KO	*engl.* Knock out
XRE	Xenobiotika-responsives Element
α-MSH	Melanozyten-stimulierendes-Hormon

Zusammenfassung

Die nur aus wenigen Zellschichten bestehende, oberste Schicht der Haut, die Epidermis, hat als äußerste Körperbegrenzung physikalisch/mechanische, physiologische und immunologische Barrierefunktionen. Die Epidermis besteht hauptsächlich aus strukturgebenden Keratinozyten, die eng mit Immunzellen und Melanozyten vernetzt sind. Immunzellen haben die Aufgabe, bei Kontakt mit Bakterien oder Viren diese als potentiell gefährlich oder harmlos einstufen, um entweder eine adaptive Immunantwort oder Toleranz zu induzieren. Melanozyten produzieren Melanin, welches die Haut vor UV-induzierten DNS-Schäden bewahrt. Faktoren aus der Umwelt, z.B. niedermolekulare chemische Substanzen oder UV-Licht, wirken auf die Haut und das epidermale Immunsystem und können so zu der Entstehung von allergischen Haut-Reaktionen, veränderten Wundheilungsprozessen oder auch UV-induziertem Hautkrebs führen. Sensor vieler niedermolekularer Chemikalien und Licht, insbesondere UV-Licht, ist der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR), auch bekannt als Dioxin-Rezeptor. Dieser evolutionär konservierte Transkriptionsfaktor vermittelt chemische Signale in die Zelle und löst dort in zellspezifischer Weise Anpassungsreaktionen aus. Zudem ist der AhR-Signalweg in vielerlei zellulären Differenzierungsprozessen involviert.

In meiner Dissertation bin ich der Frage nachgegangen, welche physiologischen Prozesse der AhR in Antwort auf Umweltstimuli in den einzelnen Zelltypen der Epidermis beeinflussen kann und welche Konsequenzen sich daraus für das immunologische Gefüge der Haut, z.B. in Hinblick auf allergische Reaktionen, ergeben.

Ich untersuchte insbesondere die Langerhans Zellen, die dendritischen epidermalen γδ T-Zellen und Melanozyten. Ich zeige in drei hier vorgelegten Originalveröffentlichungen (I-III)[1], dass der AhR in Antwort auf umweltinduzierte Stimuli eine wichtige Rolle für das Barriereorgan Haut bei der Vermittlung von Effekten auf das Immunsystem und den UV-Schutz spielt. Die Aktivität des AhR muss immer zelltypspezifisch betrachtet werden. Sie wirkt sich durch die komplexe Interaktion der Zellen untereinander jedoch auch auf das gesamte epidermale Netzwerk aus. Dieser übergreifende Einfluss des AhR zeigte sich besonders im Hinblick auf Reifungs-, Differenzierungs- und Proliferationsprozesse der verschiedenen epidermalen Zelltypen. So wird der Differenzierungs- und Reifestatus der epidermalen Langerhans Zellen, der eine entscheidende Bedeutung für die Induktion einer adaptiven Immunantwort oder Toleranz hat, durch extrinsisch vermittelte Faktoren der γδ T-Zelle, wie GM-CSF-Sekretion, reguliert. γδ T-Zellen dagegen, die eine funktionelle Rolle bei Wundheilungsprozessen und Tumorprävention haben, sind auf die AhR-vermittelte Transkription der Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit für ihre eigene Proliferation und Homöostase angewiesen. Einen ähnlichen Mechanismus konnte ich für Melanozyten beobachten. Auch in diesen hat die AhR-abhängige Expression von c-kit Einfluss auf die UV-initiierte Proliferation.

Die Daten einer weiteren Publikation (IV)[2] bestätigen die bedeutende Rolle des AhR in Barriereorganen. Sie zeigen, dass die zelltypspezifische Aktivierung des AhR durch umweltinduzierte Stimuli auch im Darm eine übergreifende Rolle bei der Regulation von immunologischen Prozessen, z.B. der Entstehung oraler Toleranz, einnimmt.

Der AhR ist ein Sensor von niedermolekularen Chemikalien. Meine Daten zeigen, dass er ein großes Potential in therapeutischen und präventivmedizinischen Ansätzen hat. Dieses Potential sollte in Zukunft weiter erforscht werden.

---

[1] (I) Stephanie Kadow, Bettina Jux, u.a. 'Aryl hydrocarbon receptor is critical for homeostasis of invariant gamma-delta T cells in the murine epidermis', *Journal of Immunology* (2011) *in revision*;
(II) Bettina Jux, Stephanie Kadow und Charlotte Esser, 'Langerhans Cell Maturation and Contact Hypersensitivity are impaired in Aryl Hydrocarbon receptor-null Mice', *Journal of Immunology, 182 (2009), 6709-6717*;
(III) Bettina Jux, Stephanie Kadow, Sandra Luecke, u.a., 'The Aryl Hydrocarbon receptor Mediates UVB Radiation induced Skin Tanning', *The Journal of Investigative Dermatology, 131 (2011), 203-210;*

[2] (IV) Stefanie Chmill, Stephanie Kadow, u.a., '2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs Stable Establishment of Oral Tolerance in Mice', *Toxicological Science, 118 (2010), 98-107;*

Summary

The uppermost layer of the skin, the epidermis, has physical/mechanical, physiological and immunological barrier functions. The epidermis consists mainly of texturing keratinocytes which are closely linked to immune cells and melanocytes. Immune cells have to decide if any recognized bacteria or virus is either harmful or harmless and initiate adaptive immune responses or induce tolerance. Melanocytes produce melanin and thereby grant protection against UVB induced DNA damage. However, environmental factors, e.g. low molecular weight chemicals or UV-irradiation, can influence the skin and the epidermal immune system, leading to the development of allergic skin diseases or UV-induced melanoma. A sensor of a vast variety of low molecular weight chemicals and light, especially UV-light, is the aryl hydrocarbon receptor (AhR), also known as dioxin-receptor.
The AhR is an evolutionary conserved transcription factor which mediates chemical signals into the cell, leading to cell-specific adaptation. In addition, AhR-signalling is involved in various cellular differentiation processes.

In my PhD thesis I addressed the physiological processes which might be influenced by an environmentally activated AhR in different epidermal cell-types and, as a result, which consequences arise for the immunological network of the skin regarding e.g. allergic skin diseases.

In particular, I investigated Langerhans cells, dendritic epidermal T cells and melanocytes. Based on three publications (I-III)[1], I show the important role of the AhR for the barrier organ skin in mediating environmental effects to the immune system and UV-protection. Noticeably, AhR-activity is always to be considered cell-type specific, but due to complex cellular interactions in the epidermal layer overall effects also have to be taken into account. These overlapping effects of the AhR are particularly related to maturation, differentiation and proliferation processes in the different epidermal cell types. Thus, the differentiation and maturation state of epidermal Langerhans cells which are relevant for the induction of adaptive immuneresponses or tolerance are regulated by γδ T cell mediated factors, e.g. GM-CSF secretion. γδ T-cells on the other hand, which have a functional role for wound healing and tumor prevention, depend on AhR mediated induction of the receptor-tyrosin-kinase c-kit for their proliferation and maintenance in the epidermis. C-kit induction is also required for the UV-induced tanning response in melanocytes.

The important role of the AhR in barrier organs is also reported in a publication regarding the gut associated immune system (IV)[2]. I was able to show that cell-type specific activation of AhR by environmental stimuli has a pivotal effect on the regulation of immunological processes and, in this case, can influence the establishment of oral tolerance.

In conclusion, my data elucidate the important role of AhR as a sensor of low molecular weight substances and in addition show its great potential for therapeutic and preventional approaches which should be a topic of future research.

[1] (I) Stephanie Kadow, Bettina Jux, u.a. 'Aryl hydrocarbon receptor is critical for homeostasis of invariant gamma-delta T cells in the murine epidermis', *Journal of Immunology* (2011) *in revision*;
(II) Bettina Jux, Stephanie Kadow und Charlotte Esser, 'Langerhans Cell Maturation and Contact Hypersensitivity are impaired in Aryl Hydrocarbon receptor-null Mice', *Journal of Immunology, 182 (2009), 6709-6717*;
(III) Bettina Jux, Stephanie Kadow, Sandra Luecke, u.a., 'The Aryl Hydrocarbon receptor Mediates UVB Radiation induced Skin Tanning', *The Journal of Investigative Dermatology, 131 (2011), 203-210;*

[2] (IV) Stefanie Chmill, Stephanie Kadow, u.a., '2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs Stable Establishment of Oral Tolerance in Mice', *Toxicological Science, 118 (2010), 98-107;*

1 Einleitung

Das Immunsystem hat die Aufgabe, Pathogene zu erkennen und eine entsprechende Abwehrreaktion einzuleiten. Es ist daher ganz besonders darauf angewiesen, auf externe Stimuli wie Bakterien, Viren oder auch Chemikalien sowie Toxine zu reagieren. Im immunologischen Sprachgebrauch wird hierfür oft der Ausdruck „Erkennen“ verwendet. Um diese Aufgabe wahrzunehmen, durchlaufen Immunzellen komplexe, auch intrinsisch gesteuerte Differenzierungsprozesse und interagieren in vielfältiger Weise miteinander. Zelluläre Sensoren, die die Fähigkeit besitzen, Stimuli aus der Umgebung in die Zelle zu vermitteln und so zellspezifisch Anpassungsreaktionen zu regulieren (z.B. Erkennung von Bakterien mittles TLRs), haben deshalb eine besondere funktionelle Bedeutung für das Immunsystem.

Umwelteinflüsse, z.B. niedermolekulare chemische Substanzen oder UV-Licht, wirken besonders an Grenzflächenorganen wie der Haut auf das lokale immunologische Netzwerk. Diese Einflüsse können zu der Entstehung von allergischen Haut-Reaktionen, veränderten Wundheilungsprozessen oder auch UV-induziertem Hautkrebs führen. Sensor vieler niedermolekularer Chemikalien und von UV-Licht ist der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR). Der AhR ist als evolutionär konservierter Transkriptionsfaktor ebenfalls an vielerlei physiologischen, zellulären Differenzierungsprozessen beteiligt. Die Vermittlung der umweltinduzierten Stimuli über den AhR in die Zelle kann so zellspezifische Anpassungsreaktionen auslösen, welche eine unbekannte Einflussgröße auf den Ablauf von Immunreaktionen darstellen und welche an der Entstehung von z.B. allergischen Hautreaktionen beteiligt sein können.

Die physiologische Bedeutung des AhR für das immunologische Netzwerk der Haut, besonders der Epidermis, ist bisher nicht untersucht worden. Zu Beginn der hier vorgelegten Dissertation existierte nur eine Arbeit, die Effekte einer TCDD-induzierten AhR-Aktivierung auf epidermale Immunzellen (Langerhans Zellen; LZ) beschreibt. Die Frage, ob diese Effekte durch die AhR-Aktivierung in LZ selbst oder durch Effekte in Nachbarzellen verursacht wurden, konnte dabei nicht beantwortet werden[1]. Weitere Arbeiten, die die physiologische Funktion des AhR für die einzelnen epidermalen Immunzellsubtypen untersuchen und so Aufschluss über mögliche Einflüsse des AhR infolge seiner umweltinduzierten Aktivierung geben, gibt es bisher nicht. In meiner Arbeit befasse ich mich deshalb mit der Klärung der grundlegenden Fragen, (i) welche zelltypspezifischen, physiologischen Prozesse der AhR in den einzelnen epidermalen Zellpopulationen reguliert und (ii) welchen übergreifenden Einfluss diese Prozesse auf die Regulation des

epidermalen Immunsystems in Antwort auf umweltinduzierte Stimuli, z.B. durch anthropogene Substanzen, haben können.

1.1 Der Arylhydrokarbon Rezeptor

Der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR), früher auch bekannt als „Dioxin-Rezeptor", wurde 1976 als Vermittler der organspezifischen, toxischen Effekte der Dioxine entdeckt[2]. Nach seiner Sequenzierung 1992 wurde er als ligandeninduzierter Transkriptionsfaktor, der zur evolutionär konservierten PAS-bHLH Superfamilie (Per-Arnt-Sim) gehört, identifiziert[3,4]. Die N-terminale Basic-Helix-Loop-Helix Domäne dient der DNA-Bindung und Dimerisierung[5,6]. Die PAS-Domäne, benannt nach den homologen Proteinen *period* (Per) und *single-minded* (Sim) in *Drosophila melanogaster*[7,8] und nach dem verwandten Säugerprotein ARNT (AhR-nukleärer Translokator), dient der Interaktion mit Chaperon-Molekülen (u.a. Hsp90) und der Dimerbildung von PAS-bHLH-Proteinen untereinander[6].

Nach bisherigen Erkenntnissen liegt der AhR in nicht aktiviertem Zustand als Multiproteinkomplex mit den stabilisierenden Chaperon-Molekülen AIP (AhR interagierendes Protein), zwei Molekülen Hsp90 (Hitzeschockprotein 90)[9] und dem p23[10] im Zytoplasma der Zelle[11,12]. Die Bindung eines Liganden führt zu einer Konformationsänderung und Translokation des Komplexes in den Zellkern. Hier dimerisiert der AhR nach Abspaltung der Chaperon-Moleküle mit ARNT. Das so entstandene Heterodimer bildet den funktionellen Transkriptionskomplex. Dieser bindet an sogenannte Dioxin-responsive Elemente (DREs) oder allgemeiner an AhR-Responsive Elemente (AREs) in der Promotor- oder Enhancerregion der Zielgene und induziert die Expression der entsprechenden Gene[13-16]. Die Induktion der Gene über den AhR/ARNT-Komplex wird in der Literatur meist als klassischer AhR-Signalweg bezeichnet. Eine schematische Darstellung dieses Signalwegs ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Zu den bekanntesten AhR-Zielgenen gehören verschiedene Gene, die fremdstoffmetabolisierende Enzyme kodieren, wie z.B. die Cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2 und CYP1B1[17,18].

Neben Genen des Fremdstoffmetabolismus konnten bis jetzt mehrere tausend Gene identifiziert werden, die ebenfalls ein oder mehrere DREs in ihrer Promoterregion enthalten und daher direkt oder indirekt über den AhR reguliert werden könnten[19,20]. Darunter befinden sich Gene, die für Proteine des Zellzyklus, der Zelldifferenzierung, der Apoptose oder des Immunsystems kodieren[19]. Welche transkriptionellen Auswirkungen eine AhR-Aktivierung für die jeweilige Zelle hat, kann nicht allgemeingültig vorhergesagt werden, da

sowohl die Art des Liganden und seine Affinität zum AhR als auch der Zelltyp eine bisher nicht genau definierte Rolle spielt.

Die transkriptionelle Aktivität des AhR kann über unterschiedliche Mechanismen reguliert werden. Eine Möglichkeit ist die negative Rückkopplung durch die Aktivität des AhR selbst. So führt eine vermehrte AhR-Aktivität zu einer erhöhten Expression des Arylhydrokarbonrezeptor-Repressors (AhRR). Ebenso wie der AhR gehört der AhRR zu der PAS-bHLH-Familie, was ihm sowohl das Binden an die DNS als auch die Dimerisierung mit ARNT ermöglicht. Durch die AhR induzierte Expression des AhRR kommt es zu einer Konkurrenz um ARNT. Das resultierende Heterodimer AHRR/ARNT kann daraufhin an DRE-Sequenzen binden und diese blockieren, ohne transkriptionell aktiv zu sein. Unter diesen Bedingungen ist die AhR/ARNT induzierte Genexpression reduziert oder unterdrückt[21,22]. (s. Abb. 1.1)
Eine weitere Regulation erfolgt über die AhR-Ubiquitinierung, die nach DNS-Bindung des aktivierten Rezeptors eingeleitet wird und den proteasomalen Abbau des AhR induziert[23,24]. Zusätzlich führt die AhR-induzierte Expression Liganden-metabolisierender Enzyme selbst zu einer Abschwächung der transkriptionalen AhR-Aktivität[25].

Neben dem oben beschriebenen, klassischen AhR/ARNT-Signalweg zeigen neuere Erkenntnisse, dass der AhR auch in vielen physiologisch relevanten, alternativen Signalwegen als Ko-Faktor aktiv ist und regulatorische Funktionen ausübt.
Es wurde z.B. gezeigt, dass der AhR mit Teilen des NFkB-Signalweges (RelA und RelB) und mit Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs) interagiert und eine Gentranskription induzieren kann[26-30] (s. Abb. 1.1). Die Zielgene dieser interaktiven Signalwege sind unterschiedlich, z.B. induziert TCDD die DNS-Bindung des RelB/AhR-Heterodimers in humanen Makrophagen, was zur Sekretion proinflammatorischer Chemokine führt[30]. Eine Regulation von STAT1 über den AhR ist hingegen für die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th_{17} Zellen notwendig[31]. Zudem sind Wechselwirkungen mit Hif1α und dem Östrogenrezeptor beschrieben[26,32,33]. Vor kurzem konnte außerdem eine Interaktion mit E2F1, einem Transkriptionsfaktor, der für den Übergang der G_1- in die S-Phase des Zellzyklus notwendig ist, nachgewiesen werden[34]. An diesen und vielleicht noch anderen, bisher nicht entdeckten Stellen, können AhR-regulierte Signalwege durch umweltinduzierte Stimuli beeinflusst werden.

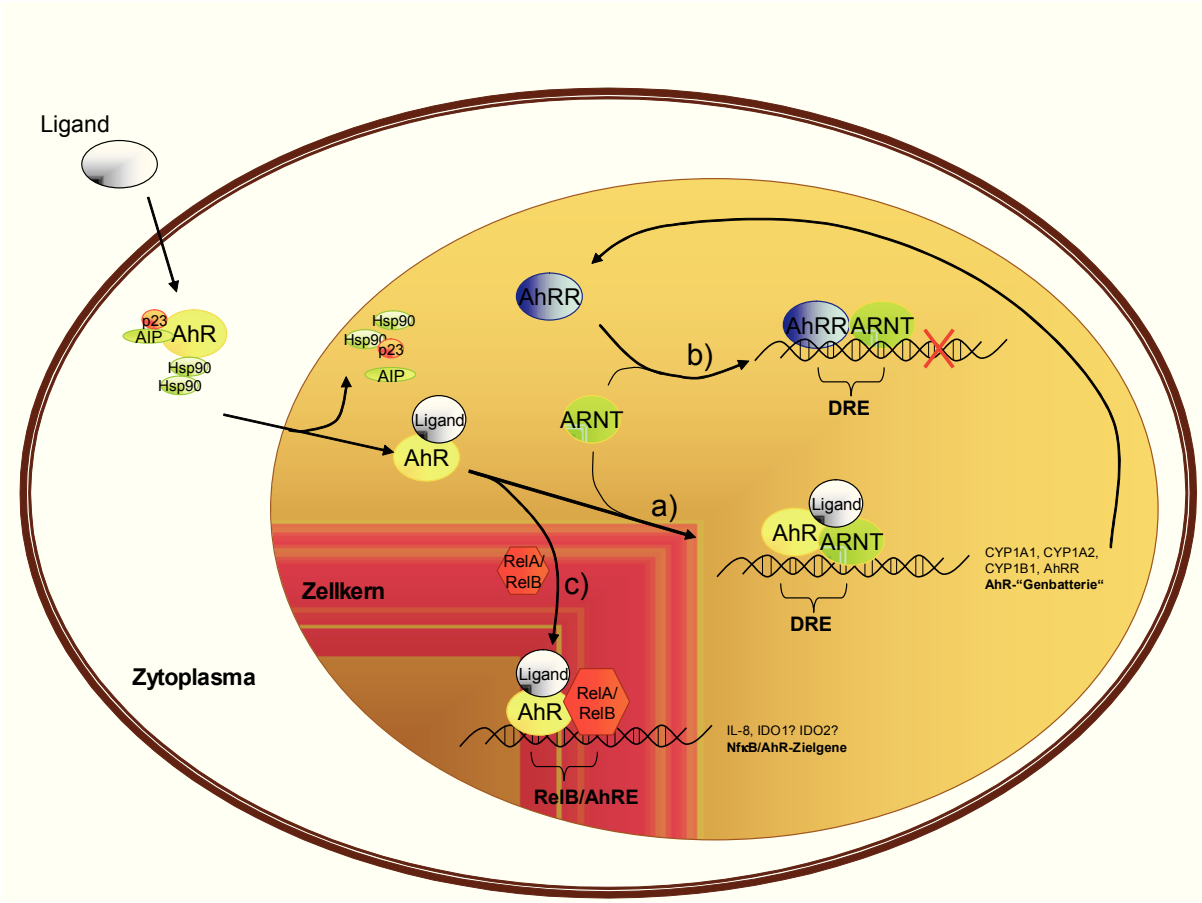


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des AhR-Signalweges. Der klassische AhR-Signalweg (a) induziert die sogenannte „AhR-Genbatterie" des Fremdstoffmetabolismus und resultiert zusätzlich in die eigene Signalweg-Inhibierung durch Induktion des AhRR (b). Alternativ beschriebener Mechanismus der AhR-Interaktion mit NfκB an spezifischen RelB/AhRE responsiven Elementen (c).

1.1.1 Liganden des AhR

Der AhR verfügt als einziges Mitglied der bHLH-PAS Familie über eine Ligandenbindestelle. Diese Bindestelle ist nach der aktuellen Datenlage relativ unspezifisch. Die Mindestanforderungen an den Liganden sind lediglich, dass er planar, unpolar und hydrophob sein muss[35-37]. Eine Übersicht über die zurzeit bekannten AhR-Liganden wurde Anfang 2011 publiziert[38].

Grob lassen sich die Liganden in zwei große Kategorien unterteilen: (i) in der Umwelt weit verbreitete, synthetische Liganden, die meist als Folge anthrophogener Aktivitäten entstehen und (ii) natürliche Liganden, die über die Nahrung in den Organismus aufgenommen oder endogen im Körper gebildet werden. Abbildung 1.2 gibt einen schematischen Überblick über typische Vertreter der beiden Kategorien.

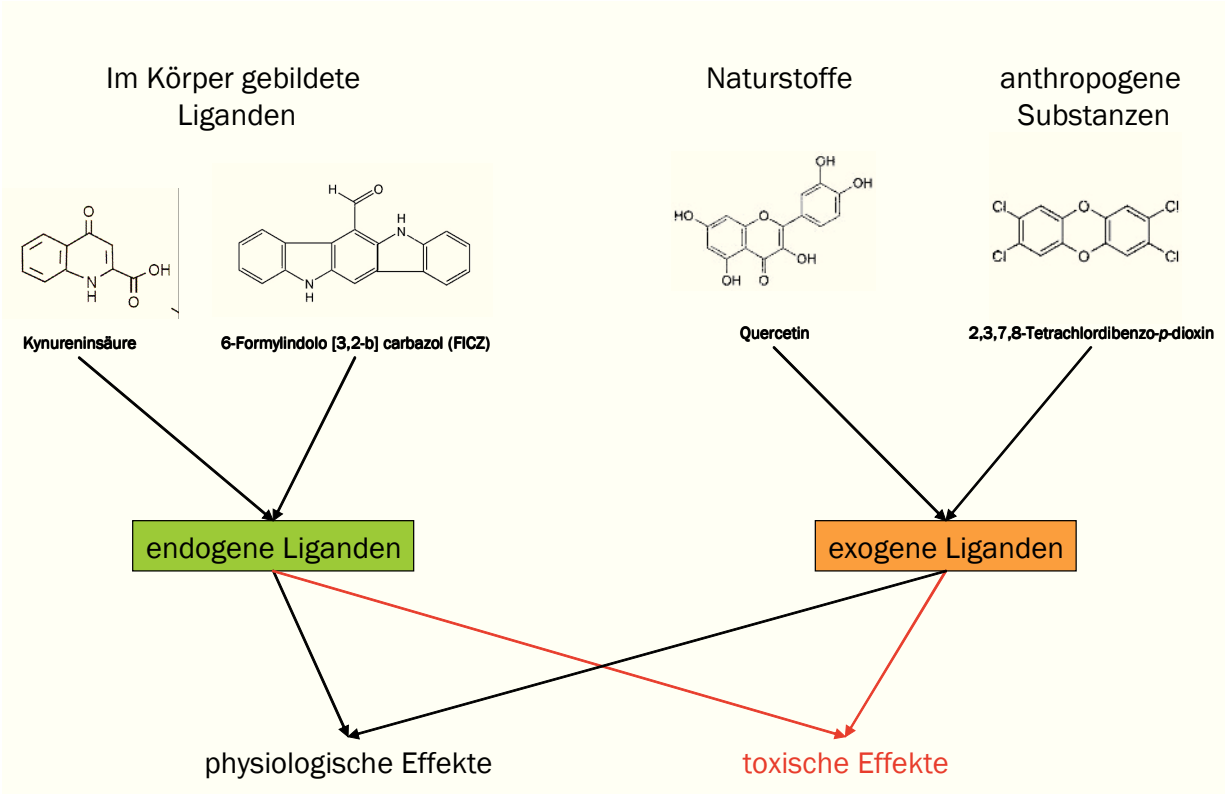


Abb. 1.2 Synthetische und natürliche, aber auch endogen gebildete AhR-Liganden können physiologische und toxische Effekte vermitteln. Naturstoffe, anthropogene Substanzen und endogen gebildete Liganden können durch die Aktivierung des AhR im Organismus physiologische Funktionen vermitteln, aber auch toxische Effekte auslösen. Natürliche Substanzen, die an sich keine AhR-Liganden sind, können durch Umwandlung im Organismus in endogene AhR-Liganden umgewandelt werden (z.B. die Umwandlung der Aminosäure Tryptophan zu FICZ oder Kynureninen).

1.1.2 Klassische synthetische AhR-Liganden

Zu den synthetisch vorkommenden, anthropogenen Substanzen zählen eine Reihe von weit verbreiteten, lipophilen Umweltchemikalien wie die halogenierten, aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAKs), deren bekannteste Vertreter die Biphenyle und die Dioxine sind. Dioxine und polyhalogenierte Biphenyle reichern sich aufgrund ihrer Lipophilie häufig in fetthaltigen Lebensmitteln an, z.B. in Fleisch, Fisch, Eiern und Milchprodukten, und gelangen hierüber in den Organismus. Die Hauptexpositionsquelle für andere AhR-Liganden, wie Benzo[a]pyren und 3-Methymcholanthren (3-MC), ist der Tabakrauch. 2,3,7,8 Tetrachlordibenzo-p-Dioxin ((TCDD) s. Abb. 1.2) hat die höchste Affinität zum AhR und ist zugleich der toxischste synthetische AhR-Ligand, der für die Bewertung von Toxizität und Bindungsaffinität anderer AhR-Liganden herangezogen wird (TEF, Toxizitätsäquivalenzfaktor).

1.1.3 Natürliche AhR-Liganden

Zu den natürlich vorkommenden AhR-Liganden zählen hauptsächlich pflanzliche Nahrungsinhaltsstoffe aus der Gruppe der Flavonoide, Karotinoide und Indole[39]. Bekannte Vertreter sind Curcumin, Quercetin oder Resveratrol[40-42]. Die größte Expositionsquelle von Organismen für natürliche AhR-Liganden ist die Nahrung.

1.1.4 Endogene AhR- Liganden

Auch in der Abwesenheit von exogenen Liganden ist der AhR-Signalweg aktiviert, was für die Existenz von endogenen Liganden des AhR spricht (Nguyen and Bradfield 2008). In den letzten Jahren sind vermehrt physiologisch relevante, im Körper gebildete, endogene Liganden identifiziert worden. Hauptsächlich handelt es sich hier um Tryptophan-Derivate[43-46]. Dazu zählt das 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), ein Ligand, der sogar eine höhere Affinität zum AhR als TCDD aufweist und durch Ultraviolett B (UVB)-Strahlen aus Tryptophan zunächst in der Haut entsteht, aber auch im Körper messbare Konzentrationen erreicht[45]. FICZ wird allerdings innerhalb weniger Stunden durch die induzierten CYP 450 abgebaut, sein Effekt ist daher nur transient[43]. Vor allem in der Haut könnte FICZ aber zu einer AhR-Aktivierung beitragen, da diese einer ständigen UVB-Strahlung ausgesetzt ist.

Anfang 2010 sind die Kynurenine, insbesondere die Kynurenin- und Xanthurensäure, als Liganden des AhR in das Interesse der Forschung gerückt[47,48]. Kynurenine sind Abbauprodukte des Tryptophans. Die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme für diese Reaktion sind die hauptsächlich in dendritischen Zellen, Makrophagen und Epithelzellen vorkommende Indolamin-2,3-dioxygenase 1 und 2 (Ido1 und Ido2) und die in der Leber vorkommende Tryptophan-1,2-dioxygenase (TDO).
Für meine Arbeit ist es wichtig zu betonen, dass die Induktion von Ido für humane LZ bereits 2004 beschrieben wurde[49]. 2008 konnten Vogel et al. die AhR-abhängig regulierte *Ido1* und *2* Induktion in Zelllinien zeigen[50] und auch im Rahmen dieser Dissertation konnte ich nachweisen, dass die Gene für *Ido1* und *Ido2* in dendritischen Zellen AhR-defizienter Mäuse nicht induziert werden können (s. II). Mögliche Konsequenzen, die diese Ergebnisse für das epidermale Immunsystem haben, werden in den folgenden Kapiteln und durch die Ergebnisse der Dissertation näher erläutert.

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor Pathogenen, entarteten körpereigenen Zellen und Toxinen zu schützen. Diese Aufgabe wird durch ein komplexes, sensibel reguliertes Zusammenspiel verschiedener Zellen und Moleküle des angeborenen und des adaptiven Immunsystems bewältigt. Störungen in dieser Interaktion, z.B. durch eine veränderte Transkription von Genen, die für Differenzierung oder immunologische Kompetenz der beteiligten Zellen kodieren, können zu unerwünschten und gefährlichen Konsequenzen für den Organismus, z.B. der Entstehung von Allergien, führen.

Als Barriere zur Außenwelt verhindern Epithelien das Eindringen von Pathogenen (Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten) in den Organismus. Gelingt es den Pathogenen, diese erste Barriere zu überwinden, stehen spezialisierte Zellen des angeborenen Immunsystems bereit, um eine Infektion einzudämmen, zu verhindern oder eine pathogenspezifische adaptive Immunantwort zu induzieren.
Die wichtigsten Effektor-Zellen des angeborenen Immunsystems sind die Phagozyten, zu denen dendritische Zellen (DZ), Makrophagen, Granulozyten und Neutrophile zählen. Phagozyten sind häufig lokal in Grenzflächenorganen vertreten, wie z.B. Langerhans Zellen in der Epidermis, und verfügen über ein begrenztes Rezeptorrepertoire von toll-like-Rezeptoren (TLR), die evolutionär konservierte Strukturen von Pathogenen außer- und innerhalb von Zellen, z.B. Lipopolysaccharide (Bakterien), CpG-Sequenzenanhäufungen (bakterieller oder viraler DNS), dsRNS oder ssRNS (Viren), erkennen. Wird eine entsprechende Struktur erkannt, d.h. bindet sie an den TLR, wird das Pathogen durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen und unschädlich gemacht. Bestandteile der Pathogene werden daraufhin als Peptide an der Zelloberfläche präsentiert, die von Zellen des adaptiven Immunsystems erkannt und das Ziel einer Abwehrreaktion werden.
Die Zellen des adaptiven Immunsystems, wie B- und T-Zellen, erhalten durch somatische Rekombination ein stark diversifiziertes Rezeptorrepertoire. Dies führt dazu, dass mit einer hohen Wahrscheinlichkeit T- oder B-Zellen vorhanden sind, deren Rezeptor die Antigene eines Pathogens erkennt, wodurch eine primäre, antigenspezifische zelluläre und humorale Immunantwort eingeleitet wird. Allerdings brauchen die Zellen des adaptiven Systems neben der Präsentation des Antigens über MHC-Moleküle weitere Zusatzinformationen in Form ko-stimulatorischer Moleküle und Zytokine, um effektiv reagieren zu können. Diese Zusatzinformationen werden von besonderen Phagozyten, den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), zu denen auch die DZ gehören, vermittelt. DZ stellen somit das Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar.

Auf zellulärer Ebene wird von DZ in Abhängigkeit von der Art des Pathogens und den vermittelten Zusatzsignalen die Differenzierung und Proliferation von spezifischen T-Zellen induziert.

Man unterscheidet $CD8^+$ zytotoxische Effektor-T-Zellen, die über MHC-I Moleküle präsentierte Antigene direkt auf infizierten Zellen erkennen und daraufhin in den betroffenen Zellen Apoptose induzieren, von $CD4^+$ Effektor-T-Zellen (T_{eff}), die spezifische Antigene erkennen, die von DZ über MHC-II Moleküle präsentiert werden. T_{eff}–Zellen werden auch T Helfer-Zellen genannt (Th).

Die von DZ sezernierten Zytokine sind dafür ausschlaggebend, in welchen Subtyp sich die Th-Zellen differenzieren. Derzeit sind drei Subpopulationen von T-Helfer-Zellen bekannt, die auch unterschiedliche biologische Funktionen haben: Th_{17}-Zellen, die durch die Zytokine TGFβ und IL-6 induziert werden und durch IL-17 Sekretion umgebende Zellen ihrerseits zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6 und GM-CSF) anregen; Th_1-Zellen, die durch IL-12 und IFNγ induziert werden und über die eigene IFNγ Sekretion Zellen des angeborenen Immunsystems, z.B. Makrophagen, aktivieren; Th_2-Zellen, die durch IL-4 induziert werden (die Herkunft des IL-4 ist in diesem Fall noch nicht vollständig geklärt) und selbst hauptsächlich IL-4 produzieren, wodurch sie eine humorale Immunantwort induzieren. Im Thymus gebildete, natürlich vorkommende $CD4^+$ regulatorische T-Zellen ($_nT_{reg}$) bilden die Gegenspieler zu den T_{eff}-Zellen, indem sie Th-Zellen über IL-10 Sekretion supprimieren und den Körper so vor einer überschießenden Immunreaktion schützen[51]. Die Differenzierung naiver T-Zellen in T_{reg} (induzierbare $_iT_{reg}$) wird nach bisherigen Erkenntnissen auch unter nicht inflammatorischen Bedingungen induziert. Dies geschieht, wenn DZ in der Peripherie Autoantigene von apoptotischen Zellen ohne inflammatorischen Stimulus aufnehmen und im Kontext reduzierter Mengen Ko-stimulatorischer Moleküle zusammen mit einer TGFβ–Sekretion an naive T-Zellen präsentieren. Durch diesen Prozess kann das Immunsystem eine Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen entwickeln und lernt diese von potentiell gefährlichen Antigenen zu unterscheiden.

Im Vergleich zum angeborenen Immunsystem, das innerhalb weniger Minuten oder Stunden auf das Eindringen von pathogenen Keimen reagieren kann, brauchen Zellen des adaptiven Immunsystems mehrere Tage, um klonal zu expandieren und in Effektorzellen auszudifferenzieren, um so das Pathogen effizient bekämpfen zu können. Im Gegensatz zu Zellen des angeborenen Immunsystems bilden Zellen des erworbenen Immunsystems aber nach einem ersten Kontakt mit dem Pathogen spezifische Gedächtniszellen. Diese antigenspezifischen T- oder B-Gedächtniszellen können bei einem erneuten Kontakt mit

demselben Antigen innerhalb kurzer Zeit zu proliferierenden Effektor-Zellen reaktiviert werden, die das Pathogen schnell und gezielt bekämpfen können (Impf-Prinzip).

1.2.1 AhR und Immunsystem

Die Abhängigkeit des Immunsystems von strikt regulierten, mannigfaltigen Regulations- und Interaktionsmechanismen kann es auch anfällig für Störungen machen, die sich für den Organismus negativ auswirken können.

Es ist seit langem bekannt, dass die AhR-vermittelten toxischen Effekte des TCDD das Immunsystem der Maus besonders stark betreffen und zu einer systemischen Immunsuppression führen. Von der Immunsuppression sind nahezu alle Komponenten der Immunantwort betroffen. Neben der Atrophie des Thymus[52] und einer gestörten T-Zell Entwicklung und Emigration unreifer T-Zell-Vorläufer aus dem Thymus[53-55] wurde auch eine verminderte Proliferation aktivierter B-Zellen und eine Beeinflussung der humoralen Immunantwort beobachtet[56]. Zudem hat TCDD einen starken Einfluss auf hämatopoetische Stammzellen[57,58]. TCDD verändert das Migrationsvermögen, die Antigenpräsentation und die Fähigkeit dendritischer Zellen, naive $CD8^+$ T-Zell zu stimulieren[59,60]. Außerdem hat eine Aktivierung des AhR Einfluss auf die Zytokinexpression und kann so das Gleichgewicht der adaptiven Immunantwort (z.B. Th_1/Th_2) verlagern[61,62].

Eine Rolle des AhR-Signalweges für die Funktion des Immunsystems bestätigt sich weiter durch Beobachtung an AhR-defizienten Mäusen. Bei ihnen wurden verschiedene hämatopoetische Defekte beschrieben. Darunter eine Veränderung der Lymphozytenzahlen und Vergrößerung der Milz[63-65]. In *in vitro* Stimulationen von T-Zellen AhR defizienter Mäuse mit dem Mitogen ConcanavalinA oder eine Restimulation mit Ovalbumin konnte dagegen eine vermehrte Sekretion der proinflammatorischen Th_1 Zytokine IFNγ und IL-12 gezeigt werden[66]. Zudem sind AhR-defiziente Mäuse anfälliger für bakterielle Infektionen mit Listerien[67] und zeigen eine Überempfindlichkeit gegenüber einem LPS-induzierten septischen Schock, der durch eine Makrophagen Dysfunktion mit vermehrter IL-1β Sekretion ausgelöst wird[68]. Kimura et al. und Veldhoen et al. konnten außerdem 2009 zeigen, dass die Funktion von Th_{17}-Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten spielen und auch in Verbindung mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen gebracht werden (EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; Multiple Sklerose), in AhR-defizienten Mäusen *in vitro* inhibiert ist. Diese Zellen sind *in vitro* nicht in der Lage, IL-22 zu exprimieren. Umgekehrt

führte eine *in vitro* Stimulation der Th_{17}-Zellen aus WT Mäusen mit AhR-Liganden zu IL-22 Expression[26,69,70], was ein Erklärungsansatz für die verstärkende Wirkung von AhR-Liganden auf die Pathogenese der zuvor genannten Autoimmunerkrankungen bieten könnte.

Die aufgeführten Beispiele verdeutlichen, dass der AhR das Potential hat, an vielen Punkten der Immunregulation einzugreifen. Viele zugrundeliegenden Mechanismen, z. B. die Differenzierung der Th_{17} Zellen über die AhR-abhängige IL22 Induktion, konnten durch intensive Forschung bereits aufgedeckt werden. Allerdings gibt es bis jetzt keine Arbeiten, die den Einfluss des AhR unter immunologischen Gesichtspunkten auf das Netzwerk epidermaler Zellen beschreiben.

Welche Zellen zu diesem epidermalen Immunsystem gehören, welche Aufgaben sie erfüllen und welche Hinweise uns darauf schließen lassen, dass der AhR auch hier durch seine physiologische Funktion Einfluss auf das Immunsystem nimmt, wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

1.3 Aufbau und Immunsystem der Haut – Zelltypen und Funktionen

Die Haut hat als Barriereorgan die Aufgabe, den Organismus gegen Einflüsse von außen zu schützen. Sie verhindert den Verlust von Körperflüssigkeiten, wirkt als Wärmeregulator und vermittelt über Rezeptoren das Temperatur-, Schmerz- und Tastempfinden. Neben ihrer Eigenschaft als mechanische Barriere gegen das Eindringen von chemischen, physikalischen (z.B. UV-Strahlung) und biologischen (z.B. Mikroorganismen) Noxen ist die Haut zusätzlich mit Zellen des angeborenen Immunsystems und mit Zellen, die Schutzfunktionen ausüben (z.B. Melanozyten), ausgestattet.

Die Haut ist aus verschiedenen Schichten aufgebaut, die sich in Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subcutis (Unterhaut) unterteilen lassen (Abb. 1.3). Die Subcutis dient als Unterlage für die darüber liegenden Zellschichten. Sie besteht aus dem subcutanen Fettgewebe und aus lockerem Bindegewebe. In ihr liegen Nerven und größere Blutgefäße sowie Druckrezeptoren. Die darüber liegende Dermis besteht zu 90% aus festem Bindegewebe und Fibroblasten. Durch ein feines Netzwerk an Blutgefäßen versorgt sie die Grenzschicht der Epidermis und bedingt die mechanische Festigkeit und Elastizität der Haut. Des Weiteren sind freie Nervenendigungen, initiale Lymphgefäße, Wärme- und

Kälterezeptoren sowie Tastkörperchen angesiedelt. Als immunologisch aktive Zellen des angeborenen Immunsystems findet man hier verschiedene Typen dermaler dendritischer Zellen (dDZ), Makrophagen, Mastzellen und dermale γδ T-Zellen[71].

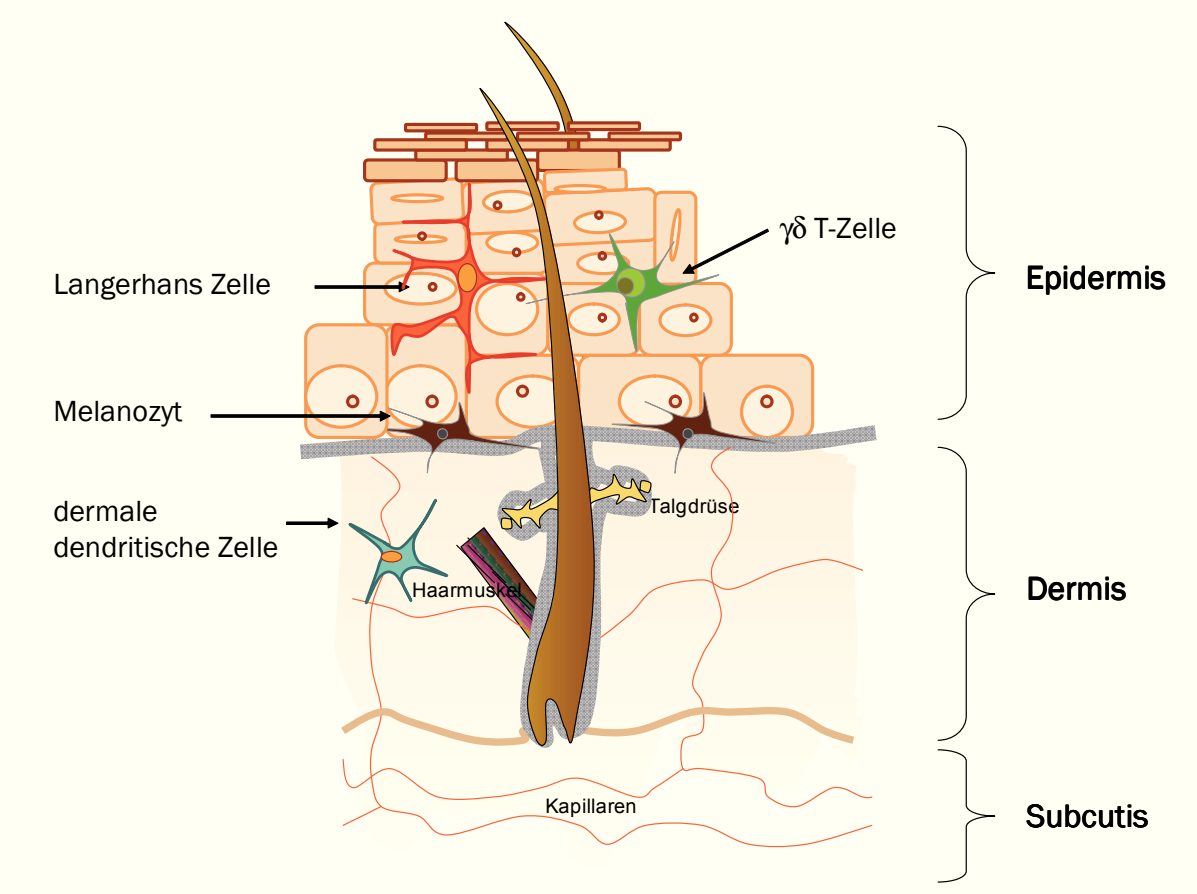


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau der Haut mit immunologisch relevanten Zellpopulationen. In der oberen Epidermis bilden Keratinozyten, Langerhans Zellen und γδ T-Zellen ein dichtes Netzwerk. In der basalen Epidermis sind Melanozyten angesiedelt. In der tiefer liegenden Dermis finden sich eine Reihe unterschiedlicher dermaler dendritischer Zellen.

Die oberste Schicht, die Epidermis, bildet die erste Kontaktfläche des Körpers zur Außenwelt und ist durch ihre Lage am stärksten gegenüber Pathogenen und potentiellen AhR-Liganden aus der Umwelt exponiert. Sie besteht aus einem mehrere Zellschichten umfassenden, zellulären Netzwerk aus ca. 90% Keratinozyten, 4-5% Melanozyten, 1-3% dendritischen Langerhans Zellen (LZ) und 5-10% spezifischen epidermalen γδ T-Zellen, die wie die LZ dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden (s. Abb. 1.3).

Die Interaktion epidermaler Zellen über Zell-Zell-Kontakte und verschiedene sezernierte Faktoren stellen auch hier einen Mechanismus dar, der die immunologischen und protektiven Eigenschaften der Zellen reguliert. Bei Ausfällen der Immunüberwachung

kommt es in verschiedener Weise zu entzündlichen Hautreaktionen. Dazu zählen unter anderem die atopische Dermatitis, Vitiligo, Schuppenflechte und die allergische Kontaktdermatitis. Eine von außen verursachte Beeinflussung auf dieser Ebene, z.B. über eine Aktivierung des AhR, kann somit Einfluss auf funktionelle und immunologische Kompetenz der Zellen haben.

1.3.1 Epidermale γδ T-Zellen

Epidermale γδ T-Zellen gehören zu den 5% aller T-Zellen, die anstelle des αβ TZR einen γδ TZR ausprägen. γδ TZR$^+$ T-Zellen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Dabei unterscheidet man sessile γδ T-Zellen, die in einem Epithel angesiedelt sind, wie z.B. in der Epidermis, von peripheren γδ T-Zellen, die wie αβ T-Zellen im Blut zirkulieren und sich in den peripheren lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphknoten, finden.
Die Besonderheit der sessilen γδ T-Zellen ist die Ausprägung eines epithelspezifischen T-Zell-Rezeptors mit demselben Rearrangement der γ und δ Gene. Somit verfügen diese γδ TZRs über dieselbe Antigenspezifität. Es ist bis jetzt nicht bekannt, welches Antigen von diesem TZR erkannt wird. Man vermutet, dass es sich dabei um von Keratinozyten freigesetzte Stressproteine, z.B. Hitzeschockproteine (HSP)[72], handelt.
Epidermale γδ T-Zellen stellen in der Maus einen Anteil von ca. 5-12% der epidermalen Zellen. Der Anteil an γδ T-Zellen schwankt in Abhängigkeit von Mausstamm, Körperregion, Alter und Hygienestatus[73,74]. In der murinen Epidermis bilden mehr als 95% der γδ T-Zellen einen TZR mit Vγ3Vδ1 Rearrangement (Nomenklatur nach Garman et al.).[75,76]. γδ T-Zellen der Epidermis werden wegen ihrer dendritischen Morphologie auch dendritische epidermale T-Zellen (DETZ) genannt.

DETZ-Vorläufer entstehen als erste T-Zellen im embryonalen Thymus ausschließlich zwischen Tag 14 bis 18 der embryonalen Entwicklung und besiedeln bereits vor der Geburt die Epidermis. Im Thymus des adulten Tieres werden diese Zellen nicht mehr gebildet. DETZ expandieren und proliferieren nach der initialen Besiedlung nur noch in der Epidermis selbst bis etwa vier Wochen nach der Geburt durch klonale Expansion[77,78]. Im weiteren Leben der Maus erfolgt eine Proliferation nur noch nach Verwundung, UV-Bestrahlung oder ähnlichen externen „Stimuli“[79].
In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl für Entstehung der DETZ im Thymus als auch für ihre Proliferation in der Epidermis die Interleukine IL-2, IL-7 und IL-15

und die Expression der zugehörigen Rezeptoren benötigt werden. DETZ proliferieren demnach *in vitro* auf Stimulation mit IL-2, IL-7 und IL-15[80-83], andererseits fehlen DETZ in Mäusen, die eine Defizienz für den IL-7, IL-15 oder IL-2 Rezeptor aufweisen[84-87]. Der genaue Mechanismus, wie die Homöostase und Proliferation der DETZ in der adulten Maus reguliert wird, d.h. welche Zytokine, Wachstumsfaktoren, zellulär-stimulatorische Signale oder Interaktionen mit Nachbarzellen beteiligt sind, ist bis jetzt noch nicht geklärt.

Die Funktion der DETZ ist zum jetzigen Zeitpunkt nur teilweise verstanden. Durch Sekretion verschiedener Zytokine (KGF-1, KGF-2 und IGF-1), die das Keratinozytenwachstum fördern, kommt ihnen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase und Wundheilung zu[88,89]. In *in vitro* Studien mit DETZ- und Langerhans-Zelllinien konnte außerdem gezeigt werden, dass die von DETZ sezernierten Zytokine GM-CSF, CSF-1, IL-4 und IL-13 eine entscheidende Rolle bei der LZ Proliferation und Differenzierung spielen.
DETZ verfügen über eine immunmodulatorische Funktion, indem sie die Infiltration von konventionellen αβ T-Zellen und anderen Immunzellen in die Haut (z.B. während atopischer Dermatitis, Kontakthypersensitivitätsreaktionen und als Folge von Verletzung) durch Zytokine und Chemokine (z.B. IL-2, IFNγ, Lymphotaktin, MIP-1α) regulieren[90-92]. Mäuse, die eine Defizienz in γδ T-Zellen haben, weisen einen Defekt in der Entzündungsphase der Wundheilung auf, der durch eine verzögerte Einwanderung inflammatorischer Zellen (Makrophagen) in die betroffenen Regionen verursacht wird[93]. Andere Studien weisen darauf hin, dass epidermale γδ T-Zellen auch eine Rolle bei der Abschwächung inflammatorischer Prozesse der Haut spielen und eine überschießende Immunreaktion durch aktivierte αβ T-Zellen verhindern[94].
DETZ prägen den NKG2D-Rezeptor aus, dessen Aktivierung durch Liganden auf gestressten oder entarteten Keratinozyten zur Lyse der betroffenen Zellen führen kann[95]. Sie könnten demnach Einfluss auf die Entstehung und Progression von Hauttumoren nehmen. Diese Annahme wurde durch Studien von Girardi et al. und anderen Forschergruppen in einem Modell der Chemikalien-induzierten Entstehung von Hauttumoren unter Verwendung von TZRδ–defizienten Mäusen bestätigt [96-98].
Epidermale γδ T-Zellen sind ebenfalls für den Menschen beschrieben und scheinen dort ähnliche Funktionen wie in der Maus wahrzunehmen. Durch *in vitro* Experimente mit isolierten, humanen epidermalen γδ T-Zellen (hDETZ) konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Produktion von Wachstumsfaktoren wie IGF-1 durch Stimulation weiter induziert werden kann. Bestätigt wurden diese *in vitro* Versuche durch Untersuchungen an

hDETZ, die aus frischen Wunden isoliert wurden. Diese zeigten eine aktive Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren, die sich positiv auf die Wundheilung auswirkten. [99-103].

Ob murine DETZ den AhR exprimieren und ob er für die Differenzierung und Funktion dieser Zellen relevant ist, ist bis jetzt noch nicht bekannt. Martin et al. konnten vor kurzem zeigen, dass die Sekretion von IL-17A über die AhR-abhängige Induktion von IL-22 in peripheren Vγ2$^+$ γδ T-Zellen aus Lymphknoten und Blut induziert wird[104]. Auch eine AhR-Überaktivierung embryonaler Thymus-Organ-Kulturen mit TCDD führt zu einer vermehrten Emigration TZR γδ positiver Zellen[105]. Die Klärung der Frage, ob der AhR in DETZ exprimiert wird, und wenn ja, welche funktionelle Bedeutung er für diesen Zelltyp hat, ist deshalb Ziel dieser Dissertation.

1.3.2 Langerhans Zellen

Langerhans Zellen (LZ) machen ca. 1-3% der epidermalen Zellen aus. Sie haben eine dendritische Morphologie und bilden ein Netzwerk mit γδ T-Zellen und Keratinozyten. LZ gehören zu den antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (APZ) des angeborenen Immunsystems und sind hämatopoetischen Ursprungs. Sie unterscheiden sich von dermalen dendritischen Zellen (dDZ) durch typische morphologische Strukturen (Birbeck Granulae und die Expression von Langerin)[106,107].

Neben der Sekretion verschiedener Zytokine, die für die Proliferation und Homöostase benachbarter Melanozyten (z.B. SCF) und γδ T-Zellen (IL-7 und IL-15,) Bedeutung haben[108,109], haben LZ die Fähigkeit, periphere Pathogene zu detektieren. Erkannte Pathogene werden mittels Pinocytose oder Phagozytose aufgenommen und eine primäre, T-Zell-abhängige Immunantwort wird eingeleitet. Eine Antigenaufnahme führt dabei in den LZ zu morphologischen und funktionellen Veränderungen, die als Reifung bezeichnet werden. Reifenden Zellen geht die Phagozytosefähigkeit verloren und sie regulieren verschiedene ko-stimulatorische Oberflächenmoleküle (MHC Klasse II, CD80, CD86, CD40) auf. Die aktivierte Langerhans Zelle löst sich von den umgebenden Keratinozyten und migriert – geleitet von einem Chemokingradienten - in die hautdrainierenden Lymphknoten. Dort präsentiert sie Peptide des Pathogens über MHC-II Moleküle im Kontext mit ko-stimulatorischen Molekülen und Zytokinen an T-Zellen[110-113]. Antigenspezifische, naive T-Zellen, die diese Signale empfangen, werden dabei zur Proliferation und Differenzierung in Effektor T-Zellen angeregt.

Langerhans Zellen migrieren auch unter nicht inflammatorischen Bedingungen regelmäßig in die drainierenden Lymphknoten. Vermutlich dient dieser Vorgang dazu, körpereigene Antigene an T-Zellen zu präsentieren, um so eine Toleranz zu induzieren[110]. Im Einklang mit dieser Vermutung steht, dass sich Langerhans Zellen in dieser Situation in einem nicht aktivierten, unreifen Zustand befinden, d.h., dass ko-stimulatorische Moleküle nur bedingt aufreguliert sind[114].
Lange Zeit wurden die LZ als Prototyp der dendritischen Zellen und demzufolge als Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort betrachtet[115]. Im Gegenspruch zu dieser Annahme stehen die Ergebnisse von Allan et al. und Zhao et al., die 2003 zeigten, dass nach einer viralen Hautinfektion die T-Zell- Antwort nicht durch LZ vermittelt wird. Die parallele Entwicklung verschiedener LZ-spezifischer Knock-out Mäuse und die daraus gewonnenen Ergebnisse stellten das LZ-Paradigma weiter in Frage und warfen gleichzeitig neue Fragen bezüglich der immunologischen Kompetenz der LZ auf[112].

Kaplan et al. konnten zeigen, dass es in konventionellen LZ-defizienten Tieren bei der Abwesenheit von Langerhans Zellen zu einer verstärkten Ohrschwellung während der Kontakthypersensitivitäts-Reaktion kommt. Sie zeigten außerdem, dass LZ in der Sensibilisierungsphase, nicht aber in der Effektorphase eine Rolle spielen[116]. Dagegen zeigten Bennett et al., dass in Mäusen mit induzierbar depletierten Langerhans Zellen die Kontakthypersensitivitäts-Reaktion erheblich abnimmt und die dermalen dendritischen Zellen (dDZ) Auslöser der Reaktion sind, das Ausmaß der allergischen Reaktion aber durch Langerhans Zellen reguliert wird[117]. Kissenpfennig et al. induzierten ebenfalls eine Depletion der LZ, kamen aber, anders als Bennett et al. und Kaplan et al., zu dem Ergebnis, dass die Langerhans Zellen entbehrlich für die Entstehung einer allergischen Kontaktdermatitis sind. Sie konnten zeigen, dass durch das Fehlen von Langerhans Zellen weder die Intensität noch die Kinetik der allergischen Reaktion beeinflusst wurde. Weiterhin konnten sie zeigen, dass Langerhans Zellen die Aktivierung der haptenspezifischen Effektor T-Zellen vermitteln[118]. Nach Kissenpfennig et al. ist es durchaus möglich, dass Hapten-beladene dDZ für die Entstehung einer allergischen Kontaktdermatitis verantwortlich sind.
Faktoren und Mechanismen, durch die LZ die Immunantwort beeinflussen, scheinen also stark von der spezifischen Situation in der Haut abzuhängen und sind bis jetzt nicht genau definiert[119]. Fest steht, dass die Langerhans Zelle für die Induktion der Kontaktallergie zwar entbehrlich ist, durch ihre regulatorische Funktion für Ausprägung einer Immunreaktion jedoch von Bedeutung ist[112].

Frühe Untersuchungen von Anderson et al., die zeigten, dass eine Kontakthypersensitivitäts-Reaktion durch polyaromatische Kohlenwasserstoffe ausgelöst werden kann, wenn diese in der Haut zu reaktiven Metaboliten umgewandelt werden[120], gaben erste Hinweise auf eine Beteiligung des AhR an diesen Prozessen. Ob der AhR in Langerhans Zellen exprimiert wird und seine Aktivierung durch exo-oder endogene Liganden in den LZ selbst oder in den umgebenden Zellpopulationen eine immunologische Konsequenz für diese Zellen hat, war bis zu Beginn dieser Dissertation nicht bekannt. Die Frage, welche Rolle der AhR in LZ für die Vermittlung von Immunantworten gegen niedermolekulare Substanzen einnimmt, sollte deshalb im Rahmen dieser Dissertation näher untersucht werden.

1.3.3 Melanozyten

Ca. 5% der epidermalen Zellen sind Melanozyten (MZ). Diese Zellen produzieren den Farbstoff Melanin als Reaktion auf Sonnenbestrahlung bzw. den im Sonnenlicht enthaltenen UVB-Anteil (280-320nm). Das Melanin wird in spezialisierten Organellen, den Melanosomen gebildet. Das Schlüsselenzym der Melaninsynthese, die Tyrosinase (Tyr), wird vom Transkriptionsfaktor Mitf (Mikrophthalmie-assoziierter Transkriptionsfaktor) induziert und katalysiert den limitierenden ersten Schritt der Melanogenese, die Hydroxylierung von L-Tyrosin zu ß-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA)[121]. In weiteren Schritten wird durch unterschiedliche Enzyme, wie z. B. TRP-1 und -2 (*Tyrosinase related protein*-1und -2), die Melaninsynthese katalysiert. Über Melanosomen wird das produzierte Melanin an bis zu 30 benachbarte Keratinozyten transferiert[122]. In den Keratinozyten wird das aufgenommene Melanin als Schutz vor UV induzierten DNS-Schäden um den oberen Zellkernpol gelagert.

Die konstitutive, basale Pigmentierung der Haut ist dabei nicht, wie man vermuten könnte, durch die Anzahl der Melanozyten geprägt. Ausschlaggebend ist vielmehr die Menge des von ihnen produzierten Melanins. Im Gegensatz dazu ist bei einer sonneninduzierten Bräunung der Haut die Proliferation der Melanozyten neben einer verstärkten Melaninsynthese entscheidend[123].

Frühe klinische Beobachtungen von Menschen, die durch Umwelt- oder Arbeitsunfälle mit Dioxin-, Furan- oder PCB belastet wurden (Japan 1968, Taiwan 1979) gaben bisher erste Hinweise auf eine Rolle des AhR bei der Melanogenese. Diese manifestierte sich in den exponierten Personen durch eine verstärkte Pigmentation der Haut und des Zahnfleischs. Neugeborene, deren Mütter mit PCBs während der Schwangerschaft ausgesetzt waren,

wiesen eine dunkle Pigmentierung der Kopf-und Gesichtshaut und der Genitalien auf, was den Begriff „Cola-Babys“ prägte[124-127]. Zudem konnten Dunagi et al. 1984 eine TCDD verursachte Hyperpigmentierung der Haut nachweisen[128] (Dunagi, 1984), so dass ein kausaler Zusammenhang zwischen AhR-Aktivierung und Melanogenese sehr wahrscheinlich scheint. Im Rahmen der Dissertation sollte deshalb untersucht werden, ob der AhR auch eine funktionelle Bedeutung für die UV-induzierte Melanogenese hat.

1.3.4 Keratinozyten

Keratinozyten stellen den Großteil epidermaler Zellen dar. Stammzellen in der Basalschicht teilen sich permanent und neue Keratinozyten werden nach oben geschoben. Keratinozyten stellen nicht, wie früher angenommen, nur eine strukturelle Barriere dar, sondern besitzen auch immunologische Funktionen wie Detektion (mittels TLRs) und Phagozytose pathogener Strukturen[129,130]. Nach Stimulation oder physiologischem Stress (z.B. durch UV-Strahlung, chemische Irritanzien, Allergene oder bakterielle Endotoxine) sind sie in der Lage, eine Reihe antimikrobieller Stoffe wie Defensine, S100 Proteine und Cathelicidine zu produzieren und zu sezernieren[131].

Von Keratinozyten produzierte Chemokine dienen außerdem der Rekrutierung anderer Immunzellen in die Haut. Zusätzlich sezernieren Keratinozyten eine Reihe verschiedener Zytokine, die die Funktion und Homöostase der angrenzenden Langerhans Zellen, Melanozyten und γδ T-Zellen beeinflussen können[132-134]. Beispielsweise sezernieren Keratinozyten konstitutiv den Melanozyten Wachstumsfactor SCF (stem cell factor) und nach UV-Bestrahlung die wichtigen Peptidhormone ACTH (adrenokortikotrophes Hormon) und α-MSH (melanozyten stimulierendes Hormon), die die Melanogenese in Melanozyten anregen[135-137]. TNF-α, IL-1β und GM-CSF tragen zur Aktivierung und Differenzierung von Langerhans Zellen bei[138-141]. IL-2, IL-7 und IL-15 spielen für die Homöostase und Proliferation der γδ T-Zellen eine Rolle[80,142,143].

Die Expression des AhR in Keratinozyten ist bekannt. So steigt in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten die Menge an AhR proportional an, ihre Reaktivität auf TCDD nimmt mit fortschreitender Differenzierung zu[144,145].

Henley et al. belasteten humane KZ-Linien mit TCDD und zeigten, dass der AhR auch ein immunregulatorisches Potential in Keratinozyten über die Regulation des Zytokins IL-1β ausübt[146]. Dabei zeigte die *in vitro* Stimulation mit TCDD eine AhR-abhängige,

posttranskriptionale Regulation der IL-1β Genexpression, die durch den AhR-Antagonisten alpha-Naphtoflavon reduziert wurde.
Für die Fragestellungen meiner Dissertation war es deshalb wichtig, die potentiellen AhR-vermittelten Einflüsse in Keratinozyten, die sich parakrin auf LZ, DETZ und Melanozyten auswirken können, durch die Generierung geeigneter Maus-Modelle ermitteln zu können.

1.4 Modelle zur Untersuchung des AhR

In dieser Arbeit wurde die physiologische Rolle des AhR im murinen Modell durch AhR-Überaktivierung mit TCDD und anhand AhR-defizienter Mausstämme untersucht.
Um die funktionelle Bedeutung des AhR für die Interaktion zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem unter diesen Bedingungen zu untersuchen, wurde das Modell einer T-Zell vermittelten allergischen Hautreaktion (Typ IV-Reaktion) verwendet.

1.4.1 Überaktivierung des AhR mit TCDD

Bei der Verwendung von TCDD als Modellsubstanz müssen Faktoren wie Toxizität und speziesindividuelle Unterschiede beachtet werden. Beispielsweise ist das Meerschweinchen mit einer LD_{50} von 0,6-2µg/kg sehr sensitiv, hingegen beträgt die LD_{50} des Hamsters 5mg/kg[147].
Bei Mäusen sind verschiedene Allelvariationen im Genlocus des AhR beschrieben[148,149], die jeweils eine unterschiedliche TCDD-Bindungsaffinität aufweisen. So zeigten sich die von uns verwendeten Mäuse, die einen AhR mit hoher Affinität exprimieren (z.B. Ah^b, C57BL/6), wesentlich sensitiver gegenüber den immunsuppressiven Wirkungen des TCDD als die Mäusestämme, die einen Ah-Rezeptor mit geringer Affinität bilden (z.B. Ah^d-DBA/2 - Mäuse)[150,151].
TCDD Belastung führt bei Mäusen zu teratogenen, kanzerogenen, kardiovaskulären und hepatotoxischen Effekten, die mit einer generellen Gewichtsabnahme, auch „Wasting-Syndrom“ genannt, einhergehen. Zusätzlich kommt es zu einer Immunsuppression und Thymusatrophie[152]. Die in dieser Arbeit verwendeten Dosen an TCDD entsprechen mit 10µg/kg Körpergewicht ca. 10% der LD_{50} in C57BL/6 Mäusen. Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass diese Dosis keine akut toxischen Effekte in den Tieren verursacht. Eine immunsuppressive Wirkung ist trotzdem gegeben, da bereits Dosen von 0,7µg/kg und 5µg/kg Körpergewicht mit Immunsuppression und Thymusatrophie

beschrieben wurden[36,153] und unsere eigenen Beobachtungen diese Ergebnisse bestätigen.

1.4.2 AhR- defiziente Mausmodelle

Zur Zeit gibt es drei unabhängig voneinander entwickelte, AhR-defiziente Mausstämme[63,154,155]. Alle drei sind resistent gegenüber TCDD und zeigen selbst bei Dosen weit über dem LD_{50} Wert keine der unter 1.2.1 beschriebenen Symptome nach TCDD Belastung, was einen Nachweis für die direkte AhR-Abhängigkeit der Effekte darstellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von Christopher Bradfield generiert. Bei ihnen wurde das Exon 2 des AhR, welches für die helix-loop-helix Domäne kodiert und für die Dimerisierung mit ARNT notwendig ist (s. Abschnitt 1.1), im gesamten Organismus deletiert[63]. Eine Gegenüberstellung aller bekannten AhR-defizienten Mäusstämme findet sich in dem Übersichtsartikel von Esser (2009)[156].

Für die Fragestellung meiner Dissertation war es wichtig, die direkte, primäre Funktion des AhR in LZ, MZ und DETZ von indirekt vermittelten Effekten durch andere AhR-defiziente Zellen zu differenzieren. Wir generierten in unserer Arbeitsgruppe deshalb zwei konditionale AhR-defiziente Mausstämme mittels Cre/loxP-vermittelter, gewebsspezifischer Gendeletion in Keratinozyten (K5AhR-KO) und Langerhans Zellen (LZAhR-KO;). Dazu wurden Mäuse, bei denen der AhR von zwei loxP-Sequenzen flankiert wird, jeweils mit Keratinozyten- und Langerinspezifischen Cre-Mäusen (Cre unter der Kontrolle des Langerin- bzw. K5-Promotors (Zahner und Clausen, Manuskript in Vorbereitung)) verpaart. Nach verkreuzen gefloxter und Cre-exprimierender Mäuse erfolgt in den Nachkommen eine Exzision des gefloxten AhR-Gens.

1.4.3 Modell der allergischen Kontakthypersensitivitäts-Reaktion

Die Kontakthypersensitivitäts-Reaktion (engl. contact hypersensitivity reaktion, CHS) ist eine T-Zell vermittelte entzündliche Immunreaktion (Typ IV) auf wiederholten Kontakt mit Allergenen, bei deren Entstehung vor allem dendritische Zellen eine wichtige Rolle spielen[117,157]. Experimentell kann diese Reaktion durch die Applikation eines Haptens auf die Haut induziert werden.

Die erste Exposition (Sensibilisierungs-Phase; s. Abb. 1.4) verläuft normalerweise ohne Symptome. Dabei bindet das Hapten kovalent an Zell-assoziierte oder extrazelluläre

Proteine. Diese modifizierten Proteine können von Langerhans Zellen und dermalen dendritischen Zellen aufgenommen werden, die durch die afferenten Lymphgefäße in die hautdrainierenden Lymphknoten migrieren[158]. Im Lymphknoten wird das Hapten dann über MHC-II Moleküle im Kontext mit ko-stimulatorischen Molekülen und sezernierten Zytokinen an naive T-Zellen präsentiert. Haptenpezifische T-Zellen erkennen das modifizierte Protein (s. auch (V)), was zu einer klonalen Expansion und der Differenzierung zu zytotoxischen/effektor T-Zellen mit anschließender Entstehung von Gedächtniszellen führt. Diese Zellen gelangen über das Blut in alle Körperregionen. Bei einem erneuten Kontakt präsentieren lokale APZ die Hapten-Protein-Komplexe an die patroullierenden, haptenspezifischen Gedächtniszellen. Diese Phase wird auch Effektorphase genannt. Hier überschneiden sich eine Antigen-unspezifische und eine Antigenspezifische Phase. In der Antigen-unspezifischen Phase werden entzündliche Mediatoren aus Keratinozyten freigesetzt, die ihrerseits Endothelzellen aktivieren, so dass aktivierte $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen die Gefäße verlassen und in das Gewebe migrieren können. Während dieser Phase werden Thrombozyten, Granulozyten, Makrophagen sowie dendritische Zellen aktiviert. In der Antigen-spezifischen Phase sezernieren aktivierte T-Zellen proinflammatorische Zytokine, vor allem IFNγ und TNFα. Es folgt eine Entzündungsreaktion, die geprägt ist von unspezifischen Infiltraten aus mononukleären Zellen und von einer gesteigerten Aktivierung des Gefäßendothels. Durch die gesteigerte Permeabilität des Gefäßendothels werden die charakteristischen Merkmale der Auslösephase der Kontaktdermatitis, wie Pusteln, Ödeme und Erytheme der Haut, sichtbar[159]. Die maximale Ausprägung der Reaktion wird erst 24-72 Stunden nach Allergenkontakt erreicht. Der schematische Verlauf des in dieser Arbeit verwendeten CHS-Modells mit den jeweilig gemessenen Endpunkten ist in Abb. 1.4 dargestellt.

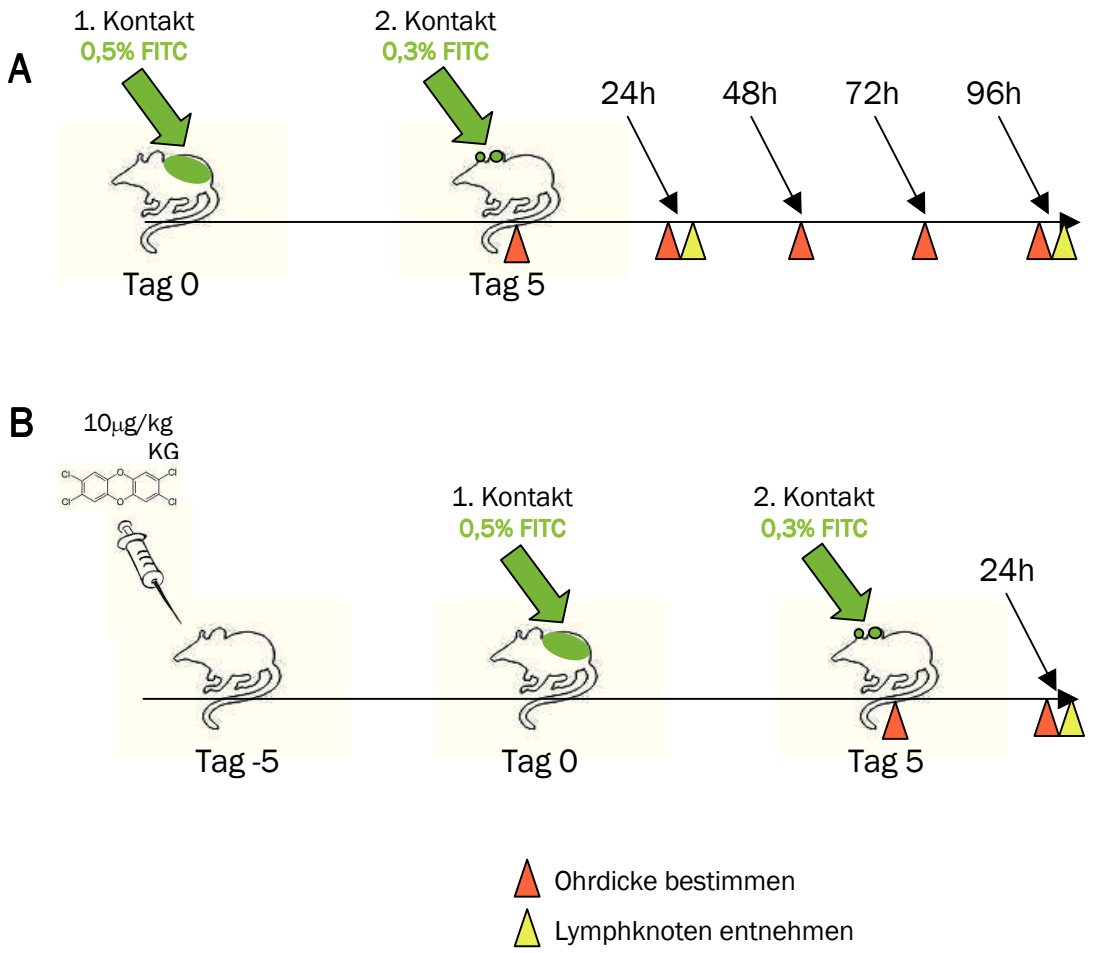


Abbildung 1.4: **Schematischer Verlauf der FITC induzierten CHS-Reaktion zur Untersuchung der Rolle des AhR**. (A) Applikation von 0.5% FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) auf die rasierte Rückenhaut (1. Kontakt, Tag 0) und Auslösen der Effektor-Phase durch 2. Kontakt mit FITC (0,3%) am Ohr (nach 5 Tagen). Messung der basalen Ohrdicke an Tag 5 und der resultierenden Schwellung 24h, 48h, 72h und 96h nach 2. Kontakt. Entnahme der aurikulären Lymphknoten zur Bestimmung eingewanderter $FITC^+$ LZ und dDZ 24h und 96h nach 2.Kontakt. (B) CHS-Reaktion nach Gabe von 10µg/kg KG TCDD intraperitoneal (Tag -5). Auslösen der CHS-Reaktion an Tag 0 und 5. Bestimmung der basalen Ohrdicke an Tag 5 und der Ohrschwellung 24h nach 2. Kontakt. Entnahme der drainierenden Lymphknoten und Bestimmung der eingewanderten $FITC^+$ LZ und dDZ.

1.5 Fragestellung

Die Rolle des AhR für die Liganden-induzierte Induktion des Fremdstoffmetabolismus und seine Funktion als Vermittler der toxikologischen Effekte von TCDD und verwandter Stoffe auf das Immunsystem ist bekannt. Als Sensor niedermolekularer chemischer Substanzen ist der AhR ein Molekül, das Einflüsse aus der Umwelt auf zellulärer Ebene vermitteln kann. Der Schwerpunkt der aktuellen Forschung ist deshalb auf zugrundeliegende Mechanismen AhR-vermittelter Effekte in Zusammenhang mit den komplexen Zell-Zell Interaktionen des Organismus gerichtet. Ein Verständnis dieser Zusammenhänge und Mechanismen könnte dabei die Basis für neue präventive und medizinische Strategien bilden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des AhR für das immunologische Netzwerk epidermaler Zellen genauer aufzuklären (s. Abb. 1.4).

Dazu wurde

I. die AhR-Expression in den einzelnen Zell-Populationen untersucht
II. die transkriptionelle Aktivität des AhR nach der TCDD Stimulation in den einzelnen Zelltypen ermittelt
III. die physiologische Funktion des AhR in den einzelnen Zelltypen durch die Verwendung verschiedener AhR-defizienter Mausstämme und die sich daraus ergebende immunologische Relevanz und deren Auswirkungen auf die Interaktion des epidermalen Netzwerkes untersucht.

	AhR Expression?	klassischer/ alternativer AhR-Signalweg?	physiologische Funktion des AhR?	Auswirkung auf Nachbarzellen?	Immunologisch relevant?
Keratinozyten	ja	Ja, Cyp450-Induktion	reguliert IL-1β posttranskriptional	?	?
Melanozyten	?	?	?	?	?
Langerhans Zellen	?	?	?	?	?
γδ T-Zellen	?	?	?	?	?

Abbildung 1.4: Schematische Darstellung offener Fragen (?) für das immunologische Netzwerk im Barriereorgan Haut, die im Rahmen der Dissertation beantwortet werden sollten.

2 Ergebnisse

In dieser Dissertation präsentiere ich die Ergebnisse von mehreren, inhaltlich miteinander verknüpften Originalveröffentlichungen (eine als Erstautorin, drei als Mitautorin) sowie einen Übersichtsartikel (als Erstautorin). Die Arbeiten beschäftigen sich mit der Rolle des AhR in verschiedenen Immunzellen, insbesondere der Haut, und sind in den folgenden Kapiteln noch einmal zusammengefasst.

Die Arbeiten führen mich zu dem Schluss, dass der AhR in der Haut eine physiologisch wichtige Rolle spielt und insbesondere an Differenzierungsprozessen und der Zellproliferation in Antwort auf Umweltstimuli beteiligt ist. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse deutlich, dass AhR-Aktivität immer zellspezifisch zu betrachten ist und dass zudem durch die Interaktion von Zellen untereinander – gerade in der Haut – ein komplexes Geschehen vorliegt, das in der Interpretation von Daten berücksichtig werden muss.

Meine Daten machen deutlich, dass der AhR als Sensor von niedermolekularen Chemikalien ein vielversprechendes, therapeutisches und präventivmedizinisches Potential hat, das in Zukunft weiter erforscht werden sollte. Mögliche Ansätze dazu werden in meinen Arbeiten diskutiert.

Originalarbeiten in Fachzeitschriften (peer-reviewed)

Barriereorgan Haut

Zellen: epidermale dendritische T-Zellen, Langerhans Zellen, Keratinozyten, Melanozyten; **Moleküle:** GM-CSF, Indolamin-2,3-deoxygenase, c-kit; **Funktionen:** Proliferation, Reifung, Immunkapazität

I. Kadow S, Jux B, Zahner SP, Wingerath B, Chmill S, Clausen BE, Hengstler J, Esser C. The aryl hydrocarbon receptor is a necessary factor for invariant γδ T cell homeostasis in the skin. *In Revision J. Immunology 28.3.2011.*

II. Jux B, Kadow S, Esser C:
Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J Immunol 182:6709-6717 (2009).*

III. Jux B, Kadow S, Luecke S, Rannug A, Krutmann J, Esser C:
The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates UVB Radiation-Induced Skin Tanning. *J Invest Dermatol (2010).*

Barriereorgan Darm

Zellen: intraepitheliale Lymphozyten, intestinale Epithelzellen, dendritische Zellen, Th_{17}-Zellen; **Moleküle:** c-kit, IL-6; **Funktionen:** Differenzierung, Immunkapazität, Migration

IV. Chmill S, Kadow S, Winter M, Weighardt H, Esser C:
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs stable establishment of oral tolerance in mice. *Toxicol Sci 118:98-107 (2010).*

Übersichtsarbeit (peer-reviewed)

V. Kadow S, Jux B, Chmill S, Esser C:
Small molecules as friends and foes of the immune system. *Future Med Chem 1:1583-1591 (2010).*

Konferenzbeiträge:

- Kadow S, Wingerath B, Chmill S, Krutman J, Weighardt H, Jux B, Esser C
  Aryl hydrocarbon receptor (AhR) dependent c-kit expression is required for dendritic epidermal T cell homeostasis in murine skin
  71. Jahrestagung der Society of Investigative Dermatology, Phoenix, Arizona/USA (04.-07.05.2011)

- Padberg E, Kadow S, Albrecht C, Burkardt V, Diehl P, Esser C
  Der Dioxin-Rezeptor und das methabolische Syndrom – Untersuchungen an gendefizienten Mäusen (mus musculus, L.)
  Medizinischer Doktorandenkongress, Heinrich-Heine Univesität, Düsseldorf (17.06.2011)

- Kadow S, Wingerath B, Chmill S, Jux B, Esser C
  Aryl hydrocarbon receptor is a necessary factor for invariant γδT-cell homeostasis in the skin; 40. Jahrestagung der DGfI, Leipzig, (22.-25.09.2010)

- Kadow S, Jux B, Steinwachs S, Chmill C, Weighardt H, Esser C
  Aryl hydrocarbon receptor is critical for induction of IDO and IDO2 in dendritic cells;
  14. Internationaler Immunologie-Kongress,Japan (22.-27.08.2010)

- Kadow S, Jux B, Esser C
  The role of the aryl hydrocarbon receptor in suppression of contact allergy;
  11. Internationaler Langerhans Zells Workshop, Madeira, Portugal (03.-06.09.2009)

- Kadow S, Jux B, Esser C
  The role of the aryl hydrocarbon receptor in suppression of contact allergy;
  Eur. J. Immunol. 39, S1, S360 (2009); 2. Europäischer Immunologie Kongress, Berlin (13.-16.09.2009)

- Jux B, Hübinger J, Kadow S, Esser C
  The aryl hydrocarbon receptor in skin immune cells;
  Eur. J. Immunol. 39, S1, S648 (2009);2. Europäischer Immunologie Kongress, Berlin (13.-16.09.2009)

- Esser C, Jux B, Kadow S, Chmill S, Hübinger J, Frericks M:
  Cell specific action and toxicity of the AhR: Focus immune system.
  Toxicol Lett 1895S:S55 (2009) 46. Kongress der Europäischen Gesellschaft für Toxikologie.(13-16.09.2009)

- Kadow S, Jux B, Esser C
  Contact allergy is suppressed by Arylhydrocarbon receptor over-activation and deficiency by different mechanisms; 50. Jahrestagung der DGPT, Mainz (11.-13.03.2009)

- Kadow S, Jux B, Esser C
  Aryl hydrocarbon receptor null mice are impaired in CHS but not in LC migration;
  2. Symposium des GRK1427, Düsseldorf (03.-04.04.2008)

I. The Aryl hydrocarbon receptor is a necessary factor for invariant γδ T cell homeostasis in the skin

Kadow S, Jux B., Zahner S., Wingerath B, Chmill S, Clausen B, Hengstler J., Esser C

Manuskript in Revision, Journal of Immunology;

Thema dieser Veröffentlichung war die Untersuchung der physiologischen Funktion des AhR in spezialisierten, sessilen γδ T-Zellen vom Vγ3 TZR Typ (Vγ3$^+$ DETZ) in der murinen Epidermis. Dieser Zelltyp ist wichtig für die Aufrechterhaltung der epithelialen Homöostase, für die Unterstützung bei Wundheilungsprozessen und für die Regulation von Immunantworten. Ob der AhR überhaupt in diesem Zelltyp exprimiert wird, war bis zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. In dieser Veröffentlichung konnten wir erstmalig eine physiologische Funktion für den AhR in Vγ3$^+$DETZ nachweisen.

Wir konnten zeigen, dass DETZ von WT Mäusen große Mengen AhR exprimieren.
Die Frequenzen Vγ3$^+$DETZ in adulten AhR-defizienten Mäuse waren gegenüber WT-Tieren in allen untersuchten Körperregionen signifikant reduziert (>85%). Dagegen zeigten K5AhR-KO und LZAhR-KO Tiere keine Veränderung der DETZ-Frequenzen und deren morphologischer Merkmale. mRNS und ELISA Untersuchungen epidermaler Zellen und Zellkulturüberstände aller Mausstämme (WT, AhR-KO, K5AhR-KO und LZAhR-KO) unterschieden sich nicht in Hinblick auf die proliferationsfördernden Faktoren IL-2, -7, -15 und TNFα. Auch die Expression der entsprechenden Zelloberflächenrezeptoren CD122 und CD127 war auf AhR-KO DETZ nicht reduziert. Diese Ergebnisse zeigten, dass extrinsisch vermittelte Faktoren der umgebenden Keratinozyten und LZ und die intrinsisch vermittelte Zytokinrezeptor-Expression nicht die Ursache der reduzierten DETZ Frequenzen in AhR-defizienten Mäusen waren. Mögliche Punkte der DETZ-Entwicklung, an denen der AhR Einfluss nehmen könnte, standen deshalb im Fokus der weiteren Arbeit.
In Untersuchungen der embryonalen Thymi von WT- und AhR-defizienten Mäusen von Tag 14-17 konnte ich nachweisen, dass die Generierung hautspezifischer Vγ3$^+$DETZ in AhR-KO Mäusen nicht signifikant beeinträchtigt war. Eine fehlgeleitete Emigration der Zellen aus dem Thymus in periphere lymphatische Organe (Milz, Lymphknoten, Blut) oder in die Dermis anstatt in die Epidermis, oder ein Steckenbleiben der DETZ im Thymus, waren ebenfalls nicht ursächlich. An Tag 2 nach der Geburt wurden sogar signifikant mehr Vγ3$^+$ Zellen in der Epidermis AhR-defizienter Mäuse beobachtet.

Im Gegensatz zu WT DETZ, bei denen wir zwischen Tag 7 und 14 nach der Geburt eine starke Frequenzzunahme beobachten konnten, nahm die Frequenz der AhR-defizienten DETZ von Tag 2 bis 28 nach der Geburt kontinuierlich ab und erreichte mit Tag 28 das reduzierte Niveau der adulten AhR-KO Maus. Weniger AhR-defiziente DETZ exprimierten den Aktivierungsmarker CD69, was zusammen mit der beobachteten dendritenarmen, runden Morphologie auf ein Problem bei der Differenzierung oder Apoptose hinwies. Eine vermehrte Apoptose in AhR defizienten DETZ konnte ich mittels TUNEL-Assay ausschließen. AhR-defiziente DETZ zeigten aber keinen Proliferationsschub, wie er sich zwischen Tag 10 und 14 in WT DETZ darstellte. Durch Zellzyklusanalysen konnte ich nachweisen, dass mehr AhR-defiziente DETZ in der G_1-Phase verweilten, was in einer anhaltenden, signifikant verringerten Proliferation resultierte, die die reduzierten Frequenzen in der adulten AhR-KO Maus erklärte.

Durch unsere Untersuchungen an murinen Melanozyten wussten wir, dass CD117 (c-kit) über zwei funktionelle DREs reguliert wird. c-kit und sein Ligand stem-cell-factor (SCF; kit Ligand, kitl) sind für die Proliferation von Melanozyten und darmspezifischer γδ T-Zellen wichtig (s. 2.2.2). Wir konnten hier erstmalig die CD117 Expression spezifisch auf Vγ3$^+$ WT- und K5AhR-KO DETZ (>85%) nachweisen. Im Gegensatz dazu exprimierte im AhR-KO nur ein geringer Anteil (<50%) der verbleibenden 0,5% Vγ3$^+$DETZ diesen Rezeptor. Die Expression des c-kit-Liganden SCF unterschied sich hingegen nicht zwischen AhR-KO, WT oder K5AhR-KO Mäusen. Die AhR-abhängige c-kit Induktion konnten wir durch Einbringen gerichteter Mutationen innerhalb der DREs in Ergänzung zu der Arbeit (III) noch zusätzlich verifizieren. Ein funktioneller AhR ist laut unserer Ergebnisse für die Proliferation und Homöostase Vγ3$^+$ spezifischer DETZ über die transkriptionelle Regulation der CD117 Expression notwendig.

Zusätzlich zu dem epidermalen Phänotyp zeigten AhR-defiziente Mäuse signifikante Unterschiede in der Frequenz Darm-spezifischer, intraepithelialer Lymphozyten (IEL; CD8αα$^+$ TZRγδ$^+$). Anders als in der Haut wurden diese Zellen im Darm durch αβ T-Zellen ersetzt. Andere, periphere γδ T-Zellen aus Blut, Lymphknoten und Milz waren von der AhR-Defizienz nicht betroffen.

Durch unsere Untersuchungen aus (II) war uns bekannt, dass AhR-defiziente Mäuse signifikant reduzierte Menge GM-CSF in der Epidermis aufweisen. Ein Vergleich von GM-CSF in Überständen kultivierter, gesamt epidermaler Zellen mit DETZ-depletierten epidermalen Zellen von WT und K5AhR-KO mit AhR-KO Mäusen zeigte, dass die signifikant reduzierten GM-CSF Mengen in AhR-defizienten Mäusen ein Resultat fehlender DETZ sind.

Dabei konnten wir außerdem beobachten, dass der Reifezustand der LZ neben der verringerten CD80 Expression auch auf Ebene der Größe und Granularität von DETZ beeinflusst wird.

Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit sind:

- Der AhR wird in epidermalen γδ T-Zellen exprimiert.
- Der AhR reguliert die Expression von c-kit in Vγ3$^+$DETZ.
- Der AhR übernimmt in epidermalen- und darmspezifischen γδ T-Zellen eine zelltypspezifische und gewebsspezifische, physiologische Funktion, die die Differenzierung und Proliferation der Zellen (über c-kit) reguliert.
- Der Einfluss des AhR auf die Interaktion des immunologischen Netzwerks der Epidermis wird durch γδ T-Zell-abhängige Sekretion von GM-CSF und dem daraus resultierenden Einfluss auf die Reifung der LZ deutlich.

II. Langerhans Cell Maturation and Contact Hypersensitivity are impaired in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Mice

Jux B, Kadow S, Esser C

Journal of Immunology 2009 Jun 1;182(11):6709-17

Langerhans Zellen sind die professionellen Antigen-präsentierenden Zellen der Epidermis. Vor kurzem wurde angedeutet, das LZ eine tolerogene Funktion wahrnehmen und an der Kontrolle adverser Immunreaktionen gegen niedermolekulare Chemikalien beteiligt sind. Niedermolekulare Chemikalien oder ihre Metabolite werden normalerweise nicht direkt von T-Zellen erkannt, können aber als Hapten mit Proteinen reagieren und dann als Teil eines Peptids über MHC Moleküle als Neoantigen präsentiert werden und eine Immunantwort auslösen (s. auch V). Der AhR ist als Sensor niedermolekularer Chemikalien bekannt und kann über die transkriptionelle Aktivierung fremdstoffmetabolisierender Enzyme diese Substanzen metabolisieren und somit ggf. auch aktivieren.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass LZ konstitutiv über große Mengen an AhR und AhRR verfügen. Der Expressionslevel ist dabei höher als der in typischerweise AhR-reichen Organen wie Leber und Thymus. Überraschend war, dass LZ im Gegensatz zu allen anderen bekannten AhR exprimierenden Zelltypen keine Induktion der klassischen AhR Zielgene (*Cyp1A1, Cyp1B1, Nqo1* und *Aldh3a1*) des Fremdstoffmetabolismus nach TCDD Behandlung aufwiesen. Die globale Genexpressionsprofilanalyse dieser Zellen zeigte keine TCDD induzierte Genexpressionsänderung in 22.500 verschiedenen Genen. Langerhans Zellen erscheinen demnach inert gegen eine TCDD induzierte AhR Aktivierung. Um einen Eindruck der AhR regulierten Gene unter physiologischen Bedingungen in LZ zu bekommen, wurde ein Vergleich des Genexpressionsprofils von LZ aus WT- und AhR-defizienten Mäusen untersucht. Insgesamt fanden sich 127 unterschiedlich (mindestens 2-fach) regulierte Gene, die u.a. für das Immunsystem von Bedeutung sind. So werden *IL-1β* und *MHC-II* in AhR-KO LZ höher, *Ido1*, *AhRR* und *Hif1α* hingegen niedriger exprimiert, was auf eine AhR abhängige Regulation der Expression hindeutet. Versuche mit kultivierten LZ und dendritischen Zellen, die aus Knochenmark von WT und AhR-defizienten Mäusen generiert wurden (BM-DZ), bestätigten, dass der AhR in beiden Zelltypen für die Expression von *Ido1* unerlässlich ist.

Durch Untersuchungen des Differenzierungszustandes bzw. des Reifestatus kultivierter LZ aus WT und AhR-defizienten Mäusen konnten wir zudem zeigen, dass die ko-stimulatorischen Moleküle CD24a und CD80 bei AhR-Defizienz signifikant geringer aufreguliert wurden. Außerdem entsprach die Morphologie und Phagozytosekapazität eher der einer unreifen LZ. Die geringere Aufregulation von CD80 konnten wir hierbei auf eine geringere Sekretion des Zytokins GM-CSF durch epidermale Zellen zurückführen. Im Gegenschluss konnte der CD80 Phänotyp durch Supplementation physiologischer Mengen GM-CSF wiederhergestellt werden.
Ein *in vivo* Versuch mit AhR-defizienten Mäusen zeigte außerdem eine reduzierte Immunantwort (CHS-Reaktion) gegen das topisch applizierte Hapten FITC. Ein verringertes Migrationsvermögen der aktivierten LZ oder dDZ als Ursache der Reduzierten Immunantwort konnten wir aber ausschließen, da sich die Anzahl und die migratorische Kapazität beider Zelltypen in den hautdrainierenden Lymphknoten in AhR-KO Tieren nicht von der im WT unterschied.

Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit sind:

- Der AhR wird in LZ exprimiert; das Transkriptom der Zellen ist aber inert gegenüber einer TCDD induzierten AhR-Aktivierung.
- Der AhR nimmt Einfluss auf Differenzierung und Reifung der LZ, was teilweise durch die Interaktion mit anderen epidermalen Zellen, z.B. über GM-CSF Sekretion, verursacht wird. Eine Interpretation der Ergebnisse muss deshalb mögliche Interaktionen der AhR-regulierten Faktoren auf anderer Ebene berücksichtigen.
- Die Expression immunologisch relevanter Gene, z.B. *Ido,* wird in LZ und BM-DZ AhR-abhängig reguliert. Der Einfluss des AhR auf das immunologische Netzwerk der Epidermis könnte deshalb in präventivmedizinischen Ansätzen genutzt werden

Für diese Veröffentlichung führte ich folgende Untersuchungen selbst durch oder war an der Erhebung der Daten und den damit verbundenen experimentellen Schritten maßgeblich beteiligt:

- AhR Nachweis auf Proteinebene in primären murinen Langerhans Zellen von Wildtyp- und AhR-defizienten Mäusen im Vergleich zu verschiedenen Geweben und dendritischen Zellen, die aus Knochenmark generiert wurden (BM-DZ).
- Phagozytose Assays primärer LZ AhR-defizienter Tiere im Vergleich zu LZ aus WT Mäusen.
- GM-CSF Supplementations-Experimente.

- Induktion der *Ido*-Genexpression mittels LPS, IFNγ und TCDD in BM-DZ und enzymatischer IDO-Aktivitätsnachweis.
- Ermittlung der Genexpression typischer AhR-Zielgene nach Induktion mit TCDD in aufgereinigten LZ, Leber und gesamt epidermalen Zellen.
- Untersuchung der CHS-Reaktion *in vivo* und die darauf folgenden durchflusszytometrischen Analysen der gewonnenen Gewebe.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben sich die Fragestellungen für die in (I) beschrieben Untersuchungen der epidermalen γδ T-Zellen. Zusätzlich flossen die Ergebnisse dieser Veröffentlichung in den unter (V) beschriebenen Übersichtsartikel mit ein.

III. The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Ultraviolet B Radiation Induced Skin Tanning

Jux B, Kadow S, Luecke S, Rannug A, Krutmann J, Esser C

Journal of investigative Dermatology; 2011 Jan;131(1)203-210

Die Bräunung der Haut ist eine physiologische Reaktion auf die Exposition mit Sonnenlicht. UVB Strahlung induziert zum einen die Melaninproduktion in Melanozyten, zum anderen regt sie die Melanozyten zur Teilung an. Unterstützend wirken dabei die Keratinozyten, die durch eine Reihe von löslichen Faktoren die Viabilität und die Melanogenese fördern. Das Tryptophan-Derivat FICZ, ein endogener, hoch affiner Ligand des AhR, wird durch UVB Strahlung in epidermalen Keratinozyten generiert. Außerdem gaben frühe klinische Studien Dioxin-, Furan- und PCB exponierter Menschen (Japan 1968, Taiwan 1979) erste Hinweise auf eine Rolle des AhR bei der Melanogenese. Eine Rolle des AhR-Signalweges in Melanozyten scheint dadurch plausibel. In dieser Arbeit wurde deshalb die Bedeutung des AhR für die physiologische Bräunungsreaktion der Haut auf UVB-Strahlung untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir den AhR in murinen Melanozyten auf mRNA- und Protein-Ebene nachweisen und seine funktionelle Aktivität mittels TCDD und FICZ zeigen.
Durch UVB-Bestrahlung von Wildtyp-, AhR-defizienten- und konditionellen K5AhR-KO Mäusen konnte wir außerdem eine biologisch relevante Rolle des AhR bei der UVB induzierten Hautpigmentierung *in vivo* darstellen. WT Mäuse zeigten demnach einen signifikant stärkeren Melaninanstieg und eine signifikant höhere Tyrosinase-Aktivität im Vergleich zu AhR-KO Mäusen. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit K5AhR-KO Mäuse zeigte, dass dieser Unterschied nicht durch Keratinozyten-sezernierte Faktoren ausgelöst wurde, sondern eine direkte Funktion des AhR in Melanozyten war.
Die Rolle des AhR lag dabei nicht in der direkten Induktion von Enzymen der Melanogenese oder der Melaninproduktion (*tyr, tyrp1, tyrp2* und *mitf*), da eine Stimulation der Zellen mit TCDD oder FICZ keinen Anstieg der mRNS dieser Gene zeigte. Vielmehr zeigte der Vergleich UV-bestrahlter WT und AhR-defizienter Mäuse eine geringere Proliferation der Melanozyten als Folge der AhR-Defizienz.
Durch Genexpressionsanalysen von kultivierten, primären Melanozyten konnten wir den direkten Einfluss des AhR auf 291 (mindestens 3-fach) höher exprimierte Gene in WT Mäusen und 45 höher exprimierte Gene in AhR-defizienten Mäusen darstellen. Von diesen

Genen waren 65 (WT > AhR-KO) und 14 (AhR-KO > WT) mit Differenzierung, Apoptose und Proliferation assoziiert. Unter anderem wurden Endothelin-1 (*end1*) und kit-Ligand (*kitl*; SCF) im WT 3,6- bzw. 6-fach höher als in AhR-defizienten Mäusen exprimiert. Bei diesen Genen handelt es sich um Faktoren, die in der Melanozytenproliferation involviert sind. Durch die reduzierte Expression infolge eines AhR-KO lässt sich schließen, dass der AhR für eine normale Expression benötigt wird. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass c-kit, der Rezeptor für kitl in AhR-defizienten Melanozyten, schwächer ausgeprägt ist und AhR-abhängig über funktionelle DREs reguliert wird.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- Der AhR wird in Melanozyten exprimiert.
- TCDD induziert den klassischen AhR-Signalweg des Fremdstoffmetabolismus in Melanozyten.
- Der AhR übernimmt in Melanozyten eine zelltypspezifische, physiologische Funktion, indem er die UV-induzierte Proliferation der Zellen durch die Induktion von c-kit und kit-Ligand (SCF) reguliert.

Für diese Veröffentlichung führte ich folgende Experimente durch:

- AhR Nachweis auf Proteinebene in primären murinen Melanozyten von WT und AhR-defizienten Mäusen im Vergleich zu verschiedenen Geweben.
- UVB-Bestrahlung (180mJ/cm^2) AhR-defizienter und WT Tiere mit anschließender Präparation von Epidermishäutchen von Mausschwänzen für einen visuellen Bräunungsvergleich
- Nachweis einer Keratinozyten-spezifischen AhR-Defizienz in K5AhR-KO Mäusen durch Anreicherung und Isolation der einzelnen Zellpopulationen (Keratinozyten, Langerhans Zellen, Melanozyten und γδ T-Zellen) auf DNS-Ebene.

IV. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs stable establishment of oral tolerance in mice

Chmill S, Kadow S, Winter M, Weighardt H, Esser C
Toxicological Sciences; 2010 Nov; 118(1):98-107

Eine Aktivierung des AhR-Signalweges durch den Umweltschadstoff TCDD führt zu einer Vielzahl toxischer Effekte und hat insbesondere Auswirkungen auf das Immunsystem. Obwohl die größte Exposition gegenüber TCDD und natürlich vorkommenden AhR-Liganden (Indole, Flavonoide) über die Nahrung erfolgt, gibt es bis jetzt kaum Erkenntnisse hinsichtlich der Auswirkungen einer AhR-Überaktivierung für das Immunsystem des Darms.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des AhR in verschiedenen Bereichen des Dünndarms und den damit verbunden Zellpopulationen des Darm-assoziierten Immunsystems auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Eine konstitutive AhR-Expression konnten wir in allen drei Bereichen des Dünndarms (Duodenum, Jejunum und Ileum), sowie in den Zellen der mesenterialen Lymphknoten (MLN), den Epithelzellen und in geringem Maße in den Peyer´schen Patches (PP) nachweisen. Eine konstitutiv hohe Expression des AhR zeigte sich vor allem in CD8$\alpha\alpha^+$ TZR $\gamma\delta^+$ T-Zellen, die für die Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität und für die Immunüberwachung des Darms eine große Rolle spielen. Hingegen konnten wir nur geringe Mengen an AhR in CD103$^+$ DZ, die regulatorische Funktion bei der Aufrechterhaltung der Darmhomöostase vermitteln, und in CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen ermitteln. Nach oraler Gabe von TCDD konnten wir zeigen, dass das AhR-Zielgen *Cyp1a1* in MLN, Peyers Patches und Epithelzellen induziert werden kann, die Induktion im Dünndarm dabei von proximal nach distal (Duodenum> Jejunum> Ileum) abnimmt. *Cyp1a1* war in CD103$^+$ DZ nicht induzierbar, dafür wurde eine starke Expression des AhR-Zielgens AhRR gemessen, die überraschend weit über Werten von Leber und Thymus liegt und eine mögliche Erklärung für die schwache *Cyp1a1* Expression in diesen Zellen darstellt. Um einen Einfluss der AhR-Aktivierung und des damit verbundenen Signalweges auf die Entwicklung einer oralen Toleranz (OT) zu untersuchen, wurde WT Mäusen TCDD oral verabreicht und im Anschluss daran durch dreimaliges Füttern von Ovalbumin (OVA) eine Toleranz gegen OVA induziert. Nachfolgend wurden die Tiere mit einem Adjuvanz in Kombination mit OVA an drei Zeitpunkten gegen OVA immunisiert. Die Ermittlung der Serumtiter des OVA-spezifischen und des Gesamt-IgG1-Spiegels zeigte uns

eine signifikante Reduktion beider Titer in der nicht toleranten TCDD-Gruppe nach der ersten Immunisierung im Vergleich zur nicht toleranten Kontrollgruppe. Diese Suppression verschwand allerdings nach der zweiten Immunisierung, so dass sich die nicht tolerante TCDD- und die Kontroll-Gruppe auf einem Niveau befanden. Zu unserer Überraschung wurde die orale Toleranz nach der dritten Immunisierung auch in der toleranten TCDD-Gruppe komplett aufgehoben, was darauf schließen lässt, dass die stabile Etablierung einer oralen Toleranz durch die TCDD-Exposition verhindert wurde. Eine ähnliche Beobachtung konnten wir auch für OVA-spezifische IgA-Konzentrationen im Kot der Tiere machen. Dass dieses Ergebnis nicht das Resultat einer toxischen Wirkung des TCDD auf Immunzellen des Darms ist, konnten wir durch Untersuchungen der einzelnen Zellpopulationen (DZ, T-und B-Zellen), die in ihrer Zusammensetzung nicht beeinflusst waren, zeigen. Auch einen negativen Einfluss auf das Migrationsvermögen $CD103^+$ DZ in die mesenterialen Lymphknoten und eine daraus resultierende schlechte Antigenpräsentation an T-Zellen konnte nicht bestätigt werden. Wir fanden im Gegenteil mehr $CD103^+$ DZ in den MLN, die zudem mehr IL-6 produzierten. Da IL-6 eine wichtige Rolle bei der Induktion von Th_{17} Zellen spielt und wir zudem einen höheren prozentualen Anteil an Th17 Zellen in den MLN TCDD behandelter Tiere messen konnten, scheint dies ein Hinweis auf einen möglichen Mechanismus zur Durchbrechung der oralen Toleranz mittels TCDD zu sein.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- Der AhR wird in allen untersuchten Zellpopulationen des Darms exprimiert.
- Das Expressionsniveau des AhR und seine funktionelle Rolle sind im Barriereorgan Darm zelltypspezifisch.
- Der AhR reguliert in den Zellen des darmassoziierten Immunsystems immunologisch relevante Prozesse, wie z.B. die Zytokinsekretion (IL-6), und hat so Einfluss auf die Interaktion der Zellen.
- Aktivierung des AhR mit TCDD führt zu einer Aufhebung der oralen Toleranz. Dies weist außerdem auf mögliche Beeinflussbarkeit durch exogene, mit der Nahrung aufgenommene AhR-Liganden hin, die die Homöostase des Darms positiv oder negativ beeinflussen können.

Für diese Veröffentlichung führte ich folgende Experimente durch:

- Isolation einzelner Zellpopulationen aus dem Darm
- Nachweis verschiedener Gene auf mRNS-Ebene

V. Small molecules as friends and foes of the immune system

Kadow S, Jux B, Chmill S, Esser C

Future Med. Chem. Dec 2009 1(9), 1583-91

Thema dieses Übersichtsartikels ist die Bedeutung des AhR in der dynamischen Interaktion zwischen Immunsystem und Umwelt in Bezug auf T-Zell Aktivierung und zelluläre Signalwege unter Beteiligung von niedermolekularen Molekülen (<1000 Da).

Niedermolekulare Chemikalien sind selbst zu klein, um als Antigen von T-Zellen erkannt zu werden. Es gibt aber verschiedene Möglichkeiten, wie sie mit dem Immunsystem interagieren können. Zum einen können sie direkt an ein präsentiertes Peptid binden und Neo-Antigene bilden (Hapten-Konzept), gegen die der Körper nicht tolerant ist (z.B. Penicilin). Ein anderer Weg führt über die metabolische Aktivierung der Chemikalien, die an zelleigene Peptide innerhalb der Zelle binden, diese strukturell verändern (kryptische Antigene) und als neues Peptid über MHC-Molekülen an T-Zellen präsentiert werden, was autoimmune Reaktionen auslösen kann. Eine dritte Möglichkeit, das Prinzip der pharmakologischen Interaktion (p-i), geht von einer direkten Interaktion der Chemikalien mit dem TZR aus, was in einer Aktivierung der Zelle resultieren kann.
Niedermolekulare Moleküle können auch einen direkten Effekt auf Zellen des Immunsystems haben, was z.B. das Absterben, eine Veränderung der Zellfunktion (z.B. veränderte Zytokinproduktion) oder eine Veränderung der Zelldifferenzierung (z.B. Inhibierung der T_{reg} Bildung) bestimmter Immunzellen zur Folge hat. Pharmakologisch interessant sind diese Effekte, wenn sie durch Signalwege ausgelöst werden, die auf niedermolekulare Moleküle als physiologische Liganden zurückgreifen. Der immunsuppressive Effekt von CyclosporinA und Tacrolimus basiert z.B. auf der spezifischen Bindung an Cyclophilin bzw. FKB506 in T-Zellen. Der resultierende Rezeptor-Ligand-Komplex bindet und blockiert Calcineurin und verhindert so die T-Zell Proliferation und Zytokinsekretion.
Für das Immunsystem stellen niedermolekulare Substanzen also ein Risiko dar, wenn sie mit immunologisch wichtigen Signalwegen interagieren. Bedenkt man die Häufigkeit, mit der der Organismus diesen Gefahren ausgesetzt ist, muss man davon ausgehen, dass Regulationsmechanismen existieren, die das Risiko besonders in Hinblick auf Allergie und Autoimmunreaktionen senken.

So wirkt sich eine schnelle metabolische Elimination der Substanz in vielen Fällen positiv auf den Organismus aus (z.B. höhere CYP1A1-Aktivität = geringeres Risiko, an Psoriasis zu erkranken; langsame Acetylierer werden vermehrt mit Medikamenten-induziertem Lupus in Verbindung gebracht).

Obwohl die Leber in Hinblick auf den Fremdstoffmetabolismus das wichtigste Organ darstellt, erfolgt die Exposition mit niedermolekularen Substanzen hauptsächlich über die Epithelien der Lunge, des Darms oder der Haut. Auch der Darm und die Haut verfügen über eine Vielzahl fremdstoffmetabolisierender Enzyme (z.B. CYPs), was ihnen zwar zum einen die Degradation der Substanzen ermöglicht, zum anderen aber das Risiko für die Bildung von Neo-Antigenen und adversen Immunreaktionen erhöht. Als Sensor niedermolekularer Substanzen, der die Transkription fremdstoffmetabolisierender Enzyme induzieren kann, nimmt der AhR unter diesem Gesichtspunkt eine zentrale Rolle ein. Epidermale Langerhans Zellen haben im Immunsystem sowohl eine immunogene als auch eine tolerogene Funktion. So sind sie an der T-Zell-Aktivierung mittels MHC-II und ko-stimulatorischer Moleküle z.B. während einer CHS-Reaktionen beteiligt. Auf der anderen Seite müssen sie aber durch ihre Aufgabe als „Wächter“ eine gewisse Toleranz induzieren. LZ exprimieren noch größere Mengen AhR als Keratinozyten, sind aber, im Gegensatz zu diesen, inert gegenüber dem AhR-vermittelten Fremdstoffmetabolismus. Betrachtet man dieses Phänomen mit dem Wissen, dass die meisten Haptene aus Metaboliten entstehen und dass das Gleichgewicht zwischen Detoxifizierung und Bio-Aktivierung einen Einfluss auf die Haptenbildung hat, lässt mich das vermuten, dass die reduzierte Fremdstoffmetabolisierung eine Strategie der Risikoreduktion in Langerhans Zellen darstellt.

Die Rolle des AhR ist nicht nur auf den Fremdstoffmetabolismus beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf zelluläre Prozesse, z.B. Proliferation und Differenzierung. Zudem kann die AhR-induzierte Signalkette nicht als universelles Schema betrachtet werden, sondern ist Liganden- und Zelltyp-abhängig. Z.B. resultiert eine AhR-Aktivierung mittels TCDD in einer systemischen Immunsuppression. Eine Aktivierung mit einem schnell abbaubaren Liganden, z.B. FICZ, induziert in AhR-reichen Th_{17} Zellen die Sekretion von IL-22. IL-22 wird andererseits mit autoimmunen (Bsp. Psoriasis) und proinflammatorischen Prozessen (z.B. dermale Entzündungen, Reizdarm, Morbus Crohn) in Verbindung gebracht, hat aber auch immunprotektive Funktionen in Haut und Leber. Aus diesen Beobachtungen entstand schließlich die Theorie, dass der AhR eine Verbindung zwischen Umwelteinflüssen und adversen Immunreaktionen durch Promotion von Th_{17} Zellen und Zytokinsekretion darstellen könnte. Eine Bestätigung der Theorie böte gleichzeitig auch eine Möglichkeit zur

Manipulation der Immunantwort über AhR-spezifische Liganden. Tatsächlich gibt es zur Zeit zwei AhR-spezifische Substanzen (VAF347 und M50367), die in der Lage sind, Allergien oder Transplantationsabstoßungen im Mausmodel zu unterdrücken.

Die Erkenntnis, dass bestimmte niedermolekulare Substanzen als Liganden für immunologisch wichtige Transkriptionsfaktoren, wie z.B. den AhR, fungieren können, und die Möglichkeiten, die sich für Präventionen und gezielte Manipulation immunologischer Prozesse bieten, hat bereits zu einer verstärkten Forschung auf diesem Gebiet geführt und wird auch in den nächsten Jahren maßgeblich die Fragestellungen der Forschung beeinflussen.

3 Diskussion

3.1. Die Rolle des AhR für Funktion und Homöostase epidermaler Zellen

In der Epidermis sind Keratinozyten eng mit Langerhans Zellen (LZ), Melanozyten (MZ) und epidermalen γδ T-Zellen (DETZ) vernetzt. Eine kontrollierte Interaktion all dieser Zellen ist für die Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase und der immunologischen Funktion in der Haut essentiell. Die Haut ist täglich mit einer Vielzahl an Fremdstoffen, wie nierdermolekulare Chemikalien, die als potentielle Liganden des AhR gelten, in Kontakt. Auch UVB-Strahlung führt in der Haut zu der Entstehung des AhR-Liganden FICZ. Die Beteiligung des AhR an der Regulation physiologischer Funktionen in diesen Zellen, wie die in (I), (II) und (III) beschriebene Beteiligung an Differenzierung und Reifung epidermaler Langerhans Zellen und die regulation der Proliferationund Homöostase von Vγ3 positiven DETZ und von Melanozyten, stellen somit mögliche Ansatzpunkte für Fehlregulationen dar, die weitreichende Konsequenzen für den Organismus haben können.

3.1.1. Der AhR wird in epidermalen γδ T-Zellen konstitutiv exprimiert

Es ist bekannt, dass der AhR in verschiedenen αβ T-Zellen Subpopulationen differentiell ausgeprägt wird und bei deren Differenzierung eine Rolle spielt[160,161]. Ebenso wurde kürzlich von Martin et al. eine funktionelle Bedeutung des AhR für periphere γδ T-Zellen bei der antimikrobiellen Immunantwort durch die AhR-abhängige Induktion von IL-17 beschrieben[104]. Welche Rolle dem AhR in invarianten epidermalen γδ T-Zellen zukommt, die entscheidende Funktionen bei der Regulation der Wundheilung[89], Regulation inflammatorischer Prozesse der Haut[91,93] und Unterdrückung der Tumoren Entwicklung haben[96-98], ist bis jetzt noch nicht untersucht. Da γδ T-Zellen zusammen mit Keratinozyten die Hauptproduzenten des epidermalen GM-CSF sind[109,162], legte die unter (II) beschriebene verringerte GM-CSF Sekretion in AhR-KO Tieren die Vermutung nahe, dass die AhR-Defizienz einen Einfluss auf diesen Zelltyp haben könnte. In der unter (I) zusammengefassten Arbeit wurden deshalb Vγ3$^+$ epidermale γδ T-Zellen (Vγ3$^+$DETZ) im Kontext einer AhR-Defizienz untersucht.

Wir konnten erstmals zeigen, dass der AhR, ähnlich wie in αβ T-Zellen[160] und in peripheren γδ T-Zellen[104], in primären WT DETZ in großen Mengen exprimiert wird. Das ermittelte Expressionsniveau des AhR lag dabei sogar über dem der in (II) beschriebenen LZ, dem der

Leber und dem des Thymus. Eine *in vivo* Exposition von WT Mäusen mit 10µg/kg KG TCDD zeigte zu unserer Überraschung keine Induktion des typischen AhR-Zielgens *Cyp1a1* in DETZ. Da DETZ aber auch konstitutiv große Mengen AhR Repressor (AhRR) mRNS ausprägen, erscheint mir eine durch diesen verursachte Inaktivierung des klassischen AhR/ARNT-Signalwegs eine plausible Erklärung zu sein. Genexpressionsanalysen der DETZ von TCDD behandelten im Vergleich zu unbehandelten Tieren könnten weiter Aufschluss darüber geben, ob neben *Cyp1a1* auch die Induktion andere Zielgene des klassischen AhR-Signalwegs inhibiert ist. Durch weiterführende *in vivo* Experimente mit konditionellen AhRR-defizienten Mäusen könnte außerdem die physiologische Bedeutung der AhRR-vermittelten Inhibition des klassischen AhR-Signalwegs geklärt werden.

3.1.2. Epidermale γδ T-Zellen sind in AhR-KO Tieren sifgnifikant reduziert

Die von mir verwendeten AhR-Ko Mäuse zeigen unter unseren Haltungsbedingungen keine dermatologischen Symptome. Wir konnten unter physiologischen Bedingungen auch keine Verdickung der Ohren oder die Entstehung einer spontanen Dermatitis beobachten, wie sie für TZRδ-defiziente FVB Mäuse beschrieben ist[74]. Es war deshalb überraschend, dass die Vγ3$^+$ γδ T-Zellen in adulten, AhR-defizienten Tieren in allen untersuchten Körperregionen signifikant reduziert (>85%) waren. Um die Ursache dieses Phänomens zu klären, untersuchte ich verschiedene Punkte, an denen sich die AhR-Defizienz auswirken könnte: (i) eine reduzierte Bildung der DETZ-Vorläufer im embryonalen Thymus; (ii) eine inhibierte Migration der DETZ-Vorläufer aus dem Thymus in die Epidermis; (iii) eine verstärkte Apoptose der DETZ in der Epidermis, da die AhR-Defizienz Einfluss auf die Induktion antiapoptotischer Signale haben könnte[163,164] und (iv) Proliferation und Homöostase der DETZ in der Epidermis.

Meine Untersuchungen Vγ3$^+$ γδ T-Zellen von AhR-KO und WT Embryonen zeigten, dass zwar die Zellularität des Thymus in AhR-defizienten Embryonen im Vergleich zum WT signifikant reduziert war, dies aber nicht die Vγ3$^+$DETZ Vorläufer-Zellen betraf. Ein Effekt der AhR-Defizienz auf die frühe Positivselektion dieser Vorläuferzellen, z.B. durch eine Expressionsänderung des γδ T-Zell-spezifischen Selektionsgens *skint1*[165], kann somit zwar nicht komplett ausgeschlossen werden, der beobachtete Effekt ist aber zu gering, um die stark reduzierten DETZ-Frequenzen in der Epidermis der adulten AhR-KO Tiere zu erklären. Zusammen mit früheren Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe, in denen eine TCDD vermittelte Aktivierung des AhR Einfluss auf die Entwicklung der embryonalen γδ TZR

spezifischen T-Zellen hatte, was sich durch eine verstärkte Bildung von γδ TZR+ Emigranten darstellte[105], zeigen meine Daten somit, dass nicht das Fehlen des AhR, wohl aber seine Aktivierung mit TCDD im Thymus zu Zeitpunkten der γδ T-Zell Entwicklung einen Effekt auf diese Zellen hat. Weiterführende Experimente mit TCDD Exposition *in utero* und eine anschließende Untersuchung der γδ TZR+ Subpopulationen in den verschiedenen Organen könnten nähere Erkenntnisse liefern, welche γδ T-Zell Subpopulationen durch eine frühe AhR-Aktivierung direkt betroffen sind und welche biologischen Konsequenzen dies für den Organismus hat.

Eine fehlerhafte oder inhibierte Migration epidermaler γδ T-Zellen, z.B. durch eine Expressionsänderung der Rezeptoren CCR4 und CCR10 und CCL27, die diese Migration vermitteln[166,167] und zu einer Ansammlung der Zellen in der Milz, den Lymphknoten oder der Dermis statt in der Epidermis führen, konnten meine Untersuchungen nicht bestätigen. Vielmehr zeigten Analysen in neugeborenen AhR-KO und WT Tieren deutlich, dass eine initiale Besiedlung der Epidermis kurz nach der Geburt wie im WT stattfindet. AhR-KO Tiere wiesen zwei Tage nach der Geburt sogar höhere Vγ3+DETZ Frequenzen in der Epidermis auf als der WT.

Nach der initialen Besiedlung der Epidermis expandieren DETZ nur noch lokal, da sie im Thymus der adulten Tiere nicht mehr gebildet werden[77]. Da die initiale Besiedlung der Epidermis in AhR-KO Tieren stattfand, untersuchte ich den zeitlichen Verlauf des Expansionprofils der Vγ3+ DETZ in WT und AhR-KO Mäusen von Tag 2 bis 28 nach der Geburt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von De Creus et al. konnte ich in WT Tieren einen starken Anstieg der Vγ3+DETZ Frequenzen zwischen Tag 7 und 14 nach der Geburt beobachten[142]. Im Gegensatz zum WT zeigte sich in AhR-KO Tieren kein Anstieg, sondern eine kontinuierliche Reduktion der Vγ3+DETZ von Tag 2 bis Tag 28 nach der Geburt. Da sowohl in WT als auch in AhR-KO DETZ vergleichbar niedrige Frequenzen apoptotischer Zellen nachweisbar waren, konnte ich Apoptose als Ursache des langsamen Verschwindens von Vγ3+DETZ ebenfalls ausschließen. Zellzyklusanalysen während der starken Proliferations-Phase zwischen Tag 10 und 14 zeigten, dass signifikant mehr AhR-KO DETZ in der G1-Phase des Zellzyklus „stecken bleiben“ als WT DETZ. Die signifikant reduzierten Vγ3+DETZ-Frequenzen im adulten AhR-KO Tier werden also durch eine verringerte Proliferation kurz nach der Geburt verursacht. Zusätzliche Studien mit z.B. BrdU, die direkt *in vivo* Aufschluss über das Proliferationsvermögen der AhR-defizienten

Vγ3⁺DETZ liefern, wären eine Möglichkeit, die Kinetik dieses Phänomens weiter zu verfolgen.

3.1.3. Die Homöostase epidermaler γδ T-Zellen wird durch intrinsische Faktoren AhR-abhängig reguliert

Faktoren, die die Differenzierung, Homöostase und Proliferation der DETZ beeinflussen, können sowohl extrinsisch vermittelt werden, z.B. über Zell-Zell-Kontakte und von Keratinozyten sowie von LZ sezernierten Zytokinen (IL-7, IL-15, IL-2 und TNF-α)[80,108,142,143], aber auch von intrinsischen Faktoren, die z.B. die Expression der Zytokin-Rezeptoren auf DETZ regulieren, abhängen[168,169].

DETZ von Keratinozyten und Langerhans Zell-spezifischen AhR-KO Tieren (K5AhR-KO und LZAhR-KO) zeigten in meinen Untersuchungen im Vergleich zum WT keine Unterschiede in den Frequenzen und in ihren morphologischen Merkmalen. Die Vγ3⁺DETZ 7 und 14 Tage alter Mäuse prägten im AhR-KO hingegen eine rundere, dendritenärmere Morphologie aus. Auch der Aktivierungsmarker CD69 wurde auf AhR-defiziente Vγ3⁺DETZ nur reduziert exprimiert. Dies ließ uns auf ein Problem bei der Differenzierung dieser Zellen schließen. mRNS und Proteinmengen von IL-7, IL-15 und IL-2 in epidermalen Zellen bzw. Zellkulturüberständen unterschieden sich nicht zwischen WT, K5AhR-KO und AhR-KO. Der Einfluss intrinsisch regulierter Faktoren auf die Proliferation der DETZ, wie die Expression von Zytokin-Rezeptoren, ist durch Studien mit IL-7, IL-2 und IL-15 Rezeptor-defizienten Tieren bekannt[84-86]. Wir wissen zudem, dass die Rezeptoren Untereinheit-β, die vom IL2- und IL7-Rezeptor genutzt wird, acht DREs in ihrer Promotor-Region enthält. Durchflusszytometrische Analysen der DETZ von WT, AhR-KO und K5AhR-KO zeigten keinen Einfluss der AhR-Defizienz auf die Expression dieser Rezeptoren. Dies ließ vermuten, dass die AhR-Defizienz sich nicht auf die bekannten extrinsischen und intrinsischen Faktoren auswirkt. Diese können somit als Ursache der reduzierten DETZ-Proliferation und gestörten Differenzierung ausgeschlossen werden.

3.1.4. Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit wird AhR-abhängig induziert und vermittelt so den Einfluss auf die DETZ-Proliferation

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigten, dass Differenzierung und Proliferation in AhR-defizienten Vγ3$^+$DETZ gestört sind und dass diese Effekte nicht durch bereits bekannte, extrinsisch und intrinsisch vermittelte Faktoren verursacht wurden. Die fehlerhafte Proliferation musste demnach durch andere, AhR-regulierten Mechanismen verursacht werden. Durch unsere Arbeiten über Langerhans Zellen und Melanozyten konnten wir schließen, dass sich die AhR-Defizienz zelltypspezifisch nur auf die Proliferation der Vγ3$^+$DETZ und Melanozyten, nicht aber auf LZ und Keratinozyten auswirkt. Wir vermuteten deshalb, dass es in DETZ und Melanozyten einen gemeinsamen, AhR-abhängigen Faktor geben müsste, der oberhalb der Zellzyklusregulation ansetzt, und zelluläre Differenzierungs- und Proliferationsprozesse steuert.

In der unter (III) beschriebenen Arbeit konnten wir durch globale Genexpressionsprofil- und durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass AhR-defiziente Melanozyten die Rezeptor-Tyrosinkinase c-kit nur noch marginal exprimieren. c-kit und sein Ligand Stem-cell-factor (SCF) sind als essentielle Wachstumsfaktoren für Melanozyten beschrieben. Der Ligand SCF wird dabei von Keratinozyten, LZ[135] und, laut unserer Ergebnisse aus (III), auch von Melanozyten konstitutiv sezerniert. UV-Bestrahlung führt zu einer gesteigerten Induktion der SCF Sekretion. Mäuse mit einer spontanen Mutation im „W“ Lokus (der c-kit Lokus) zeigen eine funktionelle Rolle von c-kit in Keimzellen, Melanozyten, neuralen Stammzellen und hämatopoetischen Zelltypen[170,171]. Das c-kit/SCF-System spielt außerdem eine bedeutende Rolle für die Differenzierung, Expansion und Aktivität CD8αα$^+$ TCRγδ$^+$ intraepithelialer Lymphozyten (IEL) im Darm[172,173]. Unsere Ergebnisse aus (I) zeigten interessanterweise eine 50%ige Reduktion der CD8αα$^+$ TZRγδ$^+$ IEL AhR-defizienter Tiere im Barriereorgan Darm. Die Frequenzen der peripheren γδ T-Zell Populationen in Blut, Milz, LN und Thymus unterschieden sich hingegen nicht zwischen den WT und AhR-KO, was auf einen organ- und auch zelltypspezifischen Einfluss des AhR hinwies.

Wir zeigen hier erstmals, dass Vγ3$^+$DETZ neben Melanozyten die einzige epidermale Zellpopulation sind, die c-kit exprimiert. Die Promotorregion von c-kit enthält zwei AhR-responsive Elemente[19]. Die Sekretion von SCF ist in kultivierten murinen AhR-defizienten Melanozyten reduziert (gezeigt in III). Die Vermutung lag deshalb nahe, dass das Fehlen des AhR Einfluss auf den c-kit/SCF-Signalweg hat und dass dieser Signalweg in der Epidermis einen bisher unbekannten, spezifischen Mechanismus bei der Vγ3$^+$DETZ Proliferation und Differenzierung einnehmen könnte.

Vergleiche der SCF mRNS epidermaler Zellen von WT, K5AhR-KO und AhR-KO zeigten, dass die Expression des c-kit Liganden durch eine AhR-Defizienz nicht betroffen war. Im Gegensatz dazu konnten wir durch die Klonierung der beiden DRE kodierenden Promotorregionen von c-kit in einen Luziferase-Reporter-Plasmid, gefolgt von einer TCDD vermittelten AhR-Aktivierung, ergänzend zu den in (III) publizierten Daten eine AhR-abhängige Aktivierung der c-kit Promotorsequenz darstellen. Die c-kit-Promotor induzierte Luziferase-Aktivität wurde durch eine Punktmutation in einer der beiden DRE-Sequenzen vermindert. Bei gleichzeitiger Mutation beider DRE-Sequenzen war eine Aktivität nicht mehr nachweisbar. Tatsächlich konnte ich eine c-kit-Expression nur noch auf ~50% der verbleibenden ~0.5% AhR-defizienten Vγ3$^+$DETZ *in vivo* nachweisen, wohingegen von den ~5% K5AhR-KO und WT Vγ3$^+$DETZ ~90% c-kit exprimierten. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass die DRE-Sequenzen von c-kit auch *in vivo* Ziele der AhR-vermittelten Induktion der Transkription sind.

Eine Hypothese für die verbleibende c-kit Expression in AhR-defizienten Vγ3$^+$DETZ bietet die vor kurzem beschriebene Interaktion des Transkriptionsfaktors SP1 mit dem AhR/ARNT-Komplex. Diese ist als notwendige Bedingung für eine maximale transkriptionale Aktivität bestimmter Gene beschrieben[174]. Die SP1-abhängige Induktion der c-kit Expression ist für Mastzellen bereits bekannt[175]. Weiterführende Analysen der c-kit Promotorregion auf SP1 Bindestellen und Immunpräzipitation von AhR und SP1 könnten Aufschluss über eine AhR/SP1 regulierte c-kit-Expression liefern.

Die spezifische c-kit-Expression auf Vγ3$^+$DETZ wurde von unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal beschrieben. Während der überwiegende Anteil der DETZ Vγ3Vδ1 positiv ist, gibt es auch einige DETZ (~1-2%) mit anderen Vγ–Region Spezifitäten[176]. Interessanterweise prägen die Vγ3 negativen DETZ c-kit nicht konstitutiv aus, und auch ihre Frequenz ist von der AhR-Defizienz nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse unterstützen damit unsere Theorie, dass die spezifische Proliferation der Vγ3$^+$DETZ über die AhR-abhängige c-kit Expression reguliert wird.

Verschiedene experimentelle Ansätze sind denkbar, um diese Zusammenhänge genauer zu klären. Die Verabreichung neutralisierender, c-kit spezifischer Antikörper an neugeborenen WT Tieren würde zunächst einen direkten Aufschluss über eine c-kit-abhängige DETZ Proliferation zu frühen Zeitpunkten liefern. Laut unserer Daten zeigen Vγ3$^+$DETZ aus adulten WT und AhR-KO Tieren unter physiologischen Bedingungen keine nennenswerte Proliferation (dargestellt in (I)). Durch externe Reize, die bekanntermaßen die Proliferation Vγ3$^+$DETZ induzieren, wie z.B. durch Verwundung, UV-Bestrahlung oder

Induktion einer CHS-Reaktion[100,177,178], könnte man Bedingungen schaffen, um den Einfluss von c-kit auf die DETZ Proliferation im adulten Tier zu untersuchen. Denkbar sind auch *in vitro* und *in vivo* Versuche, bei denen nach Exposition mit TCDD oder FICZ eine mögliche gesteigerte c-kit-Expression in kausalen Zusammenhang mit einer erhöhten Proliferationrate gesetzt werden könnte.

Ein interessanter Befund der Arbeit (I) ist, dass die fehlenden Vγ3$^+$ DETZ in AhR-KO Tieren nicht durch αβ$^+$ T-Zellen oder andere γδ T-Zellen ersetzt wurden, wie es für TZRδ$^-$, IL2-, IL7- und IL15-Rezeptor-defiziente Tiere beschrieben ist[179,180]. Bei diesen Tieren ist im Gegensatz zu AhR-KO Tieren bereits die Entwicklung der embryonalen Vγ3$^+$DETZ Vorläuferzellen gestört. Die Zellen erreichen die Epidermis also nur eingeschränkt oder gar nicht[84]. Andere Vγ3 negative Subtypen oder αβ T-Zellen können deshalb zu einem sehr frühen Zeitpunkt die freie epidermale Nische besetzen. Unser Befund weist erstmalig auf die Zeitabhängigkeit dieser frühen Besiedlungsphase hin, da die Neubesetzung der epidermalen Nische zu späteren Zeitpunkten (> Tag 7 nach der Geburt), wie es im AhR-KO der Fall ist, scheinbar nicht mehr erfolgen kann.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine bisher unbekannte physiologische Funktion des AhR in Vγ3$^+$DETZ. Diese wird durch die AhR-abhängige Induktion des c-kit/SCF-Signalwegs vermittelt, der einen neuen, bisher unbekannten Mechanismus der spezifische Proliferation/Homöostase Vγ3$^+$ epidermalen γδ T-Zellen darstellt.

3.1.5. Der AhR nimmt Einfluss auf die γδ T-Zell-/LZ-Interaktion

Unsere Arbeiten zu Langerhans Zellen (II) zeigten, dass die verringerte Aufregulation des ko-stimulatorischen Moleküls CD80 durch signifikant reduzierte GM-CSF Mengen in der Epidermis AhR-defizienter Tiere verursacht wird. γδ T-Zellen sind neben Keratinozyten bekannte GM-CSF Produzenten in der Epidermis[108]. Untersuchungen von epidermalen Zellkulturüberständen von WT, K5AhR-KO und AhR-KO mittels GM-CSF ELISA zeigten deutlich, dass die AhR-Defizienz in Keratinozyten keinen negativen Einfluss auf die GM-CSF Sekretion hatte. Depletierte man hingegen epidermale γδ T-Zellen *in vitro*, was den unter (II) beschriebenen AhR-KO Phänotyp simulierte, entsprachen die ermittelten GM-CSF Mengen von WT und K5AhR-KO Kulturüberständen denen der AhR-defizienten Mäuse. Die

LZ exprimierten signifikant weniger CD80 und waren kleiner und weniger granulär im Vergleich zu WT LZ, bei denen γδ T-Zellen nicht depletiert wurden. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass γδ T-Zellen neben der Funktion als GM-CSF Produzenten zusätzliche Aufgaben bei der Reifung der Langerhans Zellen einnehmen. Denkbar sind z.B. Zell-Zell-Kontakte oder die Sekretion anderer Zytokine, wie TNF-α oder TGF-β[138,139,181]. Der unreife Phänotyp AhR-defizienter LZ ist die Folge des Fehlens von Zytokinen, insbesondere GM-CSF, die normalerweise durch DETZ sezerniert werden, in AhR-KO Tieren jedoch fehlen. Unsere Ergebnisse zeigen somit zum ersten Mal die direkte Abhängigkeit zwischen LZ und DETZ *in vivo,* die in Abb. 3.1 noch einmal schematisch dargestellt ist. Möglichkeiten, die sich durch eine DETZ vermittelte Modulation der LZ zu einem unreifen, toleranzvermittelnden Phänotyp ergeben, könnten z.B. für die Behandlung allergischer Hautreaktionen von Interesse sein. Versuche mit einer *In vitro* Ko-Kultivierungen von DETZ und LZ, die mit verschiedenen AhR-Liganden exponiert würden, gefolgt von einer Stimulation naiver T-Zellen mit diesen LZ, könnten erste Erkenntnisse über die immunologische Kompetenz solcher modulierten LZ liefern.

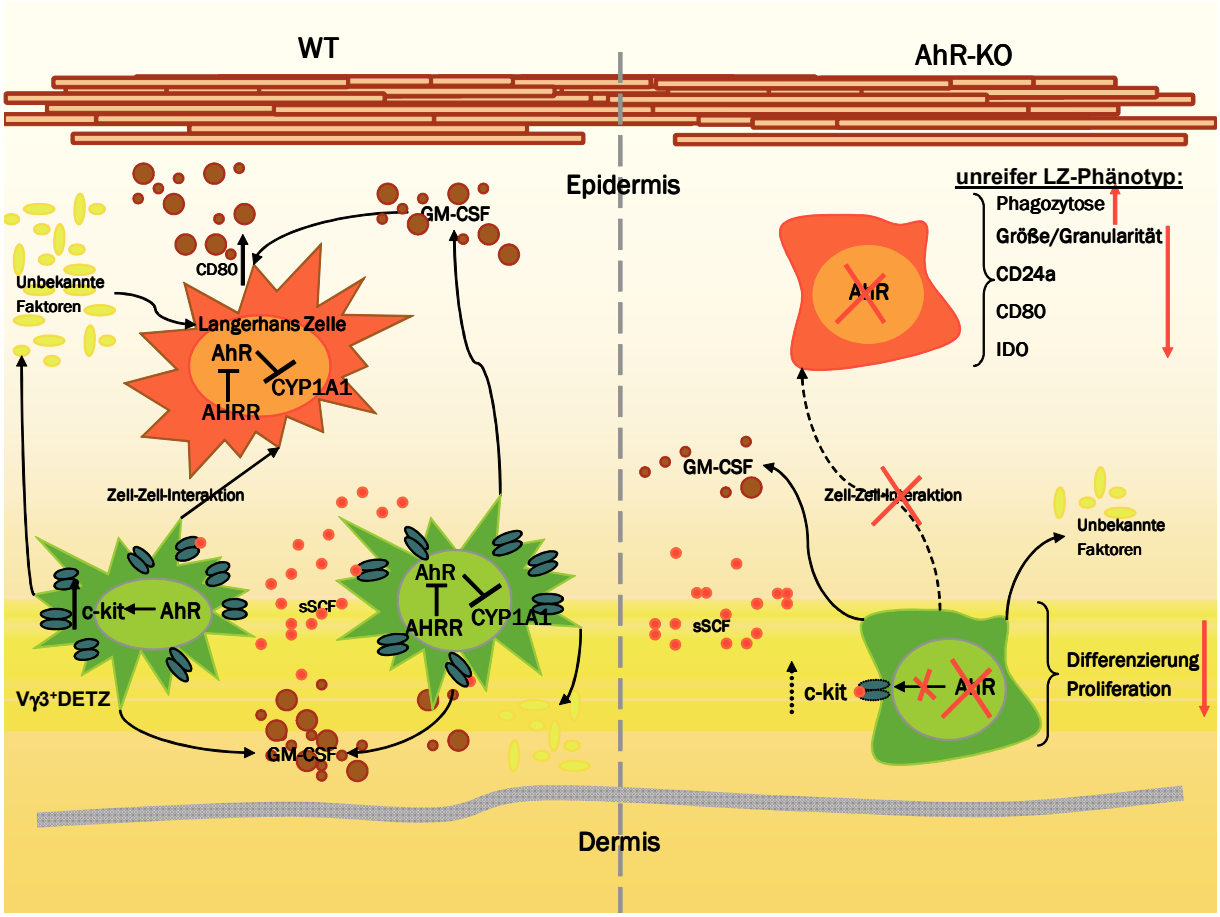


Abbildung 3.1: Die Expression des AhR hat Einfluss auf die Interaktion von Vγ3⁺DETZ und Langerhans Zellen. Der AhR wird in WT LZ (orange) und DETZ (grün) exprimiert. Das typischen AhR-Zielgen *cyp1A1* wird in DETZ durch TCDD nicht induziert. Das Transkriptom der LZ ist insgesamt inert gegenüber der TCDD induzierten AhR-Aktivierung. Sowohl in DETZ als auch in LZ wird diese Inhibition des klassischen AhR-Signalwegs vermutlich durch die hohe AhRR-Expressionn vermittelt. In Vγ3⁺DETZ induziert der AhR die Expression des SCF-Rezeptors

c-kit und nimmt so Einfluss auf die c-kit/SCF-vermittelte Proliferation. Das von DETZ produzierte GM-CSF wird von LZ für die Aufregulation des ko-stimulatorischen Moleküls CD80 benötigt. Andere DETZ-vermittelte, lösliche Faktoren und/oder Zell-Zell-Kontakte haben zusätzlichen Einfluss auf die Reifung und Differenzierung der LZ. AhR-KO Vγ3$^+$DETZ exprimieren c-kit nur noch marginal, die daraus resultierende reduzierte Proliferation führt zu einer drastisch reduzierten Anzahl Vγ3$^+$DETZ, die wiederum zu einer verringerten Menge GM-CSF und anderen löslichen Faktoren in der Epidermis führt. Zusammen mit der fehlenden DETZ/LZ-Interaktionen kommt es in AhR-KO Tieren zu der Ausprägung eines unreifen LZ-Phänotyps.

3.1.6. AhR und Langerhans Zellen – „klassischer" Signalweg oder „alternative" Funktion?

Verschiedene Studien deuten auf dendritische Zellen als direkte Ziele von TCDD und verwandter Substanzen hin[182-184]. Infolge einer AhR-Aktivierung verändert sich das Zytokin-Profil der DZ und vermittelt so die immunsuppressiven Effekte auf B- und T-Zellen[29,60,185]. Langerhans Zellen sind als dendritische Zellen die Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort in der Haut. Bis vor kurzem war die gängige Annahme, dass LZ eine funktionelle Rolle bei der Vermittlung der Kontakt-Hypersensitivitäts-Reaktion (CHS) einnehmen[118]. Untersuchungen an neu entwickelten Mausmodellen zeigen hingegen sowohl tolerogene als auch regulatorische Funktion von LZ[117,186]. Experimente mit verschiedenen viralen Antigenen zeigen, dass LZ in diesen Fällen nicht in der Lage waren, die entsprechende spezifische T-Zell Antwort zu vermitteln[187]. Aufgabenspektrum und Spezifität der LZ lassen noch viele Fragen offen[188]. Studien zur Rolle des AhR in LZ sind in diesem Zusammenhang bis jetzt nicht bekannt. Als Vermittler umweltinduzierter Stimuli ist es denkbar, dass der AhR Einfluss auf tolerogene bzw. regulatorische Funktionen der LZ nimmt.

In der unter (II) beschriebenen Arbeit konnten wir erstmalig zeigen, dass Langerhans Zellen hohe Mengen AhR ausprägen. Dabei konnten wir eine gute Korrelation zwischen mRNS- und Protein-Menge darstellen. Unseres Wissens nach beschäftigt sich nur eine Studie mit den Auswirkungen einer AhR-Aktivierung in LZ. 1989 untersuchten Puhvel und Kollegen die Dichte und Morphologie von LZ in HRS/J Mäusen, die mit TCDD belastet worden waren. Sie konnten zeigen, dass LZ von TCDD behandelten Mäusen kleiner und dendritenärmer waren als die der Kontrolltiere[1]. Unklar blieb, ob das Phänomen auf einem extrinsischen oder intrinsischen Einfluss des AhR auf die Differenzierung der Zellen beruhte.
Unsere Untersuchungen des globalen Expressionsprofils (22,500 Gene) der LZ nach *in vivo* Exposition mit einer moderaten Dosis TCDD zeigte zu unserer Überraschung, dass das Transkriptom der LZ inert gegenüber einer TCDD-induzierten transkriptionellen Regulation

war. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da verschiedene andere Studien unter gleichen experimentellen Bedingungen eine starke Induktion der klassischen AhR-Zielgene (*Cyps*) durch TCDD in DZ der Milz zeigten[60,189]. LZ exprimieren ähnlich große Mengen an AhRR wie epidermale γδ T-Zellen, was uns vermuten ließ, dass auch in primären LZ eine AhRR vermittelte Inhibierung des AhR/ARNT-Signalwegs stattfindet. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Anderson et al. mit einer murinen, LZ-ähnlichen Zelllinie eine Verstoffwechslung der AhR-Liganden 7,12-Dimethylbenzanthrazen und Benz[a]pyren nachweisen[120]. Auch die Arbeit von Seaki et al. zeigte in *in vitro* generierten LZ-ähnlichen Zellen eine konstitutive Expression verschiedener Cyp450 Gene[190]. Diese Ergebnisse stehen nicht in Widerspruch zu unserer Arbeit, vielmehr verdeutlichen sie, dass bei der Verwendung von Zelllinien, die über die Zeit Veränderungen gegenüber ihren primären Ursprüngen entwicklen können, die Ergebnisse unter Vorbehalt interpretiert werden sollten. Unsere Ergebnisse zeigen erstmalig, dass primäre LZ in der Epidermis anders als viele andere Zellarten, nach Exposition mit einem hochaffinen AhR-Liganden weder Gene des Fremdstoffmetabolismus (wie Cytocrom P450) noch andere Gene aktivieren.

Die Exposition der Haut mit AhR-Liganden kann verschiedene Reaktionen hervorrufen. Niedermolekulare chemische Substanzen könnten durch die Aktivierung des AhR über die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme abgebaut und, ohne eine Reaktion auszulösen, ausgeschieden werden. Die Metabolisierung eines Liganden zu einem Protein-reaktiven Hapten könnte aber auch zu der Bildung von Neoantigenen führen, die eine T-Zell-abhängige Allergie (Kontaktdermatitis) induzieren (s. hierzu auch (V)). Anderson und Kollegen konnten nachweisen, dass die Metabolisierung des AhR-Liganden 7,12-Dimethylbenzanthrazen zu reaktiven Metaboliten für das Auslösen einer CHS-Reaktion notwendig ist[120]. Die Verstoffwechselung und infolgedessen eine Bioaktivierung niedermolekularer Substanzen spielt demnach eine Rolle bei der Vermittlung adverser Effekte auf das Immunsystem. Die Verhinderung des zelleigenen Metabolismus dieser Substanzen in LZ und die reduzierte Phagozytosekapazität der LZ nach TCDD Exposition, die möglicherweise die Aufnahme von Neoantigenen, die von Keratinozyten generiert wurden, verhindert (in unserer Arbeitsgruppe von Bettina Jux gezeigt), könnte deshalb einen bisher unbekannten Mechanismus der LZ zur Wahrung ihrer immunregulatorischen Funktion darstellen.

Eine Wiederholung unserer Untersuchungen mit AhRR-defizienten Mäusen, die in der AG Förster generiert wurden, im Vergleich zum AhR-KO und WT, könnten in diesem Zusammenhang Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung des AhRR für das inerte LZ

Transkriptom liefern und zusätzlich Aufschluss über die immunologische Relevanz dieses Mechanismus liefern.

3.1.7. Indolamin- 2,3-Dioxygenase 1 und 2 werden in LZ und BM-DZ AhR-abhängig reguliert

Verschiedene Untersuchungen lassen die Annahme zu, dass der AhR neben der direkten Liganden-vermittelten Induktion der Transkription andere, Liganden-unabhängige Funktionen in der Zelle, z.B. durch eine direkte Interaktion mit den NF_KB-Untereinheiten RelA oder RelB, ausübt[15,29,30,191]. Außerdem ist bekannt, dass der AhR eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und Funktion peripherer Immunzellen einnimmt[160,192]. In der vorliegenden Studie (II) wurden die globalen Genexpressionsprofile isolierter WT und AhR-KO LZ miteinander verglichen. Es wurden 127 unterschiedliche, konstitutiv ausgeprägte Gene in WT und AhR-KO nachgewiesen. Interessanterweise stehen 20 dieser Gene in Zusammenhang mit dem Immunsystem (z.B. MHC-II und CD36), diese sind in AhR-defizienten Mäusen höher exprimiert, d.h., möglicherweise reprimiert der AhR die Expression dieser Gene im WT direkt über „inhibitorische" DREs[193] oder der AhR interagiert im WT mit anderen Signalwegen[15], die schließlich die Transkription dieser 20 Gene regulieren (in diesem Fall erniedrigen). Andere Gene wurden in AhR-KO LZ niedriger exprimiert, was auf eine AhR-abhängige Transkription deutet.

Am stärksten verändert war die Expression von Ido1, einem immunsuppressiv wirkenden Enzym, das konstitutiv und induzierbar u.a. in dendritischen Zellen ist. Die Fähigkeit dendritischer Zellen, IDO zu exprimieren, ist für den Organismus von großer Bedeutung. So zeigen Studien, dass die Induktion von IDO Abstoßreaktionen gegenüber Transplantaten verhindert (graft-vs.host-disease)[194]; Ebenso verhindert die IDO Produktion durch DZ die Erkennung entarteter Zellen und trägt so zur Entstehung von Melanomen bei[195]. Die Abhängigkeit der Ido-Induktion von AhR könnte also durch eine gezielte Modulation über verschiedene AhR-Liganden interessante klinische Ansatzpunkte liefern.

Sowohl *Ido1 als auch Ido2* besitzen DRE-Sequenzen in ihrer Promotorregion[19]. Durch Klonieren einzelner DRE-kodierender Sequenzabschnitte in einen Luziferase-Reporterplasmid und Stimulation mit TCDD konnten wir die AhR-abhängige Aktivierung der *Ido2*-Promotorsequenz nachweisen, die durch das Einbringen einer gerichteten Punktmutation verloren geht. Einzelne *Ido1*-DREs zeigten zwar keine Luziferase-Aktivität (s. Anhang B), eine Erklärung hierfür könnte aber in der von Vogel und Kollegen postulierten,

notwendigen Interaktion des AhR mit der NFκB Untereinheit RelB für eine erfolgreiche Geninduktion liegen. So wird die IL-8 Induktion in humanen Makrophagen durch die Bindung eines RelB/AhR-Komplex an bis dahin unbekannte RelB/AhR-responsive Elemente (RelB/AhRE) in der Promotorregion des Gens induziert[196]. Dieser Mechanismus wäre auch für eine AhR-vermittelte Ido-Induktion denkbar und sollte unter Beachtung der RelB/AhRE-Sequenz in weiteren Klonierungsansätzen untersucht werden. Die Verwendung von WT und AhR-KO BM-DZ, die mit verschiedenen *Ido*-induzierenden Stimuli (TLR-Liganden, IFNγ und TCDD)[197-199] behandelt wurden, ermöglichte es uns, die Limitierung des Klonierungsexperiments zu umgehen. Hier konnten wir zeigen, dass sowohl die *Ido1*- als auch die *Ido2*-Expression direkt über dem AhR vermittelt wird und nicht durch eine AhR-Interaktion auf Ebene der TLR- und IFNγ-Rezeptor Expression oder der nachgeschalteten Signalwege verursacht wird (s. Anhang B). Unsere Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die eine TCDD induzierte *Ido1* und *-2* Expression *in vivo* für dendritische Zellen der Milz oder *in vitro* für verschiedene DZ-Zelllinien und BM-DZ nachweisen konnten[48,182,183].

Untersuchungen mit verschiedenen AhR-spezifischen Liganden, die in der Lage sind, Allergien oder Transplantationsabstoßungen im Mausmodel zu unterdrücken, gibt es bereits[200-205]. Besonders in Hinblick auf eine AhR-abhängige IDO-Modulation werden diese Ansätze auch in Zukunft im Fokus der Forschung stehen.

3.1.8. AhR-Defizienz inhibiert die Kontakt-Hypersensitivitäts-Reaktion

Nach Aufnahme von Antigen, aber auch durch Präparation der LZ aus der Epidermis und durch den Reiz einer *in vitro* Kultivierung, verändern sich dendritische Zellen. In diesem als Reifung bezeichneten Prozess regulieren sie ko-stimulatorische Moleküle, insbesondere CD80 und CD86, auf, verlieren ihre Fähigkeit zur Phogozytose und werden größer. In der vorliegenden Arbeit (II) konnten wir zeigen, dass LZ aus der Epidermis von AhR-KO Mäusen diese Reifungsmarker nur vermindert ausprägten und demnach schlechter reifen. Die reduzierte Expression von *Ido*, welche in reifen, nicht aber in unreifen LZ nachweisbar ist[49], unterstützte diese Hinweise. Eine Stimulation mit CD24a und CD80 begünstigt besonders die Proliferation von Th_1-Zellen[206,207], die für die Effektorphase der CHS-Reaktion von Bedeutung sind. Die Rolle des AhR für das Th_1/Th_2 Gleichgewicht ist aber schwer zu ermitteln, da hierbei wieder zelltyp- und organspezifische Unterschiede zum Tragen kommen[59,61,201,208]. Die von uns beobachtete, signifikant reduzierte Expression der ko-

stimulatorischen Moleküle CD24a und CD80 auf AhR-KO LZ lässt die Frage nach der stimulatorischen Kapazität dieser Zellen aufkommen. Eine mögliche Auswirkung zeigte sich in der Kontakt-Hypersensitivitäts-Reaktion (CHS-Reaktion) AhR-defizienter Tiere. Diese zeigten zwar einen ähnlichen kinetischen Verlauf der Effektorphase wie der WT, wiesen aber 24-48 Stunden nach einem zweiten Hapten-Kontakt eine signifikant reduzierte CHS-Reaktion auf. Um zu klären, ob die Reaktion durch die AhR-defizienten LZ selbst oder durch andere Faktoren beeinflusst wurde, untersuchte ich: (i) die Fähigkeit der LZ, aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten zu migrieren, was z.B. durch verringerte Zytokinsekretion von Keratinozyten verursacht werden könnte; (ii) die LZ vermittelte Aktivierung $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen; (iii) den Einfluss einer AhR-Defizienz auf andere Zelltypen, z.B Keratinozyten, die laut Literatur eine funktionelle Rolle bei der Induktion einer CHS-Reaktion einnehmen.

Die migratorische Kapazität der LZ und der dermalen DZ, die einen kritischen Faktor für die Induktion einer CHS-Reaktion darstellt[209], war durch die AhR-Defizienz nicht beeinträchtigt. Sowohl unsere Untersuchungen von *ex vivo* Hautexplantaten, als auch Analysen der drainierenden Lymphknoten *in vivo* zeigten, dass LZ und dDZ sich aus dem Keratinozyten-Verband lösen und in WT und AhR-KO in ähnlicher Anzahl in die drainierenden Lymphknoten einwandern. Auch die Analyse aktivierter $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen im Lymphknoten zeigte keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell konnten wir in AhR-KO Tieren sogar mehr $CD69^+$ T-Zellen beobachten (s. Anhang B,). Durch die zuvor beschriebene, verringerte Expression der ko-stimulatorischen Moleküle auf AhR-defizienten LZ ist es denkbar, dass die vermittelte Immunreaktion nicht Th_1-spezifisch induziert werden konnte[210,211]. Durch die verwendeten, konventionellen AhR-„knock-out“ Tiere konnten wir allerdings den Einfluss der AhR-Defizienz auf andere beteiligte Zellpopulationen, auch auf T-Zellen, nicht ausschließen. So könnten aktivierte T-Zellen nicht in der Lage sein, aus den Lymphknoten auszuwandern oder würden bei ihrer Wanderung durch veränderte Chemokin-Signale evtl. fehlgeleitet werden[212,213]. IL-2 produzierende $CD8^+$ T-Zellen und regulatorische T-Zellen sind wichtige Mediatoren für die Prävention oder frühe Terminierung der Kontaktallergie[214,215]. Die Aktivierung des AhR trägt direkt zur IL-2 Produktion und indirekt, z.B. über Ido, zur T_{reg} Differenzierung bei[61,216]. Darüber hinaus induziert eine Sensibilisierung mit Allergenen die Entwicklung spezifischer IL-17 produzierender T-Zellen, wobei der AhR als Ko-Faktor für die IL-22 vermittelte Induktion dieser Th_{17}-Zellen beschrieben ist. Nakae und Kollegen beschrieben eine reduzierte CHS-Reaktion in IL-17-defizienten Mäusen, und auch die Gabe von IL-17 spezifischen Antikörpern resultierte in einer reduzierten CHS-Reaktion mit einer ähnlichen Kinetik, wie in

Abschnitt B für AhR-KO Mäuse beschrieben[217,218]. Eine funktionelle Rolle des AhR auf Ebene der T-Zellen könnte somit in Zusammenhang mit der reduzierten CHS-Reaktion stehen.

Einen Einfluss der AhR-Defizienz in Keratinozyten auf die CHS-Reaktion, etwa durch die in der Literatur beschriebene Fähigkeit der Keratinozyten zur Antigenpräsentation[219-222], konnte ich ausschließen, da K5AhR-KO Tiere keine Reduktion der CHS-Reaktion im Vergleich zu WT Tieren zeigten (s. Anhang B). Eine weitere Einflussgröße auf die CHS-Reaktion stellen Mastzellen dar[223,224]. Mastzellen benötigen sowohl für ihre Immigration in die Dermis als auch für ihre lokale Proliferation in der Dermis das ckit-/SCF-System[225]. Die AhR-abhängige Expression von c-kit, wie wir sie für DETZ (I) und Mastzellen (III) zeigen konnten, machen Mastzellen zu einer Zellpopulation, die durch die AhR-Defizienz direkt betroffen wäre. Diese Theorie soll in Zukunft innerhalb eines Kooperationsprojekts mit der Arbeitsgruppe Dermatologie und Allergie von Prof. Maurer an der Charité Berlin näher untersucht werden.

Unsere Untersuchungen mit WT Tieren, die *in vivo* mit 10µg/kg TCDD exponiert wurden, zeigen eine Korrelation zwischen signifikant reduzierter CHS-Reaktion mit einer signifikant reduzierten Migration dermaler DZ (s. Anhang B, B2.4). Die Migration der LZ wurde durch TCDD nur tendenziell, aber nicht signifikant beeinflusst. Neben epidermalen Langerhans Zellen wurde besonders für dermale dendritische Zellen eine funktionelle Rolle im Zusammenhang mit der CHS-Reaktion nachgewiesen[116,226-228]. In diesem Kontext wäre es interessant zu untersuchen, ob dDZ über einen aktivierbaren AhR verfügen, und ob die AhR-vermittelte Geninduktion auch in diesem Zelltyp durch hohe Mengen AhRR supprimiert ist, was unsere TCDD Daten nicht vermuten lasssen.

Bedingt durch die von mir verwendeten AhR-KO Tiere kann bis jetzt keine genaue Unterscheidung zwischen den AhR-Effekten auf LZ oder dDZ gemacht werden. Die Auswirkungen einer AhR-Defizienz auf dDZ in AhR-KO Tieren und somit auf den Ausgang der CHS-Reaktion kann deshalb nicht ausgeschlossen werden. Um diesen Einfluss näher zu untersuchen, sind weitere Experimente, z.B. *in vitro* Migrations- oder T-Zell Stimulations-Experimente mit isolierten AhR-Defizienten dDZ und LZ, nötig. Zusätzlich könnten weitere CHS-Experimente mit LZ spezifischen AhR-KO Tieren (LZAhR-KO), die vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe generiert wurden, oder mit dDZ spezifischen AhR-KO Tieren, Aufschluss über die *in vivo* Situation geben.

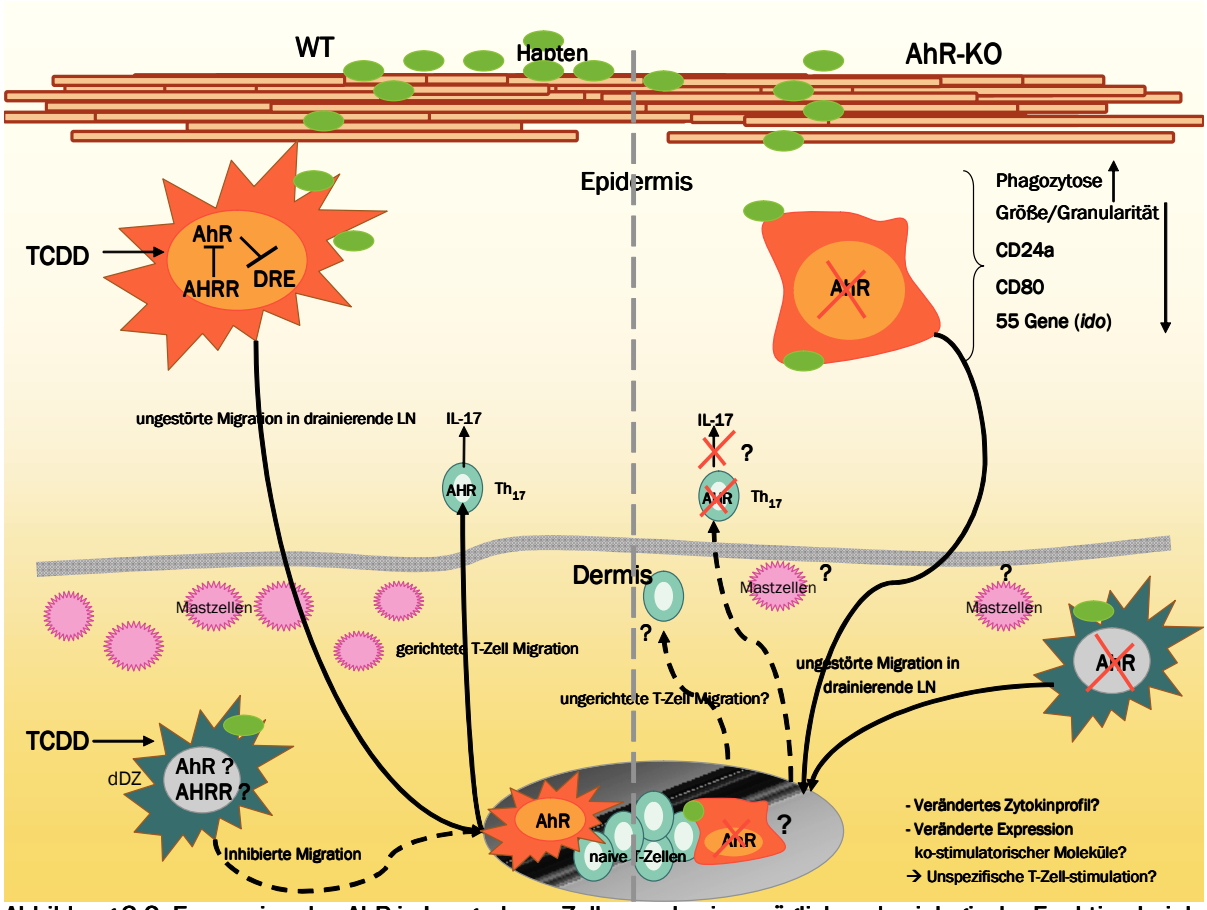


Abbildung 3.2: Expression des AhR in Langerhans Zellen und seine mögliche physiologische Funktion bei der Vermittlung der Hapten induzierten CHS-Reaktion. Der AhR wird in LZ exprimiert. Dabei wird die Induktion der typischen AhR-„Genbatterie" möglicherweise durch die hohen Mengen des AHR-Repressors inhibiert, was auf eine tolerogene Strategie dieser Zellen in Bezug auf niedermolekulare chemische Substanzen hindeuten könnte. Die erfolgreiche Induktion der Effektorphase der CHS-Reaktion wird durch TCDD möglicherweise durch die inhibierte Migration der dDZ verursacht. AhR-defiziente LZ zeigen durch die verringerte Aufregulation der ko-stimulatorischen Moleküle CD24a und CD80, durch eine erhöhte Phagozytosekapazität, durch verringerte Größe und Granularität und durch die nicht induzierbare *Ido1*-Expression einen unreiferen Phänotyp. Die abgeschwächte CHS-Reaktion in AhR-KO Tieren könnte dabei durch den unreifen LZ-Phänotyp und nicht ausreichende T-Zell Stimulation verursacht werden. In diesem Zusammenhang könnte aber auch eine fehlgeleitete Migration der Effektor T-Zellen oder die Unfähigkeit dieser Zellen, in Th17 Zellen zu differenzieren, eine Rolle spielen.

3.1.9. Der AhR reguliert die UV-induzierte Melanozytenproliferation

UVB Strahlung (280 bis 315 nm) stellt durch die direkte Induktion von DNS-Schäden ein großes Risiko für die Entstehung von Hautkrebs dar[229]. Schutz gegen diese Effekte vermitteln epidermale Melanozyten, die durch die Exposition mit der im Sonnenlicht enthaltenen UVB Strahlung zur Melaninproduktion (Melanogenese) und Proliferation angeregt werden. Dioxin-, Furan- und PCB exponierte Menschen (Unfälle in Japan 1968 und Umweltskandale in Taiwan 1979) hatten häufig eine Hyperpigmentierung der Haut[124-127]. 2006 wurde der AhR und sein Dimerisierungspartner ARNT in humanen Melanozyten und Melanomzelllinien nachgewiesen und eine Rolle bei der Melanombildung durch TCDD

gezeigt[230]. Verschiedene Studien belegen außerdem die Bildung natürlicher AhR-Liganden in der Haut. So bildet die Hefe *Malassezia furfur* (*M. furfur*) das Tryptophan-Abbau-Produkt 2-(1H-indol-3-ylmethyl)-1H-indole-3-carbaldehyd (Malassezin). Dieses wird mit einem vermehrten Absterben der Melanozyten und einer damit verbundenen lokalen Depigmentierung in Verbindung gebracht[231,232]. Das aus Tryptophan mittels UV-Strahlen entstehende FICZ (s. Abschnitt 1.1.4) induziert in Keratinozyten die Aktivierung des AhR-Signalwegs[45]. Aufgrund dieser Datenlage erschien es uns plausibel, dass eine Aktivierung des AhR-Signalwegs in Melanozyten bei der physiologischen Hautbräunung durch UVB eine Rolle spielen könnte.

Wir untersuchten zunächst die Expression und Funktionalität des AhR in primären murinen Melanozyten. In Übereinstimmung mit humanen Studien[230,233] konnten wir sowohl AhR-mRNS als auch AhR-Protein nachweisen. Anders als in den bisher vorgestellten Arbeiten (I und II) konnte in WT Melanozyten das AhR-Zielgen *Cyp1a1* sowohl durch 10nM TCDD und 1nM FICZ als auch durch 1mM UVB-bestrahltes Tryptophan induziert werden, was in Übereinstimmung mit humanen Melanozytenstudien[233] ist und auf einen funktionellen, klassischen AhR-Signalweg schließen lässt.

Die konstitutive Pigmentierung der Mäuse ist nicht AhR-abhängig, da AhR-KO Tiere eine schwarze Haut und schwarzes Fell haben. Die aktive Beteiligung des AhR bei der UVB-induzierten Bräunung konnten wir mittels zwei verschiedener Bräunungsprotokolle nachweisen[234,235]. In beiden Ansätzen führte die UVB Bestrahlung zu einem Anstieg des Melaningehalts in WT Tieren; die Haut der Tiere wurde also „gebräunt“. Im Gegensatz dazu erschien die Haut AhR-defizienter Tiere visuell heller. In epidermalen Zellen dieser Tiere konnten wir im Vergleich zum WT signifikant weniger Melanin nachweisen. Es stellte sich die Frage, auf welche Weise eine AhR-Aktivierung die Bräunung der Haut induzieren oder unterstützen könnte. Da der AhR in allen Zellen der Epidermis ausgeprägt ist, war es wichtig, die jeweils möglichen zell-intrinsischen Effekte von AhR-abhängigen extrinsischen Effekten durch die umgebenden Zellen, z.B. in Keratinozyten[236], zu differenzieren. Mäuse, denen der AhR nur in Keratinozyten fehlte, bräunten normal. Die Ergebnisse wiesen somit auf einen intrinsischen Einfluss des AhR in Melanozyten auf die Melaninproduktion/Bräunung hin. Wir untersuchten deshalb die Auswirkung einer AhR-Aktivierung auf die vier entscheidenden Enzyme der Melaninproduktion *(mitf*, *tyr*, *tyrp-1* und-*2)*. Die AhR-Aktivierung resultierte nicht in einer verstärkten Expression dieser Gene oder einer Zunahme der Tyrosinaseaktivität. Ergänzend zeigte die Analyse der Promotorsequenzen dieser Gene nur für *tyrp1* zwei potentielle DREs[19], die in Versuchen mit einem Luziferase-Reporter-Plasmid aber keine AhR-vermittelte Luziferaseaktivität

aufwiesen. Wir schlussfolgerten daraus, dass eine Liganden-vermittelte AhR-Aktivierung in murinen Melanozyten anderes als in humanen Melanozyten[233] nicht zu der *de novo* Transkription von Schlüsselenzymen der Melaninsynthese führt und ein anderer Mechanismus ausschlaggebend für den beobachteten Phänotyp sein müsste.

Eine Exposition mit UV-Strahlung resultiert neben einer gesteigerten Melaninsynthese in einer Proliferation der Melanozyten im WT[237,238]. In AhR-KO Tieren konnten wir nach Bestrahlung mit 180mJ/cm^2 UVB signifikant weniger Melanozyten im Vergleich zu WT und K5AhR-KO Tieren nachweisen, so dass wir einen Einfluss des AhR auf die Proliferation der Zellen vermuteten. Eine vergleichende Analyse des globalen Expressionsprofils kultivierter primärer Melanozyten (KPM) von WT und AhR-KO zeigte uns 336 unterschiedlich exprimierte Gene, von denen 79 für ihre Funktionen in Zelldifferenzierung, Apoptose, Proliferation und Pigmentierung beschrieben sind. So wurde in AhR-KO KPMs c-kit und sein Ligand Stem-Cell-Factor (SCF) signifikant niedriger exprimiert. Das SCF/c-kit-Signalsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung, Proliferation und Melanogenese der Melanozyten[239]. Frühere Studien von Hachiya et al. und von Kawaguchi et al. zeigen bereits eine Abhängigkeit der Bräunung vom c-kit/SCF-Signalweg. Sie beobachteten nach Injektion mit c-kit-blockierenden Antikörpern einen Einfluss auf die Differenzierung reifer Melanozyten aus Melanozytenvorläufern, was zu einer Reduzierung der UVB-induzierten Pigmentierung führte[234,240]. Ein AhR-vermittelter Einfluss auf die Interaktion dieses Systems schien uns deshalb wahrscheinlich. Vergleichende Analysen der SCF mRNS von WT und AhR-KO KMPs bestätigten die signifikant reduzierte Expression sowohl der löslichen (sSCF) als auch der membrangebundenen Form (mSCF). Die Klonierung der Promotorsequenz von c-kit in einen Luziferase-Reporter-Plasmid gab uns zusätzlich Aufschluss über die AhR-abhängige Induktion des c-kit Promotors. Die AhR-abhängige Expression von c-kit konnten wir durch vergleichende *in vivo* Untersuchungen an WT und AhR-KO Melanozyten bestätigen. In diesem Zusammenhang zeigen unsere Untersuchungen somit erstmalig einen AhR-abhängigen Mechanismus, über den der c-kit/SCF-Signalweg bei der UV-induzierten Melanozyten Proliferation reguliert wird. Dabei kann dieser Einfluss sich möglicherweise schon auf Ebene der UV-induzierten Immigration und Differenzierung der Melanozytenvorläuferzellen bemerkbar machen.

Im Gegensatz zu Studien mit humanen Melanozyten konnten wir im murinen Modell keinen Einfluss des AhR auf die Regulation der an der Melaninsynthese beteiligten Gene beobachten. Bei der Interpretation der erhobenen Daten muss bedacht werden, dass eine Liganden-induzierte Aktivierung des AhR nicht die gegenteiligen Effekte induziert wie durch das vollständige Fehlen des AhR. Zusätzliche, speziesindividuelle Unterschiede der AhR-

Affinität für verschiedene Liganden (TCDD bindet an den murinen AhR mit einer 10-mal höheren Affinität als im Menschen), die unterschiedliche Ligandenspezifität des Rezeptors in den Spezies[241,242] und die experimentellen Bedingungen, unter denen die Daten von Luecke et al. erhoben wurden (*in vitro* statt *in vivo*; Verwendung von Zelllinien; Kultivierung unter artifiziellen Bedingungen), machen die beobachteten Unterschiede plausibel.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen im Vergleich zu den Arbeiten (I) und (II) deutlich die zelltypabhängigen Spezifitäten des AhR-Signalwegs. So reguliert er in MZ, ähnlich wie bei γδ T-Zellen, Proliferation und Differenzierung, induziert aber gleichzeitig andere, spezifische Funktionen, wie die Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme. Um ein genaueres Verständnis der AhR-regulierten Faktoren infolge der UVB-induzierten Pigmentierung in Melanozyten zu erhalten, wäre es sinnvoll, eine Melanozyten-spezifische AhR-defiziente Maus zu generieren.

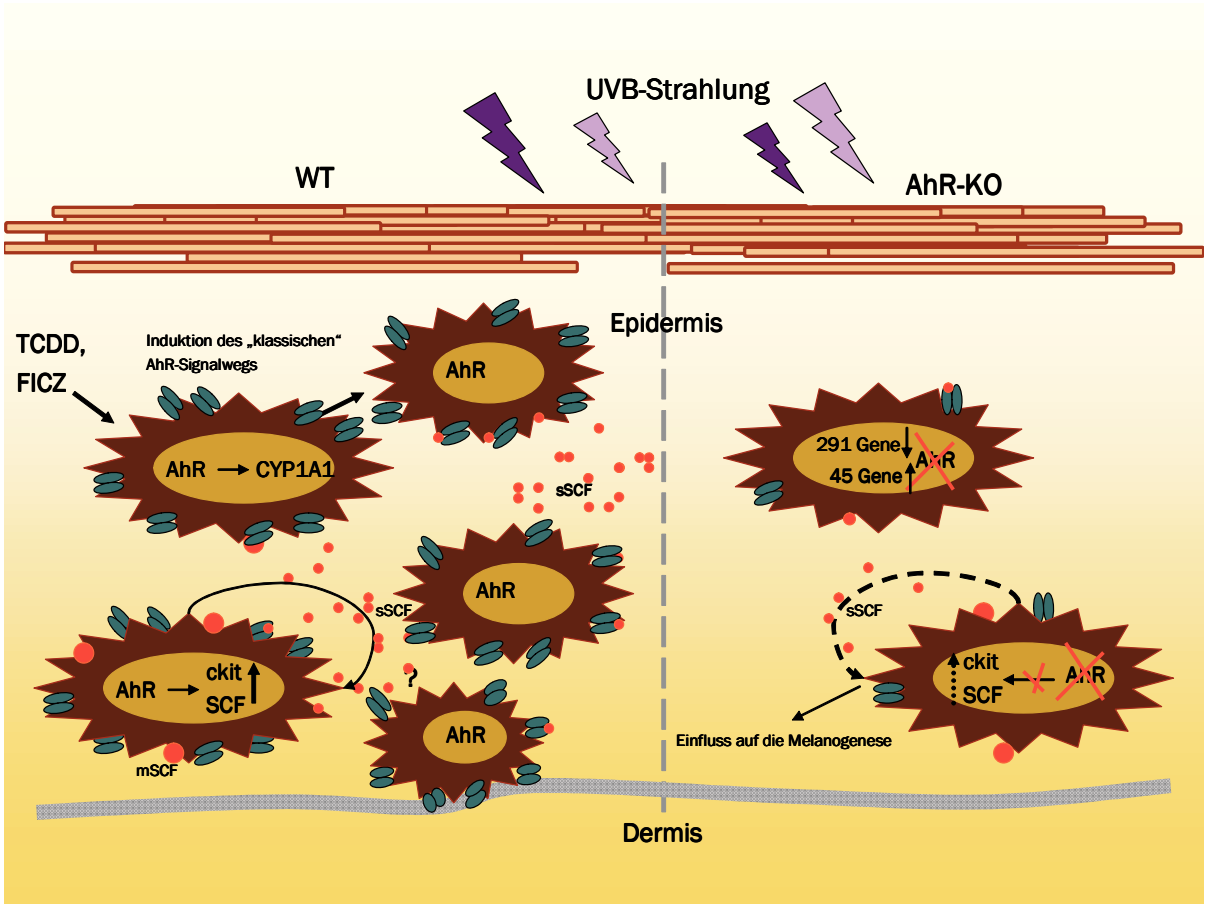


Abbildung 3.4: AhR Expression und physiologische Funktion in murinen Melanozyten. Der AhR wird in murinen Wildtyp-Melanozyten exprimiert und induziert durch die Aktivierung mit TCDD oder FICZ die typische AhR-„Genbatterie“. Dabei reguliert der AhR zusätzlich die Expression von SCF und dessen Rezeptor c-kit, die für die Proliferation der Melanozyten nach UV-Bestrahlung von Bedeutung sind. In AhR-KO Melanozyten ist die Expression von SCF und c-kit reduziert, was möglicherweise eine Erklärung für die geringere Proliferation nach UV-Bestrahlung sein könnte.

3.1.10 Ausblicke

Die in dieser Arbeit zusammen gestellten Ergebnisse sind in der Abb. 3.4. noch einmal übersichtlich dargestellt. Sie zeigen erstmalig die übergreifende Funktion, die der AhR durch die transkriptionelle Regulation auf zellulärer Ebene und in Folge dieser im Gesamtkonzept der Regulation immunologischer und physiologischer Prozesse der Haut einnimmt.

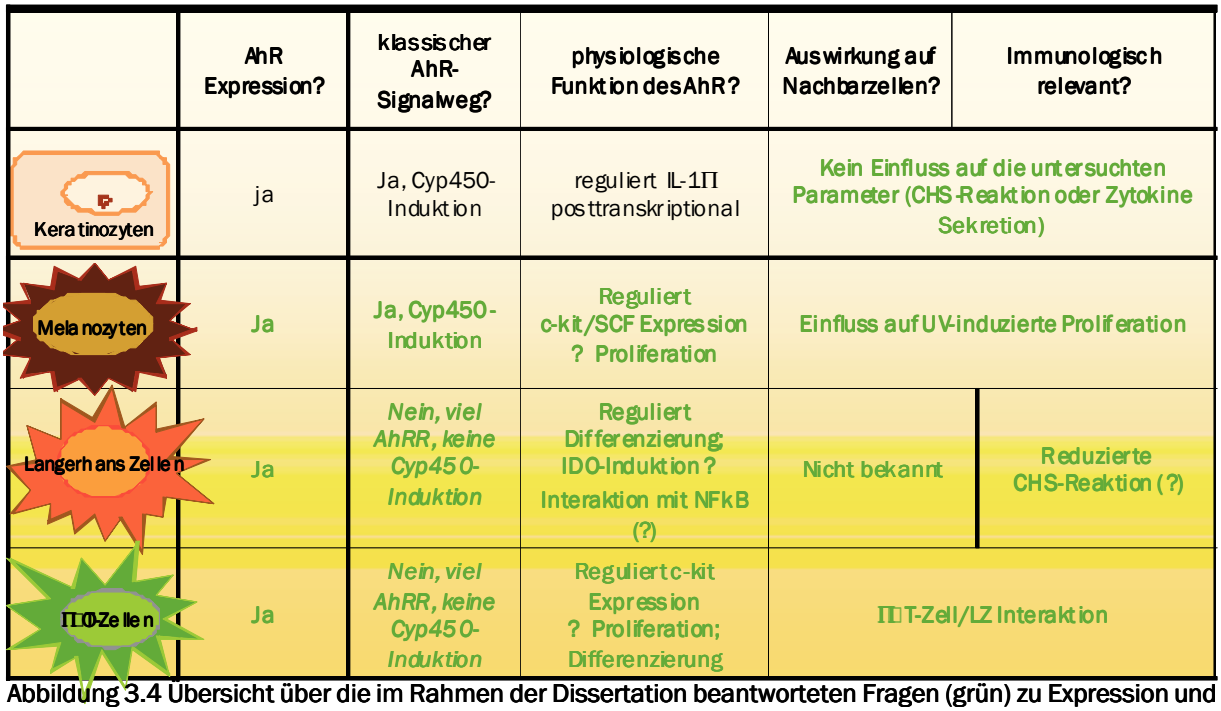


Abbildung 3.4 Übersicht über die im Rahmen der Dissertation beantworteten Fragen (grün) zu Expression und physiologischer Funktion des AhR für epidermale Zellen.

Ich konnte zeigen, dass die Zelltyp-abhängige Induktion klassischer AhR-regulierter Gene mit dem Expressionsniveau des AhRR korreliert. Dabei ist das Transkriptom der LZ und vermutlich auch der DETZ inert gegenüber dem synthetischen AhR-Liganden TCDD. Dieses Ergebnis lässt über eine mögliche Strategie der Zellen gegenüber einer umweltinduzierten AhR-Aktivierung spekulieren, wodurch ihre immunregulatorische Funktion gesichert werden würde. Was würde passieren, wenn man den AhRR in diesen Zellen deletiert? In ersten Experimenten mit AhRR-defizienten Mäusen konnte ich zeigen, dass die Anzahl und die Morphologie der LZ und DETZ sich nicht von WT Tieren unterschied. Weitere Untersuchungen bezüglich der immunologischen Kompetenz der Zellen (Ausgang der CHS-Reaktion, Einfluss durch TCDD auf die Migration der LZ, die c-kit Expression und Proliferation der Vγ3$^+$DETZ) werden zur Klärung dieser Frage notwendig sein.

In dieser Arbeit konnte ich weiterhin zeigen, dass der AhR eine bisher unbekannte, übergreifende, physiologische Rolle für die Differenzierung von LZ, Vγ3$^+$DETZ und Melanozyten einnimmt und zusätzlich die Proliferation der Vγ3$^+$ DETZ und die UV-induzierte Proliferation der Melanozyten über c-kit reguliert. Dieser Einfluss auf die immunologische Kompetenz der Zellen (hier LZ) oder auf den Schutz des Körpers vor UV-induzierten DNS-Schäden (MZ) zeigt neue Mechanismen auf, durch die Faktoren aus der Umwelt über den AhR auf das Immunsystem der Epidermis wirken können. Eine Aktivierung des AhR durch umweltinduzierte Stimuli kann z.B. die Induktion von *Ido* und *c-kit* vermitteln, die beide in Zusammenhang mit verschiedenen Krebsarten, einschließlich cutanen Melanomen und Mastozytomen[243,244], stehen. Die Identifizierung von spezifischen Liganden oder Antagonisten, die eine Modulation der AhR-regulierten Prozesse erlauben, ist somit für die Entwicklung neuer therapeutischer und präventivmedizinischer Ansätze von großem Interesse.

3.2. Die Rolle des AhR im Darm-assoziierten Immunsystem – Auswirkungen auf die orale Toleranz

Obwohl seit Jahrzehnten bekannt ist, dass Überaktivierung des AhR zu einer Suppression des peripheren Immunsystems führt, ist die funktionelle Bedeutung des AhR bei der Regulation immunologischer Prozesse, z.B. der Defekt in der Induktion einer Th_{17}-Antwort in AhR-defizienten Tieren[69], erst kürzlich vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt. Die Aufnahme von AhR-Liganden, wie sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, aber auch Dioxin, erfolgt zu 90% über die Nahrung. In der unter (IV) beschriebenen Publikation wurde deshalb erstmalig das Expressionsmuster des AhR und des AhRR im Dünndarm und den damit assoziierten Immunzellen und-organen und die Auswirkung einer AhR-Aktivierung auf die orale Toleranz (OT) untersucht.

Wir konnten eine konstitutive AhR-Expression im gesamten Dünndarm, in den mesenterialen Lymphknoten (mLK), den Peyer´s Patches (PP), den Epithelzellen und in intraepithelialen $CD8\alpha\alpha^+$ $TZR\gamma\delta^+$-Zellen feststellen. Überraschend geringe AhR-Expression zeigte sich in den CD103+ dendritischen Zellen (DZ) und den $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen der mesenterialen Lymphknoten. Dafür war die Expression des AhRR in den $CD103^+$ DZ besonders hoch, was, wie in vorherigen Kapiteln beschrieben, auf eine negative Rückkopplung mit folgender Suppression der AhR-Expression in diesen Zellen hindeutete. Die Induktion der *Cyp1a1* Expression nach TCDD Exposition korrelierte diesbezüglich mit der Expression des AhRR und konnte in $CD103^+$ DZ als einzigem Zelltyp nicht induziert werden, was auf eine mögliche Inhibierung des „klassischen" AhR-Signalwegs in diesen Zellen schließen ließ.

Welche Rolle hat nun das beobachtete AhR/AhRR Expressionmuster für die Regulation vom Immunantworten? Sekine und Kollegen konnten 2009 nachweisen, dass AhR-defiziente Mäuse hypersensitiv gegenüber LPS induzierter Sepsis sind. Sie erklärten dies durch die Überproduktion von proinflammatorischem IL-1β durch AhR-defiziente Makrophagen[68]. 2010 zeigten Benson und Shepherd, dass die Aktivierung des AhR mit TCDD durch die Induktion von regulatorischen Immunzellen (T_{reg}), zu einer reduzierten Entzündung des Colons in einem murinen Kolitis-Model führte, wodurch sich neue therapeutische Möglichkeiten bezüglich der Morbus Crohn Behandlung eröffnen könnten[245]. Außerdem ist zu bemerken, dass eine Liganden-abhängige Aktivierung des AhR in T-Zellen zu einer verstärkten Differenzierung von proinflammatorischen Th_{17}-Zellen über die AhR-abhängige IL-22 Expression führt. Andererseits fördert eine Aktivierung des AhR in

dendritischen Zellen über die Expression von IDO, TGFß und Retinsäure indirekt die Entwicklung immunregulatorischer Treg Zellen[246-248]. Beide Zelltypen können so entweder proinflammatorisch oder regulatorisch auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wirken. Zusätzlich wurde die modulierende Funktion des AhR bei der Regulation des Th_1/Th_2 Gleichgewichts beschrieben[208].
Der Darm und das damit assoziierte lymphatische Gewebe (GALT, von engl.: gut associated lymphoid tissue) hat neben der Infektionsabwehr die Aufgabe, zwischen harmlosen und potentiell gefährlichen Antigenen aus der Nahrung zu unterscheiden und daraufhin entweder eine Toleranz zu induzieren oder eine Immunreaktion auszulösen. Das GALT stellt somit ein hoch exponiertes System dar, was im Bezug auf den Einfluss einer AhR-Aktivierung noch wenig untersucht ist.

Unsere Untersuchungen bestätigen zunächst Literaturangaben, die die Unterdrückung der humoralen Immunantwort[151], in unserem Fall gegenüber OVA, mit TCDD zeigen. Ergänzend konnten wir erstmalig zeigen, dass diese Suppression nach einer erneuten Immunisierung gegenüber OVA nicht aufrechterhalten wird. Die berechnete Restmenge an TCDD lag zum Zeitpunkt der zweiten Immunisierung immer noch in einem immunsuppressiven Bereich[36,249], so dass eine zu geringe TCDD Belastung für diesen Effekt unwahrscheinlich scheint. Unsere Beobachtungen bieten in diesem Zusammenhang eine Erklärung für die beschriebenen, normalen Antikörper Titer, die für Dioxin-, Furan- oder Biphenyl-exponierte Menschen beschrieben wurden.
Vor kurzem zeigten Ishikawa et al. eine reduzierte IgA Sekretion in das Darm-Lumen in neugeborenen Mäusen, die über die Muttermilch mit TCDD exponiert wurden[250]. Diese Daten konnten wir nicht bestätigen, was aber durch experimentelle Unterschiede begründet sein könnte. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten Ishikawa et al. keine TCDD abhängigen Änderungen der Zellularität oder Zellpopulationen (CD4, CD8, B-Zellen oder DZ) der mLN und PP nachweisen.

In unseren Untersuchungen (IV) konnten wir erstmalig zeigen, dass die vorherige Injektion einer moderaten Dosis TCDD die Aufrechterhaltung einer etablierten oralen Toleranz (OT) gegenüber dem Antigen OVA nach erneuter Exposition zu dem Antigen aufhebt. Interessanterweise zeigten Kinoshita und Kollegen, dass eine 10-fach geringere Dosis TCDD als wir sie verwendet haben in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zu der Generierung OVA-spezifischer Antikörper in tolerisierten Mäusen führte. Die Autoren zeigten aber auch, dass das TCDD zu späteren Untersuchungszeitpunkten systemisch eliminiert

war. Daraus schlossen wir, dass TCDD auf Zellen wirkt, die die Toleranz induzieren und das Gedächtnis gegenüber einem bestimmten Antigen vermitteln. Ist dieser initiale Einfluss einmal gegeben, wird TCDD nicht länger benötigt. Ob TCDD auch die Durchbrechung einer bereits etablierten OT bewirken kann, ist bis jetzt nicht bekannt und soll in weiterfürenden Untersuchungen geklärt werden.

Wie beeinflusst TCDD die Aufrechterhaltung der oralen Toleranz? Orale Toleranz gegenüber einem spezifischen Antigen entsteht, indem dieses Antigen aus dem Darmlumen aufgenommen und mittels sogenannter „tolerogener" CD130$^+$ DZ in die mesenterialen Lymphknoten transportiert wird[246]. CD103$^+$ DZ haben die Fähigkeit, das Gleichgewicht zwischen Th_{17} und T_{reg} zu verschieben. Einen zytotoxischen Effekt auf die CD103$^+$ DZ, T-Zellen und B-Zellen des GALT konnten wir ausschließen. Die Exposition mit TCDD führte im mLN im Gegenteil zu einer erhöhten Anzahl CD103$^+$ DZ, die mit einer vermehrten IL-6 Produktion assoziiert waren. Da der „klassische" AhR/ARNT Signalweg durch das hohe AhRR Vorkommen in den CD103$^+$DZ vermutlich wie in LZ inhibiert ist, könnte die Aktivierung des „alternativen" AhR/NFκB Signalwegs präferiert sein und zu einer vermehrten IL-6 Expression führen[27,251]. IL-6 zusammen mit TGFβ fördert die Differenzierung von Th_{17} Zellen, während es gleichzeitig die Entwicklung der T_{reg} inhibiert[252]. In Einvernehmen mit der erhöhten IL-6 Produktion konnten wir eine erhöhte Frequenz IL-17 positiver CD4$^+$ T-Zellen im mLN, also eine Verschiebung des T_{reg}/Th_{17} Gleichgewichts, beobachten. Die Aktivierung des AhR ist entscheidend für die Differenzierung von Th_{17} und T_{reg} Zellen[28,69,253]. In Zusammenhang mit unseren Ergebnissen scheint es deshalb möglich, dass CD103$^+$ DZ in Anwesenheit von TCDD in den mLN einen weniger tolerogenen Phänotyp annehmen und die Induktion IL-17 produzierender T-Zellen initiieren. Um diese Theorie zu überprüfen, sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die Antigenspezifität der Th_{17}/T_{reg} Zellen zu untersuchen.

Die Ausprägung tolerogener oder inflammatorischer CD103$^+$ DZ wird durch die Epithel-Zellen (EZ) des Darms, z.B. durch die Sekretion von GM-CSF, TGFβ oder IDO, beeinflusst[157]. Die Induktion des TLR-Signalwegs in Epithelzellen erhöht die Frequenz und Geschwindigkeit, mit der die CD103$^+$ DZ in die mLN migrieren[254]. Laut unserer Ergebnisse verfügen EZ über eine sehr große Menge an AhR, exprimieren den AHRR nur gering und zeigen durch die Induktion metabolisiernder Enzyme eine Beteiligung am Fremdstoffmetabolismus. Ob der AhR und dessen Aktivierung mittels TCDD einen Einfluss

auf Epithel-Zellen haben, was z.B. zu einer veränderten Expression von DZ-modulierenden Faktoren führt, bleibt noch zu klären.

Abschließend kann gesagt werden, dass eine vorherige TCDD Exposition die Aufrechterhaltung der oralen Toleranz im Darm, vermutlich durch eine Verschiebung des Th_{17}/T_{reg} Gelcihgewichts, verhindert. Viele als AhR-Liganden bekannte sekundäre Pflanzenstoffe sind in der Nahrung enthalten. Dazu kommen noch bakterielle Abbauprodukte des Tryptophans und Billirubin[40,44]. Neben ihrer bekannten positiven, antioxidativen Wirkung könnten sie als Aktivatoren des AhR auch negativen Einfluss haben, z.B. bei der Entstehung von Nahrungsmittelunverträglichkeiten. Die Klärung dieser Frage ist besonders im Hinblick auf kommerziell erhältliche, hoch konzentrierte Nahrungsergänzungsmittel (z.B. Quercetin-Plus der Firma Nature´s Plus mit 250mg Quercetin/Dosis) ein wichtiger Gesundheitsaspekt, da mit diesen Produkten ernährungstypische Konzentrationen leicht um das 100-fache überschritten werden. In zukünftigen Studien soll daher der Effekt solcher Liganden auf die orale Toleranz in unserer Arbeitsgruppe weiter untersucht werden.

4 Referenzen

1. Puhvel, S.M., Sakamoto, M. & Reisner, R.M. Effect of TCDD on the density of Langerhans cells in murine skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **99**, 72-80 (1989).
2. Poland, A., Glover, E. & Kende, A.S. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem* **251**, 4936-4946 (1976).
3. Ema, M. u. a. cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **184**, 246-253 (1992).
4. Burbach, K.M., Poland, A. & Bradfield, C.A. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**, 8185-8189 (1992).
5. Murre, C. u. a. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1218**, 129-135 (1994).
6. Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B. & Bradfield, C.A. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **40**, 519-561 (2000).
7. Citri, Y. u. a. A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a Drosophila clock gene. *Nature* **326**, 42-47 (1987).
8. Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A. & Crews, S.T. The Drosophila single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* **67**, 1157-1167 (1991).
9. Denis, M., Cuthill, S., Wikström, A.C., Poellinger, L. & Gustafsson, J.A. Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **155**, 801-807 (1988).
10. Kazlauskas, A., Poellinger, L. & Pongratz, I. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem* **274**, 13519-13524 (1999).
11. Perdew, G.H. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem* **263**, 13802-13805 (1988).
12. Bell, D.R. & Poland, A. Binding of aryl hydrocarbon receptor (AhR) to AhR-interacting protein. The role of hsp90. *J. Biol. Chem* **275**, 36407-36414 (2000).
13. Hoffman, E.C. u. a. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* **252**, 954-958 (1991).
14. Reyes, H., Reisz-Porszasz, S. & Hankinson, O. Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* **256**, 1193-1195 (1992).
15. Carlson, D.B. & Perdew, G.H. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem. Mol. Toxicol* **16**, 317-325 (2002).
16. Vrzal, R., Ulrichová, J. & Dvorák, Z. Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **148**, 3-10 (2004).
17. Whitlock, J.P. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **39**, 103-125 (1999).
18. Ma, Q. Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr. Drug Metab* **2**, 149-164 (2001).
19. Sun, Y.V., Boverhof, D.R., Burgoon, L.D., Fielden, M.R. & Zacharewski, T.R. Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res* **32**, 4512-4523 (2004).

20. Frericks, M., Temchura, V.V., Majora, M., Stutte, S. & Esser, C. Transcriptional signatures of immune cells in aryl hydrocarbon receptor (AHR)-proficient and AHR-deficient mice. *Biol. Chem* **387**, 1219-1226 (2006).
21. Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K. & Fujii-Kuriyama, Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* **13**, 20-25 (1999).
22. Evans, B.R. u. a. Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator. *Mol. Pharmacol* **73**, 387-398 (2008).
23. Davarinos, N.A. & Pollenz, R.S. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytosplasmic proteasome following nuclear export. *J. Biol. Chem* **274**, 28708-28715 (1999).
24. Ma, Q. & Baldwin, K.T. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activaton and DNA binding of AhR. *J. Biol. Chem* **275**, 8432-8438 (2000).
25. Mitchell, K.A. & Elferink, C.J. Timing is everything: consequences of transient and sustained AhR activity. *Biochem. Pharmacol* **77**, 947-956 (2009).
26. Kimura, A. u. a. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J. Exp. Med* **206**, 2027-2035 (2009).
27. Vogel, C.F.A. & Matsumura, F. A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family. *Biochem. Pharmacol* **77**, 734-745 (2009).
28. Marshall, N.B. & Kerkvliet, N.I. Dioxin and immune regulation: emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the generation of regulatory T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **1183**, 25-37 (2010).
29. Ruby, C.E., Leid, M. & Kerkvliet, N.I. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin suppresses tumor necrosis factor-alpha and anti-CD40-induced activation of NF-kappaB/Rel in dendritic cells: p50 homodimer activation is not affected. *Mol. Pharmacol* **62**, 722-728 (2002).
30. Vogel, C.F.A., Sciullo, E. & Matsumura, F. Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **363**, 722-726 (2007).
31. Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. & Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 9721-9726 (2008).
32. Wormke, M., Stoner, M., Saville, B. & Safe, S. Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes. *FEBS Lett* **478**, 109-112 (2000).
33. Rüegg, J. u. a. The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin. *Mol. Endocrinol* **22**, 304-316 (2008).
34. Watabe, Y., Nazuka, N., Tezuka, M. & Shimba, S. Aryl hydrocarbon receptor functions as a potent coactivator of E2F1-dependent trascription activity. *Biol. Pharm. Bull* **33**, 389-397 (2010).
35. Poland, A. & Knutson, J.C. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **22**, 517-554 (1982).
36. Davis, D. & Safe, S. Immunosuppressive activities of polychlorinated dibenzofuran congeners: quantitative structure-activity relationships and interactive effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **94**, 141-149 (1988).

37. Whitlock, J.P., Jr Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **30**, 251-277 (1990).
38. Stejskalova, L., Dvorak, Z. & Pavek, P. Endogenous and Exogenous Ligands of Aryl Hydrocarbon Receptor: Current State of Art. *Curr Drug Metab* (2011).auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395538>
39. Denison, M.S. & Nagy, S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **43**, 309-334 (2003).
40. Ciolino, H.P., Daschner, P.J. & Yeh, G.C. Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J* **340 (Pt 3)**, 715-722 (1999).
41. Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Wang, T.T. & Yeh, G.C. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol* **56**, 197-206 (1998).
42. Ciolino, H.P., Daschner, P.J. & Yeh, G.C. Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res* **58**, 5707-5712 (1998).
43. Rannug, A. u. a. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J. Biol. Chem* **262**, 15422-15427 (1987).
44. Heath-Pagliuso, S. u. a. Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* **37**, 11508-11515 (1998).
45. Rannug, A. & Fritsche, E. The aryl hydrocarbon receptor and light. *Biol. Chem* **387**, 1149-1157 (2006).
46. Nguyen, L.P. & Bradfield, C.A. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem. Res. Toxicol* **21**, 102-116 (2008).
47. DiNatale, B.C. u. a. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol. Sci* **115**, 89-97 (2010).
48. Mezrich, J.D. u. a. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J. Immunol* **185**, 3190-3198 (2010).
49. von Bubnoff, D. u. a. Human epidermal langerhans cells express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Invest. Dermatol* **123**, 298-304 (2004).
50. Vogel, C.F.A., Goth, S.R., Dong, B., Pessah, I.N. & Matsumura, F. Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **375**, 331-335 (2008).
51. Mai, J., Wang, H. & Yang, X.-F. Th 17 cells interplay with Foxp3+ Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity. *Front. Biosci* **15**, 986-1006 (2010).
52. Vos, J.G., Moore, J.A. & Zinkl, J.G. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the immune system of laboratory animals. *Environ. Health Perspect* **5**, 149-162 (1973).
53. Laiosa, M.D. u. a. Cell proliferation arrest within intrathymic lymphocyte progenitor cells causes thymic atrophy mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *J. Immunol* **171**, 4582-4591 (2003).
54. Temchura, V.V., Frericks, M., Nacken, W. & Esser, C. Role of the aryl hydrocarbon receptor in thymocyte emigration in vivo. *Eur. J. Immunol* **35**, 2738-2747 (2005).
55. McMillan, B.J., McMillan, S.N., Glover, E. & Bradfield, C.A. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces premature activation of the KLF2 regulon during thymocyte development. *J. Biol. Chem* **282**, 12590-12597 (2007).
56. Allan, L.L. & Sherr, D.H. Constitutive activation and environmental chemical induction of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor in activated human B lymphocytes. *Mol. Pharmacol* **67**, 1740-1750 (2005).

57. Laiosa, M.D. u. a. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes alterations in lymphocyte development and thymic atrophy in hemopoietic chimeras generated from mice deficient in ARNT2. *Toxicol. Sci* **69**, 117-124 (2002).
58. Murante, F.G. & Gasiewicz, T.A. Hemopoietic progenitor cells are sensitive targets of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J mice. *Toxicol. Sci* **54**, 374-383 (2000).
59. Jin, G.-B., Moore, A.J., Head, J.L., Neumiller, J.J. & Lawrence, B.P. Aryl hydrocarbon receptor activation reduces dendritic cell function during influenza virus infection. *Toxicol. Sci* **116**, 514-522 (2010).
60. Vorderstrasse, B.A., Dearstyne, E.A. & Kerkvliet, N.I. Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the antigen-presenting activity of dendritic cells. *Toxicol. Sci* **72**, 103-112 (2003).
61. Jeon, M.S. & Esser, C. The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS transcription factor family. *J. Immunol* **165**, 6975-6983 (2000).
62. Lai, Z.W., Hundeiker, C., Gleichmann, E. & Esser, C. Cytokine gene expression during ontogeny in murine thymus on activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol. Pharmacol* **52**, 30-37 (1997).
63. Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C. & Bradfield, C.A. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 6731-6736 (1996).
64. Fernandez-Salguero, P. u. a. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* **268**, 722-726 (1995).
65. Wright, M. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Hum Exp Toxicol* **15**, 176-179 (1996).
66. Rodríguez-Sosa, M. u. a. Over-production of IFN-gamma and IL-12 in AhR-null mice. *FEBS Lett* **579**, 6403-6410 (2005).
67. Shi, L.Z. u. a. The aryl hydrocarbon receptor is required for optimal resistance to Listeria monocytogenes infection in mice. *J. Immunol* **179**, 6952-6962 (2007).
68. Sekine, H. u. a. Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol. Cell. Biol* **29**, 6391-6400 (2009).
69. Veldhoen, M. u. a. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453**, 106-109 (2008).
70. Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A. & Stockinger, B. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J. Exp. Med* **206**, 43-49 (2009).
71. Sumaria, N. u. a. Cutaneous immunosurveillance by self-renewing dermal {gamma}{delta} T cells. *J Exp Med* (2011).doi:10.1084/jem.20101824
72. Jameson, J.M., Cauvi, G., Witherden, D.A. & Havran, W.L. A keratinocyte-responsive gamma delta TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *J. Immunol* **172**, 3573-3579 (2004).
73. Lee, H.-C., Tomiyama, K., Ye, S.-K., Kawai, K. & Ikuta, K. Seeding of dendritic epidermal T cells in the neonatal skin is reduced in 129 strain of mice. *Immunol. Lett* **81**, 211-216 (2002).
74. Girardi, M., Lewis, J.M., Filler, R.B., Hayday, A.C. & Tigelaar, R.E. Environmentally responsive and reversible regulation of epidermal barrier function by gammadelta T cells. *J. Invest. Dermatol* **126**, 808-814 (2006).
75. Asarnow, D.M. u. a. Limited diversity of gamma delta antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Cell* **55**, 837-847 (1988).
76. Tigelaar, R.E., Lewis, J.M. & Bergstresser, P.R. TCR gamma/delta+ dendritic epidermal T cells as constituents of skin-associated lymphoid tissue. *J. Invest. Dermatol* **94**, 58S-63S (1990).

77. Elbe, A. u. a. Fetal skin: a site of dendritic epidermal T cell development. *J. Immunol* **149**, 1694-1701 (1992).
78. Payer, E., Elbe, A. & Stingl, G. Epidermal T lymphocytes--ontogeny, features and function. *Springer Semin. Immunopathol* **13**, 315-331 (1992).
79. Guzmán, E.A. u. a. S179D prolactin diminishes the effects of UV light on epidermal gamma delta T cells. *Mol. Cell. Endocrinol* **280**, 6-12 (2008).
80. Matsue, H., Bergstresser, P.R. & Takashima, A. Keratinocyte-derived IL-7 serves as a growth factor for dendritic epidermal T cells in mice. *J. Immunol* **151**, 6012-6019 (1993).
81. Leclercq, G., De Smedt, M., Tison, B. & Plum, J. Preferential proliferation of T cell receptor V gamma 3-positive cells in IL-2-stimulated fetal thymocytes. *J. Immunol* **145**, 3992-3997 (1990).
82. Leclercq, G., De Smedt, M. & Plum, J. Cytokine dependence of V gamma 3 thymocytes: mature but not immature V gamma 3 cells require endogenous IL-2 and IL-7 to survive--evidence for cytokine redundancy. *Int. Immunol* **7**, 843-851 (1995).
83. Nishimura, H. u. a. IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by Salmonella infection. *J. Immunol* **156**, 663-669 (1996).
84. Kawai, K. u. a. Requirement of the IL-2 receptor beta chain for the development of Vgamma3 dendritic epidermal T cells. *J. Invest. Dermatol* **110**, 961-965 (1998).
85. Ye, S.K. u. a. Differential roles of cytokine receptors in the development of epidermal gamma delta T cells. *J. Immunol* **167**, 1929-1934 (2001).
86. Maki, K. u. a. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 7172-7177 (1996).
87. Maki, K., Sunaga, S. & Ikuta, K. The V-J recombination of T cell receptor-gamma genes is blocked in interleukin-7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med* **184**, 2423-2427 (1996).
88. Jameson, J.M., Cauvi, G., Sharp, L.L., Witherden, D.A. & Havran, W.L. Gammadelta T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J. Exp. Med* **201**, 1269-1279 (2005).
89. Sharp, L.L., Jameson, J.M., Witherden, D.A., Komori, H.K. & Havran, W.L. Dendritic epidermal T-cell activation. *Crit. Rev. Immunol* **25**, 1-18 (2005).
90. Boismenu, R., Feng, L., Xia, Y.Y., Chang, J.C. & Havran, W.L. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J. Immunol* **157**, 985-992 (1996).
91. Boismenu, R., Hobbs, M.V., Boullier, S. & Havran, W.L. Molecular and cellular biology of dendritic epidermal T cells. *Semin. Immunol* **8**, 323-331 (1996).
92. Jameson, J.M., Sharp, L.L., Witherden, D.A. & Havran, W.L. Regulation of skin cell homeostasis by gamma delta T cells. *Front. Biosci* **9**, 2640-2651 (2004).
93. Daniel, T. u. a. Regulation of the postburn wound inflammatory response by gammadelta T-cells. *Shock* **28**, 278-283 (2007).
94. Girardi, M. u. a. Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *J. Exp. Med* **195**, 855-867 (2002).
95. Whang, M.I., Guerra, N. & Raulet, D.H. Costimulation of dendritic epidermal gammadelta T cells by a new NKG2D ligand expressed specifically in the skin. *J. Immunol* **182**, 4557-4564 (2009).
96. Girardi, M. u. a. The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J. Exp. Med* **198**, 747-755 (2003).
97. Girardi, M. u. a. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* **294**, 605-609 (2001).

98. Gao, Y. u. a. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J. Exp. Med* **198**, 433-442 (2003).
99. Toulon, A. u. a. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J. Exp. Med* **206**, 743-750 (2009).
100. Havran, W.L. & Jameson, J.M. Epidermal T cells and wound healing. *J. Immunol* **184**, 5423-5428 (2010).
101. Ebert, L.M., Meuter, S. & Moser, B. Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J. Immunol* **176**, 4331-4336 (2006).
102. Dupuy, P. u. a. T-cell receptor-gamma/delta bearing lymphocytes in normal and inflammatory human skin. *J. Invest. Dermatol* **94**, 764-768 (1990).
103. Bos, J.D. u. a. The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J. Invest. Dermatol* **88**, 569-573 (1987).
104. Martin, B., Hirota, K., Cua, D.J., Stockinger, B. & Veldhoen, M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* **31**, 321-330 (2009).
105. Majora, M., Frericks, M., Temchura, V., Reichmann, G. & Esser, C. Detection of a novel population of fetal thymocytes characterized by preferential emigration and a TCRgammadelta+ T cell fate after dioxin exposure. *Int. Immunopharmacol* **5**, 1659-1674 (2005).
106. Valladeau, J. u. a. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* **12**, 71-81 (2000).
107. Stoitzner, P. u. a. Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207. *J. Invest. Dermatol* **120**, 266-274 (2003).
108. Yokota, K. u. a. Cytokine-mediated communication between dendritic epidermal T cells and Langerhans cells. In vitro studies using cell lines. *J. Immunol* **157**, 1529-1537 (1996).
109. Matsue, H., Bergstresser, P.R. & Takashima, A. Reciprocal cytokine-mediated cellular interactions in mouse epidermis: promotion of gamma delta T-cell growth by IL-7 and TNF alpha and inhibition of keratinocyte growth by gamma IFN. *J. Invest. Dermatol* **101**, 543-548 (1993).
110. Steinman, R.M. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* **111**, 675-697 (2003).
111. Romani, N., Holzmann, S., Tripp, C.H., Koch, F. & Stoitzner, P. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* **111**, 725-740 (2003).
112. Romani, N. u. a. Epidermal Langerhans cells--changing views on their function in vivo. *Immunol. Lett* **106**, 119-125 (2006).
113. Stoitzner, P. u. a. Langerhans cells cross-present antigen derived from skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**, 7783-7788 (2006).
114. Hemmi, H. u. a. Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int. Immunol* **13**, 695-704 (2001).
115. Schuler, G. & Steinman, R.M. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med* **161**, 526-546 (1985).
116. Kaplan, D.H., Jenison, M.C., Saeland, S., Shlomchik, W.D. & Shlomchik, M.J. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* **23**, 611-620 (2005).
117. Bennett, C.L. u. a. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J. Cell Biol* **169**, 569-576 (2005).

118. Kissenpfennig, A. u. a. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* **22**, 643-654 (2005).
119. Stoitzner, P. The Langerhans cell controversy: are they immunostimulatory or immunoregulatory cells of the skin immune system? *Immunol. Cell Biol* **88**, 348-350 (2010).
120. Anderson, C. u. a. Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons. *J. Immunol* **155**, 3530-3537 (1995).
121. Park, H.Y., Kosmadaki, M., Yaar, M. & Gilchrest, B.A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life Sci* **66**, 1493-1506 (2009).
122. Boissy, R.E. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Exp. Dermatol* **12 Suppl 2**, 5-12 (2003).
123. Lincoln, E.A. Sun-induced skin changes. *Prim. Care* **27**, 435-445 (2000).
124. Kikuchi, M. Autopsy of patients with yusho. *Prog. Clin. Biol. Res* **137**, 19-30 (1984).
125. Masuda, Y. Health status of Japanese and Taiwanese after exposure to contaminated rice oil. *Environ. Health Perspect* **60**, 321-325 (1985).
126. Hashiguchi, I. u. a. [Epidemiologic examination on the prevalence of the periodontal diseases and oral pigmentation in Yusho patients in 2006]. *Fukuoka Igaku Zasshi* **98**, 170-175 (2007).
127. Kanagawa, Y. u. a. Association of clinical findings in Yusho patients with serum concentrations of polychlorinated biphenyls, polychlorinated quarterphenyls and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran more than 30 years after the poisoning event. *Environ Health* **7**, 47 (2008).
128. Dunagin, W.G. Cutaneous signs of systemic toxicity due to dioxins and related chemicals. *J. Am. Acad. Dermatol* **10**, 688-700 (1984).
129. Terhorst, D., Kalali, B.N., Ollert, M., Ring, J. & Mempel, M. The role of toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases. *Am J Clin Dermatol* **11**, 1-10 (2010).
130. Miller, L.S. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol* **24**, 71-87 (2008).
131. Schröder, J.-M. Purification of antimicrobial peptides from human skin. *Methods Mol. Biol* **618**, 15-30 (2010).
132. McKenzie, R.C. & Sauder, D.N. The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. *J. Invest. Dermatol* **95**, 105S-107S (1990).
133. McKenzie, R.C. & Sauder, D.N. Keratinocyte cytokines and growth factors. Functions in skin immunity and homeostasis. *Dermatol Clin* **8**, 649-661 (1990).
134. Kondo, S. The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc* **4**, 177-183 (1999).
135. Yaar, M. & Gilchrest, B.A. Melanocyte biology: before, during, and after the Fitzpatrick era. *J. Invest. Dermatol* **122**, xxvii-xxix (2004).
136. Yamaguchi, Y. & Hearing, V.J. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* **35**, 193-199 (2009).
137. Kadekaro, A.L., Kanto, H., Kavanagh, R. & Abdel-Malek, Z.A. Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **994**, 359-365 (2003).
138. Heufler, C., Koch, F. & Schuler, G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med* **167**, 700-705 (1988).
139. Koch, F. u. a. Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture, but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, without inducing their functional maturation. *J. Exp. Med* **171**, 159-171 (1990).

140. Ozawa, H., Nakagawa, S., Tagami, H. & Aiba, S. Interleukin-1 beta and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediate Langerhans cell maturation differently. *J. Invest. Dermatol* **106**, 441-445 (1996).
141. Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. & Banchereau, J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**, 258-261 (1992).
142. De Creus, A. u. a. Developmental and functional defects of thymic and epidermal V gamma 3 cells in IL-15-deficient and IFN regulatory factor-1-deficient mice. *J. Immunol* **168**, 6486-6493 (2002).
143. Takashima, A., Matsue, H., Bergstresser, P.R. & Ariizumi, K. Interleukin-7-dependent interaction of dendritic epidermal T cells with keratinocytes. *J. Invest. Dermatol* **105**, 50S-53S (1995).
144. Jones, C.L. & Reiners, J.J. Differentiation status of cultured murine keratinocytes modulates induction of genes responsive to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys* **347**, 163-173 (1997).
145. Ray, S.S. & Swanson, H.I. Dioxin-induced immortalization of normal human keratinocytes and silencing of p53 and p16INK4a. *J. Biol. Chem* **279**, 27187-27193 (2004).
146. Henley, D.V., Bellone, C.J., Williams, D.A., Ruh, T.S. & Ruh, M.F. Aryl hydrocarbon receptor-mediated posttranscriptional regulation of IL-1beta. *Arch. Biochem. Biophys* **422**, 42-51 (2004).
147. Holsapple, M.P., Morris, D.L., Wood, S.C. & Snyder, N.K. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: possible mechanisms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* **31**, 73-100 (1991).
148. Poland, A. & Glover, E. Characterization and strain distribution pattern of the murine Ah receptor specified by the Ahd and Ahb-3 alleles. *Mol. Pharmacol* **38**, 306-312 (1990).
149. Poland, A., Glover, E. & Taylor, B.A. The murine Ah locus: a new allele and mapping to chromosome 12. *Mol. Pharmacol* **32**, 471-478 (1987).
150. Birnbaum, L.S., McDonald, M.M., Blair, P.C., Clark, A.M. & Harris, M.W. Differential toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in C57BL/6J mice congenic at the Ah Locus. *Fundam Appl Toxicol* **15**, 186-200 (1990).
151. Kerkvliet, N.I. u. a. Role of the Ah locus in suppression of cytotoxic T lymphocyte activity by halogenated aromatic hydrocarbons (PCBs and TCDD): structure-activity relationships and effects in C57Bl/6 mice congenic at the Ah locus. *Fundam Appl Toxicol* **14**, 532-541 (1990).
152. Holsapple, M.P., Snyder, N.K., Wood, S.C. & Morris, D.L. A review of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: 1991 update. *Toxicology* **69**, 219-255 (1991).
153. Weber, H., Harris, M.W., Haseman, J.K. & Birnbaum, L.S. Teratogenic potency of TCDD, TCDF and TCDD-TCDF combinations in C57BL/6N mice. *Toxicol. Lett* **26**, 159-167 (1985).
154. Fernandez-Salguero, P. u. a. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* **268**, 722-726 (1995).
155. Mimura, J. u. a. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* **2**, 645-654 (1997).
156. Esser, C. The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. *Biochem. Pharmacol* **77**, 597-607 (2009).
157. Gell, P. *Clinical aspects of immunology.* (Blackwell Scientific: Oxford, 1975).
158. Silberberg, I., Baer, R.L. & Rosenthal, S.A. The role of langerhans cells in contact allergy. I. An ultrastructural study in actively induced contact dermatitis in guinea pigs. *Acta Derm. Venereol* **54**, 321-331 (1974).

159. Goebeler, M. u. a. Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am. J. Pathol* **158**, 431-440 (2001).
160. Esser, C., Rannug, A. & Stockinger, B. The aryl hydrocarbon receptor in immunity. *Trends Immunol* **30**, 447-454 (2009).
161. Veldhoen, M. & Duarte, J.H. The aryl hydrocarbon receptor: fine-tuning the immune-response. *Curr. Opin. Immunol* **22**, 747-752 (2010).
162. Matsue, H., Cruz, P.D., Bergstresser, P.R. & Takashima, A. Profiles of cytokine mRNA expressed by dendritic epidermal T cells in mice. *J. Invest. Dermatol* **101**, 537-542 (1993).
163. Marlowe, J.L. u. a. The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3263-3271 (2008).
164. Park, K.-T., Mitchell, K.A., Huang, G. & Elferink, C.J. The aryl hydrocarbon receptor predisposes hepatocytes to Fas-mediated apoptosis. *Mol. Pharmacol* **67**, 612-622 (2005).
165. Boyden, L.M. u. a. Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat. Genet* **40**, 656-662 (2008).
166. Jin, Y., Xia, M., Sun, A., Saylor, C.M. & Xiong, N. CCR10 is important for the development of skin-specific gammadeltaT cells by regulating their migration and location. *J. Immunol* **185**, 5723-5731 (2010).
167. Jiang, X., Campbell, J.J. & Kupper, T.S. Embryonic trafficking of gammadelta T cells to skin is dependent on E/P selectin ligands and CCR4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **107**, 7443-7448 (2010).
168. Jameson, J.M., Cauvi, G., Witherden, D.A. & Havran, W.L. A keratinocyte-responsive gamma delta TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *J. Immunol* **172**, 3573-3579 (2004).
169. Witherden, D.A. u. a. The junctional adhesion molecule JAML is a costimulatory receptor for epithelial gammadelta T cell activation. *Science* **329**, 1205-1210 (2010).
170. Bernstein, A. u. a. The mouse W/c-kit locus. *Ciba Found. Symp* **148**, 158-166; discussion 166-172 (1990).
171. Ogawa, M. u. a. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med* **174**, 63-71 (1991).
172. Wang, T., Alam, R., Langley, K.E. & Klimpel, G.R. Stem cell factor and IL-2 act synergistically in inducing intraepithelial lymphocyte proliferation and cytokine production: upregulation of the IL-2 receptor gamma-chain and signaling via JAK-3. *Cell. Immunol* **205**, 62-71 (2000).
173. Puddington, L., Olson, S. & Lefrançois, L. Interactions between stem cell factor and c-Kit are required for intestinal immune system homeostasis. *Immunity* **1**, 733-739 (1994).
174. Wang, F., Wang, W. & Safe, S. Regulation of constitutive gene expression through interactions of Sp1 protein with the nuclear aryl hydrocarbon receptor complex. *Biochemistry* **38**, 11490-11500 (1999).
175. Maeda, K., Nishiyama, C., Ogawa, H. & Okumura, K. GATA2 and Sp1 positively regulate the c-kit promoter in mast cells. *J. Immunol* **185**, 4252-4260 (2010).
176. Uche, U.N., Huber, C.R., Raulet, D.H. & Xiong, N. Recombination signal sequence-associated restriction on TCRdelta gene rearrangement affects the development of tissue-specific gammadelta T cells. *J. Immunol* **183**, 4931-4939 (2009).
177. Takashima, A. UVB-dependent modulation of epidermal cytokine network: roles in UVB-induced depletion of Langerhans cells and dendritic epidermal T cells. *J. Dermatol* **22**, 876-887 (1995).

178. Kaminski, M.J., Bergstresser, P.R. & Takashima, A. In vivo activation of mouse dendritic epidermal T cells in sites of contact dermatitis. *Eur. J. Immunol* **23**, 1715-1718 (1993).
179. Jameson, J. & Havran, W.L. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol. Rev* **215**, 114-122 (2007).
180. Shiohara, T., Moriya, N., Hayakawa, J., Itohara, S. & Ishikawa, H. Resistance to cutaneous graft-vs.-host disease is not induced in T cell receptor delta gene-mutant mice. *J. Exp. Med* **183**, 1483-1489 (1996).
181. Borkowski, T.A., Letterio, J.J., Farr, A.G. & Udey, M.C. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med* **184**, 2417-2422 (1996).
182. Simones, T. & Shepherd, D.M. Consequences of AhR activation in steady-state dendritic cells. *Toxicol. Sci* **119**, 293-307 (2011).
183. Bankoti, J., Rase, B., Simones, T. & Shepherd, D.M. Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **246**, 18-28 (2010).
184. Jin, G.-B., Moore, A.J., Head, J.L., Neumiller, J.J. & Lawrence, B.P. Aryl hydrocarbon receptor activation reduces dendritic cell function during influenza virus infection. *Toxicol. Sci* **116**, 514-522 (2010).
185. Laupeze, B. u. a. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol* **168**, 2652-2658 (2002).
186. Bobr, A. u. a. Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *J. Immunol* **185**, 4724-4728 (2010).
187. Allan, R.S. u. a. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* **301**, 1925-1928 (2003).
188. Romani, N., Clausen, B.E. & Stoitzner, P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev* **234**, 120-141 (2010).
189. Vorderstrasse, B.A. & Kerkvliet, N.I. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects the number and function of murine splenic dendritic cells and their expression of accessory molecules. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **171**, 117-125 (2001).
190. Saeki, M. u. a. mRNA expression of multiple cytochrome p450 isozymes in four types of cultured skin cells. *Int. Arch. Allergy Immunol* **127**, 333-336 (2002).
191. Kim, D.W. u. a. The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene* **19**, 5498-5506 (2000).
192. Stockinger, B., Hirota, K., Duarte, J. & Veldhoen, M. External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Semin Immunol* (2011).doi:10.1016/j.smim.2011.01.008
193. Wang, F., Samudio, I. & Safe, S. Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol* **172**, 91-103 (2001).
194. Yi, Y.-M. u. a. A new tumor vaccine: FAPт-MT elicits effective antitumor response by targeting Indolamine2, 3-dioxygenase in antigen presenting cells. *Cancer Biol Ther* **11**, (2011).
195. Jasperson, L.K. u. a. Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood* **114**, 5062-5070 (2009).
196. Vogel, C.F.A. u. a. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol* **21**, 2941-2955 (2007).

197. Fallarino, F. u. a. T cell apoptosis by kynurenines. *Adv. Exp. Med. Biol* **527**, 183-190 (2003).
198. Mellor, A.L. & Munn, D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol* **4**, 762-774 (2004).
199. Munn, D.H. u. a. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest* **114**, 280-290 (2004).
200. Hauben, E. u. a. Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance through direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells. *Blood* **112**, 1214-1222 (2008).
201. Lawrence, B.P. u. a. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound. *Blood* **112**, 1158-1165 (2008).
202. Ettmayer, P. u. a. A novel low molecular weight inhibitor of dendritic cells and B cells blocks allergic inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* **173**, 599-606 (2006).
203. Morales, J.L., Krzeminski, J., Amin, S. & Perdew, G.H. Characterization of the antiallergic drugs 3-[2-(2-phenylethyl) benzoimidazole-4-yl]-3-hydroxypropanoic acid and ethyl 3-hydroxy-3-[2-(2-phenylethyl)benzoimidazol-4-yl]propanoate as full aryl hydrocarbon receptor agonists. *Chem. Res. Toxicol* **21**, 472-482 (2008).
204. Kato, Y., Mizuguchi, K. & Mochizuki, H. A novel benzoimidazole derivative, M50367, modulates helper T type I/II responses in atopic dermatitis mice and intradermal melanoma-bearing mice. *Biol. Pharm. Bull* **28**, 78-82 (2005).
205. Kato, Y., Negishi, T., Furusako, S., Mizuguchi, K. & Mochizuki, H. An orally active Th1/Th2 balance modulator, M50367, suppresses Th2 differentiation of naïve Th cell in vitro. *Cell. Immunol* **224**, 29-37 (2003).
206. Enk, A.H. & Katz, S.I. Heat-stable antigen is an important costimulatory molecule on epidermal Langerhans' cells. *J. Immunol* **152**, 3264-3270 (1994).
207. Ozawa, H., Aiba, S., Nakagawa & Tagami, H. Interferon-gamma and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *Eur. J. Immunol* **26**, 648-652 (1996).
208. Negishi, T. u. a. Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. *J. Immunol* **175**, 7348-7356 (2005).
209. Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
210. Van Parijs, L. u. a. Functional consequences of dysregulated B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression in B or T lymphocytes of transgenic mice. *J. Immunol* **159**, 5336-5344 (1997).
211. Judge, T.A., Tang, A. & Turka, L.A. Immunosuppression through blockade of CD28:B7-mediated costimulatory signals. *Immunol. Res* **15**, 38-49 (1996).
212. Santamaria Babi, L.F., Perez Soler, M.T., Hauser, C. & Blaser, K. Skin-homing T cells in human cutaneous allergic inflammation. *Immunol. Res* **14**, 317-324 (1995).
213. Santamaria, L.F., Perez Soler, M.T., Hauser, C. & Blaser, K. Allergen specificity and endothelial transmigration of T cells in allergic contact dermatitis and atopic dermatitis are associated with the cutaneous lymphocyte antigen. *Int. Arch. Allergy Immunol* **107**, 359-362 (1995).
214. Kish, D.D., Gorbachev, A.V. & Fairchild, R.L. CD8+ T cells produce IL-2, which is required for CD(4+)CD25+ T cell regulation of effector CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J. Leukoc. Biol* **78**, 725-735 (2005).
215. Kish, D.D., Gorbachev, A.V. & Fairchild, R.L. Regulatory function of CD4+CD25+ T cells from Class II MHC-deficient mice in contact hypersensitivity responses. *J. Leukoc. Biol* **82**, 85-92 (2007).
216. Funatake, C.J., Marshall, N.B., Steppan, L.B., Mourich, D.V. & Kerkvliet, N.I. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-

dioxin generates a population of CD4+ CD25+ cells with characteristics of regulatory T cells. *J. Immunol* **175**, 4184-4188 (2005).
217. Nakae, S. u. a. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* **17**, 375-387 (2002).
218. He, D. u. a. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J. Immunol* **177**, 6852-6858 (2006).
219. Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M.L. & Girolomoni, G. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**, 329-334 (2005).
220. Sebastiani, S. u. a. The role of chemokines in allergic contact dermatitis. *Arch. Dermatol. Res* **293**, 552-559 (2002).
221. Terunuma, A., Aiba, S. & Tagami, H. Cytokine mRNA profiles in cultured human skin component cells exposed to various chemicals: a simulation model of epicutaneous stimuli induced by skin barrier perturbation in comparison with that due to exposure to haptens or irritant. *J. Dermatol. Sci* **26**, 85-93 (2001).
222. Wakem, P. u. a. Allergens and irritants transcriptionally upregulate CD80 gene expression in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol* **114**, 1085-1092 (2000).
223. Heib, V. u. a. Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood* **110**, 946-953 (2007).
224. Kalesnikoff, J. & Galli, S.J. Antiinflammatory and immunosuppressive functions of mast cells. *Methods Mol. Biol* **677**, 207-220 (2011).
225. Wehrle-Haller, B. The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment Cell Res* **16**, 287-296 (2003).
226. Honda, T. u. a. Compensatory role of Langerhans cells and langerin-positive dermal dendritic cells in the sensitization phase of murine contact hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol* **125**, 1154-1156.e2 (2010).
227. Merad, M., Ginhoux, F. & Collin, M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol* **8**, 935-947 (2008).
228. Bursch, L.S., Rich, B.E. & Hogquist, K.A. Langerhans cells are not required for the CD8 T cell response to epidermal self-antigens. *J. Immunol* **182**, 4657-4664 (2009).
229. de Gruijl, F.R. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Meth. Enzymol* **319**, 359-366 (2000).
230. Villano, C.M., Murphy, K.A., Akintobi, A. & White, L.A. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **210**, 212-224 (2006).
231. Krämer, H.-J. u. a. Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast Malassezia furfur, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chembiochem* **6**, 860-865 (2005).
232. Karaoui, R., Bou-Resli, M., Al-Zaid, N.S. & Mousa, A. Tinea versicolor: ultrastructural studies on hypopigmented and hyperpigmented skin. *Dermatologica* **162**, 69-85 (1981).
233. Luecke, S. u. a. The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**, 828-833 (2010).
234. Kawaguchi, Y., Mori, N. & Nakayama, A. Kit(+) melanocytes seem to contribute to melanocyte proliferation after UV exposure as precursor cells. *J. Invest. Dermatol* **116**, 920-925 (2001).
235. D'Orazio, J.A. u. a. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV-induced tanning. *Nature* **443**, 340-344 (2006).

236. Archambault, M., Yaar, M. & Gilchrest, B.A. Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol* **104**, 859-867 (1995).
237. Rosdahl, I.K. & Szabo, G. Thymidine labelling of epidermal melanocytes in UV-irradiated skin. *Acta Derm. Venereol* **56**, 159-161 (1976).
238. Tobin, D., Quinn, A.G., Ito, S. & Thody, A.J. The presence of tyrosinase and related proteins in human epidermis and their relationship to melanin type. *Pigment Cell Res* **7**, 204-209 (1994).
239. Grichnik, J.M., Burch, J.A., Burchette, J. & Shea, C.R. The SCF/KIT pathway plays a critical role in the control of normal human melanocyte homeostasis. *J. Invest. Dermatol* **111**, 233-238 (1998).
240. Hachiya, A., Kobayashi, A., Ohuchi, A., Takema, Y. & Imokawa, G. The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J. Invest. Dermatol* **116**, 578-586 (2001).
241. Flaveny, C.A., Murray, I.A., Chiaro, C.R. & Perdew, G.H. Ligand selectivity and gene regulation by the human aryl hydrocarbon receptor in transgenic mice. *Mol. Pharmacol* **75**, 1412-1420 (2009).
242. Nohara, K. u. a. Comparison of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced CYP1A1 gene expression profile in lymphocytes from mice, rats, and humans: most potent induction in humans. *Toxicology* **225**, 204-213 (2006).
243. Algazi, A.P., Soon, C.W. & Daud, A.I. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects. *Cancer Manag Res* **2**, 197-211 (2010).
244. Prendergast, G.C., Metz, R. & Muller, A.J. IDO recruits Tregs in melanoma. *Cell Cycle* **8**, 1818-1819 (2009).
245. Benson, J.M. & Shepherd, D.M. Aryl hydrocarbon receptor activation by TCDD reduces inflammation associated with Crohn's disease. *Toxicol. Sci* **120**, 68-78 (2011).
246. Coombes, J.L. u. a. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med* **204**, 1757-1764 (2007).
247. Jaensson, E. u. a. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med* **205**, 2139-2149 (2008).
248. Svensson, M. u. a. Retinoic acid receptor signaling levels and antigen dose regulate gut homing receptor expression on CD8+ T cells. *Mucosal Immunol* **1**, 38-48 (2008).
249. Kerkvliet, N.I. & Brauner, J.A. Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations in the spleen and thymus of mice exposed to an acute immunosuppressive dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Environ. Res* **52**, 146-154 (1990).
250. Ishikawa, S. Children's immunology, what can we learn from animal studies (3): Impaired mucosal immunity in the gut by 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin (TCDD): a possible role for allergic sensitization. *J Toxicol Sci* **34 Suppl 2**, SP349-361 (2009).
251. Tian, Y. Ah receptor and NF-kappaB interplay on the stage of epigenome. *Biochem. Pharmacol* **77**, 670-680 (2009).
252. Kimura, A. & Kishimoto, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol* **40**, 1830-1835 (2010).
253. Quintana, F.J. u. a. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **453**, 65-71 (2008).
254. Schulz, O. u. a. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J. Exp. Med* **206**, 3101-3114 (2009).
255. Stutte, S., Jux, B., Esser, C. & Förster, I. CD24a expression levels discriminate Langerhans cells from dermal dendritic cells in murine skin and lymph nodes. *J. Invest. Dermatol* **128**, 1470-1475 (2008).

Anhang A: Veröffentlichungen

Im Folgenden sind alle in dieser Dissertation besprochenen Veröffentlichungen angehängt. Der Druck erfolgte mit der Genemigung der Verlage, die das Copyright für die Veröffentlichung besitzen.

Aryl hydrocarbon receptor is critical for homeostasis of invariant gamma-delta T cells in the murine epidermis[1]

Stephanie Kadow[*,‡], Bettina Jux[*,§] Sonja P. Zahner[†], Britta Wingerath*, Stefanie Chmill*, Björn E. Clausen[†], Jan Hengstler[‡], Charlotte Esser[*, ¶]

[*]Molecular Immunology, IUF – Leibniz Research Institute for Environmental Medicine, Düsseldorf, Germany
[†] Erasmus MC, University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands
[‡] Leibniz-Institut für Arbeitsphysiologie Dortmund (IfADo), Dortmund, Germany
[§] current address: Molecular Immunology & Cell Biology Unit, LIMES Institute, University of Bonn, Bonn, Germany

running title: AhR is critical for DETC homeostasis in murine epidermis

Key words: DETC, epidermis, aryl hydrocarbon receptor, c-kit, GMSCF, mouse

[¶]Corresponding author:
Charlotte Esser, Ph.D.
IUF – Leibniz Research Institute for Environmental Medicine
Molecular Immunology
Auf´m Hennekamp 50
40225 Düsseldorf
GERMANY

Tel: +49-211-3389253
FAX +49-211-3190910

chesser@uni-duesseldorf.de

Footnotes

1
This study was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through GK1427. B.E.C. received grants from the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO, VIDI 917-76-365), and the Landsteiner Foundation for Blood Transfusion Research (LSBR, 0414F) for the generation of Langerin-Cre mice.

2
Abbreviations used: AhR (aryl hydrocarbon receptor); ARE (AhR-responsive element, also known as dioxin- or xenobiotic-responsive element); DETC (dendritic epidermal T cells); $V\gamma3^{+}$-DETC (DETC which express $V\gamma3$) ; FACS (flow cytomeric cell sorting); IEL (intraepithelial lymphocytes); K5AhR-KO (keratinocyte specific AhR-deficient); LC (Langerhans cells); TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; TCR (T cell receptor); WT (wild-type, here: C57BL/6 mice);

Abstract

An immunoregulatory role of aryl hydrocarbon receptor (AhR) has been shown in conventional αβ T cells, but its function in invariant γδ T cells remains unclear. Skin contains a network of γδ T lymphocytes, but little is known about their homeostasis and function. Recently, we have shown that GM-CSF levels are very low in AhR-deficient (AhR-KO) mouse epidermis and that maturation of Langerhans cells is compromised. Here, we show that murine dendritic epidermal γδ T cells (DETC), a major source of GM-CSF in skin, were specifically absent in AhR-KO epidermis, while conventional γδ T cells were present in spleen or blood. The lack of DETCs was responsible for compromised LC maturation. We show that DETC precursors are generated in the thymus and home to the skin. Proliferation of DETC in the skin was impaired in AhR-KO mice, resulting in a more than 90% loss compared to wild-type (WT). Surprisingly, DETC were not replaced by αβ T cells or conventional γδ T cells, suggesting a limited time frame for seeding this niche. We found that DETC from AhR-KO mice failed to express the receptor tyrosine kinase c-kit, a known growth factor for γδ T cells in the gut. We demonstrate that DETC express AhR. Moreover, we found that c-kit is a direct target of AhR, and propose that AhR-dependent c-kit expression controls DETC homeostasis. These findings provide insights into a novel role for AhR in the maintenance of tissue-specific γδ T cells, and its consequences for the skin immune network.

Introduction

Recently, aryl hydrocarbon receptor (AhR)[2], a ligand-activated transcription factor, has been recognized as an important factor in the differentiation and function of peripheral immune cells (1,2). In the skin, a role for AhR as a sensor of chemicals and light has been demonstrated for keratinocytes, Langerhans cells (LC), melanocytes, and fibroblasts (2-6). However, nothing is known about the function of AhR for the epidermal resident T cell population, i.e., γδTCR$^+$ T cells. These T cells account for almost 100% of epidermal lymphocytes, and are commonly known as dendritic epidermal T cells (DETC) (7). We had shown that levels of GM-CSF are very low in the epidermis of AhR-KO mice, and that LC maturation requires GM-CSF (3), which is a target of AhR (8,9). DETC are a major source of GM-CSF (10) and are pivotal in wound healing and tumor surveillance (10-14). Therefore, we decided to dissect its cell-type specific functions further by (conditional) gene targeting. In mouse, γδ T cells preferentially reside in epithelia such as epidermis, gut, lung or the genitourinary tract (15,16); they are an immediate source of cytokines and chemokines upon antigen stimulation (17). DETC have a very limited T cell receptor repertoire and in mice most DETC belong to the Vγ3/δ1 clonotype (Vγ3$^+$-DETC) (17-19). DETC are in constant contact with multiple neighbouring keratinocytes and LC, integrating innate and adaptive immunity (20).

Vγ3/δ1 T cells destined for the skin are generated and selected exclusively in the fetal thymus between embryonic day 15-18 (7,21-23), then migrate to the skin in an E/P selectin-dependent fashion (24) where they remain for life. In Vδ$^{-/-}$ mice αβ TCR$^+$ DETC seed the skin, but disappear with time (18), suggesting that the epidermal niche for T cells cannot be successfully occupied by conventional T cells. The exact nature of homeostatic proliferation and maintenance of γδ T cells *in situ* in skin is not known.

AhR-dependence of gene transcription is known for many genes, including genes of the immune system (8,25), which bear the AhR responsive element (ARE, also known as dioxin responsive element) in their promoter (26). Recently it was discovered that AhR interacts also with other signalling molecules, such as NFκB, estrogen receptor, or STAT1 (27-29). As a consequence, AhR-mediated gene induction is highly context-dependent and cell specific (30,31). The intracellular abundance of AhR differs markedly between cells, even if they are closely lineage related such as peripheral $CCR6^+$ and $CCR6^-$ γδ T cells (32). Interestingly, keratinocytes, LC, and melanocytes of the skin express AhR (3-6). Although not formally proven, it is generally assumed that physiological relevance correlates with expression levels. Here we report the seminal finding that DETC express AhR abundantly and were dramatically lost from skin in AhR-KO, but not in keratinocyte or Langerhans cell specific conditional AhR-KO mice. Moreover, we found that the lack of DETC is not compensated by other T cells in the AhR-KO mouse, indicating a restricted time window for colonizing the skin with intraepithelial lymphocytes. Fewer DETC of AhR-KO expressed c-kit, a potential target of AhR. Together, our data establish an unexpected intrinsic role of AhR in $Vγ3^+$-DETC T-cell survival and proliferation in the murine skin, and indicate a novel role for AhR in c-kit expression and c-kit dependent $Vγ3^+$-DETC homeostasis in epidermis.

Material and Methods

Animals

10-12 week old female wild-type C57BL/6 and congenic AhR-KO mice (33,34) were used. Keratinocyte-specific AhR-KO mice (K5AhR-KO) were described previously (4). LC specific (LangerinAhR-KO) were bred from $AhR^{flox/flox}$ and Langerin-Cre mice (generated by B.E.C. and S.P.Z., manuscript in preparation), and the LC specificity of AhR deletion was verified. For details see supplementary data S4. All experiments were in accordance with relevant German and Dutch animal welfare laws.

Epidermal cell suspensions and cellular staining

Epidermal cell suspensions were prepared from ear, tail, or depilated back skin, as described (4). Briefly, dermis and epidermis were separated by trypsinization and epidermal cells released mechanically. Epidermal cells were cultivated in RPMI1640 supplemented with 10% FCS, Pen/Strep, and 0.15% $NaHCO_3$. For flow cytometry or cell sorting, cell suspensions were cultivated for several hours, allowing re-expression of surface markers. $CD3^+$ T cells were enriched with MACS (Miltenyi), then sorted for vital $CD3^+$ and γδ TCR^+ (with GL3, a monoclonal pan-anti-TCRγδ antibody) double positive cells on a FACSCalibur (BD Biosciences) to a purity of >97%. For FACS analysis cells were stained with the appropriate antibodies (see supplementary data S1), after blocking Fc-Receptors with anti-CD16/32. Propidium iodide staining and scatter characteristics were used to exclude dead cells and doublettes. Data were analyzed with FlowJo 7.5 Software (TreeStar).

DETC comprise both $GL3^+V\gamma3^-$ (<5%) and $GL3^+V\gamma3^+$ cells (>95%). In this paper, we use the term $V\gamma3^+$-DETC cells to distinguish the latter. In multicolour fluorescence analysis DETC were gated on γδTCR$(GL3)^+CD3^+$ cells as shown in Figure 1A, unless indicated otherwise.

GM-CSF measurement

Epidermal cells were isolated as described above and cultured at 10^6 cells/ml in 12-well plates for 24 or 48 hours. GM-CSF concentrations in the supernatants were determined by ELISA

(eBioscience). Western Blotting of sorted TCRγδ$^+$/CD3$^+$ cells (purity >97%) was done with standard procedures, using Biomol (cat. #SA210) polyclonal rabbit anti-mouse AhR antibody, and goat-anti-rabbit Ab to develop. Loading was controlled with anti-GAPDH antibody clone 6C5 (Acris, Hiddenhausen).

Immunhistochemistry and cell cycle analysis

Epidermal sheets were fixed in acetone at -20°C for 20 min, followed by a blocking step (10% FCS/PBS for 1 h, RT). Sheets were stained with anti-Vγ3^{FITC} and anti-MHCII over night at 4°C, then developed with goat anti-rat IgG^{TexasRed} (Invitrogen) for 2 h at RT. Epidermal sheets mounted on glass slides were photographed and analyzed with a Leica DM2500 Microscope (Leica) and AxioVision Rel.4.6 Software (Zeiss). Cell cycle was analysed by propidium iodide staining, and apoptotic cells detected with TUNEL assay using the `In situ cell death detection kit´ (Roche Applied Bioscience).

RNA analysis

Total RNA was isolated with TRIzol™ (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, treated with DNAse and reversely transcribed with $(dT)_{16}$ oligonucleotide primers. qPCR was performed on a Rotor-Gene RG 3000 (LTF Labortechnik). Amplification conditions were 45 cycles of denaturation (15 s at 94°C), primer annealing (20 s at 55°C (Cyp1A1), 56°C (AhR), and 60°C (IL-2, IL-7, IL-15, TNFα), respectively), elongation (30 s (Cyp1A1, AhR) or 20 s (IL-2, IL-7 IL-15, TNFα) at 72°C), and 2 s at 72°C for fluorescence detection. Expression levels were normalized with the ΔΔCt method to Rps6, amplified from the same sample. Analysis of *Scf* expression levels was done by non-quantitative RT-PCR, with 38 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C and 90 s at 72°C. PCR products were analyzed by gel electrophoresis. All primer sequences are given in supplementary data S1.

Plasmid constructs and Luciferase assay

The mouse c-kit promoter (-396/-37) containing two AREs core sequences 5´-GCGTG-3´ (at -344 and -145) was subcloned into the luciferase reporter plasmid pGL3 basic vector

(Promega). Mutations of ARE1 or ARE2 in c-kit (mut-1, mut-2) or both (mut1+2) were generated by site-directed mutagenesis with the QuikChangeII Site-Directed-Mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Mutations were verified by sequencing. The promoter region of *cyp1a1* containing five DREs was used as reference control. HepG2 cells were transfected and then treated with 10 nM 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin dissolved in 01% dimethylsulfoxid or solvent for 24 hours. Luciferase activities were determined by using the Dual-Luciferase® Reporter Assay system (Promega) in a Multi-Bioluminate LB 9505C (Berthold Technologies). Firefly luciferase activity derived from the reporter plasmids was normalized to *Renilla* luciferase activity derived from co-transfected pRL-SV40 (Promega). Cloned sequences are shown in supplementary data S1.

Statistical analysis

Data were analyzed with *student's t test* or one-way ANOVA. P values of <0.05 were considered to be significant. Means ± SD are shown.

Results

AhR deficient mice lack epidermal γδ T cells

Recently, we found that GM-CSF is reduced in the skin of AhR-KO mice, and we suggested that lack of GM-CSF might be one reason for diminished LC maturation and function in these mice (3,20). Because DETC are a major source of GM-CSF in the skin (10) we examined the presence of DETC populations in ear, back and tail skin of AhR-KO mice by flow cytometry and immunohistochemistry. As demonstrated in Figure 1, DETC were dramatically reduced in tail, back and ear skin of AhR-KO (Figure 1A and B), but not in the epidermis of conditional keratinocyte-specific AhR-deficient mice (K5AhR-KO) mice (Fig. 1B). Immunohistology showed that epidermal distribution pattern and morphology of $V\gamma3^+$-DETC remained normal in the epidermis (ears) of K5AhR-KO as well as in the epidermis of conditional LC specific AhR-deficient mice (LangerinAhR-KO) (Fig. 1C). Except in the AhR-KO mice, $V\gamma3^+$-DETC formed a dense dendritic network with LC and keratinocytes. In both WT and AhR-KO mice some $V\gamma2^+$ DETC were detectable, as has been described (35), these cells appear not to be lost in the AhR-KO (Table I). Interestingly, DETC were not replaced by αβ TCR^+ T cells in AhR-KO mice, on average we detected <0.5% $TCR\beta^+$ T cells in both WT and AhR-KO (supplementary data S2A). Surface expression levels of activation markers and IL2R (CD122 β-chain) or IL7R (CD127, α-chain) did not differ, except for expression of CD69 and c-kit (CD117) (Table I, see also below).

IL2 protein in 24 hour supernatants, or IL7, IL15, and TNFα mRNA levels of freshly isolated epidermal cells, all of which are relevant for γδ T cell homeostasis (10), did not differ between epidermal cell suspensions from WT, AhR-KO and K5AhR-KO mice (supplementary data S2B,C). These data suggest that the lack of DETC is neither due to an

AhR-dependent impairment of paracrine cytokine secretion by keratinocytes or LC, nor to a failure to express the respective cytokine receptors by the DETC.

Vγ3+ T cells are generated in AhR-KO mice

Vγ3/δ1 T cells are generated exclusively during a short period in the fetal thymus (7,36). We therefore analyzed the frequency and absolute numbers of $V\gamma3^+$ cells in thymi from embryonic day 15 to 17. In agreement with our previous observations (37), total cell numbers were reduced in the fetal thymus of AhR-deficient mice (Figure 2A). However, despite a possible drop in $V\gamma3^+$ cells in AhR-KO at day 17, neither frequencies (Figure 2 B, C) nor absolute numbers (Figure 2D) of $V\gamma3^+$ cells differed significantly between WT and AhR-KO on days 15-17. It is thus unlikely that a failure to generate DETC precursors in the thymus is the underlying cause of DETC absence in adult AhR-KO mice.

DETC proliferation is compromised in AhR-KO epidermis

Thymus-generated $V\gamma3^+$ T cells home to the skin. We asked whether skin homing is intact in AhR-KO mice and investigated for the presence of $V\gamma3^+$-DETC in the dermis and epidermis of new born mice between days two and 28 after birth. We found no accumulation of $V\gamma3^+$-DETC in the dermis of AhR-deficient mice, indicating that they are not retained in the dermis (supplementary data S3A). $V\gamma3^+$-DETC were detectable in the epidermis in WT and AhR-KO mice at day 2 after birth. Note that at this time-point the frequency of $V\gamma3^+$-DETC was even higher in AhR-KO mice than in WT mice (insert Figure 3A). The frequencies increased in WT, peaked at day 14 and reached adult levels of about 5-8% at the age of four weeks. In contrast, $V\gamma3^+$-DETC steadily decreased in AhR-KO mice after day 2 (Figure 3A). The frequencies of $V\gamma3^+$-DETC of heterozygote littermates were the same as in WT (supplementary data S3B). Thus, $V\gamma3^+$ T cells were generated in the embryonic thymi of

AhR-KO mice and found resident in the epidermis shortly after birth at equal or even higher numbers, then lost from the skin within a few weeks. In addition, Vγ3^{+}-DETC of AhR-KO mice did not undergo normal morphological changes after birth, i.e., retained distinct round shapes and few dendrites (Figure 3B), conceivably indicating impaired differentiation and possibly occupation of the epidermal niche.

The results shown in Figure 3A indicate a failure of AhR-KO DETC to proliferate adequately. Congruent with this, we detected about 5% more cycling cells in AhR$^{+/-}$ than in AhR-KO on both day 7 and 10 after birth (Table II, note that as shown in supplementary data S3 AhR+/- have Vγ3 cell density like WT). A difference in frequency of apoptotic DETC, measured by TUNEL staining was not detectable (supplementary data S3C). Surprisingly, inhibition of proliferation appeared to affect Vγ3 cells only (Figure 3C, compare the shift in Vγ3^{pos} and Vγ3^{neg} cells). Our data demonstrate that AhR-deficiency results in incapacity of DETC to adopt their dendritic morphology, and proliferate adequately after successful primary seeding of the skin. Together, this eventually leads to the loss of these cells shortly after birth.

c-kit expression is AhR-dependent

We had previously shown that the tyrosine kinase and growth factor c-kit (CD117) is absent in AhR-KO melanocytes, which correlated with a reduced capacity of UV-induced proliferation of these cells (4). c-kit is also known to regulate activation and expansion of intraepithelial lymphocytes in the gut, many of which are γδ T cells (38). We found that γδ TCR^{+} intraepithelial lymphocytes were reduced by 50% in AhR-KO mice, but frequencies of γδ T cells in blood or spleen did not differ between AhR genotypes (supplementary data S3D,E). It is known that the ligand of c-kit, stem cell factor (SCF), is secreted by all epidermal cells (39). We therefore hypothesized that SCF/c-kit signalling might be affected by AhR-deficiency. Indeed, the frequency of c-kit- expressing Vγ3^{+}-DETC cells was reduced

in AhR-KO mice, but not WT or K5AhR-KO mice, indicating an intrinsic regulation of c-kit (Figure 4A, see also Table I). There were no differences in the amount of soluble (sSCF) or membrane bound SCF (mSCF) in epidermal cells of WT, K5AhR-KO or AhR-KO mice (Figure 4B). C-kit harbors two AhR-responsive elements (AREs) in its promoter (8), and DETC express AhR (Figure 4C). We cloned the promoter fragment covering these AREs (supplementary data S1) into a luciferase reporter vector. Treatment of transfected hepatoma (HepG2) cells with the strong AhR agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced luciferase expression, which was reduced when point mutations were introduced into either of the two ARE, and abrogated, when both AREs were mutated (Figure 4D). Together these results demonstrate that c-kit can be a direct target for AhR-mediated transcription, and suggest that c-kit expression is needed for $V\gamma3^{+}$-DETC maintenance.

AhR-KO epidermal cultures have lower GM-CSF levels and an aberrant LC phenotype

Mice from the TCRδ-deficient strain FVB have an increased ear thickness and spontaneous dermatitis (13). In contrast, we observed no pathological skin phenotype such as skin lesions or thickening of the epidermis in our AhR-deficient C57BL/6 mice. However, we recently reported that LC from AhR-KO mice were impaired in maturation and expressed significantly lower levels of CD80 due to reduced GM-CSF levels in epidermal cells (3). We cultured WT, K5AhR-KO or AhR-KO epidermal cells and determined GM-CSF levels in the respective supernatants. As shown in Figure 5A, GM-CSF levels were significantly reduced in AhR-KO epidermal cells compared to both WT and K5AhR-KO. The increase in the amount of GM-CSF in AhR-KO culture supernatants between 24 and 48h of culture could have been produced by the few remaining γδ T cells. Epidermal cells from K5AhR-KO mice produced normal levels of GM-CSF, indicating that the reduction in GM-CSF in AhR-KO mice is the result of reduced γδ T cells (Figure 5A). LC from WT epidermal cell cultures depleted of DETC displayed lower levels of the maturation marker CD80 (Figure 5B), and lower mean

scatter characteristics (Figure 5C), both parameters of immature LC (3). Together, our data indicate that low GM-CSF levels in AhR-KO skin are due to the lack of DETC.

Discussion

γδ T cells are a rare subset of T cells and can be separated into peripheral γδ T cells with a highly diverse TCR repertoire and the epithelial subsets with site-specific invariant TCRs. A pivotal role of AhR for the anti-microbial response of peripheral γδ T cells has recently been shown (32). Here, we report the unexpected finding that invariant epidermal γδ T cells are virtually absent in the skin of AhR deficient mice. While γδ T cells, destined for the periphery, are generated in the thymus throughout life, invariant epidermal γδ T cells are generated exclusively during a short time window in the fetal thymus. Albeit we had shown previously that fetal γδ T cell development was affected by unphysiological persistent activation of AhR with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (40), we establish here that AhR presence is not required *per se* for normal generation of embryonic γδ T cells. Rearrangement of the Vδ genes during the DN stage in the thymus is regulated and controlled by recombination signals (35). Apparently, AhR activation, rather than needed, must be avoided in the fetal thymus for normal γδ T cell development to occur. An effect of AhR on the positive selection of future DETC, e.g. via expression changes in the selection gene Skint1 (22), is also unlikely because $V\gamma3^+$ cells were detectable in the fetal thymus and able to emigrate.

We detected homing to the epidermis to levels equal to that of WT mice, indicating that skin homing signals such as CCR10/CCL27 (41) were not targeted by AhR. Confirming published data, we observed a proliferative burst of $V\gamma3^+$-DETC cells in the epidermis of WT mice between days seven and 14 after birth followed by a decline until adult frequencies were reached 28 days (42). In contrast, no proliferative burst was detectable in $V\gamma3^+$-DETC from

AhR-KO mice, which steadily declined in the epidermis, and had approximately 5% fewer cycling cells compared to WT. Assuming a cell cycle duration of about 12-16 hours even this small difference in percent of cycling cells would translate into several-fold higher frequencies of WT Vγ3^{+}-DETC seen on day 14. Other factors might exacerbate the loss of DETC from the epidermis. DETC of AhR-KO had an altered morphology, i.e. they did not properly form dendrites after homing to the skin. It is possible that this is associated with an altered ability to establish the necessary cell-cell contacts in the epidermis. This notion is congruent with fewer DETC expressing CD69, i.e. having an unusual non-activated state (43). Notably, in AhR-KO mice the missing Vγ3^{+}-DETC were not replaced, neither by αβ T cells nor by other γδ T cells. Such reconstitution has been described for TCRδ$^{-/-}$ mouse strains, albeit αβ T cells were lost again with time (12,44). Again, this might be due to the unique ability of DETC to contact closely the surrounding keratinocytes and LC via their dendrites. This unexpected finding (i) reflects that there is a window for T cell seeding of the epidermis, and (ii) suggests that an empty epidermal γδ T cell niche cannot be filled successfully with non-γδ T cells, once this opportunity has passed. This has to be considered in situations, where reconstitution of DETC cells is therapeutically desirable.

Keratinocytes respond to AhR activation, and many DETC growth factors secreted by keratinocytes harbour AREs in their promoters (45). However, we have ruled out such paracrine AhR-dependency, as epidermal sheets from K5AhR-KO mice (4,8) contained normal Vγ3^{+}-DETC. Similarly, putative AhR-dependent factors from LC seem irrelevant for DETC homeostasis, as evident form the results in LangerinAhR-KO mice. In addition, IL-7 and IL-15 mRNA levels were similar in epidermis from WT, AhR-KO and K5AhR-KO mouse strains. Together, these findings point to an intrinsic requirement for AhR regarding the homeostasis of γδ T cells.

Which factor could be relevant in the homeostasis of DETC? Recently, we reported that melanocytes of AhR-deficient mice fail to express c-kit, and consequently did not proliferate well in response to UVB irradiation (46). With regard to γδ T cells, c-kit and its ligand stem-cell factor (SCF) have been described as necessary growth factors for intraepithelial γδ T lymphocytes in the gut (34). Congruent with a role for AhR in c-kit expression, gut specific γδ T cells were reduced by 50% in AhR-deficient mice. As we demonstrate here, a much smaller proportion of the few remaining $V\gamma3^+$-DETC in the epidermis of AhR deficient mice still expressed c-kit. The *c-kit* gene is differentially expressed in cell lineages and in developmental stages (47). Mice with spontaneous mutations in the "W" locus (i.e., *c-kit* locus) demonstrated the role for *c-kit* in germ cells, melanocytes, neural cells and the haematopoietic lineage (48). In the W/W^v mice a point mutation results in aberrantly spliced c-kit transcripts, putatively expressed in a tissue specific manner (49). Interestingly, Puddington and colleagues showed that in W/W^v mice the frequency of $Thy1^+GL3^+$ epidermal cells (i.e., DETC) was comparable to control mice, while frequencies of gut intraepithelial lymphocytes were reduced (34). The authors did not test for c-kit (or Vγ3) expression on these cells, and the difference to our findings in AhR-KO mice could be due to the tissue specific penetrance of the mutation. To our knowledge, we report here expression of c-kit on $V\gamma3^+$-DETC for the first time.

γδ T cells are also found in human epidermis, together with αβ T cells (50); similar to mice their functional capabilities and homeostasis are not fully understood, but evidence suggests that they share biological roles in immunosurveillance and wound healing (43,51,52). Information gained on DETC in mouse may provide new insights into their human counterparts. There are implications of our findings for skin allergies and wound healing, in particular as AhR activity is amenable to modulation by small chemicals. First, our finding of the relevance of DETC cell-produced GM-CSF for LC maturation, might be used to

manipulate LC cells in allergic reactions. Second, our identification of c-kit as a target of AhR and as a relevant factor in DETC homeostasis could be exploited using AhR-agonists in the manipulation of c-kit related cancers, including melanoma or mastocytoma.

In aggregate, we present the novel finding that DETC homeostasis depends on AhR expression in DETC, and we suggest c-kit as an important and AhR-dependent proliferation factor for DETC.

Acknowledgement

We thank Babette Martiensen and Swantje Steinwachs for expert technical help.

References

1. Esser, C., A. Rannug, and B. Stockinger. 2009. The aryl hydrocarbon receptor and immunity. *Trends Immunol.* 9:447-454.

2. Stockinger, B., K. Hirota, J. Duarte, and M. Veldhoen. 2011. External influences on the immune system via activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Semin. Immunol in press. doi:10. 1016/j. semim. 2011. 01. 008*.

3. Jux, B., S. Kadow, and C. Esser. 2009. Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J. Immunol.* 182:6709-6717.

4. Jux, B., S. Kadow, S. Luecke, A. Rannug, J. Krutmann, and C. Esser. 2010. The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates UVB Radiation-Induced Skin Tanning. *J. Invest Dermatol.*

5. Fritsche, E., C. Schafer, C. Calles, T. Bernsmann, T. Bernshausen, M. Wurm, U. Hubenthal, J. E. Cline, H. Hajimiragha, P. Schroeder, L. O. Klotz, A. Rannug, P. Furst, H. Hanenberg, J. Abel, and J. Krutmann. 2007. Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104:8851-8856.

6. Carvajal-Gonzalez, J. M., A. C. Roman, M. I. Cerezo-Guisado, E. M. Rico-Leo, G. Martin-Partido, and P. M. Fernandez-Salguero. 2009. Loss of dioxin-receptor expression accelerates wound healing in vivo by a mechanism involving TGF{beta}. *J. Cell Sci.* 122:1823-1833.

7. Xiong, N., and D. H. Raulet. 2007. Development and selection of gammadelta T cells. *Immunol. Rev.* 215:15-31.

8. Sun, Y. V., D. R. Boverhof, L. D. Burgoon, M. R. Fielden, and T. R. Zacharewski. 2004. Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 32:4512-4523.

9. Prell, R. A., J. A. Oughton, and N. I. Kerkvliet. 1995. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on anti-CD3-induced changes in T-cell subsets and cytokine production. *Int. J. Immunopharmacol.* 17:951-961.

10. Yokota, K., K. Ariizumi, T. Kitajima, P. R. Bergstresser, N. E. Street, and A. Takashima. 1996. Cytokine-mediated communication between dendritic epidermal T cells and Langerhans cells. In vitro studies using cell lines. *J. Immunol.* 157:1529-1537.

11. Sharp, L. L., J. M. Jameson, G. Cauvi, and W. L. Havran. 2005. Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nat. Immunol.* 6:73-79.

12. Jameson, J., and W. L. Havran. 2007. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol. Rev.* 215:114-122.

13. Girardi, M., J. M. Lewis, R. B. Filler, A. C. Hayday, and R. E. Tigelaar. 2006. Environmentally responsive and reversible regulation of epidermal barrier function by gammadelta T cells. *J. Invest Dermatol.* 126:808-814.

14. Girardi, M., D. E. Oppenheim, C. R. Steele, J. M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R. E. Tigelaar, and A. C. Hayday. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294:605-609.

15. Hayday, A. C., H. Saito, S. D. Gillies, D. M. Kranz, G. Tanigawa, H. N. Eisen, and S. Tonegawa. 1985. Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes. *Cell* 40:259-269.

16. Nanno, M., T. Shiohara, H. Yamamoto, K. Kawakami, and H. Ishikawa. 2007. gammadelta T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses. *Immunol. Rev.* 215:103-113.

17. Hayday, A. C. 2009. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity.* 31:184-196.

18. Jameson, J. M., G. Cauvi, D. A. Witherden, and W. L. Havran. 2004. A keratinocyte-responsive gamma delta TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *J. Immunol.* 172:3573-3579.

19. Garman, R. D., P. J. Doherty, and D. H. Raulet. 1986. Diversity, rearrangement, and expression of murine T cell gamma genes. *Cell* 45:733-742.

20. Takashima, A., and P. R. Bergstresser. 1996. Cytokine-mediated communication by keratinocytes and Langerhans cells with dendritic epidermal T cells. *Semin. Immunol.* 8:333-339.

21. Kang, J., and D. H. Raulet. 1997. Events that regulate differentiation of alpha beta TCR+ and gamma delta TCR+ T cells from a common precursor. *Semin. Immunol.* 9:171-179.

22. Boyden, L. M., J. M. Lewis, S. D. Barbee, A. Bas, M. Girardi, A. C. Hayday, R. E. Tigelaar, and R. P. Lifton. 2008. Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat. Genet.* 40:656-662.

23. Taghon, T., M. A. Yui, R. Pant, R. A. Diamond, and E. V. Rothenberg. 2006. Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity.* 24:53-64.

24. Jiang, X., J. J. Campbell, and T. S. Kupper. 2010. Embryonic trafficking of gammadelta T cells to skin is dependent on E/P selectin ligands and CCR4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107:7443-7448.

25. Schmidt, J. V., and C. A. Bradfield. 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:55-89.

26. Denison, M. S., and S. R. Nagy. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:309-334.

27. Kimura, A., T. Naka, T. Nakahama, I. Chinen, K. Masuda, K. Nohara, Y. Fujii-Kuriyama, and T. Kishimoto. 2009. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J. Exp. Med.* 206:2027-2035.

28. Vogel, C. F., E. Sciullo, W. Li, P. Wong, G. Lazennec, and F. Matsumura. 2007. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.* 21:2941-2955.

29. Safe, S., M. Wormke, and I. Samudio. 2000. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* 5:295-306.

30. Frericks, M., M. Meissner, and C. Esser. 2007. Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220:320-332.

31. Jeon, M. S., and C. Esser. 2000. The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS transcription factor family. *J. Immunol.* 165:6975-6983.

32. Martin, B., K. Hirota, D. J. Cua, B. Stockinger, and M. Veldhoen. 2009. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity.* 31:321-330.

33. Schmidt, J. V., G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon, and C. A. Bradfield. 1996. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:6731-6736.

34. Puddington, L., S. Olson, and L. Lefrancois. 1994. Interactions between stem cell factor and c-Kit are required for intestinal immune system homeostasis. *Immunity.* 1:733-739.

35. Uche, U. N., C. R. Huber, D. H. Raulet, and N. Xiong. 2009. Recombination signal sequence-associated restriction on TCRdelta gene rearrangement affects the development of tissue-specific gammadelta T cells. *J. Immunol.* 183:4931-4939.

36. Havran, W. L., and J. P. Allison. 1988. Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* 335:443-445.

37. Hundeiker, C., T. Pineau, G. Cassar, R. A. Betensky, E. Gleichmann, and C. Esser. 1999. Thymocyte development in Ah-receptor-deficient mice is refractory to TCDD-inducible changes. *Int. J. Immunopharmacol.* 21:841-859.

38. Wang, T., K. E. Langley, W. K. Gourley, and G. R. Klimpel. 2000. Stem cell factor (SCF) can regulate the activation and expansion of murine intraepithelial lymphocytes. *Cytokine* 12:272-280.

39. Yamaguchi, Y., and V. J. Hearing. 2009. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 35:193-199.

40. Majora, M., M. Frericks, V. Temchura, G. Reichmann, and C. Esser. 2005. Detection of a novel population of fetal thymocytes characterized by preferential emigration and a TCRgammadelta+ T cell fate after dioxin exposure. *Int. Immunopharmacol.* 5:1659-1674.

41. Jin, Y., M. Xia, A. Sun, C. M. Saylor, and N. Xiong. 2010. CCR10 is important for the development of skin-specific gammadeltaT cells by regulating their migration and location. *J. Immunol.* 185:5723-5731.

42. De, C. A., B. K. Van, F. Stevenaert, V. Debacker, J. Plum, and G. Leclercq. 2002. Developmental and functional defects of thymic and epidermal V gamma 3 cells in IL-15-deficient and IFN regulatory factor-1-deficient mice. *J. Immunol.* 168:6486-6493.

43. Havran, W. L., and J. M. Jameson. 2010. Epidermal T cells and wound healing. *J. Immunol.* 184:5423-5428.

44. Shiohara, T., N. Moriya, J. Hayakawa, S. Itohara, and H. Ishikawa. 1996. Resistance to cutaneous graft-vs.-host disease is not induced in T cell receptor delta gene-mutant mice. *J. Exp. Med.* 183:1483-1489.

45. Lai, Z. W., T. Pineau, and C. Esser. 1996. Identification of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5' regions of putative dioxin-inducible genes. *Chem. Biol. Interact.* 100:97-112.

46. Kawaguchi, Y., N. Mori, and A. Nakayama. 2001. Kit(+) melanocytes seem to contribute to melanocyte proliferation after UV exposure as precursor cells. *J. Invest Dermatol.* 116:920-925.

47. Hayashi, S., T. Kunisada, M. Ogawa, and S. Nishikawa. 1995. Identification of the control regions for mouse c-kit gene transcription induced by retinoic acid. *DNA Res.* 2:211-218.

48. Bernstein, A., B. Chabot, P. Dubreuil, A. Reith, K. Nocka, S. Majumder, P. Ray, and P. Besmer. 1990. The mouse W/c-kit locus. *Ciba Found. Symp.* 148:158-166.

49. Hayashi, S., T. Kunisada, M. Ogawa, K. Yamaguchi, and S. Nishikawa. 1991. Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in W/W mouse. *Nucleic Acids Res.* 19:1267-1271.

50. Dupuy, P., M. Heslan, S. Fraitag, T. Hercend, L. Dubertret, and M. Bagot. 1990. T-cell receptor-gamma/delta bearing lymphocytes in normal and inflammatory human skin. *J. Invest Dermatol.* 94:764-768.

51. Toulon, A., L. Breton, K. R. Taylor, M. Tenenhaus, D. Bhavsar, C. Lanigan, R. Rudolph, J. Jameson, and W. L. Havran. 2009. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J. Exp. Med.* 206:743-750.

52. Ebert, L. M., S. Meuter, and B. Moser. 2006. Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J. Immunol.* 176:4331-4336.

Figure Legends

Figure 1

Frequencies and morphology of DETC

Epidermal cells were isolated from ear, back or tail skin. Dead cells and doublettes were excluded by PI staining and scatter gate. (A) Dotplot of WT vs. AhR-KO epidermal cells. Numbers indicate percentages per all live epidermal cells. The gate used to determine $\gamma\delta TCR^{+}CD3^{+}$ cells is indicated by the oval circle (B) Frequencies of $V\gamma3^{+}$ within the $\gamma\delta TCR^{+}CD3^{+}$ cells prepared from different skin regions of WT (black bars), AhR-KO (white bars) and K5AhR-KO mice (grey bars). Data are representative of at least three independent experiments. ** $p< 0.01$ by ANOVA. (C) Immunohistological photographs (400x magnification) of epidermal sheets of WT (a, 200x magnification c), AhR-KO (b, 200x magnification d), K5AhR-KO (e), and LangerinAhR-KO (f). Sheets were stained with anti-$V\gamma3^{FITC}$ and anti-I-A/I-E $^{Texas\ Red}$.

Figure 2

γδ T cells in the fetal thymus

Thymus cell suspensions from embryonic day (ED) 15 to 17 were prepared, stained for γδTCR ($GL3^{+}$) and $V\gamma3^{+}$ cells, and analysed by FACS, after gating on live cells. (A) Thymocyte numbers from thymi of 5-17 individual mice ± SD; (B) Representative dot plot of γδ TCR/Vγ3 staining (ED16) (C) Frequencies of total γδ TCR^{+} cell precursors from WT and AhR-KO mice (upper curves, right ordinate) and γδ $TCR^{+}/V\gamma3^{+}$ double positive WT and AhR-KO cells (lower curves, left ordinate). (D) Absolute numbers of γδ $TCR^{+}V\gamma3^{+}$, calculated from the respective frequencies above, and thymocyte numbers. N=3-9 individual mice; ***p<0.001 with *student´s t test*.

Figure 3

Kinetics of DETC in the epidermis of new-born mice

Epidermal cells from mice were prepared at the indicated age and analysed flow cytometrically. (A) Frequencies of $\gamma\delta TCR^+/V\gamma3^+$ in epidermal cells. Mean ± SD from 4-7 individual mice/time point. Insert in (A): Frequencies of $\gamma\delta$ $TCR^+/V\gamma3^+$ cells on day 2 and 7 after birth. (B) Morphology of DETC (stained with anti-$V\gamma3^{FITC}$, white arrows) in epidermal sheets of WT at day 7 (a) and 14 (c) and AhR-KO mice at days 7 (b) and 14 (d). (C) Histograms of expression intensity of $V\gamma3^+$ on $\gamma\delta TCR^+CD3^+$ gated live cells in epidermis; *p<0.05; **p < 0.01; ***p<0.001 with *student´s t-test.*

Figure 4

AhR-dependent c-kit expression

(A) Flow cytometric analysis of *c-kit* (CD117) and Vγ3 expression on epidermal $\gamma\delta TCR^+CD3^+$ cells from WT, AhR-KO and K5AhR-KO mice. Epidermal cells were cultivated for 24 hours prior to FACS analysis to allow re-expression of CD117 after trypsinization. Depicted is one of two representative experiments with at least three individual mice. (B) RNA expression levels of soluble (sSCF) and membrane bound (mSCF) SCF, determined by RT-PCR from epidermal cells of WT (lanes 1,2) , AhR-KO (lanes 3,4) and K5AhR-KO (lanes 5,6) mice, compared to Rps6 house keeping gene amplified from the same samples. Each lane shows the result for one individual mouse (C) Western Blot detection of AhR and GAPDH in protein extracts of $\gamma\delta TCR^+CD3^+$ T cells, sorted to >97% purity. (D) Bar graph showing relative units of luminescence (RUL) after transfection with indicated reporter

plasmids. One representative experiment out of three is shown (three replicates, mean ± SD). Statistical significances were calculated by ANOVA (**/##p<0.01; ***/###p<0.001;).

Figure 5

Depletion of γδ T cells from epidermal cells reduces GM-CSF levels and affects LC maturation

(A) GM-CSF levels in supernatants (24 h/48 h) of cultivated epidermal cells from WT (black bars), AhR-KO (white bars) and K5AhR-KO (grey bars), or epidermal cells from WT and K5AhR-KO depleted of γδ T cells by MACS. Shown is one out of two representative experiments. N=3 individual mice. Statistical significances were calculated by ANOVA (**p< 0.01, undepleted vs. γδ T cell-depleted epidermal cells; #p<0.05, AhR-KO vs. WT and K5AhR-KO epidermal cells. (B/C) Bar graph depicting the frequency of WT $MHCII^+$ LC expressing CD80 (B) or their mean scatter characteristics (C) after 48 hours of epidermal cell culture. N=3 mice. (**p<0.01; ***p<0.001 with *student´s t-test*)

Table I Surface expression of different surface markers on $CD3^+GL3^+/V\gamma3^+$ cells in WT and $AhR^{-/-}$ mice

	$CD3^+GL3^+$		$CD3^+GL3^+V\gamma3^+$[b]					
	Vγ3[a]	Vγ2[a]	CD90.2	CD69	CD103	CD122	CD127	CD117
WT	99/99/98	<1	100/99/99	84/88/80	99/100/100	96/99/97	4/8/5	84/83/89
AhR-/-	60/64/45	34/21/41	97/98/97	34/53/62	90/91/89	86/99/82	9/10/14	44/44/58

[a] Epidermal cells were stained for γδTCR (GL3), CD3, and Vγ3 or Vγ2 to determine the frequency of Vγ3/Vγ2 positive cells

[b] cells were stained for CD3, GL3, Vγ3 and the indicated surface markers. Cells were gated first on $\gamma\delta TCR^+CD3^+$ cells (see gate Figure1A), and then on $V\gamma3^+$ cells and the frequencies of the cells expressing the indicated surface markers was determined. Data are given as % positive cells for three individual mice.

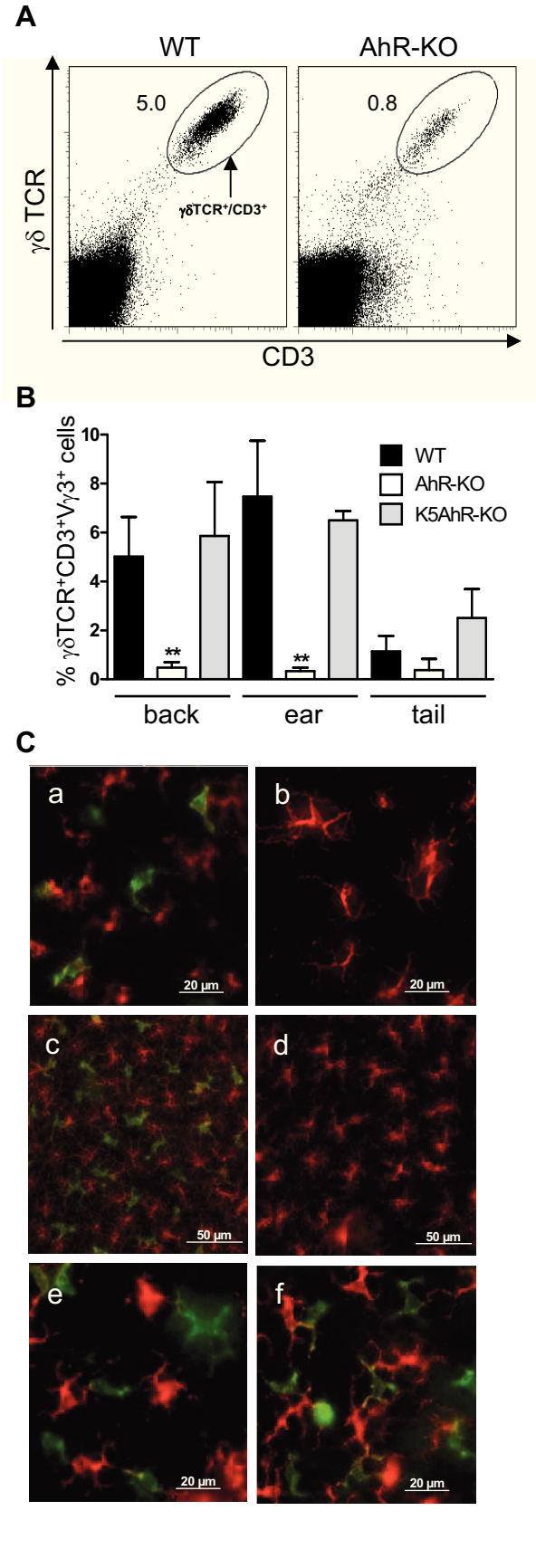
Table II Frequencies of γδ TCR$^+$ epidermal cells in G_0/G_1- Phase

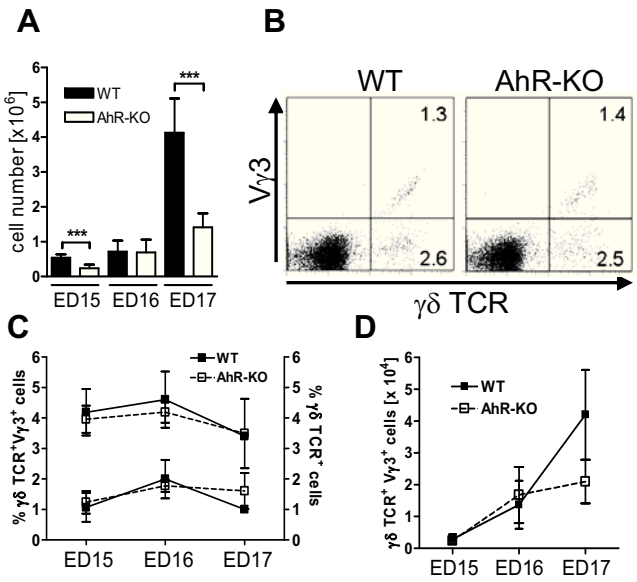
	d2[a]	d7	d10	d14	d84
	G_0/G_1-Phase[b]	G_0/G_1-Phase	G_0/G_1-Phase	G_0/G_1-Phase	G_0/G_1-Phase
AhR$^{+/-}$[c]	86.9 ± 1.4	83.4 ± 1.4	84.0 ± 0.6	**95.6 ± 0.3***	98.7 ± 0.1
AhR$^{-/-}$	88.2 ± 1.0	**89.5 ± 0.9***	**88.5 ± 0.6*****	94.1 ± 0.5	97.9 ± 0.5

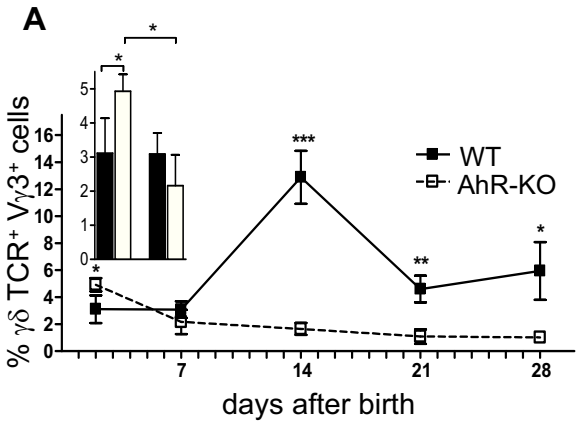
[a] Epidermal cells were prepared from mice on days 2 to 84 after birth, surface stained for γδ TCR and counterstained for DNA content with propidium iodide. Significant differences in bold letter, * <0.01; *** < 0.0005 by *student´s t-test*

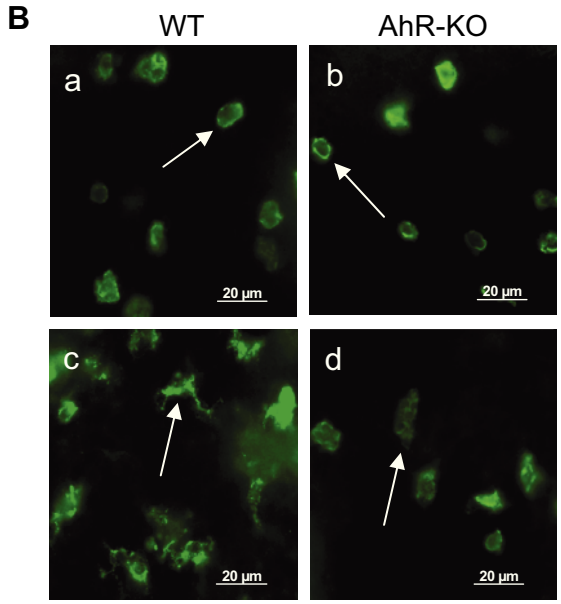
[b] Percentages ± SD from 3-7 individual mice in G_0/G_1 phase, all other cells were in $S/G_2/M$ Phase

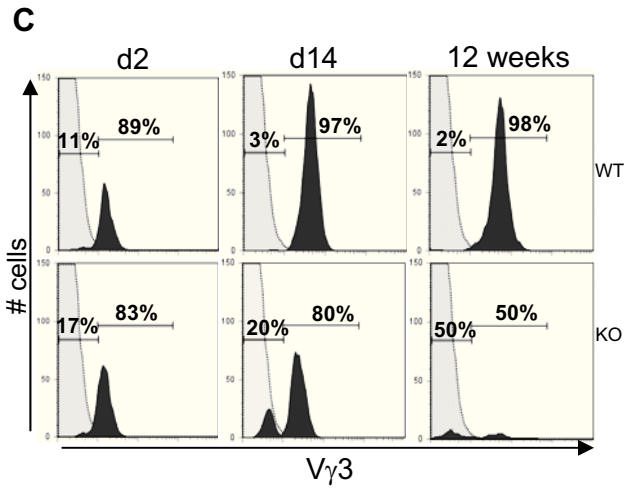
[c] AhR-heterozygotes, littermates of AhR-/- mice used in these experiments

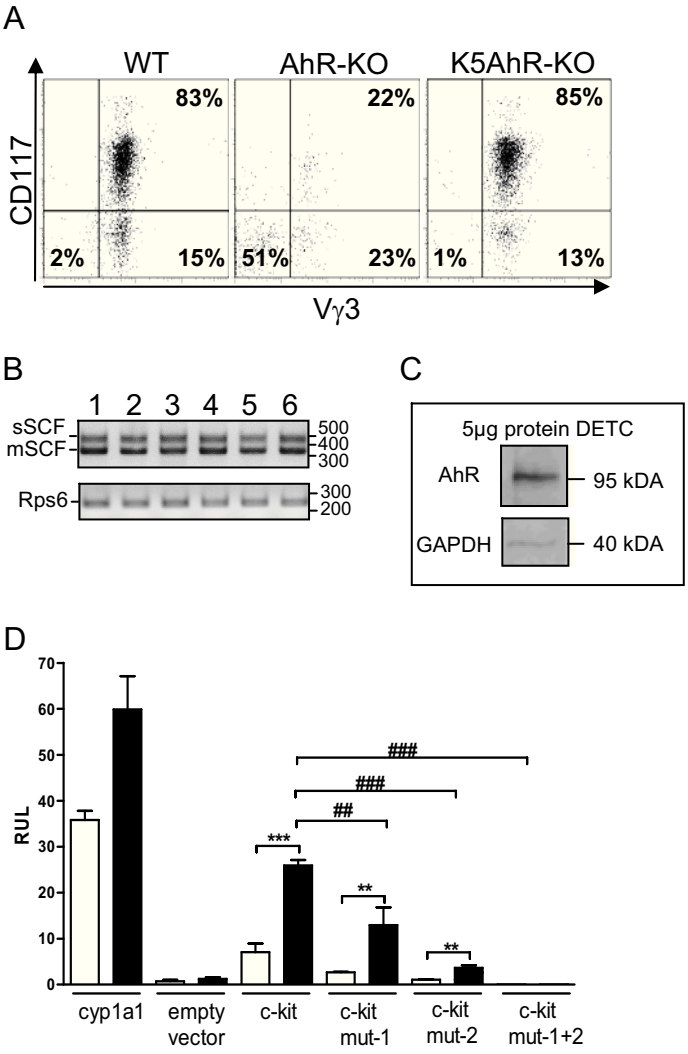

A
WT
AhR-KO
5.0
0.8
γδTCR+/CD3+
γδ TCR
CD3
B
% γδTCR+CD3+Vγ3+ cells
10
8
6
4
2
0
**
**
WT
AhR-KO
K5AhR-KO
back
ear
tail
C
a
b
c
d
e
f
20 μm
20 μm
50 μm
50 μm
20 μm
20 μm

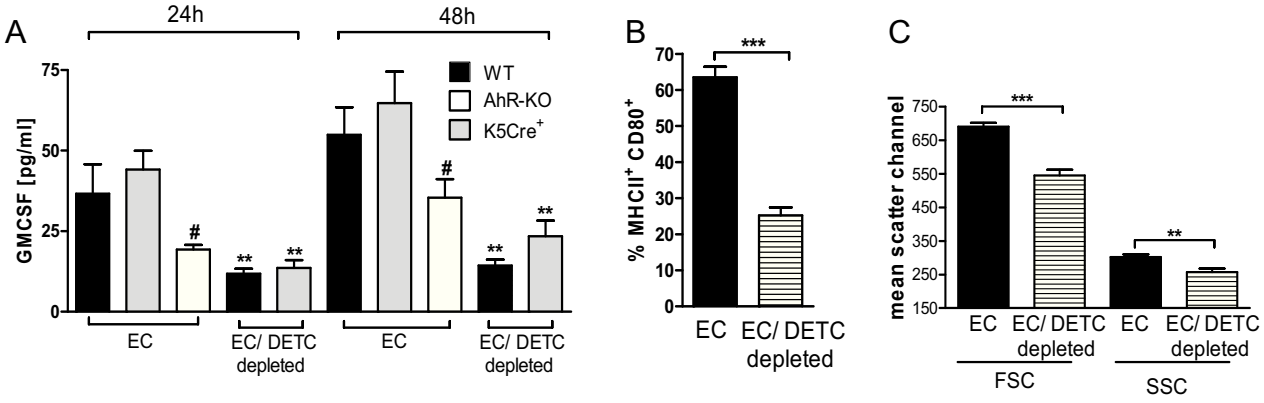

A
B
WT
AhR-KO
cell number [x10^6]
***
***
ED15
ED16
ED17
WT
AhR-KO
1.3
1.4
2.6
2.5
Vγ3
γδ TCR
C
D
WT
AhR-KO
% γδ TCR+Vγ3+ cells
% γδ TCR+ cells
γδ TCR+ Vγ3+ cells [x 10^4]
ED15
ED16
ED17


A
% γδ TCR+ Vγ3+ cells
days after birth
WT
AhR-KO
7
14
21
28


B
WT
AhR-KO
a
b
c
d
20 µm


C
d2
d14
12 weeks
11%
89%
3%
97%
2%
98%
17%
83%
20%
80%
50%
50%
WT
KO
cells
Vγ3


A
WT
AhR-KO
K5AhR-KO
CD117
83%
22%
85%
2%
15%
51%
23%
1%
13%
Vγ3
B
1 2 3 4 5 6
sSCF
mSCF
500
400
300
Rps6
300
200
C
5µg protein DETC
AhR
95 kDA
GAPDH
40 kDA
D
RUL
70
60
50
40
30
20
10
0
###
###
##
***
**
**
cyp1a1
empty vector
c-kit
c-kit mut-1
c-kit mut-2
c-kit mut-1+2


A
24h
48h
WT
AhR-KO
K5Cre+
GMCSF [pg/ml]
75
50
25
0
#
**
**
#
**
**
EC
EC/ DETC depleted
EC
EC/ DETC depleted
B
***
% MHCII+ CD80+
70
60
50
40
30
20
10
0
EC
EC/ DETC depleted
C
***
**
mean scatter channel
750
650
550
450
350
250
150
EC
EC/ DETC depleted
EC
EC/ DETC depleted
FSC
SSC

Supplementary data S1

Antibodies and Primers used

A)

Monoclonal antibodies purchased from BD Bioscience or BioLegend (Fell, Germany):

anti-TCR γδ (Clone GL3); anti-TCR Vγ3 (clone 536); anti-TCR Vγ2 (clone UC3-10A6); anti-I-A/I-E (clone M5/114.15.2); anti- CD3ε (clone 145-2C11); anti-CD4 (clone RM4-5); anti-CD8α (clone 53-6.7); anti-CD8β (clone H35-17.2); anti-CD24 (clone M1/69); anti-CD25 (clone PC61); anti-CD69 (clone H1.2F3); anti-CD90.2 (clone 30-H12); anti-CD103 (clone 2E7); anti-CD117 (clone 2B8); anti-CD122 (clone TM-β1); anti-CD127 (clone A7R34);

B)

Sequences of PCR primers used in this study (forward and reverse):
AhR, 5´-AGG ACC AAA CAC AAG CTA GA-3´and 5´-TGG AGA TCT CGT ACA ACA CA-3´;
AhRR, 5´-GCC AAT GCT GTC TAA TGA AG-3´ and 5´- AAC AGA GCA CCA AGA AAA CA-3´;
Cyp1A1, 5´-TCC TTG CAT GTC CAT GTT TC-3´and 5´- TGC ATA AGC AAA ATA CAG TCC-3´;
IL-2, 5´-ATG TAC AGC ATG CAG CTC GAC TC-3´ and 5´- GGC TTG TTG AGA TGA TGC TGC TTT GAC A-3´;
IL-7, 5´-CGC AGA CCA TGT TCC ATG T-3´ and 5´- TCT TTA ATG TGG CAC TCA GAT GAT-3´;
IL-15, 5´-CAG TGA CTT TCA TCC CAG TT-3´ and 5´-CAT TTG GAC AAT GCG TAT AA-3´;
Tnfα, 5´- GAC CCT CAC ACT CAG ATC AT-3´ and 5´-TTG AAG AGA ACC TGG GAG TA-3´;
Rps6, 5´- ATT CCT GGA CTG ACA GAC AC-3´and 5´- GTT CTT CTT AGT GCG TTG CT-3´;
Scf1 5´-GAA TCT CCG AAG AGG CCA GAA ACT AGA TCC TTT-3´ and 5´-CGT CCA CAA TTA CAC CTC TTG AAA TTC TCT CTC -3´.

Cloned promotor fragments of c-kit and cyp450 1A1

AREs (5´- GCGTG-3` or reverse CACGC) are bold and underlined, inserted mutations (CG to AT) of c-kit are marked by asterix.

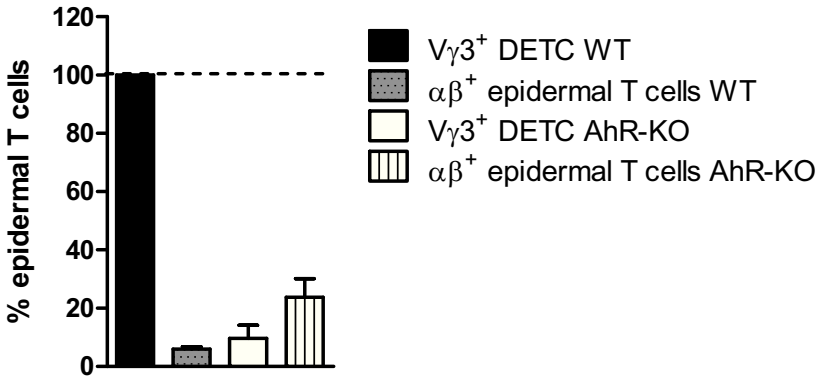
cyp1A1:
5´-
GTCCTGCCACTAAAAATGTGGACACACGCTGTTCAGGCCTTTGCTCTCAGGCAGAAGCCGAGCAT
CGCACGCAAACCCGGCCCTTTGCACCGCTGGCGCTGTCTTGTCGCGCCCTTGCAAAGCATAGAC
TATTTCTATCTCTTAAACCCCACCCCAACGCCCCAGGAGAGCTGGCCCTTTAAGAGCCTCACCCA
CGGTTCCCCTCCCCCAGCTAGCGTGACAGCACTGGGACCCGCGCCCGGTTGTGAGTTGGGTAG
CTGGGTGGCTGCGCGGGCCTCCAGGCTCTTCTCACGCAACTCCGGGGCACCTTGTCCCCAGCC
AGGTGGGGCGGAGACAGGCAGCCCGACCTCTGCCCCCAGAGGATGGAGCAGGCTTACGCACGC
TAGCCTCAGGAACCTGTGTGCGTGCCAAGCATCACCCTTTGTAGC-3´

c-kit:
5´-
CCGTACCTAATGCGCTCGTGGCGCTGGGCTTCACAAAGCGCGGGCAGCACCT**GC*G*TG**GCCAG
CCAGCCGCCTGGACTGAAGGACCACCGATGGAGGGAGAGTGCTAGGAGGAAGAGGATCCAGGG
TGGAGGGCCTGTGGGGGCTCCTGGTCTTAGAGGGCACAGCGCCCCCGGGATCAGCTTATTGCA
GCCCGAGAGCCCCGGGCACTAGGCAGCGGGAGGGAGTGCGACCCGGGCGGGAGAAGGGAGG
G**GC*G*TG**GCCACGAGCTGGGAGGAGGGCTGGAGGAGGGGCTGTCGCGCGCCGCTAGTGGCTC
TGGGGGCTCGGCTTTGCCGCGCTCGGTGCACTTGGGCGAGAGCTGTAG-3´

Supplementary data S2

DETC are not replaced by ab T cells in AhR-KO

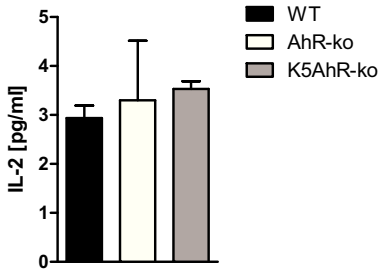
A



Epidermal cells were isolated from the indicated mouse strains and stained for either Vγ3+DETC or αβ TCR+ T cells. Bars show percentages of cells in relation to WT Vγ3+DETC, whose mean frequency was set to 100% (average from 8 mice). % ±SD are shown for bars 2-4. N=3-5. The dotted line is for clarity, and shows 100%.

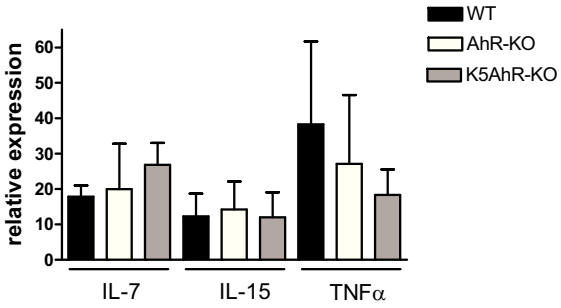
Cytokine expression in epidermal cells of WT, AhR-KO, and K5AhR-KO

B



IL2 ELISA from epidermal cells from the indicated mouse strains, cultivated for 24 hours in complete RPMI1640 Medium. Culture supernatants were collected and measured with an R&D commercial ELISA.

C

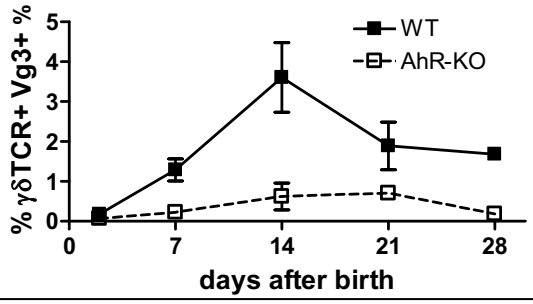


qRT-PCR was performed as described in Material and Methods with freshly isolated epidermal cells. For primers see Supporting information S6.
mRNA Levels of IL-7, IL-15 and TNFα were measured relative to Rps6 housekeeping gene with the ΔΔct method. Shown is the mean ± SD. N = 3-6 individual mice.

Supplementary data S3

DETC are not retained in the dermis

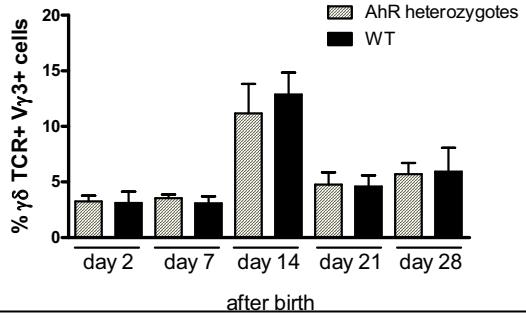
A



Dermis was prepared from AhR-KO and WT mice, after Epidermis was removed (see material and methods). Briefly, dermis was incubated in RPMI containing 2,5mg/ml Collagenase P, 2000U/mg DNAseI, for 45 minutes at 37°C. Single cell suspension were obtained by vigorous pipetting, counted and stained for γδ TCR (GL3) and Vγ3+ cells. Dead cells were excluded from the analysis by gating on propidium iodide negative cells. Shown is the mean ± SD. N = 3-6 individual mice.

AhR+/+ and AhR+/- heterozygotes have similar frequencies of DETC

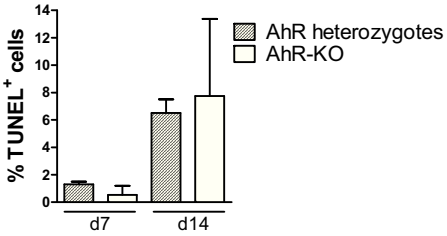
B



Comparison of γδ TCR+ Vγ3+ DETC in AhR-heterozygous littermates and WT mice, at different time points after birth. Shown is the mean ± SD. N =3-11 individual mice

No difference in apoptotic cells between AhR+/- and AhR-/-

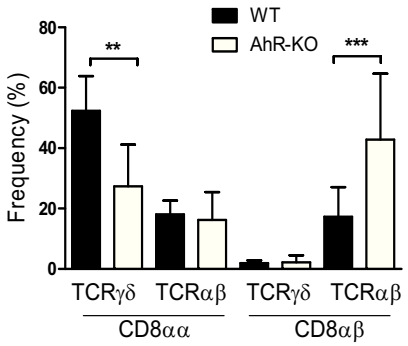
C



TUNEL staining was performed according to manufacturs instructions (in-situ cell death detection kit, Roche Applied Science) and cells analysed flow cytometrically. Epidermal cells were gated on $CD3^{hi}\gamma\delta$ TCR^{hi} cells. Shown is the mean frequency ± SD of TUNEL positive cells N =3-5 individual mice

gut intraepithelial T cell distribution and gd T cells in gut epithelium

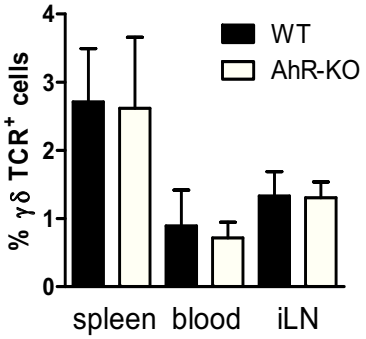
D



D) <Frequency of intraepithelial lymphocyte subpopulations in control (black bars) and AhR-KO (white bars) mice. IELs were defined as all $CD3^+$ cells, which were isolated from murine small intestine by 5mM EDTA. Results are shown ± SD from 13 mice out of 6 independent experiments. Statistical differences were calculated using ANOVA **p<0.1, *** p<0.01

Method: AhR-KO and control mice were sacrificed by cervical dislocation, the small intestine was removed (without mesenteric tissue) and flushed with cold PBS using a syringe and blunt needle. The intestine was first opened longitudinally and then cut into app. 2cm pieces. After a washing step with PBS, the pieces were shaken for 45min in 5mM EDTA in PBS at 37°C. The solution was filtered through a 100µm Nylon mesh .To remove any residual particulate matter, the cell suspension was added to the 25% fraction of a 75%/40%/25% PerColl gradient and centrifuged at room temperature at 500g for 20min. Intraepithelial lymphocytes were obtained from the 75%/40% interface and then stained for FACS analysis with the following antibodies: FITC-anti TCRγδ (GL3; ebioscience), PE-anti CD8β (BD), PerCP-anti CD8α (BD) and APC-anti CD3ε (ebioscience). Each intestine yielded 1.5 – 3 million cells, viability was 80% or higher.

E



E) Frequency of γδ TCR^+ $Vγ3^+$ cells in blood, spleen, and inguinal lymph node (iLN) in WT (black bar) and AhR-KO mice (white bar). Results are shown ± SD from at least three individual mice.

Supplementary data S4

Validation of Langerhans cell specific AhR-deficient mice



A Verification of Langerhans cell specific AhR knock out

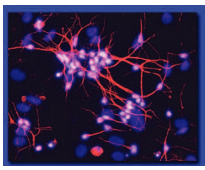
Langerhans cells (LC) from Langerin-Cre^{positive} and Langerin-Cre^{negative} mice were enriched by MHCII MACS, then and sorted by FACS. DNA was prepared and analyzed for the presence of AhR as described in Wallisser et al., PNAS 102, 17853 (2005) and in Jux et al., J Invest Dermatol. 2011 Jan;131(1):203-10 for K5Cre+ (K5-AhR-KO) mice.

(M) Marker,
(1) 96% purified LC Langerin-AhR-KO^{-} mice
(2) 98% purified LC from WT mice
(3) epidermal cells from Langerin-AhR-KO mice
(4) epidermal cells from WT mice
(5) liver cells from Langerin-AhR-KO mice
(6) liver cells from WT mice

B Sensitivity of assay regarding contaminating cells

As in the gel electrophoresis above a small band of unexcised DNA is visible in the LC+ lane (lane 1 in A), we analyzed whether this could be due to keratinocyte (KC) contamination (96%LC and 4% KC after sorting). Therefore AhR-negative and AhR-positive kerationocytes were mixed in various ratios and PCR-amplified for the deletion.

Keratinocytes of K5-AhR-KO mice were purified to 100% (1) and titrated by adding 5% (2), 10% (3), 15%(4) or 20% (5) of K5 wild-type


R&D Systems Quality-Tested Antibodies
Over 10,000 antibodies for a wide variety of applications including:
✓ Western Blot ✓ Flow Cytometry ✓ Immunocytochemistry ✓ Neutralization
Click here for more information
R&D SYSTEMS

THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY

Langerhans Cell Maturation and Contact Hypersensitivity Are Impaired in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Mice

Bettina Jux, Stephanie Kadow and Charlotte Esser

J Immunol 2009;182;6709-6717
doi:10.4049/jimmunol.0713344
http://www.jimmunol.org/content/182/11/6709

This information is current as of March 20, 2011

Supplementary Data **http://www.jimmunol.org/content/suppl/2009/05/18/182.11.6709.DC1.html**

References This article **cites 64 articles**, 29 of which can be accessed free at:
http://www.jimmunol.org/content/182/11/6709.full.html#ref-list-1

Article cited in:
http://www.jimmunol.org/content/182/11/6709.full.html#related-urls

Subscriptions Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at
http://www.jimmunol.org/subscriptions

Permissions Submit copyright permission requests at
http://www.aai.org/ji/copyright.html

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at
http://www.jimmunol.org/etoc/subscriptions.shtml/

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright ©2009 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.

Downloaded from www.jimmunol.org on March 20, 2011

Langerhans Cell Maturation and Contact Hypersensitivity Are Impaired in Aryl Hydrocarbon Receptor-Null Mice[1]

Bettina Jux, Stephanie Kadow, and Charlotte Esser[2]

Langerhans cells (LC) are professional APCs of the epidermis. Recently, it was suggested that they are tolerogenic and control adverse immune reactions, including against low molecular mass chemicals. The aryl hydrocarbon receptor (AhR), a ligand-activated transcription factor, is involved in low molecular mass chemical metabolism and cell differentiation. Growing evidence suggests a role for the AhR in the immune system, for example, by influencing dendritic cell and T cell differentiation. We found that the AhR and its repressor AhRR are expressed in LC of C57BL/6 mice. LC, unexpectedly, did not respond to a strong AhR agonist with induction of transcripts of xenobiotic metabolizing enzymes. To test for a physiological role of the AhR in LC, we investigated how AhR deficiency affects LC. We found that AhR-deficient LC were impaired in maturation; they remained smaller and less granular, did not up-regulate expression of costimulatory molecules CD40, CD80, and CD24a during in vitro maturation, and their phagocytic capacity was higher. Interestingly, the mRNA expression of tolerogenic *Ido* was severely decreased in AhR-deficient LC, and enzyme activity could not be induced in AhR-deficient bone marrow-derived dendritic cells. GM-CSF, needed for LC maturation, was secreted in significantly lower amounts by AhR-deficient epidermal cells. Congruent with this impaired maturity and capacity to mature, mice mounted significantly weaker contact hypersensitivity against FITC. Our data suggest that the AhR is involved in LC maturation, both cell autonomously and through bystander cells. At the same time, the AhR might be part of the risk strategy of LC against unwanted immune activation by potential skin allergens. ***The Journal of Immunology,*** **2009, 182: 6709–6717.**

Langerhans cells (LC),[3] which make up 1–3% of the epidermal cells, are the main APCs in the skin, where they act as sentinels. As dendritic cells (DC), they acquire, process, and subsequently present both foreign and self-Ags to T lymphocytes in lymphoid organs, leading to either the induction of immune responses or tolerance. The skin is an important barrier to the environment and is in constant contact with pathogens and biological and anthropogenic substances. Low molecular mass chemicals and their intracellular metabolites are usually not recognized by T cells. However, if these chemicals are capable of binding to proteins they may become part of a presented peptide and thus form neoantigens. It is well known that highly protein-reactive chemicals can lead to sensitization after dermal contact, resulting in contact hypersensitivity (CHS) (1).

Inert low molecular mass chemicals can become protein-reactive as a result of degradation by detoxifying enzymes of the xenobiotic metabolizing enzyme system, such as cytochrome P450 isozymes, or NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1). The aryl hydrocarbon receptor (AhR), a ligand-activated transcription factor that belongs to a highly conserved family of basic helix-loop-helix proteins, is known to be a sensor of certain low molecular mass chemicals and is able to induce genes of the xenobiotic metabolizing enzyme system, which metabolize these compounds in turn. Upon ligand binding the AhR translocates from the cytosol to the nucleus where it forms a heterodimer with the AhR nuclear translocator (ARNT). This dimer binds to xenobiotic-responsive elements present in many promoters and leads to transcription of a wide range of genes not only for xenobiotic metabolism but also genes involved in regulation of cell differentiation, proliferation, and activation (reviewed in Ref. 2). The AhR pathway is regulated by the AhR repressor (AhRR), a target gene of the AhR in a negative feedback loop. The AhRR competes with AhR for the binding site of ARNT and forms a transcriptionally inactive complex (3).

It is known that the skin performs active metabolic functions, including xenobiotic metabolism. For instance, cytochrome P450 monooxygenase CYP1A1, an important xenobiotic metabolizing enzyme and most prominent target gene of the AhR, is expressed in the epidermis, more precisely in keratinocytes (4). The skin is also a target organ of the deleterious effects of toxic AhR activation by environmental pollutants, causing human skin diseases such as chloracne, hyperkeratosis, and photosensitivity. These diseases occurred after human exposure to the AhR ligand 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (5). In the immune system, abnormalities in development and immunosuppression were observed, either after overactivation (i.e., TCDD exposure) or in the absence of the AhR in gene-deficient mouse strains (6–10). Recent studies have pointed to dendritic cells (DC) as the direct target of TCDD and congeners, which then mediate the immunosuppressive effects on T and B cells (11–13).

It appears self-evident that immune responses against low molecular mass chemicals must be under strict control in the skin to

Institut für umweltmedizinische Forschung at the Heinrich-Heine University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

Received for publication November 5, 2007. Accepted for publication March 19, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[1] This research was supported through the German Bundesministerium für Umwelt (Grant BMU.B2).

[2] Address correspondence and reprint requests to Dr. Charlotte Esser, Institut für umweltmedizinische Forschung, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf, Germany. E-mail address: chesser@uni-duesseldorf.de

[3] Abbreviations used in this paper: LC, Langerhans cell; AhR, aryl hydrocarbon receptor; AhRR, AhR repressor; ARNT, AhR nuclear translocator; BM, bone marrow; BMDC, bone marrow-derived dendritic cell; CHS, contact hypersensitivity; DC, dendritic cell; NQO1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; WT, wild type.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/$2.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0713344

Downloaded from www.jimmunol.org on March 20, 2011

suppress frequent unwanted allergic reactions. Recently, in a shift of paradigm, novel findings have suggested that LC, beyond initiating CHS (14), have regulatory and tolerogenic functions (15). Furthermore, LC were shown to be unable to elicit T cell responses to certain viral Ags (16, 17). The underlying mechanisms are not known.

We here study parameters of LC maturation and biology in $AhR^{-/-}$ mice. Congruent with the observed functional and phenotypic impairments, we find a failure to generate CHS. Our data point to a critical role of the AhR in normal LC maturation.

Materials and Methods

Experimental animals

C57BL/6 mice were purchased from Janvier Laboratories, and $AhR^{-/-}$ mice (bred onto the C57BL/6 background) were from Charles River Laboratories. These mice lack a functional AhR, as the bHLH domain is deleted (18). Mice were bred and housed in our own animal facility under specific pathogen-free conditions. Six- to 12-wk-old female mice received a subtoxic dose of 10 μg TCDD/kg body weight i.p. (LGC Standards) initially dissolved in DMSO and then diluted in corn oil (Sigma-Aldrich) or vehicle (DMSO in corn oil) alone. Mice were sacrificed by CO_2 asphyxiation for removal of organs. The experiments have been reviewed and permitted in accordance with relevant German animal welfare laws.

Cell preparations

Epidermal cell suspensions were prepared from ears and dorsal skin of C57BL/6 and $AhR^{-/-}$ mice as described elsewhere with some modifications (19). Briefly, skin was rinsed with 70% alcohol; ears were split with the aid of forceps and placed, dermal side down, on a 0.25% trypsin/PBS solution for 2 h at 37°C. In the case of dorsal skin, the s.c. fat was scraped off before placement on trypsin. Epidermal sheets were then peeled from the underlying dermis and floated in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L -glutamine, 5×10^{-5} M 2-ME, 0.15% sodium hydrogencarbonate, 1 mM sodium pyruvate, nonessential amino acids, 100 U/ml penicillin, and 100 μg/ml streptomycin (PAA Laboratories), hereafter referred to as complete medium. Cells were released by breaking up sheets with forceps and vigorous pipetting. The resulting cell suspension consisted of ~90% keratinocytes and 1–3% LC. These cells are referred to as "epidermal cells" in the text.

For cell culturing of epidermal cells, an additional digestion with DNase I (15 min, 130 U/ml; Invitrogen) was included. The resulting single-cell suspension either was used directly for sorting or was cultured in complete medium for various times at a density of 1.5×10^6 cells/ml in 6-well plates. For sorting, epidermal cells were centrifuged on dense BSA or OptiPrep (Sigma-Aldrich) as described (19), or according to the instructions of the manufacturer. The low-density fraction contained 20–35% LC, which were enriched by FACS sorting of vital MHC-II^+ cells using a FACSCalibur (BD Biosciences) to a purity of >95%. Sort purity was verified by reanalysis of samples.

CHS assay

Mice were sensitized by painting 200 μl of 0.05% (w/v) FITC on their shaved backs. FITC was dissolved in a 1:1 (v/v) mixture of acetone/dibutylphtalate. For negative controls, mice were painted with solvent only. Five days later the ear thickness of both ears was measured as reference value and 20 μl of 0.03% FITC was applied to both ears. Twenty-four hours after the challenge ear swelling on both ears was measured with a spring-loaded micrometer (Mitutoyo). CHS was determined as the amount of ear thickness after challenge compared with ear thickness before challenge. The experiment was repeated twice.

Abs, flow cytometry, and Western blotting

The following anti-mouse Abs were obtained from BD Pharmingen: anti-CD11c (clone N418), anti-CD16/32 (clone 2.4G2), anti-CD24A (clone M1/69), anti-CD40 (clone 3/23), anti-CD80 (clone 16-10A1), anti-CD86 (clone GL1), and anti-I-A/I-E (clone 2G9). Cells were preincubated with unconjugated CD16/32 before staining to block Fc receptors (except samples, where CD16/32 expression was analyzed). All stainings were performed for 15 min at 4°C. Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer with CellQuest software (BD Biosciences).

Western blotting of sorted LC, bone marrow-derived DC (BMDC) and various tissues was done with standard procedures, using BIOMOL (catalog no. SA210) polyclonal rabbit anti-mouse AhR Ab and goat anti-rabbit Ab to develop. Loading was controlled with anti-GAPDH Ab clone 6C5 (Acris), and bands were densitometrically quantified.

Gene expression analysis with microarray

Total RNA was isolated with TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For microarray analysis mRNA was amplified before chip hybridization using the MessageAmp kit of Ambion. RNA was biotinylated (Enzo BioArray HighYield RNA transcript labeling kit from Affymetrix) and purified. RNA was hybridized to MOE430A gene chips (Affymetrix). The resulting *.chp files were analyzed with the bioconductor affy package using the RMA (robust microarray analysis) algorithm. Two independent experiments were performed. A 2-fold expression difference was chosen as cut-off. Internal controls on the chip excluded a faulty preparation of the chips. The Gene Expression Omnibus accession no. is GSE9506 (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/).

Reverse transcription

For cDNA synthesis, total RNA was treated with 1 U DNase I/0.5 μg RNA (15 min, room temperature). The reaction was stopped with 2 mM EDTA for 10 min at 65°C. RNA (0.5 μg) was incubated in 10 μl with 1 μg of oligonucleotide $pd(T)_{16}$ primer for 5 min at 60°C. RNA was reverse transcribed in a final volume of 40 μl containing 1× RT buffer, 10 mM DTT, 1 mM dNTP, 80 U of RNaseOUT RNase inhibitor, and 400 U of murine leukemia virus reverse transcriptase. Reactions were conducted for 60 min at 37°C and were inactivated at 70°C for 10 min. All reagents were purchased from Invitrogen.

Polymerase chain reaction

Real-time PCR was performed on a Rotor-Gene RG 3000 (LTF Labortechnik) in 15 μl of final volume, containing 7.5 μl of SensiMixPlus SYBR PCR kit (Quantace), 1 μM each primer, 1 μl of cDNA, and RNase-free water. Amplification conditions were 45 cycles of 15 s at 94°C for denaturation; 20 s at 55°C (*AhRR*, *Aldh3a1*, *Cyp1A1*, *Nqo1*), 56°C (*AhR*), and 58°C (*Cyp1A2*, *Cyp1B1*, *Ido*), respectively, for primer annealing; 30 s at 72°C for elongation; and 2 s at 72°C for fluorescence detection.

Sequences of PCR primers were as follows (forward and reverse, respectively): *AhR*, 5′-AGG ACC AAA CAC AAG CTA GA-3′ and 5′-TGG AGA TCT CGT ACA ACA CA-3′; *AhRR*, 5′-GCC AAT GCT GTC TAA TGA AG-3′ and 5′-AAC AGA GCA CCA AGA AAA CA-3′; *Aldh3a1*, 5′-CCC CTG GCA CTC TAT GTG TT-3′ and 5′-CTC TTG CCT GGT GAG GTC TC-3′; Cyp1A1, 5′-TCC TTG CAT GTC CAT GTT TC-3′ and 5′-TGC ATA AGC AAA ATA CAG TCC A-3′; *Cyp1A2*, 5′-CTT TGA CAC AGT CAC CAC AG-3′ and 5′-CTT CTC ATC ATG GTT GAC CT-3′; *Cyp1B1*, 5′-GAC CCG GAT GTT TTG TGA AT-3′ and 5′-CAT GGT GAG CAG CAA AAG AA-3′; *Ido*, 5′-GAG TCT TGA TGT CCT TCT GG-3′ and 5′-CTA CTA TTG CGA GGT GGA AC-3′; *Nqo1*, 5′-GGA CAT GAA CGT CAT TCT CT-3′ and 5′-TTC TTC TTC TGC TCC TCT TG-3′; *Rps6*, 5′-ATT CCT GGA CTG ACA GAC AC-3′ and 5′-GTT CTT CTT AGT GCG TTG CT-3′.

Expression levels were calibrated to the expression of *Rps6* as housekeeping gene in the same sample.

Analysis of *AhRR* expression in heart, brain, and LC was performed on a Trio thermocycler (Biometra). The reaction volume of 50 μl contained 2 μl of cDNA (see above), 2.5 U of *Taq*DNA polymerase, 5 μl of 10× PCR buffer (NatuTec), 0.2 mM concentration of dNTPs (NatuTec), and 0.4 μM concentration of each primer (Operon Biotechnologies). Amplifications were conducted for 5 min at 94°C, followed by 35 cycles for *AhRR* and 30 cycles for *Rps6* of 1 min at 94°C for denaturation, 1 min at 54°C (*AhRR*) and 56°C (*Rps6*), respectively, for primer annealing, 1 min at 72°C for elongation, and 10 min at 72°C after the last cycle.

Phagocytosis assay

Freshly isolated epidermal cells from wild-type (WT) and $AhR^{-/-}$ mice were resuspended in PBS/1% BSA and incubated with 0.5 mg/ml FITC-dextran (M_r of 40,000; Sigma-Aldrich) for 45 or 90 min at 4°C or 37°C. Cells were washed three times with ice-cold PBS containing 1% BSA. After staining with allophycocyanin-conjugated anti-I-A/I-E mAb, viable LC were analyzed by flow cytometry. The percentage of MHC-II^+/$FITC^+$ living cells was determined.

IDO enzyme activity measurements

IDO activity was measured in DC generated from GM-CSF-stimulated bone marrow and treated on day 6 with either 100 U/ml IFN-γ (R&D Systems) or 100 ng/ml LPS. Twenty-four hours later, supernatants were collected. More than 80% of the nonadherent cells expressed CD11c. Generation of kynurenine indicative of IDO activity was measured in culture

Downloaded from www.jimmunol.org on March 20, 2011

supernatants as described (20) with a colorimetric assay. The amount of kynurenine was calculated using a serially diluted kynurenine standard (Sigma-Aldrich).

GM-CSF measurement

Epidermal cells were isolated as described above and seeded at 10^6 cells/ml. Cells were cultured for 48 h. GM-CSF concentrations in the supernatants were determined by ELISA (eBioscience) according to the manufacturer's instructions.

Cultivation of epidermal cells with GM-CSF

Epidermal cells were seeded at a concentration of 10^6 cells/ml and cultured with 10 pg or 100 pg/ml GM-CSF. After 48 h, cells were harvested and analyzed by flow cytometry.

Statistical analysis

The paired Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test were used to assess statistical significance of data. Values of $p < 0.05$ were considered as significant.

Results

AhR expression and responsiveness in LC

The AhR is expressed at varying levels in many tissues and cell types, including lymphoid organs like thymus and spleen. Murine keratinocytes show a pattern of increased AhR expression correlated to differentiation, and AhR expression in dermal fibroblasts has been described as well (21, 22). Here, we demonstrate for the first time AhR expression in LC. Easily detectable by RT-PCR and Western blotting, LC expressed AhR protein at much higher levels than liver or thymus (Fig. 1*A*). Epidermal cells (which consist of >90% of keratinocytes) and in vitro BMDC also expressed AhR. Very little AhR protein was detected in bone marrow and brain. Thus, protein levels reflected RNA levels (compare Fig. 1*A* and supplemental Fig. 1).[4]

We analyzed whether typical AhR target genes are induced in vivo in skin cells and LC after systemic exposure to the AhR-activating ligand TCDD and found that *Cyp1A1*, *Cyp1B1*, *Nqo1*, and *Aldh3a1* mRNA were inducible in epidermal cells, but not in highly pure LC of TCDD-exposed mice (Fig. 1*B*). A global gene expression profile analysis (Affymetrix) of LC purified to >95% by density gradient centrifugation and FACS sorting of MHC-II$^+$ cells (23) yielded no TCDD-inducible transcription, even at a moderate 2-fold expression difference. We could not detect any change in the expression of the 22,500 genes presented on the chip in treated vs control groups (data not shown; Gene Expression Omnibus accession no. GSE9506, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Thus, in contrast to many other cell types, LC appeared inert against TCDD-mediated gene induction, albeit they expressed the AhR at high levels.

Expression of the AhRR in epidermal LC of WT and Ahr$^{-/-}$ mice

The AhRR is differentially expressed in tissues. Generally, in AhR$^{-/-}$ mice the AhRR mRNA content is two to three orders of magnitude lower than in WT mice (24). As shown in Fig. 1, WT LC expressed the AhR, and the AhRR. AhRR transcripts were detectable in LC by RT-PCR, and they could be further induced after TCDD exposure. AhRR expression was lower, but not absent, in LC of AhR-deficient mice in comparison to WT counterparts (Fig. 2*A*, compare *lanes 3* and *4*). AhR signaling is regulated by the AhRR in a negative feedback fashion. The AhRR competes with the AhR in dimerization with ARNT to form a transcriptionally inactive complex (3). Note that AhRR expression was constitutively high in WT LC (Fig. 1*Bf*). Brain and heart are the organs

[4] The online version of this article contains supplemental material.

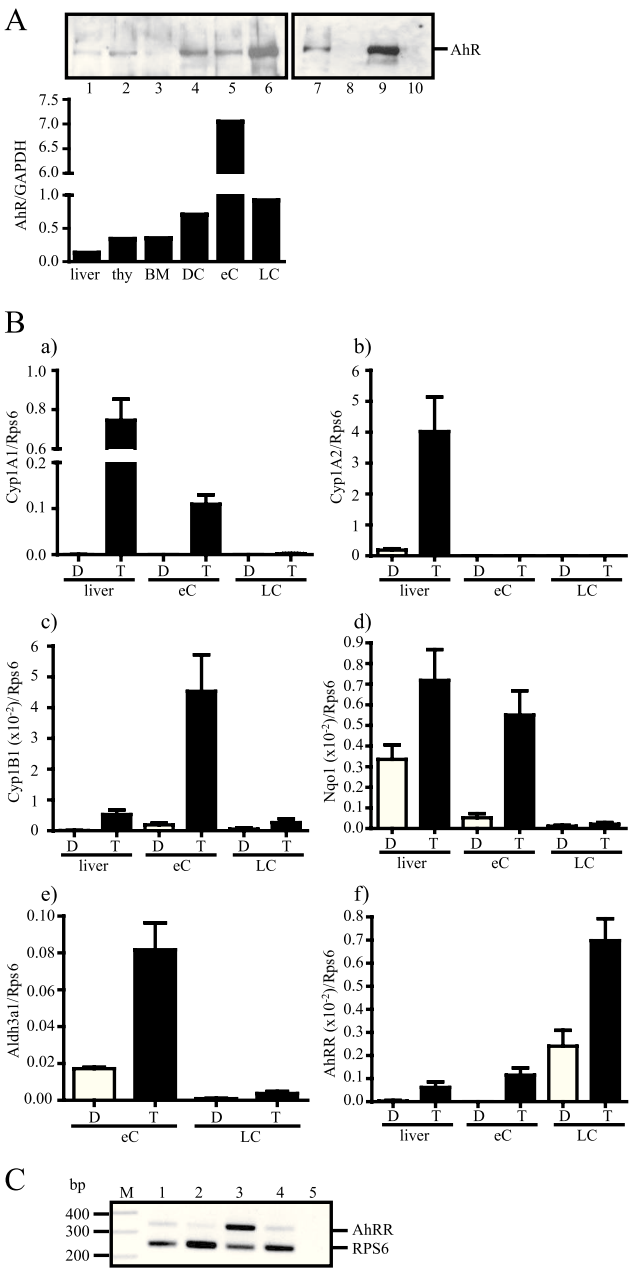


FIGURE 1. AhR expression and inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes in epidermal cells and LC. *A*, Western Blot showing expression of AhR in various cell subsets and tissues. Protein was prepared from organs or sorted cells and protein lysates were blotted with polyclonal rabbit anti-AhR (BIOMOL SA210). *Lanes 1–6*, Protein (800 ng) from WT mice was loaded: (*1*) liver, (*2*) thymus, (*3*) bone marrow, (*4*) BMDC (day 6 of culture, 80% CD11c$^+$ cells) (*5*) epidermal cells, and (*6*) Langerhans cells (sorted to >97% purity from mouse back skin); *lanes 7–10* show a blot with 2 μg of protein from WT and AhR$^{-/-}$ mice: (*7*) liver, WT mice; (*8*) liver, AhR$^{-/-}$mice; (*9*) BMDC WT mice; and (*10*) BMDC AhR$^{-/-}$ mice. Transfer was controlled with Ponceau staining and loading with GAPDH Ab. Bands were densitometrically evaluated. The bar graph shows expression after calibration to GAPDH levels on the blot. *B*, C57BL/6 mice were injected with 10 μg/kg TCDD or the solvent DMSO alone. Relative expression levels of xenobiotic metabolizing enzymes and of AhRR was measured by real-time PCR from epidermal cells and LC sorted to >98% purity. For comparison, liver is included as an organ with known high metabolic activity. D, control animals, treated with solvent DMSO; T, TCDD-treated animals. *C*, Expression levels of AhRR in LC. mRNA was prepared, reverse transcribed, and amplified by PCR for *AhRR* and the *Rps6* housekeeping gene: *Lanes 1–4*: (*1*) heart, (*2*) brain, (*3*) LC isolated from WT mice, and (*4*) LC isolated from AhR$^{-/-}$ mice. S, 100-bp marker; N, negative control without DNA in PCR. The image is representative for three independent experiments.

Downloaded from www.jimmunol.org on March 20, 2011

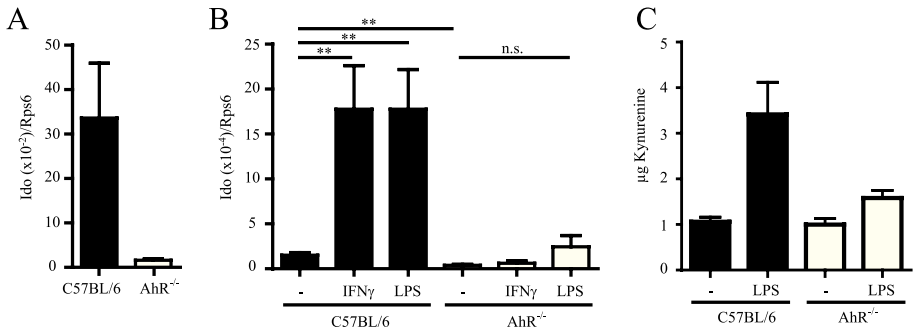


FIGURE 2. IDO expression and regulation in AhR$^{-/-}$ LC and BM-derived DC. *A*, LC were sorted by FACS to >95% purity from epidermal cells (cultivated from ear epidermal sheets for 16 h); RNA was isolated, amplified, reverse transcribed, and used for RT-PCR. Shown is the relative expression for C57BL/6 LC to AhR$^{-/-}$ LC, after calibration with housekeeping gene *Rps6*. The experiment was repeated twice. Similar results were obtained with unamplified RNA. *B*, Bone marrow was cultivated for 6 days in the presence of GM-CSF to generate DC, and then LPS (100 ng/ml) or IFN-γ (100 U/ml) was added for 24 h to induce IDO. RT-PCR was performed. Shown is the *Ido* expression relative to the housekeeping gene *Rps6*. Data are from five independent experiments. Significance was tested with student's *t* test. **, $p < 0.001$; ns, not significant. *C*, Generation of kynurenine indicative of IDO activity was assessed in culture supernatants of BMDC, stimulated for an additional 72 h with LPS and L -tryptophan as described (20). Kynurenine was quantified with a colorimetric assay against a kynurenine standard (Sigma-Aldrich). Data are from two to three individual mice.

with the highest constitutive expression of AhRR transcripts known so far (24), and AhRR expression in WT LC was even higher than in those tissues (Fig. 1*C*).

Transcription profiles of WT and AhR$^{-/-}$ LC differ

LC were sorted out of ear epidermal cell cultures to >95% purity. RNA from LC from five mice was pooled and hybridized to an Affymetrix chip.

A total of 127 genes expressed differentially (threshold 2×) between the two genotypes. Table I lists differentially expressed genes of the immune system. Approximately 20 transcripts of the immune system were more abundant in AhR$^{-/-}$ LC, including CD36 and MHC-II, suggesting that the AhR might contribute to their transcriptional regulation. More genes were down-regulated in AhR$^{-/-}$ LC; that is, their normal expression level is AhR-dependent. Confirming the PCR results, the high constitutive expression of AhRR was lost in AhR$^{-/-}$ LC. The most highly deregulated gene was *Ido*, with a lower transcript abundance in AhR$^{-/-}$ compared with WT LC. The decrease was strong and significant, as confirmed by quantitative RT-PCR of LC cultivated for 20 h (Fig. 2*A*). As expected from reports in the literature, *Ido* expression was absent in WT LC isolated directly from skin without prior cultivation (data not shown). We tested *Ido* mRNA up-regulation by the known inducers LPS or IFN-γ in BMDC. As shown above, these DC express high level of AhR, similar to LC. Absence of AhR almost completely prevented normal *Ido* up-regulation by IFN-γ. LPS led to a slight, but not significant, induction of *Ido* mRNA (Fig. 2*B*). Also,

Table I. *Differentially expressed immune-related genes in AhR$^{-/-}$ LC*[a]

Probeset ID	Gene Name[b]	Symbol	Fold Damage
Lower transcription in AhR$^{-/-}$ LC			
1420437_at	Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase	Indo[c]	8.82
1420796_at	Aryl-hydrocarbon receptor repressor	Ahrr	8.63
1416811_s_at	Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2	Ctla2a///Ctla2b	3.48
1424836_a_at	CLIP associating protein 2	Clasp2	3.37
1423489_at	Monocyte to macrophage differentiation-associated	Mmd	2.16
1419872_at	CDF1 receptor	Csf1r	2.07
1427418_a_at	Hypoxia inducible factor 1, α subunit	Hif1a	2.03
Higher transcription in AhR$^{-/-}$LC			
1417292_at	IFN-γ-inducible protein 47	Ifi47	2.00
1417292_at	C-type lectin domain family 4, member d	Clec4d	2.09
1420804_s_at	Complement component 1, q subcomponent, α polypeptide	C1qa	2.14
1417381_at	IFN-γ-inducible protein 30	Ifi30	2.15
1422476_at	CD68 Ag	Cd68	2.17
1434366_x_at	IL-1β	Il1b	2.29
1449399_a_at	IFN-activated gene 205	Ifi205	2.37
1450648_s_at	CD36 Ag	Cd36	2.40
1450883_a_at	Macrophage-expressed gene 1	Mpeg1	2.42
1435290_x_at	Complement component 1, q subcomponent, β polypeptide	C1qb	2.48
1437726_x_at	Histocompatibility 2, class II Ag E β	H2-Eb1	2.59
1425477_x_at	CD274 Ab	Cd274	2.69
1452231_x_at	Histocompatibility 2, class II Ag A, β1	H2-Ab1	2.90
1451721_a_at	Chemokine (C-X-C motif) ligand 4	Cxcl4, Pf4	3.11
1448995_at	IFN-activated gene 203	Ifi203	3.16
1426906_at	Histocompatibility 2, class II Ag A, α///histocompatibility 2, class II Ag E α	H2-Aa///H2-Ea	3.98

[a] LC were isolated from ear epidermal cells by FACS sorting. RNA was prepared, amplified, and hybridized to Affymetrix MOE430A chips. Analysis was done as described in *Materials and Methods*.
[b] Common name and official gene symbol.
[c] Also known as Ido.

Downloaded from www.jimmunol.org on March 20, 2011

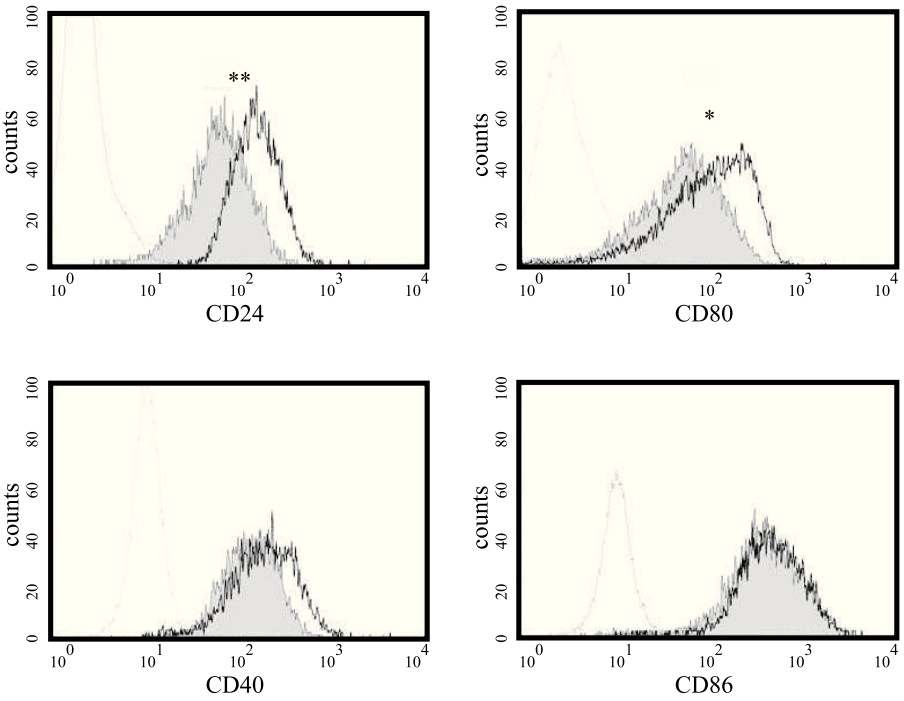


FIGURE 3. Expression of costimulatory molecules on mature LC is dependent on the AhR. WT (white curve) and AhR$^{-/-}$ (gray curve) mice, respectively, are shown. Mice were sacrificed, and epidermal cells were isolated as described in *Materials and Methods* and cultured further for 72 h. Cells were harvested, and LC were enriched over BSA density gradient centrifugation, stained with described Abs, and analyzed by FACS. Dotted line designates isotype control. Shown are representative data from three to four independent experiments. Significances were calculated by Student's *t* test. *, $p < 0.05$.

induction of generation of kynurenine from tryptophan, which is driven by IDO enzymatic activity, was much less in AhR$^{-/-}$ DC (Fig. 2*C*). Thus, AhR is necessary for IDO expression in LC/and DC, and for IDO function in DC.

Impaired maturation competence of LC in AhR$^{-/-}$ mice

Dependent on their differentiation and maturation status, LC express surface proteins necessary for stimulation of T cells (e.g., MHC-II, CD24a, CD40, CD80, and CD86). LC have been shown to mature during ex vivo culture of epidermal cells (19). Therefore, we analyzed expression levels of maturation markers on the cell surface of freshly isolated ("immature") LC and on LC after 3 days of culture ("mature") of epidermal cells from either WT or AhR$^{-/-}$ mice.

Treatment of cells for 10 min with trypsin did not impair Ab staining, indicating that the surface markers described here are not sensitive to the treatment necessary for preparing epidermal sheets/cell suspensions (data not shown).

Fig. 3 shows representative histograms of the expression of costimulatory molecules CD24a, CD40, CD80, and CD86 on mature LC from WT and AhR$^{-/-}$ mice. Table II shows the mean fluorescence intensities of these markers for both mature and immature LC, comparing LC from WT and AhR$^{-/-}$ mice. WT LC of mice injected with TCDD up-regulated CD86 expression levels. As expected, no expression changes of costimulatory molecules by TCDD was detectable in AhR$^{-/-}$ LC (data not shown).

All markers tested, except CD24a, had similar basal expression levels on immature LC. CD24a was expressed significantly lower on immature as well as on mature AhR-deficient LC compared with wild-type LC; in accordance with data in the literature, CD24a expression decreased during maturation (25). As expected, maturation of WT LC during ex vivo culture of epidermal cells led to strong up-regulation of costimulatory molecules CD40, CD80, and CD86. MHC-II was also up-regulated (data not shown). Interestingly, MHC-II surface expression did not differ significantly between LC from WT and AhR$^{-/-}$ mice (supplemental Fig. 2).

Qualitatively, LC from AhR-deficient mice up-regulated costimulatory molecules after 3 days of maturation in culture as well. Quantitatively, though, in comparison to the WT mice, the increase was significantly lower during maturation for cells of AhR$^{-/-}$ mice (Table II, compare upper and lower row) for CD80. For CD40 a similar trend was seen in three independent experiments, albeit statistical significance was not reached.

Morphology and phagocytic capacity of LC from AhR$^{-/-}$ mice

In addition to the expression of surface markers, we analyzed how the AhR affects size and granularity of LC. It is well known that LC change their morphology during maturation and become larger

Table II. *Influence of absence of functional AhR on LC phenotype in immature vs mature cells*[a]

	CD16/32		CD24		CD40		CD80		CD86	
	Immature	Mature†	Immature	Mature	Immature	Mature†	Immature	Mature†	Immature	Mature†
WT	14[b]	2[c]	156	122	13	188	2	99	13	458
AhR KO	13	2	**60****[c]	**56***	9	142	2	**42***	11	401

[a] Single-cell suspensions were prepared from ear or skin epidermis and were either immediately (Immature) analyzed by FACS or cultivated for 3 days to allow maturation of LC (Mature). See *Material and Methods* for details. Cells were stained for MHC-II and the indicated surface markers. LC were identified and gated by MHC-II expression and analyzed for the indicated surface markers. The cell suspension consisted of mainly keratinocytes, some other epidermal cells, and 1–3% LC. Scatter characteristics were used to exclude dead cells from the analysis. As controls, unstained and isotype control-stained cells were used. Cultivation and stainings were done independently three to five times.

[b] Channel of mean fluorescence (MFI), determined by FACS.

[c] The significance of values between C57BL/6 (WT) mice and AHR$^{-/-}$ mice was calculated by Student's *t* test and is indicated by asterisks and boldface numbers. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ***, $p < 0.0001$. Values differing significantly between immature and mature LC were also calculated and occur in the columns noted with a dagger (†).

Downloaded from www.jimmunol.org on March 20, 2011

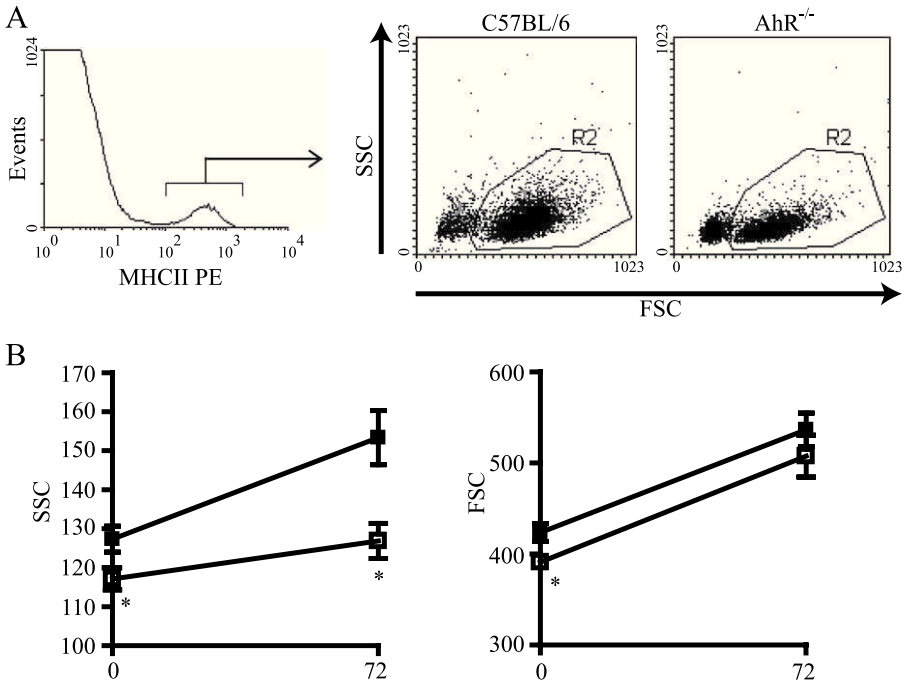


FIGURE 4. LC morphology is dependent on AhR expression. Epidermal cells from WT and AhR$^{-/-}$ mice were isolated and analyzed by FACS. An aliquot of cells was ex vivo cultured for 72 h and analyzed again. *A*, Cells were gated on MHC-II (i.e., for LC), and scatter characteristics were analyzed for WT and AhR$^{-/-}$. *B*, Graphs depicting the change after 72 h of culture. Data are from at least four independent experiments (■, wild-type; □, AhR$^{-/-}$ mice; asterisks indicate significant differences between WT and AhR$^{-/-}$ mice (*, $p < 0.05$)).

and more granular (19). Fluorescence microscopy of AhR$^{-/-}$ epidermal skin sheets did not reveal differences in numbers of LC per mm^2 or striking changes in the ramification of LC dendrites (data not shown). Fig. 4 shows the relative granularity and size of immature and mature MHC-II$^+$ LC from AhR$^{-/-}$ and WT mice. Congruent with the data on the surface marker expression, also the morphology of LC differed between AhR$^{-/-}$ and WT mice after in vitro maturation. In the absence of a functional AhR, immature LC were slightly smaller and remained of lower granularity after maturation. This was not due to the death of MHC-II$^+$ cells, as confirmed by propidium iodide staining. No significant changes of LC from TCDD-treated mice compared with control mice were observed (data not shown).

We analyzed the phagocytic capacity of LC for 45 and 90 min after isolation as a marker for functional immaturity. LC from AhR$^{-/-}$ phagocytosed more at the earlier time point than did LC from WT mice ($p = 0.0536$ at 45 min), suggestive of slower maturation. However, at 90 min this difference had disappeared (Fig. 5). Phagocytosis was abolished completely in both genotypes when LC were cultivated for 24 h (data not shown).

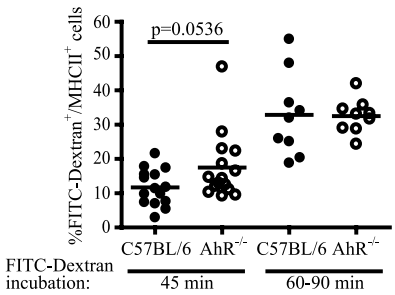


FIGURE 5. Phagocytic capacity upon maturation. Freshly isolated epidermal cells were cultured at 4°C or 37°C with FITC-dextran beads and then stained with anti-MHC-II Abs. Shown is the percentage of FITC$^+$/MHC-II$^+$ cells after 45 min and 90 min of uptake. Each dot represents the result from an individual mouse. Data were analyzed by an unpaired Student's *t* test.

GM-CSF secretion is diminished in epidermal cells of AhR$^{-/-}$ mice

GM-CSF is one of the key cytokines for LC survival and differentiation (26). GM-CSF is produced and secreted by keratinocytes in a paracrine fashion, and GM-CSF plasma levels are known to be enhanced by TCDD (27). Therefore, we analyzed the supernatants of cultured epidermal cells (containing ~90% keratinocytes) from AhR$^{-/-}$ and WT mice by ELISA. Results are shown in Fig. 6*A*. Epidermal cells from WT mice secreted more GM-CSF (mean 40 pg/ml) compared with cells isolated from AhR$^{-/-}$ mice (mean, 18 pg/ml). GM-CSF is pivotal for up-regulation of CD80 on maturing LC. As described above, AhR$^{-/-}$ LC are impaired in up-regulation of costimulatory molecules, including CD80. We cultured epidermal cells from AhR$^{-/-}$ and WT mice in the presence of GM-CSF and measured morphology and CD80 expression. As shown in Fig. 6*B*, addition of 10 or 100 pg/ml GM-CSF to cultures

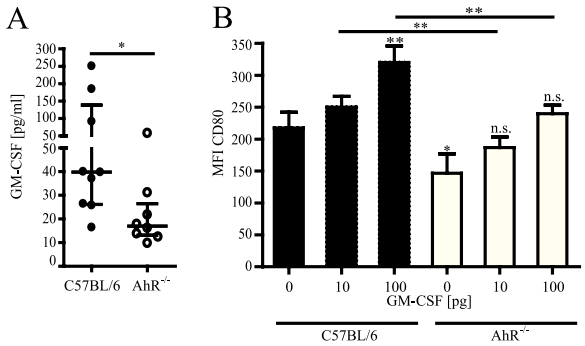


FIGURE 6. GM-CSF-production in AhR$^{-/-}$ epidermal cells. Epidermal cells were prepared from back skin and cultured for 48 h. *A*, Supernatants were tested for GM-CSF content by ELISA. *B*, GM-CSF was added to epidermal cells from AhR$^{-/-}$ and C57BL/6 mice, and cells were cultured for 48 h. The mean fluorescence index (MFI) of CD80 was determined on LC identified and gated by their MHC-II expression. Asterisks on the bars indicate significance against untreated WT cells (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.0001$; ns, not significant).

Downloaded from www.jimmunol.org on March 20, 2011

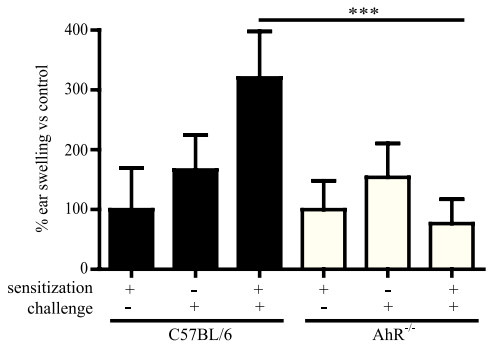


FIGURE 7. Contact hypersensitivity against FITC in AhR$^{-/-}$ mice compared with WT mice. Mice were sensitized and challenged as described in *Materials and Methods*. Ear thickness was measured and the change between both genotypes recorded. The experiment was repeated twice with similar results. Each treatment group comprised five to seven mice. Data were analyzed with Student's *t* test (***, $p < 0.0001$).

brought back CD80 expression of AhR$^{-/-}$ LC to the expression level of WT LC. This concentration is in the range of the GM-CSF secreted by WT epidermal cells (see Fig. 6*A*). Additional GM-SCF induced CD80 expression in WT LC as well, at both 10 and 100 pg/ml to levels that were significantly higher than in AhR$^{-/-}$ LC ($p = 0.0017$ and 0.0016, respectively). Addition of GM-CSF to epidermal cell cultures did not change the low granularity and size.

CHS is impaired in AhR$^{-/-}$ mice

CHS is a functional assay for competent immune responses against Ag entering via the skin. We tested whether CHS is normal or impaired in AhR$^{-/-}$ mice using the fluorescent low molecular mass chemical FITC. AhR$^{-/-}$ mice mounted a lower CHS response (Fig. 7): ear thickness of WT mice was significantly higher ($p < 0.0001$). FITC^{+} DC could be detected in draining lymph nodes of sensitized mice of both strains, indicating that migration is not abrogated (supplemental Fig. 3).

Discussion

Intrinsic and induced cell differentiation and the cellular response to endogenous and exogenous signals are hallmarks of the immune system in fighting pathogens. The AhR as an externally triggered latent transcription factor is strikingly abundant in several immune tissues. mRNA abundance equals or surpasses that of the liver (28), where the main function of the AhR is thought to be xenobiotic metabolic degradation. AhR mRNA expression appears to correlate with the AhR's ligand-induced transcription factor activity. We found a good correlation between mRNA and protein levels for AhR. Also, published interspecies data indicate a reasonable correlation between AhR mRNA and protein levels (29, 28, 30). Growing knowledge suggests that the AhR signaling pathway is relevant in the immune system, used in differentiation and function of immune cells, and links environmental triggers to the immune system (9, 10, 31, 32).

We show here for the first time that primary murine LC express AhR mRNA and protein. Indeed, expression was higher than in other immune cells, and higher than in liver. In an extension of data reported in the literature, AhR expression was high in keratinocytes as well. We analyzed the effects of AhR overactivation and AhR deficiency in LC and epidermal cells. To our knowledge, only one study addressed the effects of AhR activation on LC until now. In 1989, Puhvel et al. (33) investigated density and morphology of LC in HRS/J mice, a murine model for skin effects of TCDD. They reported that LC from hairless mice were smaller and had fewer dendritic protusions than did controls. Extending these early studies, our data are suggestive of a role for the AhR in the maturation of LC.

Immature and semimature LC from mice isolated after exposure to the strong and persistent ligand TCDD had not up-regulated or down-regulated genes for enzymes of the xenobiotic response, which is very unusual for AhR-containing tissues (31, 34). Indeed, they appeared inert to global transcriptome changes. This intriguing finding might be due to either a strong inhibitory feedback loop by the highly expressed AhR repressor in LC (35), or ligand-dependent outcomes of transcriptional changes, as has been suggested for other cell types (28). Additional experiments could test the hypothesis that LC might control xenobiotic metabolism as a means of reducing the risk of pro-hapten to hapten generation from low molecular mass metabolites (28, 36). Several authors have suggested functions of the AhR beyond its ligand-activated transcription factor status, for instance by direct contact and interaction with NF-κB (38, reviewed in Ref. 39). It is possible that beyond ligand- (TCDD-) driven transcriptional activity, nonligand-dependent activities of the AhR are relevant in LC, such as in maturation and function.

As the AhR might induce cell differentiation, we analyzed immature and mature LC from AhR-deficient mice in epidermal cell cultures. Three relevant parameters of LC maturation were analyzed, namely up-regulation of costimulatory molecules, size and scatter characteristics, and phagocytic capacity. Our data provide evidence that in the absence of the AhR in epidermal cells LC maturation is impaired. Interestingly, the number of LC per mm^2 was unaffected in skin.

Note that AhR deficiency led to low CD24a expression in LC, while in splenic DC AhR overactivation induced CD24a (11). A lower constitutive CD24a expression in AhR-deficient mice compared with WT mice could reflect the presence of an endogenous ligand (which would drive AhR activity in normal mice), as already suggested above.

Up-regulation of costimulatory molecules and morphological changes are critical features of LC maturation and their function as potent APCs. In particular, the expression of CD24a and CD80, both significantly low in AhR-deficient LC, might reduce their capacity to stimulate Th1 responses. Considering that splenic lymphocytes from AhR$^{-/-}$ mice produced more IFN-γ and IL-12 after OVA immunization than those from AhR$^{+/+}$ mice, this might be surprising. Note, however, that we look at other cells (i.e., LC) and at a "naive" situation. Moreover, allergic sensitization led to a higher IL-5 production and increased IgE titer in AhR$^{-/-}$ mice compared with AhR$^{+/+}$ mice (40, 41), suggestive of AhR as a driver toward Th2. Several lines of evidence suggest a role for the AhR in thymocyte and T cell differentiation (10, 37, 42, 43), and a number of cytokines can be regulated by AhR signaling, including IL-2 in T cells and TNF-α, and IL-1β in keratinocytes (44, 45). More data are needed to clarify the involvement of AhR in cytokine balance.

Maturation of LC may be influenced by signals from surrounding keratinocytes (which are affected by AhR absence as well). It is therefore not too surprising that epidermal cells secreted less GM-CSF in AhR-deficient cultures, in particular as the gene has four putative xenobiotic-responsive elements in its promoter (46). GM-CSF is relevant for LC maturation, that is, CD80 expression levels (47). LC themselves cannot survive unless they are either surrounded by keratinocytes or GM-CSF is added to cultures (26). GM-CSF addition to WT LC in culture even enhanced CD80 expression levels. The CD80 phenotype of AhR$^{-/-}$ LC could be rescued by GM-CSF and brought back to WT levels. However, the morphological changes persisted. Apparently, other factors

Downloaded from www.jimmunol.org on March 20, 2011

are lacking as well in $AhR^{-/-}$ mice, which warrant further investigation.

$AhR^{-/-}$ do not have a drastic immune phenotype. The animals survive and can reach old age (48). Immune responses against cellular (allogenic P815 tumor cells) and humoral (sheep RBC) model Ags showed normal and competent immune responses (49). Memory response against a protein Ag was reported (8). However, they are more susceptible to infections with *Helicobacter hepaticus*, an opportunistic infection indicating immunodeficiency (50, 51), and to *L.monocytogenes* (52). The underlying cause may be specific defects in the immune system or other general damages resulting from AhR deficiency.

CHS is a skin inflammatory reaction to topically applied haptens mediated by $CD8^+$ T cells primed in skin draining lymph nodes by poorly defined APCs. LC take up Ag, mature, and migrate to the lymph nodes to initiate an immune response or, alternatively, exert tolerogenic functions (53). We show here that CHS is impaired by AhR deficiency. CHS suppression appeared not due to an inability of LC or dermal DC to leave the skin and reach the draining lymph nodes after Ag uptake. Conceivably, the weaker CHS might be due to the low expression of costimulatory molecules and to the persisting immature phenotype we observed. $AhR^{-/-}$ LC were smaller than WT LC, possibly indicating a lower fraction of motile LC destined to migrate to the lymph nodes even in the steady-state (54). Skin-resident cell types, such as keratinocytes and mast cells, and mobile leukocytes, including T lymphocytes and NK cells, actively participate in the CHS reaction. IL-2-producing $CD8^+$ cells and regulatory T cells appear to be crucial in the prevention of contact allergy or in the early termination of the reaction (55, 56). Active AhR signaling can serve as a co-factor in IL-2 production and formation of regulatory T cells (57, 58). Moreover, allergen sensitization induces the development of distinct CD8 T cell subpopulations that produce IL-17 (10, 59), and the AhR acts as a co-factor in IL17-production. More studies are needed to differentiate the contribution of LC vs other cell types in diminished CHS response of $AhR^{-/-}$ mice. This can be done, for example, by LC cell-specific deletion of the AhR. Recently, a study demonstrated that AhR activation affected DC as well as regulatory T cell survival and function, resulting in islet allograft-specific tolerance (60).

An interesting finding was the failure by $AhR^{-/-}$ LC to upregulate *Ido* transcription. Congruently, IDO activity could not be stimulated in BMDC. Expression of IDO upon maturation was recently shown for human LC (10, 61). AhR activation can induce IDO transcription and ensuing enzyme activity in DC (10, 61, 62). Whether IDO expression by LC affects the balance between tolerance and immunity in vivo remains to be determined. It is intriguing to speculate that IDO in LC may serve to keep tryptophan levels low, as tryptophan is a precursor for the UV-induced AhR agonist FICZ (63).

In conclusion, we provide evidence for a role of the AhR in LC maturation and function. These findings contribute to a better understanding of allergic skin immune responses and their medical management.

Acknowledgments

We thank Markus Frericks for expert help and advice regarding microarrays, and Sarah Böddeker for contributions. We thank Alla Velgach and Ninon Krahnke-Schoelzel for technical help, and Michael Nowak, Heike Weighardt, and Irmgard Förster for critical discussions.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Becker, D., and J. Knop. 1993. Mechanism in allergic contact dermatitis. *Exp. Dermatol.* 2: 63–69.
2. Schmidt, J. V., and C. A. Bradfield. 1996. Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12: 55–89.
3. Mimura, J., M. Ema, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama. 1999. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 13: 20–25.
4. Swanson, H. I. 2004. Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chem. Biol. Interact.* 149: 69–79.
5. Dunagin, W. G. 1984. Cutaneous signs of systemic toxicity due to dioxins and related chemicals. *J. Am. Acad. Dermatol.* 10: 688–700.
6. Fernandez-Salguero, P., T. Pineau, D. M. Hilbert, T. McPhail, S. S. Lee, S. Kimura, D. W. Nebert, S. Rudikoff, J. M. Ward, and F. J. Gonzalez. 1995. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 268: 722–726.
7. Teske, S., A. A. Bohn, J. P. Hogaboam, and B. P. Lawrence. 2008. Aryl hydrocarbon receptor targets pathways extrinsic to bone marrow cells to enhance neutrophil recruitment during influenza virus infection. *Toxicol. Sci.* 102: 89–99.
8. Rodriguez-Sosa, M., G. Elizondo, R. M. Lopez-Duran, I. Rivera, F. J. Gonzalez, and L. Vega. 2005. Over-production of IFN-γ and IL-12 in AhR-null mice. *FEBS Lett.* 579: 6403–6410.
9. Kerkvliet, N. I. 2002. Recent advances in understanding the mechanisms of TCDD immunotoxicity. *Int. Immunopharmacol.* 2: 277–291.
10. Veldhoen, M., K. Hirota, A. M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J. C. Renauld, and B. Stockinger. 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453: 106–109.
11. Vorderstrasse, B. A., and N. I. Kerkvliet. 2001. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin affects the number and function of murine splenic dendritic cells and their expression of accessory molecules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 171: 117–125.
12. Ruby, C. E., M. Leid, and N. I. Kerkvliet. 2002. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin suppresses tumor necrosis factor-α and anti-CD40-induced activation of NF-κB/Rel in dendritic cells: p50 homodimer activation is not affected. *Mol. Pharmacol.* 62: 722–728.
13. Laupeze, B., L. Amiot, L. Sparfel, E. Le Ferrec, R. Fauchet, and O. Fardel. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 168: 2652–2658.
14. Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhe, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, et al. 2005. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22: 643–654.
15. Bennett, C. L., E. van Rijn, S. Jung, K. Inaba, R. M. Steinman, M. L. Kapsenberg, and B. E. Clausen. 2005. Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J. Cell Biol.* 169: 569–576.
16. Zhao, X., E. Deak, K. Soderberg, M. Linehan, D. Spezzano, J. Zhu, D. M. Knipe, and A. Iwasaki. 2003. Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *J. Exp. Med.* 197: 153–162.
17. Allan, R. S., C. M. Smith, G. T. Belz, A. L. van Lint, L. M. Wakim, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 2003. Epidermal viral immunity induced by $CD8\alpha^+$ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301: 1925–1928.
18. Schmidt, J. V., G. H. Su, J. K. Reddy, M. C. Simon, and C. A. Bradfield. 1996. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6731–6736.
19. Schuler, G., and R. M. Steinman. 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161: 526–546.
20. Daubener, W., N. Wanagat, K. Pilz, S. Seghrouchni, H. G. Fischer, and U. Hadding. 1994. A new, simple, bioassay for human IFN-γ. *J. Immunol. Methods* 168: 39–47.
21. Jones, C. L., and J. J. Reiners, Jr. 1997. Differentiation status of cultured murine keratinocytes modulates induction of genes responsive to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 347: 163–173.
22. Gradin, K., A. Wilhelmsson, L. Poellinger, and A. Berghard. 1993. Nonresponsiveness of normal human fibroblasts to dioxin correlates with the presence of a constitutive xenobiotic response element-binding factor. *J. Biol. Chem.* 268: 4061–4068.
23. Witmer-Pack, M. D., J. Valinsky, W. Olivier, and R. M. Steinman. 1988. Quantitation of surface antigens on cultured murine epidermal Langerhans cells: rapid and selective increase in the level of surface MHC products. *J. Invest. Dermatol.* 90: 387–394.
24. Bernshausen, T., B. Jux, C. Esser, J. Abel, and E. Fritsche. 2006. Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. *Arch. Toxicol.* 80: 206–211.
25. Enk, A. H., and S. I. Katz. 1994. Heat-stable antigen is an important costimulatory molecule on epidermal Langerhans' cells. *J. Immunol.* 152: 3264–3270.
26. Witmer-Pack, M. D., W. Olivier, J. Valinsky, G. Schuler, and R. M. Steinman. 1987. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 166: 1484–1498.
27. Prell, R. A., J. A. Oughton, and N. I. Kerkvliet. 1995. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on anti-CD3-induced changes in T-cell subsets and cytokine production. *Int. J. Immunopharmacol.* 17: 951–961.

Downloaded from www.jimmunol.org on March 20, 2011

28. Frericks, M., M. Meissner, and C. Esser. 2007. Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 220: 320–332.
29. Esser, C. 2002. The role of the Ah-receptor in the immune system: heading from toxicology to immunology. *Recent Res. Devel. Mol. Pharmacol.* 1: 141–155.
30. Carlstedt-Duke, J. M. 1979. Tissue distribution of the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat. *Cancer Res.* 39: 3172–3176.
31. Barouki, R., X. Coumoul, and P. M. Fernandez-Salguero. 2007. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 581: 3608–3615.
32. Esser, C. 2009. The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. *Biochem. Pharmacol.* 77: 597–607.
33. Puhvel, S. M., M. Sakamoto, and R. M. Reisner. 1989. Effect of TCDD on the density of Langerhans cells in murine skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99: 72–80.
34. Mimura, J., and Y. Fujii-Kuriyama. 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* 1619: 263–268.
35. Haarmann-Stemmann, T., and J. Abel. 2006. The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR): structure, expression, and function. *Biol. Chem.* 387: 1195–1199.
36. Bergstrom, M. A., H. Ott, A. Carlsson, M. Neis, G. Zwadlo-Klarwasser, C. A. Jonsson, H. F. Merk, A. T. Karlberg, and J. M. Baron. 2007. A skin-like cytochrome P450 cocktail activates prohaptens to contact allergenic metabolites. *J. Invest. Dermatol.* 127: 1145–1153.
37. Quintana, F. J., A. S. Basso, A. H. Iglesias, T. Korn, M. F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka, and H. L. Weiner. 2008. Control of T_{reg} and T_H17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453: 65–71.
38. Vogel, C. F., E. Sciullo, W. Li, P. Wong, G. Lazennec, and F. Matsumura. 2007. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.* 21: 2941–2955.
39. Carlson, D. B., and G. H. Perdew. 2002. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling?: insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16: 317–325.
40. Lawrence, B. P., M. S. Denison, H. Novak, B. A. Vorderstrasse, N. Harrer, W. Neruda, C. Reichel, and M. Woisetschlager. 2008. Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound. *Blood* 112: 1158–1165.
41. Negishi, T., Y. Kato, O. Ooneda, J. Mimura, T. Takada, H. Mochizuki, M. Yamamoto, Y. Fujii-Kuriyama, and S. Furusako. 2005. Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. *J. Immunol.* 175: 7348–7356.
42. Nohara, K., X. Pan, S. Tsukumo, A. Hida, T. Ito, H. Nagai, K. Inouye, H. Motohashi, M. Yamamoto, Y. Fujii-Kuriyama, and C. Tohyama. 2005. Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed specifically in T-lineage cells causes thymus involution and suppresses the immunization-induced increase in splenocytes. *J. Immunol.* 174: 2770–2777.
43. Staples, J. E., F. G. Murante, N. C. Fiore, T. A. Gasiewicz, and A. E. Silverstone. 1998. Thymic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin are strictly dependent on aryl hydrocarbon receptor activation in hemopoietic cells. *J. Immunol.* 160: 3844–3854.
44. Jeon, M. S., and C. Esser. 2000. The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS transcription factor family. *J. Immunol.* 165: 6975–6983.
45. Yin, H., Y. Li, and T. R. Sutter. 1994. Dioxin-enhanced expression of interleukin-1β in human epidermal keratinocytes: potential role in the modulation of immune and inflammatory responses. *Exp. Clin. Immunogenet.* 11: 128–135.
46. Sun, Y. V., D. R. Boverhof, L. D. Burgoon, M. R. Fielden, and T. R. Zacharewski. 2004. Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 32: 4512–4523.
47. Ozawa, H., S. Aiba, Nakagawa, and H. Tagami. 1996. Interferon-γ and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7–1) expression. *Eur. J. Immunol.* 26: 648–652.
48. Lahvis, G. P., and C. A. Bradfield. 1998. Ahr null alleles: distinctive or different? *Biochem. Pharmacol.* 56: 781–787.
49. Vorderstrasse, B. A., L. B. Steppan, A. E. Silverstone, and N. I. Kerkvliet. 2001. Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice generate normal immune responses to model antigens and are resistant to TCDD-induced immune suppression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 171: 157–164.
50. Ward, J. M., M. R. Anver, D. C. Haines, J. M. Melhorn, P. Gorelick, L. Yan, and J. G. Fox. 1996. Inflammatory large bowel disease in immunodeficient mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus*. *Lab. Anim. Sci.* 46: 15–20.
51. Fernandez-Salguero, P. M., J. M. Ward, J. P. Sundberg, and F. J. Gonzalez. 1997. Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet. Pathol.* 34: 605–614.
52. Shi, L. Z., N. G. Faith, Y. Nakayama, M. Suresh, H. Steinberg, and C. J. Czuprynski. 2007. The aryl hydrocarbon receptor is required for optimal resistance to *Listeria monocytogenes* infection in mice. *J. Immunol.* 179: 6952–6962.
53. Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 685–711.
54. Nishibu, A., B. R. Ward, J. V. Jester, H. L. Ploegh, M. Boes, and A. Takashima. 2006. Behavioral responses of epidermal Langerhans cells in situ to local pathological stimuli. *J. Invest. Dermatol.* 126: 787–796.
55. Kish, D. D., A. V. Gorbachev, and R. L. Fairchild. 2007. Regulatory function of $CD4^+CD25^+$ T cells from Class II MHC-deficient mice in contact hypersensitivity responses. *J. Leukocyte Biol.* 82: 85–92.
56. Kish, D. D., A. V. Gorbachev, and R. L. Fairchild. 2005. $CD8^+$ T cells produce IL-2, which is required for $CD4^+CD25^+$ T cell regulation of effector $CD8^+$ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J. Leukocyte Biol.* 78: 725–735.
57. Jeon, M. S., and C. Esser. 2000. The murine IL-2 promoter contains distal regulatory elements responsive to the Ah receptor, a member of the evolutionarily conserved bHLH-PAS transcription factor family. *J. Immunol.* 165: 6975–6983.
58. Funatake, C. J., N. B. Marshall, L. B. Steppan, D. V. Mourich, and N. I. Kerkvliet. 2005. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin generates a population of $CD4^+CD25^+$ cells with characteristics of regulatory T cells. *J. Immunol.* 175: 4184–4188.
59. He, D., L. Wu, H. K. Kim, H. Li, C. A. Elmets, and H. Xu. 2006. $CD8^+$ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J. Immunol.* 177: 6852–6858.
60. Hauben, E., S. Gregori, E. Draghici, B. Migliavacca, S. Olivieri, M. Woisetschlager, and M. G. Roncarolo. 2008. Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft specific tolerance through direct- and DC-mediated effects on regulatory T cells. *Blood* 112: 1214–1222.
61. von Bubnoff, D., H. Bausinger, H. Matz, S. Koch, G. Hacker, O. Takikawa, T. Bieber, D. Hanau, and S. H. de la. 2004. Human epidermal langerhans cells express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Invest. Dermatol.* 123: 298–304.
62. Vogel, C. F., S. R. Goth, B. Dong, I. N. Pessah, and F. Matsumura. 2008. Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375: 331–335.
63. Fritsche, E., C. Schafer, C. Calles, T. Bernsmann, T. Bernshausen, M. Wurm, U. Hubenthal, J. E. Cline, H. Hajimiragha, P. Schroeder, et al. 2007. Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 8851–8856.
64. Stutte, S., B. Jux, C. Esser, and I. Forster. 2008. CD24a expression levels discriminate Langerhans cells from dermal dendritic cells in murine skin and lymph nodes. *J. Invest. Dermatol.* 128: 1470–1475.

Downloaded from www.jimmunol.org on March 20, 2011

The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates UVB Radiation–Induced Skin Tanning

Bettina Jux[1,3], Stephanie Kadow[1], Sandra Luecke[2], Agneta Rannug[2], Jean Krutmann[1] and Charlotte Esser[1]

Melanogenesis is the vital response to protect skin cells against UVB-induced DNA damage. Melanin is produced by melanocytes, which transfer it to surrounding keratinocytes. Recently, we have shown that the aryl hydrocarbon receptor (AhR) is part of the UVB-stress response in epidermal keratinocytes. UVB triggers AhR signaling by generating the AhR ligand 6-formylindolo(3,2-*b*)carbazole from tryptophan. We show here that normal murine melanocytes express functional AhR. Using standard UVB tanning protocols, AhR-deficient mice were shown to tan significantly weaker than wild-type mice; in these mice, tyrosinase activity in the epidermis was lower as well. Tanning responses and tyrosinase activity, however, were normal in keratinocyte-specific conditional AhR knockout mice, indicating that release of melanogenic keratinocyte factors is unaffected by the UVB-AhR signaling pathway and that the diminished tanning response in $AhR^{-/-}$ mice is confined to the level of melanocytes. Accordingly, the number of dihydroxyphenylalanin-positive melanocytes increased significantly less on UVB irradiation in $AhR^{-/-}$ mice than in wild-type mice. This difference in melanocyte number was associated with a significantly reduced expression of stem cell factor-1 and c-kit in melanocytes of $AhR^{-/-}$ mice. Thus, the environmental signal sensor AhR links solar UVB radiation to skin pigmentation.

Journal of Investigative Dermatology (2011) **131,** 203–210; doi:10.1038/jid.2010.269; published online 23 September 2010

INTRODUCTION

Tanning is a physiological response to sun exposure, and solar UVB (280–320 nm) radiation is the most important stimulus of skin melanogenesis. Melanin is generated by melanocytes in specialized organelles, the melanosomes, in a complex process orchestrating signal sensors, transcription factors, and many proteins. Melanosomes then transfer melanin to the surrounding keratinocytes, where it forms a cap around the nucleus to protect them from UV-induced DNA damage. Keratinocytes stimulate melanogenesis and contribute to melanocyte viability by secreting a variety of soluble factors (Yaar and Gilchrest, 2004; Yamaguchi and Hearing, 2009). We recently showed that UVB irradiation generates formylindolo(3,2-*b*)carbazole (FICZ), a tryptophan derivate, in epidermal keratinocytes (Fritsche *et al.*, 2007). FICZ is a high-affinity ligand and endogenous activator (Rannug *et al.*, 1987; Wincent *et al.*, 2009) of the transcription factor aryl hydrocarbon receptor (AhR), which is a well-known pleiotropic sensor of environmental factors (Burbach *et al.*, 1992; Denison and Nagy, 2003; Afaq *et al.*, 2009). UVB-induced, FICZ-mediated AhR activation is an essential part of the UVB-induced stress response in epidermal keratinocytes and mediates the expression of a variety of genes, such as cytochrome P450 (CYP) and Cox-2 enzymes (Fritsche *et al.*, 2007).

AhR is a ligand-activated transcription factor present in many cell types. Following ligand binding, AhR translocates to the nucleus, dimerizes with ARNT, enabling the complex to bind to DNA recognition sequences (called dioxin-responsive elements (DREs)), and eventually initiates gene transcription (Schmidt and Bradfield, 1996; Kewley *et al.*, 2004). AhR activation affects cell proliferation, differentiation, and apoptosis, and modulates cell- and organ-specific functions (Bock and Kohle, 2006; Matsumura *et al.*, 2009).

A link between AhR activation and melanogenesis is suggested by clinical observations of the toxic exposure of humans to AhR ligands such as dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls. In Japan in 1968 and in Taiwan in 1979, accidental mass-poisoning incidents occurred from cooking oil contaminated with polychlorinated biphenyls, among which were strong AhR ligands. These patients showed increased skin and gingival pigmentation, and children of mothers exposed to polychlorinated biphenyls were born with dark pigmentation of head, face, and genitals (''cola-babies'') (Kikuchi, 1984; Masuda, 1985; Hashiguchi *et al.*, 2007; Kanagawa *et al.*, 2008). There is also evidence

[1]*Leibniz Institute for Environmental Medical Research (IUF), Düsseldorf, Germany and* [2]*Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

[3]*Current address: AG Molecular Immunology, Life and Medical Sciences, University of Bonn, Bonn, Germany*

Correspondence: Charlotte Esser, Leibniz Institute for Environmental Medical Research, IUF, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf, Germany. E-mail: chesser@uni-duesseldorf.de

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; $AhR^{-/-}$ mice, mice, in which AhR is deleted in all cells; ARNT, AhR nuclear translocator; CYP, cytochrome P450; DOPA, dihydroxyphenylalanin; DRE, dioxin-responsive element; EC, epidermal cell; FICZ, 6-formylindolo(3,2-b)-carbazole; $K5Cre^{+}$, mice in which AhR is conditionally deleted in keratin 5-expressing keratinocytes; NMM, normal mouse melanocyte; SCF, stem cell factor, kit ligand; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; WT, C57BL/6 wild-type mice

Received 20 March 2010; revised 11 June 2010; accepted 28 July 2010; published online 23 September 2010

© 2011 The Society for Investigative Dermatology

that exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), a potent AhR ligand, causes skin hyperpigmentation (Dunagin, 1984). In addition, infection with the yeast *Malassezia sp.* alters skin pigmentation (Karaoui *et al.*, 1981; Kramer *et al.*, 2005), presumably through its compound malassezin (2-(1H-indol-3-ylmethyl)-1H-indole-3-carbaldehyde), a natural ligand of the AhR (Wille *et al.*, 2001). We therefore hypothesized that activation of the AhR signaling pathway may have a role in the physiological tanning response of the skin, which is induced by solar UVB radiation.

RESULTS

AhR is expressed and functional in normal murine melanocytes

We have previously shown that keratinocytes and Langerhans cells in murine skin express AhR (Fritsche *et al.*, 2007; Jux *et al.*, 2009). As shown in Figure 1a, AhR and ARNT mRNA were also easily detectable in normal mouse melanocytes (NMMs). AhR protein levels in NMM from C57BL/6 mice reached ~50% of the levels observed in the liver and thymus (Figure 1b). To confirm that the AhR pathway is functional, we treated cultured NMM with either TCDD, UVB-irradiated tryptophan, or FICZ for 24 hours and analyzed induction of the classical AhR-responsive gene *cyp1a1*. As expected, all three exposures markedly induced *cyp1a1* in these cells (Figure 1c–e). The response was abrogated in AhR$^{-/-}$ mice for all ligands, even at the highest FICZ concentration.

AhR is involved in skin pigmentation *in vivo*

To assess the role of the AhR signaling pathway in UVB-induced skin pigmentation, C57BL/6 wild-type (WT) mice and AhR$^{-/-}$ mice on a C57BL/6 background were exposed to two different tanning regimens (Kawaguchi *et al.*, 2001; D'Orazio *et al.*, 2006), and melanin content was measured in the ears of UVB- or sham-irradiated mice. As shown in Figure 2b, the melanin contents increased through single-dose regimen in the ears of C57BL/6 mice were detectable. This UVB-induced melanin increase was significantly weaker ($P=0.0039$ in Figure 2b) in the ears of irradiated AhR$^{-/-}$ mice (Kawaguchi *et al.*, 2001). Similar results were achieved with a protocol of $20 \times 100\,mJ\,cm^{-2}$ UVB irradiations over a period of 4 weeks (Figure 2c). Photographs of tanned tail skin are shown in Figure 2a.

Essentially identical differences were obtained when the activity of tyrosinase, the key enzyme in melanogenesis, was measured in tail skin of irradiated mice. UVB-induced tyrosinase activity was weaker in AhR$^{-/-}$ than in WT mice, as measured with the second tanning protocol ($P=0.0096$ in Figure 2d).

Keratinocytes do not mediate the AhR-dependent tanning response

Exposure of skin to UVB results in the release of soluble factors by keratinocytes, which stimulate melanocyte proliferation and melanogenesis, most importantly α-melanocyte-stimulating hormone (Kadekaro *et al.*, 2003). We bred keratinocyte-specific AhR$^{-/-}$ mice (K5Cre^{+}:AhR$^{flox/flox}$; "conditional knockout"). In these mice, AhR was not expressed in keratinocytes, whereas AhR expression was detectable in all other organs tested, including in keratinocyte-depleted epidermal cells (ECs) (Figure 3a). As shown in Figure 3b and c, K5Cre^{+}:AhR$^{flox/flox}$ mice tanned normally on UVB radiation, measured by melanin content and tyrosinase activity. This indicates that AhR absence in keratinocytes does not affect the release of melanogenic factors. Congruent with this, neither the murine genes for proopiomelanocortin

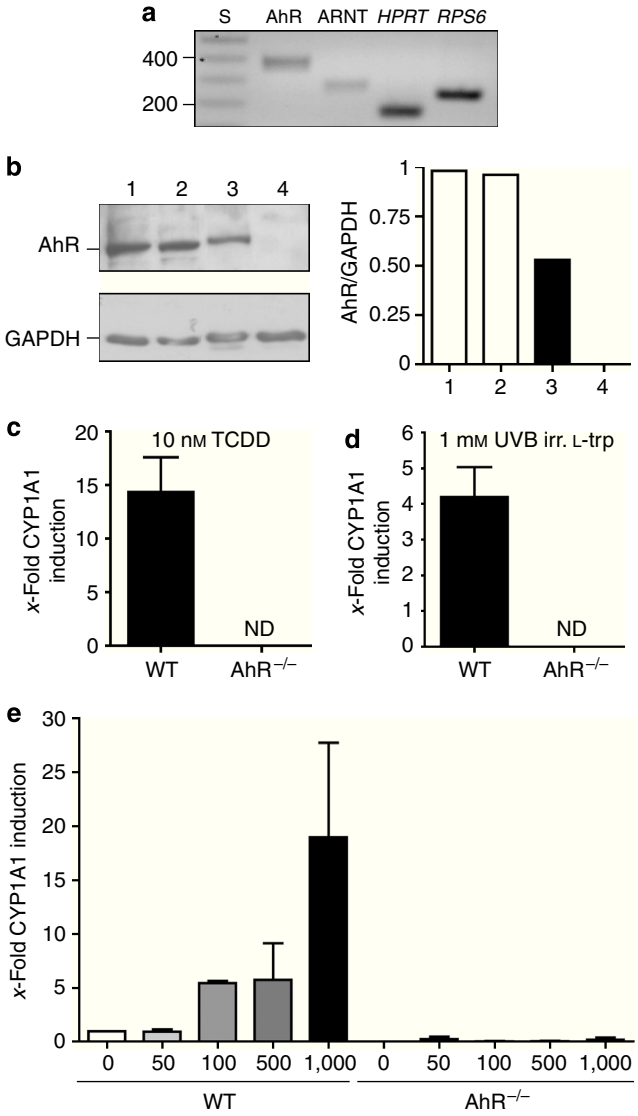


Figure 1. Normal mouse melanocytes express high levels of functional aryl hydrocarbon receptor (AhR). Mouse melanocytes were cultivated from epidermal skin as described. (**a**) Standard PCR and agarose gel electrophoresis of AhR, ARNT, and two housekeeping genes, *HPRT* and *RPS6*. S: molecular weight standard. One representative experiment out of three is shown. (**b**) Western blot: bars show densitometry of AhR expression standardized to GAPDH. 1: liver, 2: thymus, 3: wild-type (WT) melanocytes, 4: AhR$^{-/-}$ melanocytes. Primary cultivated melanocytes were exposed to 10 nM 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) (**c**), 1 mM UVB-irradiated tryptophan (**d**), or 50–1000 pM formylindolo(3,2-*b*)carbazole (FICZ) (**e**). Shown is *n*-fold induction of RNA for CYP1A1 after 24 hours, either in WT (black bars) or AhR$^{-/-}$ (white bars). The mean and SD values of three (TCDD, UVB-irr. L-trp) or two (FICZ dose) independent experiments are shown. ND, not detectable; UVB-irr. L-trp, UVB-irradiated L-tryptophan tryptophan.

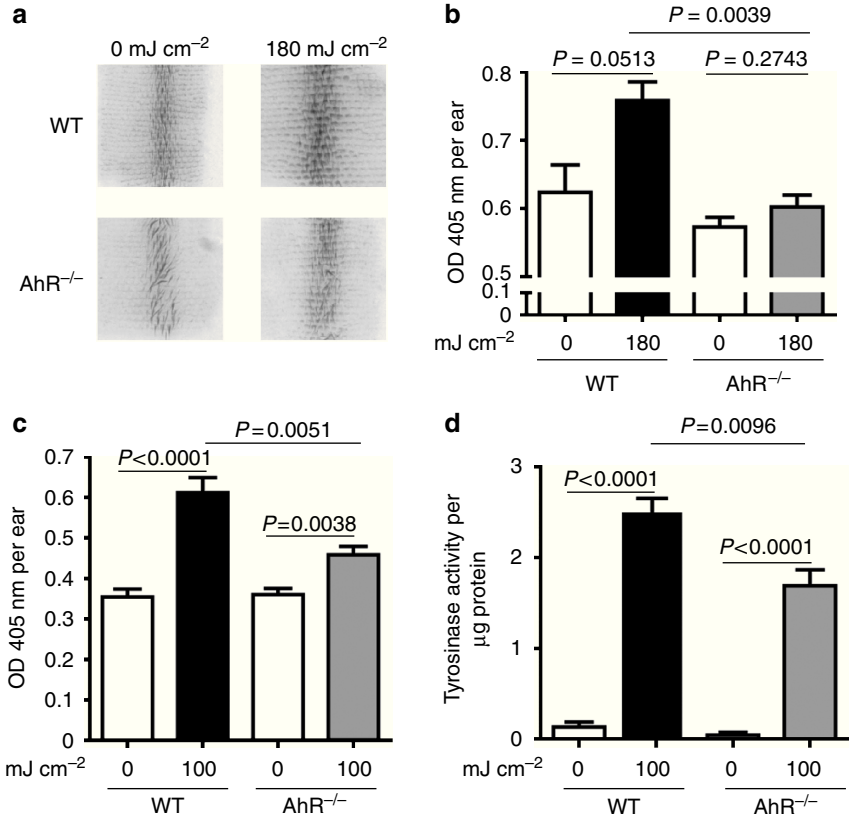


Figure 2. Tanning response of wild-type (WT) versus aryl hydrocarbon receptor (AhR)-deficient mice. (**a**) Photographs of epidermal sheets from tail skin of WT or $AhR^{-/-}$ mice, taken 2 weeks after a single irradiation of 180 mJ cm^{-2}. The length of the biopsied tail pieces is approximately 1 cm each. (**b**, **c**) Melanin content after 1 × 180 mJ cm^{-2} or 5 × 100 mJ cm^{-2} per week for 4 weeks. (**d**) Tyrosinase activity in tail epidermis. Three to six mice were used per group. Shown is a representative experiment. OD, optical density.

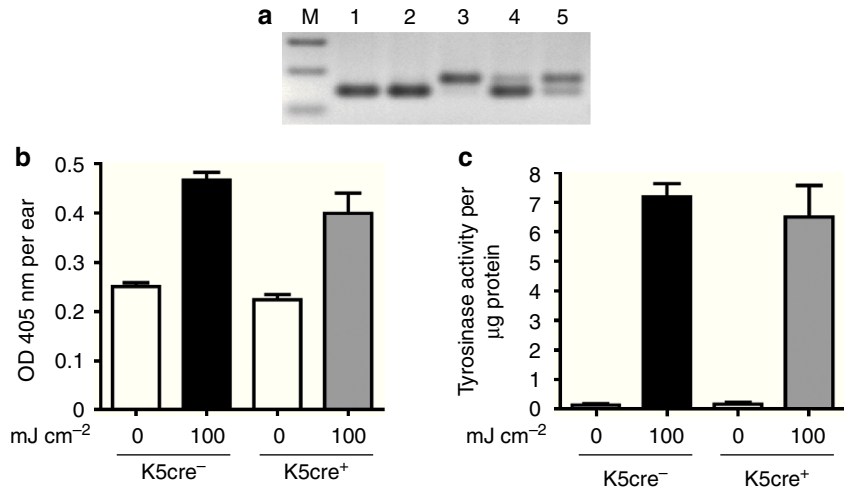


Figure 3. Tanning response in $K5Cre^{+}$ mice. (**a**) Aryl hydrocarbon receptor $(AhR)^{flox/flox}$ mice were bred with $K5^{Cre}$ mice. Keratinocyte-specific excision was confirmed with PCR. Epidermal cells (ECs) were stained with CD117, MHCII, and CD3 and separated by magnetic cell sorting. Lanes from left to right: (M) 100 bp size standard (1) liver, (2) thymus, (3) enriched KC, (4) CD117/MHCII/CD3-enriched ECs, (5) unseparated epidermis. Wild-type (WT) band: 140 bp; excised band: 180 bp. (**b**) Melanin content in the ears of conditionally deficient mice ("$K5Cre^{+}$") in keratinocytes and in control mice having no AhR deletion ("$K5Cre^{-}$", exposed to 100 mJ cm^{-2} UVB five times per week for 4 weeks). (**c**) Tyrosinase activity in tail epidermis. At least four mice were used per group.

(the precursor of α-melanocyte-stimulating hormone) nor those for endothelin-1 or basic fibroblast growth factor have valid dioxin-responsive elements in their promoters in mice (Sun *et al.*, 2004). These results indicate that the decreased tanning response of $AhR^{-/-}$ mice is confined at the level of melanocytes.

Activated AhR does not induce melanogenic enzymes and melanin production

We measured *tyr*, *tyrp1*, *tyrp2*, and *mitf* expression in cultures of NMMs after 10 nM TCDD, 1 mM UVB-irradiated tryptophan, and 1 nM FICZ, concentrations that easily induce the AhR target gene *cyp1a1* (Figure 1). We also tested *tyr* activity on FICZ treatment. Conversion of tyrosine into dihydroxyphenylalanin (DOPA) by tyrosinase is the rate-limiting step in melanogenesis. AhR activation did not enhance or mediate tyrosinase transcription or tyrosinase activity, nor did it affect *tyrp1*, *tyrp2*, or *mitf* RNA expression. In addition, melanin production did not increase in cultured normal melanocytes on stimulation with FICZ (data not shown). Moreover, the two possible DREs of the *tyrp1* promoter did not drive luciferase in HepG2 cells transfected with a reporter vector on TCDD treatment (data not shown). We conclude that ligand-induced activation of AhR does not drive *de novo* transcription of these key factors in melanin production in murine melanocytes.

UVB-induced melanocyte density is lower in AhR-deficient mice than in WT mice

We next analyzed UVB-induced proliferation of melanocytes in WT and AhR$^{-/-}$ mice (Rosdahl and Szabo, 1976). Mice were exposed to a single tanning UVB dose of 180 mJ cm^{-2}, and DOPA-positive cells were counted in ear epidermis 2 weeks later. As shown in Figure 4, UVB radiation led to increased melanocyte density, approximately 3-fold in C57BL/6 mice, but only about 2-fold in AhR-deficient mice (Figure 4a and b). In irradiated K5Cre^{+} mice, DOPA-positive cell density increased by UVB as much as in K5Cre^{-} mice (data not shown).

Pigmentation and melanocyte differentiation-related genes are deregulated in AhR$^{-/-}$ mice

Theoretically, UVB irradiation could increase the number of DOPA-positive melanocytes by affecting (i) proliferation of mature melanocytes, (ii) differentiation of melanoblasts, (iii) mobilization of melanocytes from distant sites, for example, the hair follicle, (iv) activation of melanin synthesis in dormant melanocytes, or (v) a combination thereof. To better understand the role of AhR-signaling with regard to these possibilities, we performed a microarray analysis of cultured primary melanocytes from WT and AhR$^{-/-}$ mice. A total of 291 genes were expressed at least 3-fold higher in WT than in AhR$^{-/-}$ mice, and 45 genes higher in AhR$^{-/-}$ mice than in WT mice (see Supplementary Data S1 online). As expected, the AhR target gene *cyp1b1* was no longer expressed in AhR$^{-/-}$ melanocytes. Gene ontology analysis tagged 65 (WT > AhR$^{-/-}$) and 14 (AhR$^{-/-}$ > WT) of these genes as connected to cell differentiation, apoptosis, and proliferation. Several genes known to be involved in pigmentation were also found to be deregulated (Table 1). The chemokine SDF-1/CXCL12 and its receptor CXCR4 were expressed more strongly in WT melanocytes (Table 1). CXCL12/CXCR4 signaling has an important role in directing the migration and positioning of melanoblasts (Belmadani *et al.*, 2009). Endothelin-1 (*end1*) and kit ligand (*kitl*), two factors involved in melanocyte proliferation, were expressed 3.6- and 6-fold higher in WT than in AhR$^{-/-}$, that is, they need AhR for normal expression levels. Differentiation and proliferation of melanocytes require *kitl* (stem cell factor (SCF)), which can be secreted by keratinocytes and melanocytes themselves and binds to c-kit on the surface of melanocytes. Interestingly, we found that cultured WT melanocytes expressed *kitl*; however, in AhR$^{-/-}$ melanocytes, *kitl* expression was hardly detectable; expression of soluble *kitl* was higher than membrane-bound *kitl*, suggesting that melanocyte-produced SCF can function in an autocrine manner (Figure 5a). Flow cytometry showed that a lower number of AhR$^{-/-}$ melanocytes express c-kit on the surface in comparison with WT melanocytes (Figure 5b). Both *kitl* and *c-kit* have several putative DREs in their promoters (Sun *et al.*, 2004). Accordingly, a 358 bp promoter fragment of *c-kit* containing two DREs could drive luciferase expression in a reporter assay, indicating that the DREs are functional (Figure 5c). Collectively, these data suggest that UVB-induced migration and differentiation of melanoblasts into DOPA-positive melanocytes is favored by a functional AhR.

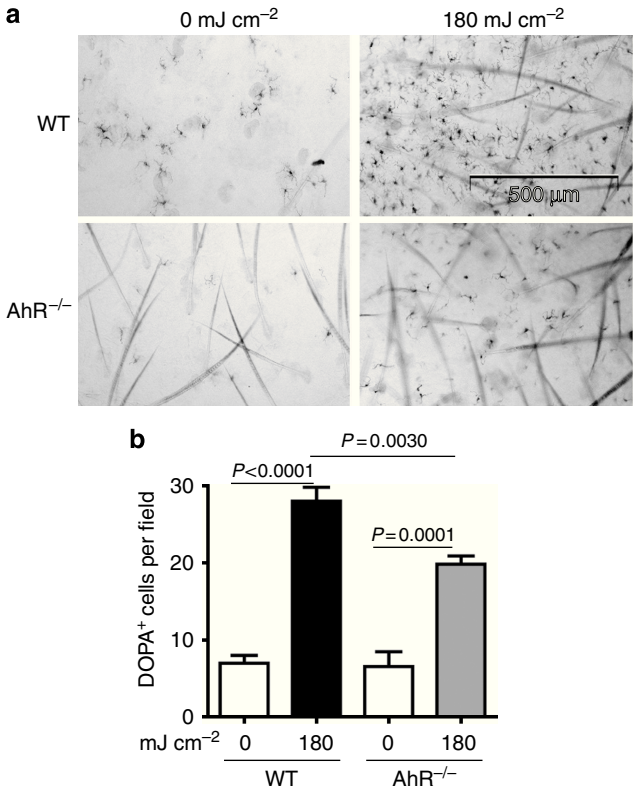


Figure 4. UVB-induced pigmentation. (**a**) Increase in dihydroxyphenylalanin (DOPA)$^{+}$ cells in ear epidermis of wild-type (WT) versus aryl hydrocarbon receptor (AhR)$^{-/-}$ mice. WT and AhR$^{-/-}$ mice were irradiated with a single dose of 180 mJ cm^{-2}, epidermis-prepared, and DOPA-stained. Scale bar = 500 μm. (**a**) Photographs of microscope fields in each group. (**b**) DOPA-positive ear melanocytes were counted using a light microscope, as described in Materials and Methods. Shown is mean + SD of 22 viewing fields. Five to six mice were used per group.

Table 1. Selected differentially expressed genes in WT versus AhR$^{-/-}$ melanocytes[1]

Probe set ID[4]	*n*-Fold induction	Gene name	Gene symbol	Gene product function[2]
(WT > AhR$^{-/-}$)				
1418203_at	11.0	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced	*Pmaip1*	Response to UV
1448710_at	7.3	Chemokine (C–X–C motif) receptor 4	*Cxcr4*	Migration of melanocyte progenitors
1415855_at	6.0	Kit ligand (stem cell factor; steel factor)	*Kitl*[3]	Neural crest migration: differentiation and proliferation of melanocytes
1451924_at	3.6	Endothelin 1	*Edn1*[3]	Neural crest cell development: proliferation of melanocytes
1428645_at	3.4	Guanine nucleotide binding protein	*Gnai3*	Melanosome biogenesis
1417574_at	2.7	Chemokine (C–X–C motif) ligand 12	*Cxcl12*	Ligand of *Cxcr4*
AhR$^{-/-}$ > WT				
1448261_at	12.3	Cadherin 1 (E-cadherin)	*Cdh1*[3]	Melanocyte positioning in the skin
1437430_at	4.5	Solute carrier family 45, member 2	*Slc45a2*	Pigmentation
1449031_at	3.5	Shisa homolog 2 (*Xenopus laevis*)	*Shisa2*	Antagonistic to Wnt and Fgf signaling

Abbreviations: AhR, aryl hydrocarbon receptor; WT, wild-type.
[1]Melanocytes were cultivated from tail skin epidermis and harvested. Purity was determined optically (>98%), and by presence of melanocyte specific genes and absence of keratinocytes or fibroblast specific genes. RNA was hybridized to Affymetrix MOE430A 2.0 arrays, representing 22,600 genes.
[2]Gene function as given by gene ontology analysis and in literature.
[3]Verified by reverse transcriptase PCR.
[4]Affymetrix nomenclature (www.affymetrix.com).

DISCUSSION

We show here that AhR expression in normal murine melanocytes has a pivotal role in the UVB tanning response. To our knowledge, this is previously unreported. Treatment with two standard tanning protocols resulted in increased melanin content and tyrosinase activity per epidermal area unit in WT but not in AhR-deficient mice. Moreover, AhR absence impaired UVB-induced increase in melanocyte density in the epidermis.

How could AhR activation induce or support skin pigmentation? As a transcription factor, AhR could induce directly any of the genes involved in melanogenesis, either in keratinocytes or in melanocytes. The results of this study indicate that this is probably not the case. First, conditional deficiency of AhR in keratinocytes was permissive for tanning, excluding the possibility that keratinocyte-derived promelanogenic factors are targets of activated AhR. Second, although we observed a lower tyrosinase activity in the skin of UVB-irradiated AhR$^{-/-}$ mice compared with WT mice, the melanin production per cell did not differ between the two genotypes. Several genes involved in melanogenesis have dioxin-responsive elements in their promoters. Of the three key enzymes driving melanin synthesis (*tyr*, *tyrp-1*, and *tyrp2*), only *tyrp1* has putative DREs. However, this was not functional in a luciferase reporter assay (data not shown).

Taken together, we conclude that induction of *de novo* melanin synthesis by activated AhR does not contribute to UVB-induced tanning in mice.

AhR deficiency impaired the UVB-mediated increase in melanocyte density in the skin. Microarray analysis revealed that absence of AhR changed the expression of genes in melanocytes, including several genes involved in melanocyte proliferation and differentiation, such as *kitl*. The latter displayed a particularly strong dependence on AhR. We found that cultured AhR$^{-/-}$ melanocytes expressed lower levels of SCF and that the number of c-kit-positive cells in the epidermis was lower in AhR$^{-/-}$ than in WT mice. The murine *c-kit* gene has two high-quality DREs in its promoter, and the c-kit promoter including these DREs could drive luciferase expression on TCDD treatment in a reporter assay. The signaling of SCF (or kit-ligand) and its receptor c-kit has an important role in melanocyte differentiation, proliferation, and melanogenesis. c-kit encodes a membrane receptor with tyrosine kinase activity. The injection of a c-kit-inhibitory antibody abolished UVB-induced pigmentation (Hachiya *et al.*, 2001). This finding was confirmed and extended by Kawaguchi *et al.* (2001), who showed that blocking of c-kit impaired UV-induced differentiation of melanocyte precursors to mature melanocytes. It is well known that the AhR can promote or inhibit cell differentiation, for example, of thymocytes, dendritic cells, or T-cell subsets (Kremer *et al.*, 1994; Kawaguchi *et al.*, 2001; Veldhoen *et al.*, 2008; Jux *et al.*, 2009; Platzer *et al.*, 2009).

In aggregate, our data suggest that AhR signaling is involved in the homeostasis and/or differentiation of melanocytes and melanocyte precursors, possibly by controlling SCF expression.

The clinical relevance of these results may be 3-fold. First, modulation of AhR signaling in melanocytes may constitute a previously unrecognized mechanism to induce or prevent skin pigmentation in normal, healthy skin. Second, AhR signaling may be involved in the pathogenesis of vitiligo, because hypopigmentation in this disease is partly due to the reduction of melanocyte numbers in lesional skin. It was

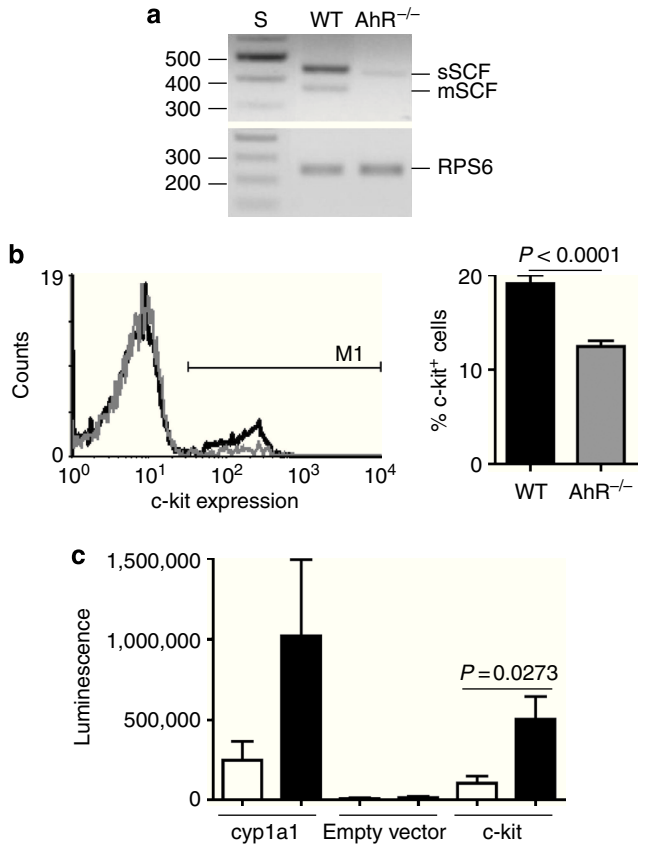


Figure 5. Expression of stem cell factor (SCF) and c-kit in wild-type (WT) versus aryl hydrocarbon receptor (AhR)$^{-/-}$ melanocytes. (**a**) Primary melanocytes were cultured, harvested, and RNA-prepared for PCR of SCF and housekeeping gene *Rps6*; for SCF primers, see reference (Kawaguchi *et al.*, 2001). The primers yield two products, soluble (sSCF) and membrane-bound SCF (mSCF). S: size marker. (**b**) Epidermal cells were prepared from WT and AhR$^{-/-}$ mice. Shown is a histogram of CD117 (c-kit) surface expression of cells negative for MHC-II, CD24, CD3, and CD16/32 to exclude Langerhans cells, keratinocytes, and T cells (left graph), and a bar diagram summarizing the results of six independent flow cytometry experiments (right graph). (**c**) Luciferase assay of c-kit promoter (two putative dioxin-responsive elements (DREs)) cloned into pGL3basic. Shown is the luminescence of HepG2 cells after transfection with the plasmid. As controls, results with transfections of the promoter of cyp1a1, which has five valid DREs, and the empty vector are shown. White bars: untransfected cells, black bars: transfected cells. For details on cloned fragments, see Supplementary Data S2 online.

shown by Nishimura *et al.* (2002) that hair follicle melanocytes can repopulate depigmented epidermis in transgenic mice constitutively expressing SCF. It is therefore tempting to speculate that topical application of AhR agonists such as FICZ may be effective in inducing skin pigmentation in these patients. Corresponding clinical studies have just been initiated.

Third, the possible role of AhR in melanocyte proliferation may indicate its involvement in the pathogenesis of malignant melanoma. AhR expression in human melanoma cells has been reported and connected to AhR-dependent regulation of genes involved in melanoma progression (Villano *et al.*, 2006). Studies using malassezin suggested AhR-mediated melanoma cell death (Kramer *et al.*, 2005). In summary, our results provide evidence of AhR as a critical mediator of skin tanning. As a sensor of environmental factors, the AhR may represent a previously unrecognized target for the regulation of skin pigmentation.

MATERIALS AND METHODS

Mice

AhR$^{-/-}$ (Schmidt *et al.*, 1996) and AhR$^{flox/flox}$ mice (Walisser *et al.*, 2005) were purchased from Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany). Keratinocyte-specific AhR-knockout mice (K5Cre^{+}) were generated by breeding mice expressing Cre-recombinase under the control of the K5 promoter (Tarutani *et al.*, 1997) with AhR$^{flox/flox}$ mice. Keratinocytes were purified from the epidermis of the resulting K5Cre^{+} mice by depletion of MHC-II, CD117^{+}, and CD3^{+} cells, and keratinocyte-specific AhR deletion was verified as described (Walisser *et al.*, 2005). Primers are given in Supplementary Data S3 online. Keratinocyte-negative ECs expressed AhR, as did the thymus, liver (see Figure 3a), kidney, lung, and heart (data not shown). All mice were kept under specific pathogen-free conditions. Mice were killed by CO_2 asphyxiation. All experiments were conducted in accordance with relevant German animal welfare laws and with approval of our institute.

Primary melanocyte culture

EC suspensions were prepared from tail skin of C57BL/6 and AhR$^{-/-}$ mice as described previously (Jux *et al.*, 2009). ECs were seeded at 1.5×10^6 cells per ml in six-well plates in serum-free melanocyte growth medium (Promocell, Heidelberg, Germany). NMMs were grown for 6–8 weeks, and passaged when confluent. All cells contained visible amounts of melanin at the end of the culture. Cells were treated with either 10 nM 2,3,7,8-TCDD (Promochem, Wesel, Germany) or FICZ for different time points.

UV irradiation

Mice were either irradiated once at 180 mJ cm^{-2} UVB and analyzed after 2 weeks, or irradiated at 100 mJ cm^{-2} five times per week for 4 weeks (Kawaguchi *et al.*, 2001; D'Orazio *et al.*, 2006). The irradiation source was a bank of four Philips UVB TL 20W/12/12Rs lamps (Eindhoven, the Netherlands), which emit UV within the range of 290–340 nm with an emission peak at 313 nm. The energy between 310 and 315 nm at a target distance of 33 cm was 0.47 mW cm^{-2} in the middle of the bank.

Melanin production

Melanocyte numbers and capacity to produce melanin were detected in epidermal sheets by the presence of DOPA-positive cells, and by measuring melanin content. DOPA stainings were carried out according to Kawaguchi *et al.* (2001), with slight modifications. Epidermal sheets were incubated in 0.1% DOPA in phosphate-buffered saline for 4 hours at 37 °C. Sheets were fixed in 10% formaldehyde/phosphate-buffered saline overnight, mounted on glass slides, and embedded in Kaiser's glycerine gelatine (Merck, Darmstadt, Germany). DOPA-positive cells were counted in a light microscope at ×250 magnification by two persons in a blinded manner. For each skin sample, 22 visual fields were counted.

The melanin content of individual ears was detected photometrically. Ears were excised and placed in lysis buffer

(100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl) with 75 μg ml^{-1} proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany). After lysis overnight, the solution was filtered through nylon gauze to remove hair and coarse debris. The solution was centrifuged for 10 minutes at 14,000 × *g*. The pellet was dissolved in 2 M NaOH in 20% DMSO at 70 °C, with vigorous shaking for 2 hours. Melanin was measured at 405 nm.

For photographs of tanned skin, tail epidermal sheets were prepared, fixed in 4% paraformaldehyde, and mounted on glass slides. Images were taken using a digital Canon EOS 5D (Tokyo, Japan), at f/4.0, in daylight.

Tyrosinase enzyme activity assays

Normal melanocytes or ECs were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed by incubating at 4 °C for 20 minutes in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) prepared with Complete Protease Inhibitor (Roche, Mannheim, Germany). Lysates were centrifuged at 14,000 × *g* for 15 minutes. Phosphate-buffered saline (120 μl) and 40 μl L-DOPA, resulting in 2 mg ml^{-1}, were added to 40 μl of supernatant. The mixture was incubated at 37 °C, and dopachrome formation was monitored by measuring absorbance at wavelength 492 nm every other minute until the reaction was exhausted. Tyrosinase activity was normalized to total protein content, and measured with the BCA protein assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Flow cytometry

Single-cell suspension from epidermal sheets was cultivated for 24 hours to allow reexpression of c-kit after trypsinization, and stained with CD117, MHC-II, CD16/32, CD3, and CD24, and analyzed on a FACScalibur with CellQuest Software (BD Bioscience, Heidelberg, Germany).

Western blotting

Western blotting was carried out with standard procedures, using Biomol (Hamburg, Germany) polyclonal rabbit antimouse AhR antibody directed against amino acids 1–402 of AhR (catalog number SA-210). The blots were reprobed with an anti-GAPDH antibody (clone 6C5, Acris, Herford, Germany) for loading control.

Real-time PCR

Total RNA from cultivated primary NMM, prepared with Trizol (Invitrogen, Darmstadt, Germany), was reverse transcribed and real-time PCR was performed on a Rotor-Gene RG 3000 (LTF Labortechnik, Wasserburg, Germany) with a SensiMixPlus SYBR PCR Kit (Quantace, Berlin, Germany). Crossing points (Cp) in the linear range of the fluorescent signal were determined with Corbett analysis software version 6.1 (Qiagen, Hilden, Germany). The *x*-fold induction relative to the housekeeping gene *Rps6* was calculated with the ΔΔCp method. For ARNT and AhR, normal PCR was performed, and bands were made visible with ethidium bromide staining. Sequences of PCR primers were as given in Supplementary Data S3 online.

Microarray

Total RNA was isolated with Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For microarray analysis, mRNA was amplified before chip hybridization using the MessageAmp Kit of Ambion (Austin, TX). RNA was biotinylated (Enzo Bio ArrayHighYield RNA transcript labeling kit (Affymetrix, High Wycombe, UK)) and purified. RNA was hybridized to MOE430A 2.0 gene chips (Affymetrix). The resulting *.chp files were analyzed with the bioconductor affy package using the RMA (robust microarray analysis) algorithm. Two independent experiments were conducted. The GEO accession number is GSE19411.

Luciferase assay

Promoter fragments (Supplementary Data S2 online) containing DREs from *tyrp-1, c-kit, and cyp1a1* were cloned into pGL3 basic vector (Promega, Madison, WI) and transiently transfected into HepG2 cells. As positive control, we used the promotor region of *cyp1a1* containing five valid DREs. Transfected cells were treated with 10 nM TCDD or DMSO as solvent control for 24 hours. Luciferase activities of reporter plasmids were determined using the firefly-luciferase assay system in a Multi-Bioluminat LB 9505C (Berthold Technologies, Bad Wild-bad, Germany).

Statistics

Data were analyzed by Student's *t*-test with GraphPad Prism software (La Jolla, CA). Means ± SEM were calculated.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the German Bundesministerium für Umwelt, project B4, the Deutsche Forschungsgemeinschaft, SFB 728 project C1 and GRK1427 project 8, and the Swedish Research Council FORMAS (216-2007-1294). We are grateful for the expert technical help of Ninon Krahnke-Schoelzel and the team at our animal facility. We thank Michael Brudek for photography, and Irmgard Förster, Josef Abel, and Ellen Fritsche for critical reading of the paper.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at http://www.nature.com/jid

REFERENCES

Afaq F, Zaid MA, Pelle E *et al.* (2009) Aryl hydrocarbon receptor is an ozone sensor in human skin. *J Invest Dermatol* 129:2396–403

Belmadani A, Jung H, Ren D *et al.* (2009) The chemokine SDF-1/CXCL12 regulates the migration of melanocyte progenitors in mouse hair follicles. *Differentiation* 77:395–411

Bock KW, Kohle C (2006) Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol* 72:393–404

Burbach KM, Poland A, Bradfield CA (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8185–9

D'Orazio JA, Nobuhisa T, Cui R *et al.* (2006) Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV-induced tanning. *Nature* 443:340–4

Denison MS, Nagy SR (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:309–34

Dunagin WG (1984) Cutaneous signs of systemic toxicity due to dioxins and related chemicals. *J Am Acad Dermatol* 10:688–700

Fritsche E, Schafer C, Calles C *et al.* (2007) Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:8851–6

Hachiya A, Kobayashi A, Ohuchi A *et al.* (2001) The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J Invest Dermatol* 116:578–86

Hashiguchi I, Yoshimine Y, Maeda H *et al.* (2007) [Epidemiologic examination on the prevalence of the periodontal diseases and oral pigmentation in Yusho patients in 2006]. *Fukuoka Igaku Zasshi* 98:170–5

Jux B, Kadow S, Esser C (2009) Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J Immunol* 182:6709–17

Kadekaro AL, Kanto H, Kavanagh R *et al.* (2003) Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. *Ann N Y Acad Sci* 994:359–65

Kanagawa Y, Matsumoto S, Koike S *et al.* (2008) Association of clinical findings in Yusho patients with serum concentrations of polychlorinated biphenyls, polychlorinated quarterphenyls and 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran more than 30 years after the poisoning event. *Environ Health* 7:47

Karaoui R, Bou-Resli M, Al-Zaid NS *et al.* (1981) Tinea versicolor: ultrastructural studies on hypopigmented and hyperpigmented skin. *Dermatologica* 162:69–85

Kawaguchi Y, Mori N, Nakayama A (2001) Kit(+) melanocytes seem to contribute to melanocyte proliferation after UV exposure as precursor cells. *J Invest Dermatol* 116:920–5

Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A (2004) The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36:189–204

Kikuchi M (1984) Autopsy of patients with yusho. *Prog Clin Biol Res* 137:19–30

Kramer HJ, Podobinska M, Bartsch A *et al.* (2005) Malassezin, a novel agonist of the aryl hydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, induces apoptosis in primary human melanocytes. *Chembiochem* 6:860–5

Kremer J, Gleichmann E, Esser C (1994) Thymic stroma exposed to arylhydrocarbon receptor-binding xenobiotics fails to support proliferation of early thymocytes but induces differentiation. *J Immunol* 153: 2778–86

Masuda Y (1985) Health status of Japanese and Taiwanese after exposure to contaminated rice oil. *Environ Health Perspect* 60:321–5

Matsumura F, Puga A, Tohyama C (2009) Biological functions of the arylhydrocarbon receptor: beyond induction of cytochrome P450s. Introduction to this special issue. *Biochem Pharmacol* 77:473

Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H *et al.* (2002) Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416:854–60

Platzer B, Richter S, Kneidinger D *et al.* (2009) Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits *in vitro* differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells. *J Immunol* 183:66–74

Rannug A, Rannug U, Rosenkranz HS *et al.* (1987) Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem* 262:15422–7

Rosdahl IK, Szabo G (1976) Thymidine labelling of epidermal melanocytes in UV-irradiated skin. *Acta Derm Venereol* 56:159–61

Schmidt JV, Bradfield CA (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:55–89

Schmidt JV, Su GH, Reddy JK *et al.* (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6731–6

Sun YV, Boverhof DR, Burgoon LD *et al.* (2004) Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res* 32:4512–23

Tarutani M, Itami S, Okabe M *et al.* (1997) Tissue-specific knockout of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7400–5

Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM *et al.* (2008) The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453:106–9

Villano CM, Murphy KA, Akintobi A *et al.* (2006) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 210:212–24

Walisser JA, Glover E, Pande K *et al.* (2005) Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:17858–63

Wille G, Mayser P, Thoma W *et al.* (2001) Malassezin—a novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*. *Bioorg Med Chem* 9:955–60

Wincent E, Amini N, Luecke S *et al.* (2009) The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem* 284: 2690–6

Yaar M, Gilchrest BA (2004) Melanocyte biology: before, during, and after the Fitzpatrick era. *J Invest Dermatol* 122:xxvii–xix

Yamaguchi Y, Hearing VJ (2009) Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 35:193–9

TOXICOLOGICAL SCIENCES **118(1)**, 98–107 (2010)
doi:10.1093/toxsci/kfq232
Advance Access publication August 20, 2010

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin Impairs Stable Establishment of Oral Tolerance in Mice

Stefanie Chmill, Stephanie Kadow, Meike Winter, Heike Weighardt, and Charlotte Esser[1]

Institute for Environmental Medical Research, Molecular Immunology Unit, 40225 Düsseldorf, Germany

[1]To whom correspondence should be addressed at Institute for Environmental Medical Research, Molecular Immunology Unit, Auf′m Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf, Germany. Fax: +49-211-3190910. E-mail: chesser@uni-duesseldorf.de.

Received March 25, 2010; accepted August 2, 2010

The toxic environmental pollutant 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is a potent immunomodulatory chemical. TCDD activates the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and suppresses peripheral humoral and cellular adaptive immune responses. Though the major route of uptake is via food, little is known until now on the immunotoxic effects of TCDD on the gut-associated lymphoid tissue. We show here that AhR is strongly expressed along the small intestine, especially in intestinal epithelial cells (IEC). The AhR marker gene *cyp1a1* is induced in IEC by oral TCDD exposure. We asked how TCDD affects oral tolerance, a unique function of mucosal immunity. C57BL/6 mice were injected with 10 μg/kg body weight TCDD and fed with ovalbumin (OVA) in a high-dose tolerization protocol. Mice were immunized and boosted with OVA on days 12, 23, and 55 after tolerization. Five of 14, 6 of 15, and 13 of 14 TCDD-treated mice generated OVA-specific immunoglobulin (Ig)G1 antibodies after the first, second, and third immunization with OVA, respectively. Only one mouse harbored anti-OVA IgG1 antibodies in the control group even after the third immunization with OVA. OVA-specific IgA in fecal samples of tolerized and TCDD-exposed mice could be detected at the levels of nontolerized mice, whereas completely absent in tolerant control mice. Correlated to this, we found in TCDD-treated mice an increase in interleukin-6 producing CD103+ dendritic cells (DC) present in the gut-draining mesenteric lymph nodes (MLN) and a small increase in the frequency of Th17 cells. Neither the frequencies nor the absolute numbers of immune cells in the lamina propria (LP) or in intraepithelial lymphocytes were changed by TCDD treatment. Our data not only have implications for food allergies in settings of environmental exposure but also raise concerns regarding the harmlessness of overdosing potential AhR agonist in food, which needs to be studied further.

Key Words: **mucosal immunity; Th17; aryl hydrocarbon receptor; tolerance; dendritic cells.**

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and other polyhalogenated hydrocarbons, including biphenyls and furans, are environmental pollutants with far-reaching toxic potential in humans and animals. They mediate toxicity via binding to and activating the aryl hydrocarbon receptor (AhR), a transcription factor and chemical sensor present in many (but not all) cell types. Classically, it mediates gene transcription in complex with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), another per-arnt-sim basic helix-loop-helix protein, and targets promoter elements called "dioxin-responsive element" (Beischlag *et al.*, 2008). Recently, alternative signaling of AhR via association with RelA or RelB was described, resulting in transcription of nuclear factor κB-responsive genes (Tian, 2009).

Immunotoxicological studies in mice exposed to TCDD showed drastic changes in thymocyte lineage decisions and impaired functions of many immune cells, including changes in cytokine profiles (Kerkvliet, 2009; Lai *et al.*, 1997; Laiosa *et al.*, 2003). The correlated systemic effects are strong immunosuppression of the humoral, cellular, and innate immune responses (Kerkvliet, 2002, 2009; Majora *et al.*, 2005; Schecter *et al.*, 2006). A definite role for AhR in immunity emerged from studies on Th17 cells and dendritic cells (DC) (reviewed in Esser *et al.*, 2009), two cell types with high expression of AhR (Jux *et al.*, 2009; Platzer *et al.*, 2009; Veldhoen *et al.*, 2008).

In humans, approximately 90% of environmental exposure to TCDD is via food (Schecter *et al.*, 2006; van Leeuwen *et al.*, 2000). Moreover, abundant constituents of food, such as plant flavonoids and indoles, or bacterial tryptophan products are agonists of the AhR and may activate this pathway in the gut (Nguyen and Bradfield, 2008). The gut is a highly active immune site in its own right, with about one third of all T cells of the body found intraepithelially and in the gut-associated lymphoid tissue (GALT), i.e., lamina propria (LP), Peyer's patches (PP), and mesenteric lymph nodes (MLN). GALT differs from the peripheral immune system because it has to balance responsiveness between pathogenic and harmless antigens, including food constituents and the symbiotic gut flora. The gut is lined with a single layer of epithelia cells, connected by tight junctions, and interspersed with goblet and paneth cells, which provide mucus and antimicrobial peptides, respectively (Artis, 2008). Interspersed in the epithelium are intraepithelial lymphocytes (IEL), mostly $CD8^+$ cells and, in particular, $CD8\alpha\alpha^+$ T cell receptor

© The Author 2010. Published by Oxford University Press on behalf of the Society of Toxicology. All rights reserved.
For permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

Downloaded from toxsci.oxfordjournals.org at Universitaets- und Landesbibliothek Duesseldorf on March 20, 2011

(TCR)$\gamma\delta^+$ T cells. The latter appear to strengthen the epithelial barrier function, e.g., by providing the lymphokine keratinocyte growth factor (Chen *et al*., 2002). Immune cells in the LP include $CD4^+$ T cells, plasma cells, DC, macrophages, natural killer cells, and mast cells.

It has been known for decades that feeding protein antigens prevents a subsequent immune response against this antigen, a phenomenon called "oral tolerance." The dose of antigen might be decisive regarding underlying mechanism. Although it is a matter of continuing debate, current evidence suggests that low doses preferentially induce regulatory T cells and immunosuppressive cytokines interleukin (IL)-4, IL-10, and transforming growth factor β (TGFβ), whereas high antigen doses lead to anergy, deletion, or increased susceptibility to apoptosis of antigen-specific T cells. The two forms are most likely not mutually exclusive (Faria and Weiner, 2005; Friedman and Weiner, 1994). Oral tolerance is maintained by specialized $CD103^+$ DCs, which sample the gut lumen, migrate to the MLNs, and present antigen (Jaensson *et al*., 2008; Worbs *et al*., 2006). Although the role and effects of AhR and TCDD on the function of peripheral DCs and differentiation of T cells have received considerable interest (Esser *et al*., 2009), surprisingly little is known on the effects of TCDD on cells of GALT, with only one study indicating an influence on oral tolerance (Kinoshita *et al*., 2006). These authors reported that a single oral administration of low-dose TCDD led to systemic sensitization to oral antigens and decreased immunoglobulin (Ig)A secretion in the gut by impairing B-cell function. We here extend these studies and asked whether and how TCDD exposure affects the homeostasis of gut immune cells and induction and maintenance of oral tolerance against the harmless food antigen ovalbumin (OVA) in a high-dose oral tolerance model.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Female C57BL/6 mice aged 8–10 weeks at the onset of experiments were from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and bred under specific pathogen-free conditions, receiving standard chow and water *ad libitum*. The experiments have been approved by and done in accordance with relevant German animal welfare laws.

Chemicals and reagents. TCDD (Cambridge Isotope Laboratories; dissolved in dimethylsulfoxid [DMSO]) was diluted in olive oil and applied by gavage at 10 μg/kg body weight (b.w.). Control mice received DMSO/olive oil only.

Feeding and immunization regimen. Mice were fed by gavage on days 0 and 2 and five times with 20 mg OVA (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) in 100 μl PBS. This represents a "high-dose" oral tolerization scheme (Friedman and Weiner, 1994). Preliminary tests indicated that this protocol led to complete failure to produce peripheral anti-OVA–specific IgG1 antibodies after immunization. Lower repetitive doses or a single dose of 50 mg OVA per mouse led to incomplete suppression of antibody response in our hands, as also reported in the literature (Mowat *et al*., 1982). Feeding was started 3 days after TCDD treatment, i.e., at a time point when TCDD is fully absorbed and distributed throughout the body. Mice were immunized with 10 μg OVA in 100 μl PBS/CFA emulsion (first immunization) or PBS/IFA emulsion (booster immunizations) on days 12, 23, and 55. To trigger OVA-specific antibody secretion into the gut, mice were fed three times 1 mg OVA in 100 μl PBS by gavage on days 38, 41, and 43.

Sample preparation. Serum was prepared from coagulated blood and frozen at −20°C until further use. For fecal samples, two to five fecal pellets per mouse were collected and dried at 4°C for weighing (Vetvik *et al*., 1998). A total of 100 mg of fecal matter was dissolved in 1 ml PBS/0.01% NaN_3 by shaking at room temperature (RT) for 3 h. Particulate matter was removed by centrifugation and samples stored at −20°C.

Enzyme-linked immunosorbent assay. Total and OVA-specific antibody concentrations were measured by ELISA. For detection of OVA-specific antibodies, ELISA plates were coated with 100 μg OVA/ml and blocked. Serum or fecal samples were diluted (1:10.000–1:80.000 or 1:8, respectively) in PBS/1% fetal calf serum and added to the wells. The plate was developed with biotinylated anti-IgG1 or IgA antibodies (SBA, Birmingham, AL). The amount of OVA-specific antibodies is given relative to our own standard sera and fecal samples acquired from immunized mice.

Total antibody concentration was determined using isotype-specific antibodies for coating. All antibodies were from Sigma (anti-IgA coating) or SBA. IgA and IgG1 standards (hybridomas 233.1.3 and N1 G9) were a kind gift of C. Uthoff-Hachenberg (University of Cologne).

RT-PCR. RNA and complementary DNA preparation was according to standard procedures. For RNA from complete intestine, about 1-cm^2 pieces were put on a shaker for 3 h at 37°C in TRIzol (Invitrogen) before chloroform extraction. RT-PCR was performed as previously published (Frericks *et al*., 2007).

Single cell preparations of IEL and LP cells. The small intestine was carefully removed and stripped of mesenterial tissue. The inside was flushed with PBS, PPs were removed with a scalpel, and the intestine was opened lengthwise. Segments (approximately 1 cm in length) were placed in 5mM EDTA in PBS (pH7.2) and shaken vigorously in a water bath at 37°C for 40 min to release the intestinal epithelial cells (IEC) and IELs into the solution. IELs were purified further on a 75%/40%/25% Percoll (Biochrom) gradient. LP cells were obtained by digesting the remaining solid gut pieces with 100 U/ml collagenase VII from *Clostridium histolyticum* (Sigma) for 1.5 h at 37°C under constant stirring at 200 rpm (Westendorf *et al*., 2009).

Flow cytometry. Single cell suspensions were incubated with Fc-block (anti-CD16/32) before staining with the indicated antibodies (10 min, 4°C). Antibodies used were anti-CD16/32 (Fc-Block, clone 2.4G2), anti-$CD4^{APC}$ (clone RM4-5), anti-$CD8a^{PerCP}$ (clone 53-6.7), anti-$CD8b^{PE}$ (clone H35-17.2), anti-$CD19^{FITC\ or\ APC}$ (clone 1D3), anti-$TCR\gamma\delta^{FITC}$ (clone GL3), and anti-$CD69^{PE}$ (clone H1.2F3), all from BD Pharmingen (Heidelberg, Germany). Anti-$CD11c^{FITC}$ (clone N418), anti-$MHCII^{APC}$ (clone M5/114.15.2), and anti-$CD103^{PE}$ (clone 2E7) antibodies for surface staining were from eBioscience (Frankfurt, Germany). The $FoxP3^{FITC}$ staining kit (antibody clone FJK-16s) from eBioscience was used for staining regulatory T cells. A total of 5×10^6 cells/ml from MLNs or PPs were stimulated *in vitro* with phorbol myristate acetate (5 ng/ml) and ionomycin (250 ng/ml). BrefeldinA (1 μl/ml; Golgi Plug, BD Pharmingen) was added 5 h prior to staining to inhibit cytokine secretion. After surface staining, cells were fixed in 2% paraformaldehyde in PBS for 20 min at RT and permeabilizied with 0.5% saponin. Cells were then incubated for 20 min at RT with the indicated intracellular antibodies in PBS/0.5% saponin and analyzed as above (Janke *et al*., 2010). Anti-$IL\text{-}6^{PE}$, IL-17 ^{PE}, interferon-$(IFN)\gamma^{APC}$, and $IL\text{-}10^{PE}$ antibodies were from BD Pharmingen. At least 50,000 cells were collected in list mode on a fluorescence activated cell sorter (FACS)Calibur and analyzed with FlowJo software.

Cell sorting. Mesenteric DC were enriched using CD11c magnetic beads (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) and $CD11c^+$ $MHCII^+$ $CD103^+$ triple-positive cells were sorted on a FACS to purity greater 95%. $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells were sorted with the magnetic cell sorter (MACS) (Miltenyi) to purity greater 80%. IECs were identified based on their scatter prior to Percoll centrifugation and obtained more than 95% pure.

Downloaded from toxsci.oxfordjournals.org at Universitaets- und Landesbibliothek Duesseldorf on March 20, 2011

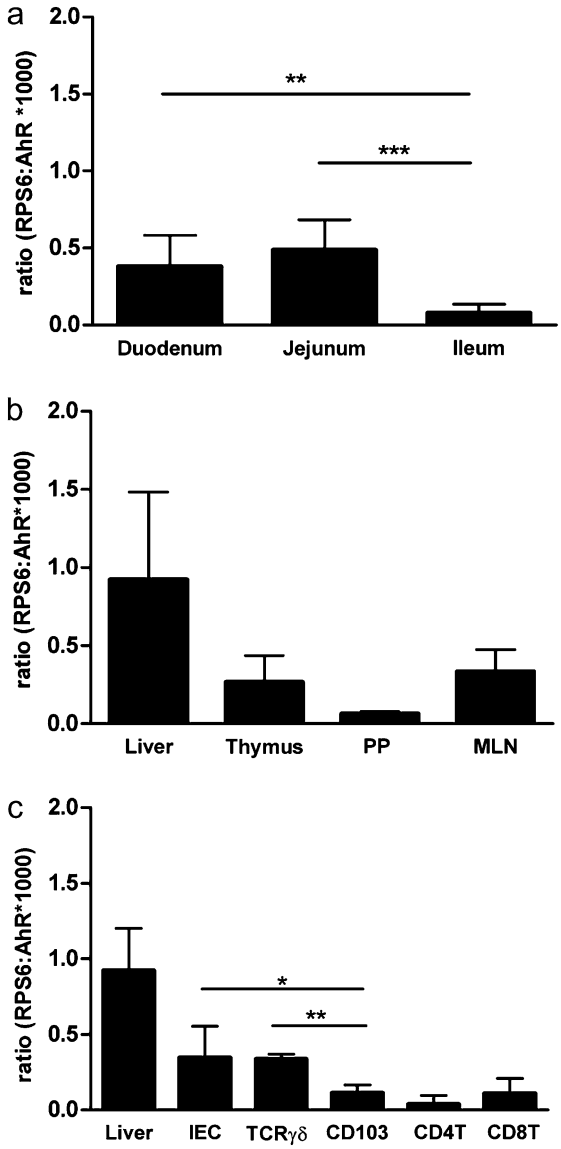


FIG. 1. Messenger RNA levels of AhR in gut, gut-associated immune cells, and liver. Expression levels of AhR were determined by real-time PCR in relation to housekeeping gene Rps6. (a) Total duodenal, jejunal, and ileal sections. (b) PPs and MLNs compared with liver and thymus (organs of high-AhR expression). (c) IEC, CD8αα$^+$ TCRγδ$^+$ (TCRγδ), and CD103$^+$DC (CD103DC) were FACS sorted to purity of more than 95% from IEL or MLN. CD4 and CD8 T cells were sorted via MACS from MLN to purity greater 80%. Graphs show that data are from $n = 3$–6 mice and assayed in two independent experiments. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

Statistics. Data were analyzed with GraphPad Prism software. Results are expressed as mean value ± SD (unless indicated otherwise). p values < 0.05 as determined with Student's t-test or ANOVA were considered significant.

RESULTS

GALT and Gut Epithelial Cells Express Functional AhR

AhR is expressed abundantly in some organs, such as liver and lung, but absent in, e.g., testis and muscle (Frericks *et al.*, 2007). With respect to the immune system, analysis of sorted subsets has revealed differential and specific AhR expression in only some immune cell subsets, in particular differentiated Th17 cells and CCR6$^+$ γδ T cells, Langerhans cells, and other DC subsets (Jux *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2009; Veldhoen *et al.*, 2008). We tested AhR expression in gut cells by semiquantitative PCR. AhR transcripts were detectable in the duodenal, jejunal, and ileal gut segments (Fig. 1a). MLNs expressed AhR at levels similar to those of the thymus (an organ with known AhR abundance). In PPs, AhR transcripts were barely detectable (Fig. 1b). IECs and CD8αα$^+$ TCRγδ$^+$ IEL, a specialized T-cell type probably responsible for epithelial integrity and immune surveillance (Hayday and Spencer, 2009), also expressed AhR strongly (Fig. 1c). In contrast, CD103$^+$DC in MLN expressed far less AhR.

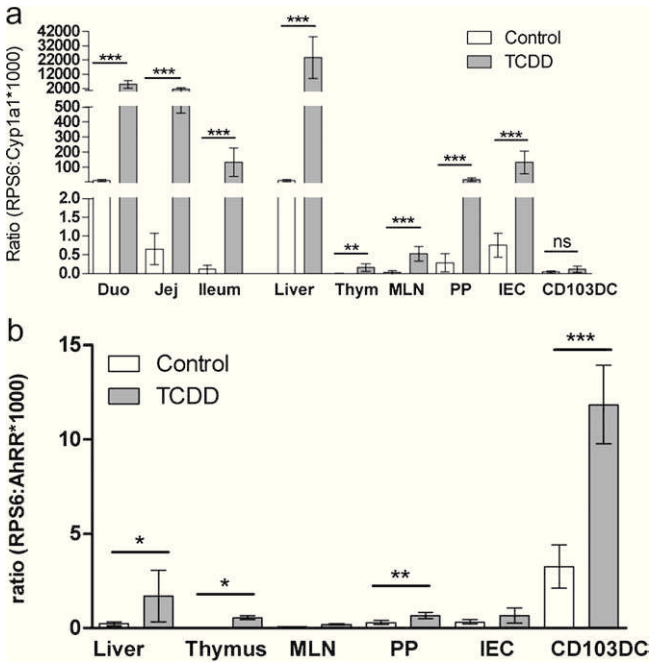


FIG. 2. Induction of the AhR target genes *cyp1a1* and *ahrr* in IECs, GALT, and immune cell subsets of TCDD-treated mice. C57BL/6 mice were fed with 10 μg/kg b.w. TCDD in olive oil. Three days later, gut was removed and *cyp1a1* (a) and *ahrr* (b) messenger RNA measured by real-time PCR. White bars represent tissue or cells form mice fed with solvent only. Gray bars represent tissue or cells from mice fed with TCDD. For comparison with strongly AhR-expressing tissues, data of liver and thymus are included. Data shown are the expression ratio compared with the housekeeping gene *rps6*; ($n = 3$–6). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

To test for functionality of the AhR in gut tissue, we treated C57BL/6 mice with 10 μg/kg b.w. TCDD, a moderate dose (Kerkvliet and Brauner, 1990), and analyzed induction of *cyp1a1*, considered to be a biomarker of AhR activation. As shown in Figure 2a, basal as well as inducible *cyp1a1* expression decreased in the jejunum and ileum compared with the more proximal intestine sections. Expression of another target gene and thus marker for AhR activity, AhR repressor (*ahrr*), increased from low levels several fold by TCDD.

Downloaded from toxsci.oxfordjournals.org at Universitaets- und Landesbibliothek Duesseldorf on March 20, 2011

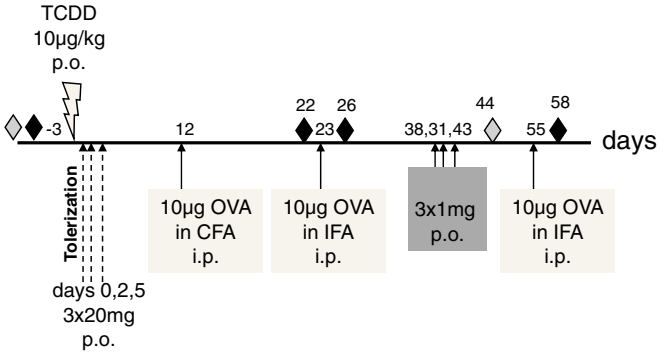


FIG. 3. Time scheme of TCDD feeding (flash arrow), tolerization (dashed arrows), and immunizations (black arrows). Numbers refer to the respective days after first feeding of OVA (= day 1). Diamonds denote time points of serum (?) and fecal sampling (?).

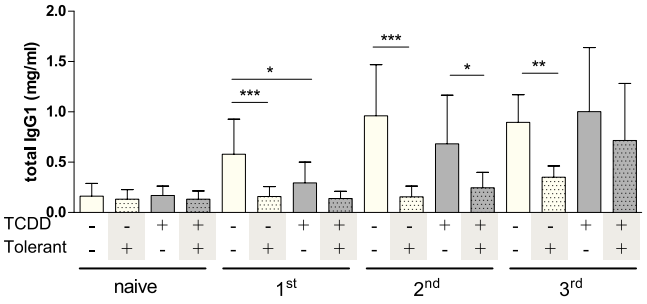


FIG. 4. Serum concentrations of IgG1 in micrograms per milliliter serum. Samples were taken 10 days after the first immunization and 3 days after each booster injection and measured via ELISA ($n > 12$, two independent experiments). Results are shown as mean ± SD. Significant differences were calculated using ANOVA. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

A spatial expression gradient could not be observed (data not shown). Taken together, AhR is functionally expressed in the gut, with *cyp1a1* gene induction by TCDD found decreasing in a gradient from proximal to distal in the small intestine.

AhRR is known to repress AhR activity. We found that c*yp1a1* induction in the different GALT tissues and cell types was inversely related to *ahrr* expression (cf. Figs. 2a and 2b). Thus, in MLN and PP (low in *ahrr* expression), *cyp1a1* transcripts increased strongly by TCDD. Similarly, *cyp1a1* RNA increased 100-fold in IEC in which *ahrr* transcripts were almost absent. In contrast, $CD103^+$DC expressed AhRR at considerably levels, and *cyp1a1* was barely induced by TCDD. Note that TCDD exposure of mice led to an even higher expression of *ahrr* in $CD103^+$DC.

TCDD and Oral Tolerance

Oral tolerance is defined as unresponsiveness of the immune system against foreign antigens, which are taken up through the gut after feeding or eating them. We fed C57/BL6 mice with 10 µg/kg b.w. TCDD in olive oil 3 days before starting a standard tolerization protocol of feeding OVA, followed by parenteral immunization against OVA. Serum samples were taken at the indicated time points and analyzed for total and OVA-specific IgG1. To detect OVA-specific IgA in fecal samples, mice were fed again with OVA after the end of the immunization scheme.

Figure 3 shows the scheme of immunizations and serum/fecal sampling, which allows looking at the influence of TCDD on the IgG1 immune response against OVA in immunized versus tolerized animals. First, TCDD treatment suppressed the humoral immune response after ip immunization with OVA. However, TCDD suppression was abrogated by a second immunization and IgG1 titers reached levels of control animals (PBS treatment) (Fig. 4, white bars). In summary, TCDD alone induced immunosuppression in the nontolerized mice, and the effect was abrogated after the second immunization.

Second, regarding tolerance, TCDD treatment prior to tolerization was permissive for IgG1 production at levels similar to those of nontolerized mice, albeit only after two booster immunization (Fig. 4, dotted gray bars). The kinetics of OVA-specific IgG1 titer paralleled the total IgG1 titer (cf. Figs. 4 and 5a).

The results of sera taken after the third immunization are shown in Figure 5b. The control groups behaved as expected: anti-OVA IgG1 titers in the nontolerized group increased with each booster immunization, whereas OVA-specific IgG1 was always below the detection limit in the tolerized mice. In contrast, TCDD-treated/OVA-tolerized mice produced significant amounts of OVA-specific IgG1 antibodies, albeit levels remained below those of the TCDD- or PBS-treated control mice. With each booster injection, more mice in the TCDD-treated group displayed break of tolerance (Table 1). Five of 14 animals had high OVA-specific IgG1 in the serum after the first, and six after the second immunization, whereas after the third immunization, 13 of 14 TCDD-treated mice produced anti-OVA–specific antibodies (Table 1). In contrast, in the absence of TCDD, only 1 of 13 mice produced anti-OVA–specific antibodies after three OVA challenges. Thus, TCDD exposure prevented the stable establishment of oral tolerance.

IgA Secretion into the Gut Lumen by TCDD Treatment

Oral tolerance also prevents production of antigen-specific IgA into the gut lumen (Kato *et al.*, 2001). We therefore measured OVA-specific IgA in fecal samples of tolerized and TCDD-exposed mice (see scheme given in Fig. 3). In OVA-tolerized mice, OVA-specific IgA was not detectable in the fecal samples. In contrast, after TCDD treatment and tolerization, OVA-specific IgA antibodies were detected at the levels of nontolerized mice (Fig. 6, white bars), affirming that TCDD breaks tolerance not only regarding peripheral antibody production but also gut antibodies.

Immune Cell Distribution Is Only Altered in MLN by TCDD

To exclude selective toxicity of 10 µg TCDD/kg b.w. on IEL and LP lymphocytes, we tested composition of immune cell

Downloaded from toxsci.oxfordjournals.org at Universitaets- und Landesbibliothek Duesseldorf on March 20, 2011

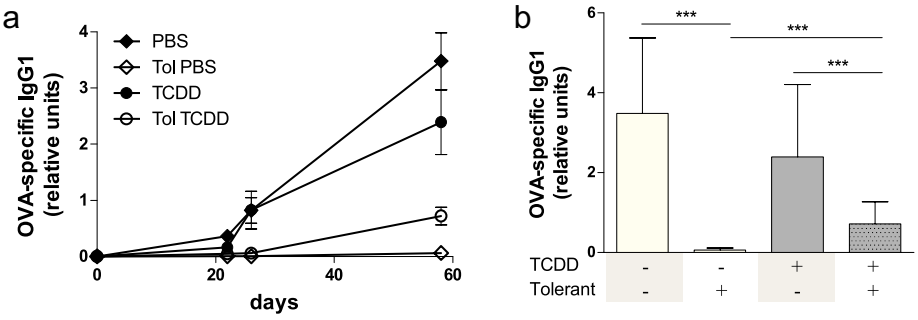


FIG. 5. Amount of OVA-specific IgG1 is given as relative units compared with a standard serum measured in ELISA. (a) Samples were taken 10 days after the first immunization and 3 days after each booster injection. TCDD-induced immunosuppression was abrogated after the second immunization (TCDD). Tolerant mice (Tol-PBS) do not mount an immune response, whereas pretreatment with TCDD (Tol-TCDD) led to significant OVA-specific IgG1 production. Results are shown as mean ± SEM. (b) OVA-specific IgG1 3 days after the third immunization. Results derived of two independent experiments and presented as mean ± SD; $n > 12$ per group of mice. Significant differences were calculated using ANOVA (***$p < 0.001$).

subsets 10 days after exposure. IEL yield was approximately 1.5×10^6 cells per small intestine in both TCDD-treated and control animals. Moreover, the immune cell subset frequencies did not differ between TCDD-exposed and control mice (~44% CD8ααTCRγδ, 20% CD8ααTCRαβ, 29% CD8αβTCRαβ, 2% CD8αβTCRγδ, and 4% CD4). Similarly, neither the absolute number of cells nor frequencies of $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$, and $CD103^+MHCII^+CD11c^+$, subsets in PP or LP cells were affected by 10 μg/kg b.w. TCDD exposure. The data are summarized in Tables 2 and 3. Thus, break of tolerance by TCDD, as described above, is not because of toxic elimination of any or all effector subsets of immune cells in GALT.

Antigen-sampling $CD103^+$DC, which migrate to MLN, is critical for induction of regulatory T cells against gut antigens (Jaensson *et al.*, 2008). TCDD might affect DC frequencies in the MLN or their tolerogenic capacities. We determined the frequencies of DC in MLN 3, 10, and 14 days after feeding TCDD. Confirming literature results (Coombes *et al.*, 2007), we found about 2–3% $MHCII^+CD11c^+$DC in MLN, of which 40% were $CD103^+$. At all time points after feeding TCDD, the percentage of total DC in MLN was unchanged. However, on days 10 and 14 after TCDD exposure, $CD103^+$DC frequency was significantly increased from 47.9% to 61.2% ± 6.2% (see Table 2). Unfortunately, whether this correlates to significant changes in absolute number could not be determined because of the small numbers and biological variation between mice.

TABLE 1
Number of Mice Producing Anti-OVA–Specific IgG1 Antibodies above Background after Oral Tolerization Against OVA and up to Three Immunizations with OVA

Treatment before oral tolerization[a]	First immunization[b]	Second immunization[b]	Third immunization[b]
Solvent ($N = 16$)	0/13	0/13	1/13
TCDD ($N = 14$)	5/14	6/14	13/14

[a]For treatment scheme, see Material and Methods section and Figure 3.
[b]Blood was taken for ELISA measurements 10 days after first immuniziation or 3 days after the second and third booster immunizations.

TCDD Affects the Regulatory T-cell/Th17 Balance in MLN

The balance between regulatory T cells (Treg) and proinflammatory T-cell subsets, in particular Th17 cells, can shift and is relevant in tolerance as well as in inflammatory disease (Duarte *et al.*, 2010; Izcue *et al.*, 2009; Kroetz and Deepe, 2010). We determined the frequencies of $CD4^+$ T-cell subsets in MLN of TCDD-treated and control mice, 3 days after tolerization. We detected a shift in the balance of Treg ($FoxP3^+$) versus Th17 ($IL\text{-}17^+$) cells in MLN, as Th17 cells doubled (Fig. 7a). No changes were detected in

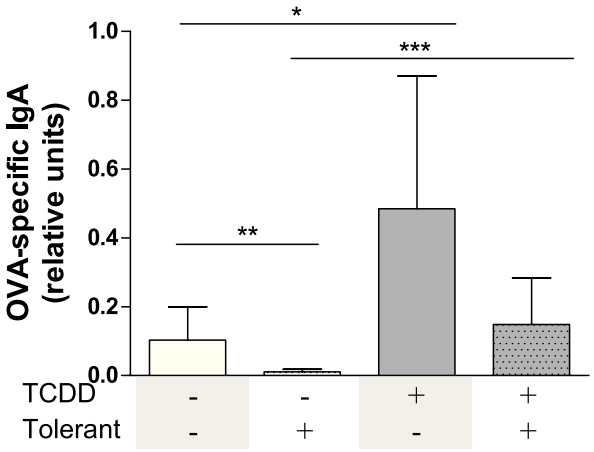


FIG. 6. OVA-specific IgA concentration was measured in fecal samples via ELISA ($n > 12$, two independent experiments) and is given as relative units compared with a standard sample. Samples were collected 1 day after oral challenge with OVA on days 38, 41, and 43 (see Fig. 3), dried, and dissolved in PBS/NaN_3 at a concentration of 100 mg/ml. Significant differences were calculated using ANOVA. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

Downloaded from toxsci.oxfordjournals.org at Universitaets- und Landesbibliothek Duesseldorf on March 20, 2011

TABLE 2
Lymphocyte Numbers and Frequencies in LP, MLNs, and PPs in mice treated with TCDD for 10 days[a]

	LP		MLNs		PPs	
	Control	TCDD	Control	TCDD	Control	TCDD
Absolute numbers						
$\times 10^6$	2.8 ± 0.9	3 ± 0.7	10 ± 2.8[a]	12 ± 4.2	0.4 ± 0.2	0.34 ± 0.18
Percentages						
$CD4^+$	20.2 ± 7.9	17.8 ± 3.8	40.0 ± 7.4	39.6 ± 8.0	17.6 ± 6.8	16.0 ± 6.2
$CD69^{+b}$			16.2 ± 2.3	17.2 ± 2.8	50.3 ± 7.6	53.2 ± 6.4
$CD8^+$	4.3 ± 1.5	4.1 ± 1.9	29.5 ± 4.4	30.1 ± 5.2	7.0 ± 3.1	5.9 ± 1.9
$CD69^{+b}$			6.4 ± 3.6	6.9 ± 2.8	13.3 ± 4.5	15.2 ± 6.0
$CD19^+$	29.5 ± 9.9	32.2 ± 15	21.5 ± 6.4	20.3 ± 6.5	69.0 ± 6.8	65.8 ± 7.6
DC[c]	3.4 ± 1.6	3.0 ± 1.7	2.3 ± 0.8	2.0 ± 0.7	2.8 ± 1.4	3.0 ± 1.4
$CD103^{+b}$	51.5 ± 3.9	55.0 ± 4.1	**47.9 ± 4.2**	**61.2 ± 6.2*****	38.8 ± 8.9	36.1 ± 7.4
			46.7 ± 9.4[d]	45.3 ± 5.6[d]		

[a]The indicated organs were isolated, single cell suspensions prepared, counted, and analyzed flow cytometrically. The percentages shown refer to life-gated cells expressing each marker as assessed by flow cytometry. The means ± SD of at least three independent experiments with three mice per group are shown. Mice were treated with 10 μg/kg b.w. TCDD 10 days prior to cell isolation and staining.

[b]Frequencies of cells expressing subset markers (CD69 and CD103) are given as percentages of the correspondent population, i.e., CD4, CD8, or DC cells.

[c]DC were defined as $CD11c^+$ $MHCII^+$.

[d]Frequencies for $CD103^+$DC on day 3 after TCDD.

***$p < 0.001$, comparison control animals with TCDD-treated animals. Significant values are highlighted in bold.

frequencies of IL-10 or IFNγ-positive cells of MLN or PP. Note that in PP, Th17 cell frequencies remained unchanged by TCDD treatment. Our data fit with recent reports that AhR is important for Th17 differentiation (Veldhoen *et al.*, 2008) and of Treg/Th17 ratio shifts in, e.g., models of oral tolerance protection against collagen-induced arthritis (Duarte *et al.*, 2010). The frequency of Th17 cells is low compared with Treg cells. DC produces IL-6, a known target of the AhR in the presence of lipopolysaccharide (Bankoti *et al.*, 2010). IL-6 instructs T-cell differentiation (Kimura and Kishimoto, 2010; Stockinger *et al.*, 2007). Therefore, we analyzed IL-6 expression in MLN DC. As shown in Figures 7d and 7e, TCDD-exposed tolerized mice had a significantly higher frequency of IL-6 producing $CD11c^+MHCII^+$ DC in their MLN, whereas no differences were detected in PP cells (Fig. 7f).

TABLE 3
IEL Frequencies[a]

	IEL	
	Control (%)	TCDD (%)
$CD4^+$	4.0 ± 2.5	4.0 ± 2.1
$CD8\alpha\alpha^+TCR\gamma\delta^+$	43.4 ± 10.0	44.9 ± 9.2
$CD8\alpha\alpha^+TCR\alpha\beta^+$	20.6 ± 8.6	20.5 ± 5.8
$CD8\alpha\beta^+TCR\gamma\delta^+$	2.6 ± 2.5	2.3 ± 1.3
$CD8\alpha\beta^+TCR\alpha\beta^+$	29.0 ± 12.5	28.2 ± 12.3

[a]IELs were prepared from the small intestine as described in Material and Methods section. The data shown are the percentages of life-gated cells expressing each cell surface marker as assessed by flow cytometry. Shown are the means ± SD of at least three independent experiments with three mice per group. Mice were treated with 10 μg/kg b.w. TCDD 10 days prior to cell isolation and staining.

DISCUSSION

It has been known for decades that the environmental pollutant TCDD suppresses the peripheral immune system via AhR activation. We show here that AhR expression is high in the gut and that TCDD affects immunity of the gut as well. A single injection of a moderate dose of TCDD led to loss of orally induced tolerance on subsequent systemic antigen challenges. The precise mechanisms of oral tolerance are controversial but might depend on antigen dose (high dose vs. low dose of antigen) or on the feeding scheme (single vs. multiple) (Faria and Weiner, 2005; Friedman and Weiner, 1994; Mowat *et al.*, 1982). In particular, evidence suggests that high-dose antigen feeding preferentially leads to anergy or deletion of T cells, whereas low-dose antigen induces regulatory T cells and is associated with inhibitory cytokine production of IL-4, IL-10, or TGFß. The two forms are not mutually exclusive and may overlap (Faria and Weiner, 2005; Smith *et al.*, 2000). In general, tests of oral tolerance reported in the literature do not go beyond one or two challenge immunizations. It is a novel and interesting finding that we could not break high dose–induced tolerance even after a third booster immunization, i.e., 12 of 13 control mice remained tolerant. This finding argues against a simple deletion of

Downloaded from toxsci.oxfordjournals.org at Universitaets- und Landesbibliothek Duesseldorf on March 20, 2011

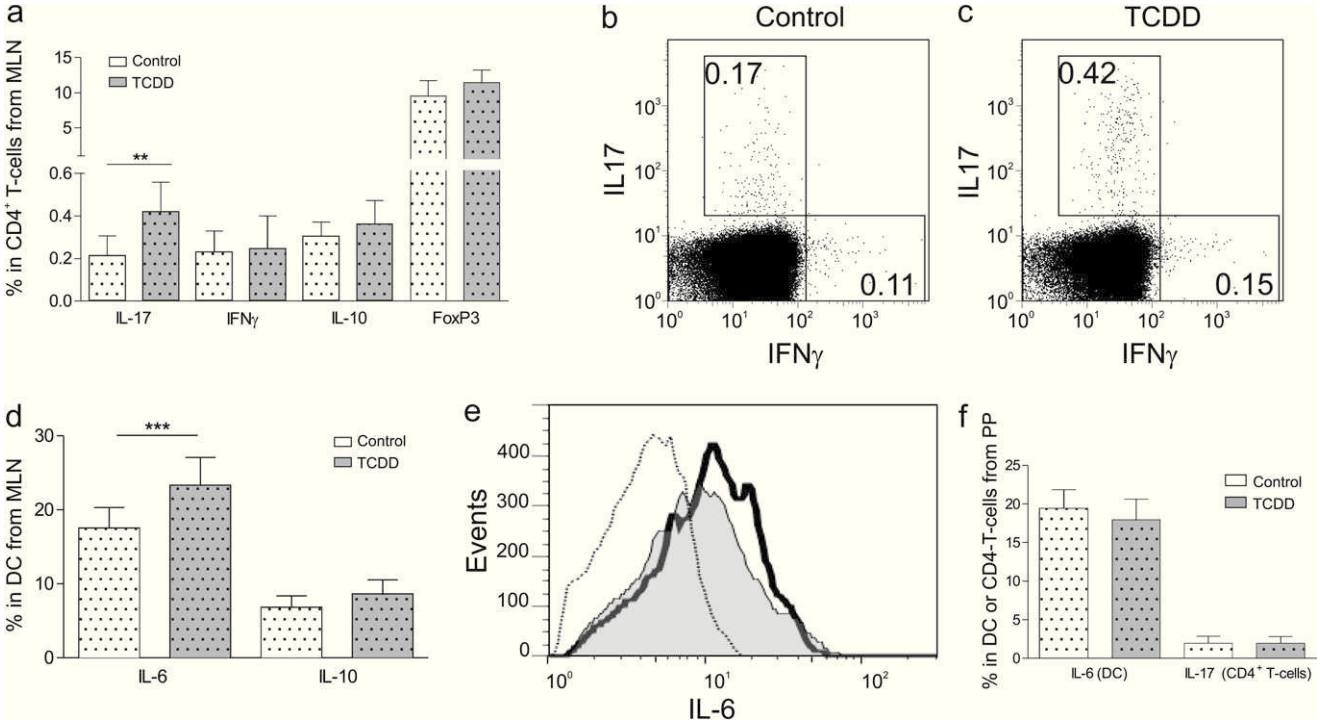


FIG. 7. Mice were treated with TCDD, tolerized as shown in Figure 3, and MLN or PP analyzed 1 day later. Controls: white dotted bars and TCDD-treated animals: gray dotted bars. (a) Frequencies of CD4+ T-cell subsets, which produce the indicated cytokines versus Treg cells. (b and c) Intracellular cytokine staining of IL-17 and IFNγ in $CD4^+$ T cells from MLN in control mice and TCDD-treated mice. (d) Frequencies of IL-6 and IL-10 cytokine producing DC in MLN. (e) Histogram overlays of IL-6 producing DC from MLN from control mice (shaded) and TCDD-treated mice (black line). (f) Frequencies of of IL-6 producing DC and IL-17 producing $CD4^+$ T cells in PP. Results are either shown as mean ± SD from three independent experiments, $n = 6$–9 (bar graphs) or as a representative flow cytometry graph. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

antigen-specific T cells, as one would expect OVA-specific T cells to be replaced with time from new thymic emigrants. The obvious explanation would be that regulatory T cells are still present in the mice. Also, it is possible to consider infectious tolerance by DC and T cells alike, a concept shown for nickel-fed mice. In this model, very few cells were capable of spreading the tolerance in serial adoptive transfers (Roelofs-Haarhuis *et al.*, 2004). It will be interesting to test for this by, e.g., adoptive transfer experiments.

Rather than abrogating oral tolerance completely, our data indicate that the persistence of oral tolerance is impaired by TCDD. Interestingly, Kinoshita *et al.* (2006) reported that a dose of only 1 μg TCDD/kg b.w. was permissive for generation of antibodies in OVA-tolerized mice on two challenges (both given in CFA). At the late time point, these authors analyzed that TCDD would have been eliminated from the system. Thus, we think that TCDD affects cells responsible for tolerance induction and memory early after treatment, and TCDD presence, once the disruption is set, is no longer needed. Whether or not TCDD can break an already established tolerance remains to be shown.

We confirmed literature data that TCDD treatment ("sine" tolerization) suppresses the humoral response (Kerkvliet *et al.*, 1990), here against OVA. Moreover, we show for the first time that suppression does not persist after booster immunizations. Most likely, this is not because of an insufficient TCDD concentration in the mice at the time point measured, despite the fact that TCDD is eliminated much faster in mice than in humans (half-life of 12 days vs. a half-life of 7 years) (Van den *et al.*, 1994). The estimated body burden at the time of the second immunization is 2.6 μg/kg b.w., and immunosuppression was already described at doses as low as 1 μg/kg b.w. (Vorderstrasse *et al.*, 2003). Adoptive transfer experiments with OVA-specific TCR-transgenic cells suggested that the TCDD-impaired humoral response was related to impaired CD4 help (Shepherd *et al.*, 2000). Our results challenge this view as suppression can be overcome with booster immunizations. Our results can explain why findings regarding the humoral immune response in humans after dioxin, furan, or biphenyl exposure yielded ambiguous results regarding suppression of antibody responses, i.e., often normal antibody titers were observed in exposed persons (Esser, 2005).

Recently, Ishikawa (2009) analyzed IgA secretion into the gut lumen in mice after low-dose TCDD treatment via nursing and reported an AhR-dependent decrease in fecal IgA. We were not able to confirm this result in our adult mice but that might be because of experimental differences. However, similar to our results, Ishikawa *et al.* did not observe any

Downloaded from toxsci.oxfordjournals.org at Universitaets- und Landesbibliothek Duesseldorf on March 20, 2011

TCDD-dependent gross changes in MLN cellularity or immune cell subset distribution of CD4, CD8, B cells, or $CD11c^+CD11b^+$ cells in MLN and PP. As they found an impaired migration of B1 B cells (a major source for intestinal IgA) toward B-cell chemokines and reduced chemokine receptor expression, they suggest that TCDD-reduced fecal IgA is because of suppression of an appropriate B1 B-cell response.

How could TCDD affect induction of oral tolerance? The underlying mechanism is currently unclear. Our tolerizing protocol of 3 × 20 mg OVA does not necessarily imply that anergy/deletion of OVA-specific T cells is the only possibly underlying mechanism. Very recent findings, which take into account the timing of antigen feedings, suggest an alternative or complementary mechanism. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in the liver were shown to take up antigen and rapidly delete antigen-specific T cells in a first line of tolerization. Only later, regulatory T cells are induced via migratory DC. Oral tolerance could be transferred by pDC, and was abrogated, if pDC were missing (Goubier *et al*., 2008). Thus, multiple feedings over a time of 7–10 days could activate different mechanisms than a single feeding. TCDD is known to damage liver, but no information exists about TCDD effects on pDC, and further experiments must consider this. We looked at DC migrated into MLN from the LP and at T cells in the gut-draining MLN. We did not find fewer DC in the gut or MLN, ruling out DC-specific cell death or a failure of DC to migrate to MLN. Also, we did not observe deletion of gut-specific T cells or B cells by TCDD, i.e., not a directly toxic effect. Gut-derived $CD103^+$DC became known as "tolerogenic DC" (Coombes *et al*., 2005) because of their capacity to shift the balance between Treg and Th17 cells. We found a small but significant increase in IL-6 producing DC in MLN. IL-6 is a regulator for Th17/Treg (Kimura and Kishimoto, 2010). Nonetheless, $CD103^+$DC expressed very low amounts of AhR, and because of high-*ahrr* expression, the classical AhR-ARNT signaling pathway is possibly blocked similar to the situation in Langerhans cells (Jux *et al*., 2009). As AhR can bind to RelA or RelB, TCDD could trigger IL-6 via this pathway (Tian, 2009). Possibly, abundant AhRR in $CD103^+$DC is a control mechanism to push DC into preference of the NFκB pathway, if AhR ligands are present, and thus involved in microbiota immune surveillance. Concomitant to the increase in IL-6 producing DC, we found a doubling in IL-17 expressing CD4+ T cells in MLN. AhR activation is involved in deciding Th17 and Treg cell differentiation fates (Marshall and Kerkvliet, 2010; Quintana *et al*., 2008; Veldhoen *et al*., 2008). It is therefore tempting to speculate that in the presence of TCDD MLN, DC become less tolerogenic and that Th17 cells are induced, albeit further experiments are needed to address this. The increase in Th17 cell frequency was small, but recent literature reports shift in the ratio of Treg/Th17 cells associated with disease severity in a model of protective oral tolerization against collagen-induced arthritis and lung inflammation (Duarte *et al*., 2010; Kroetz and Deepe, 2010; Tong *et al*., 2010). It will be interesting to determine antigen specificity of these Th17 cells and the (much more abundant) Treg cells present in the MLN. The manipulation of Treg and T-cell subsets in general is of high therapeutic interest for the management of inflammatory and autoimmune disorders. Our data show that stability of mucosal tolerance can be changed by environmental AhR agonists encountered via the oral route. Further experiments will be needed to study the kinetics of DC changes, the breakage of an existing tolerance, or the role of Th17 and Treg cells.

IECs transfer signals from nutrition and the bacterial flora of the gut lumen and control whether gut DC will become tolerogenic (Rimoldi *et al*., 2005). AhR was conspicuously abundant in IEC, conceivably it is related to the xenobiotic metabolism in IEC. IEC form a physical and biological barrier against the gut lumen. Recent evidence has revealed a role for IEC as an immunological barrier. They instruct $CD103^+$DC to become tolerogenic or inflammatory (Shale and Ghosh, 2009), e.g., by secretion of granulocyte macrophage colony stimulating factor, TGFβ, indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO), or thymic stromal lymphopoetin. Moreover, induction of toll-like receptors signaling led to increased turnover and faster migration of $CD103^+$DC into the MLN (Schulz *et al*., 2009). It is currently not known whether AhR participates in the immunological functions of IEC.

Although gut barrier function is not the focus in our study here, we note that IL-22 production by Th17 cells requires AhR (Veldhoen *et al*., 2008) and that we observed increased IL-22 expression in MLN cells of TCDD-treated mice (data not shown). It is not known whether other IL-22 producing cells of the gut, such as NKp46+ cells (Sanos *et al*., 2009), require AhR as well, and thus, AhR might be an important positive factor for gut barrier function. IL22−/− mice display increased epithelial damage, systemic bacterial burden, and mortality (Zheng *et al*., 2008).

Food contains many potential AhR agonists, such as flavonoids, bacterial tryptophan breakdown products, or bilirubins (Ciolino *et al*., 1999; Heath-Pagliuso *et al*., 1998). Beyond their recognized antioxidative health benefit, they might be important as regulators of AhR. However, some dietary supplements with flavonoids can peak AhR agonist concentration in the gut in an unprecedented way and thus could overturn beneficial effects. Further studies must explore, whether "too much" of AhR agonists in natural food constituents abrogates oral tolerance, as shown here for TCDD.

In conclusion, we have shown that a single moderate dose of TCDD prevents the stable induction of oral tolerance, affecting DC and $CD4^+$ immune cell subset frequencies in MLN but not in PP. Our data not only have implications for food allergies in settings of environmental exposure but also raise concerns regarding the harmlessness of overdosing potential AhR agonists in food.

Downloaded from toxsci.oxfordjournals.org at Universitaets- und Landesbibliothek Duesseldorf on March 20, 2011

FUNDING

Deutsche Forschungsgemeinschaft (GK1427), ''Food constituents as triggers of nuclear receptors in the gut.''

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Diana Fleissner, University of Essen, and Vladimir Temchura, Ruhr-University of Bochum, for their help with isolation of gut lymphocytes. We thank Claudia Uthoff-Hachenberg (University of Cologne) and Frederic Heinrich (DRFZ, Berlin) for gifts of antibodies. The authors declare that they have no competing financial interest.

REFERENCES

Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol.* **8,** 411–420.

Bankoti, J., Rase, B., Simones, T., and Shepherd, D. M. (2010). Functional and phenotypic effects of AhR activation in inflammatory dendritic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **246,** 18–28.

Beischlag, T. V., Luis, M. J., Hollingshead, B. D., and Perdew, G. H. (2008). The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **18,** 207–250.

Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W. L., and Boismenu, R. (2002). Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99,** 14338–14343.

Ciolino, H. P., Daschner, P. J., and Yeh, G. C. (1999). Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J.* **340**(Pt. 3), 715–722.

Coombes, J. L., Robinson, N. J., Maloy, K. J., Uhlig, H. H., and Powrie, F. (2005). Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol. Rev.* **204,** 184–194.

Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204,** 1757–1764.

Duarte, J., gua-Doce, A., Oliveira, V. G., Fonseca, J. E., and Graca, L. (2010). Modulation of IL-17 and Foxp3 expression in the prevention of autoimmune arthritis in mice. *PLoS One* **5,** e10558.

Esser, C. (2005). Dioxins and the immune system. In *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology* (H.-W. Vohr, Ed.), pp. 208–211. Springer, Heidelberg, Germany.

Esser, C., Rannug, A., and Stockinger, B. (2009). The aryl hydrocarbon receptor and immunity. *Trends Immunol.* **9,** 447–454.

Faria, A. M., and Weiner, H. L. (2005). Oral tolerance. *Immunol. Rev.* **206,** 232–259.

Frericks, M., Meissner, M., and Esser, C. (2007). Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **220,** 320–332.

Friedman, A., and Weiner, H. L. (1994). Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91,** 6688–6692.

Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., Trinchieri, G., and Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* **29,** 464–475.

Hayday, A. C., and Spencer, J. (2009). Barrier immunity. *Semin. Immunol.* **21,** 99–100.

Heath-Pagliuso, S., Rogers, W. J., Tullis, K., Seidel, S. D., Cenijn, P. H., Brouwer, A., and Denison, M. S. (1998). Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry* **37,** 11508–11515.

Ishikawa, S. (2009). Children's immunology, what can we learn from animal studies (3): impaired mucosal immunity in the gut by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): a possible role for allergic sensitization. *J. Toxicol. Sci.* **34**(SP II), SP349–361.

Izcue, A., Coombes, J. L., and Powrie, F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* **27,** 313–338.

Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J. L., Berg, P. L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., *et al.* (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med.* **205,** 2139–2149.

Janke, M., Peine, M., Nass, A., Morawietz, L., Hamann, A., and Scheffold, A. (2010). In vitro-induced Th17 cells fail to induce inflammation in vivo and show an impaired migration into inflamed sites. *Eur. J. Immunol* **40,** 1089–1098.

Jux, B., Kadow, S., and Esser, C. (2009). Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J. Immunol.* **182,** 6709–6717.

Kato, H., Fujihashi, K., Kato, R., Yuki, Y., and McGhee, J. R. (2001). Oral tolerance revisited: prior oral tolerization abrogates cholera toxin-induced mucosal IgA responses. *J. Immunol.* **166,** 3114–3121.

Kerkvliet, N. I. (2002). Recent advances in understanding the mechanisms of TCDD immunotoxicity. *Int. Immunopharmacol.* **2,** 277–291.

Kerkvliet, N. I. (2009). AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription. *Biochem. Pharmacol.* **77,** 746–760.

Kerkvliet, N. I., and Brauner, J. A. (1990). Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations in the spleen and thymus of mice exposed to an acute immunosuppressive dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Environ. Res.* **52,** 146–154.

Kerkvliet, N. I., Steppan, L. B., Brauner, J. A., Deyo, J. A., Henderson, M. C., Tomar, R. S., and Buhler, D. R. (1990). Influence of the Ah locus on the humoral immunotoxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: evidence for Ah-receptor-dependent and Ah-receptor-independent mechanisms of immunosuppression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **105,** 26–36.

Kimura, A., and Kishimoto, T. (2010). IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* **40,** 1830–1835.

Kinoshita, K., Abe, J., Akadegawa, K., Yurino, H., Uchida, T., Ikeda, S., Matsushima, K., and Ishikawa, S. (2006). Breakdown of mucosal immunity in gut by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Env. Health Prev. Med.* **11,** 256–263.

Kroetz, D. N., and Deepe, G. S., Jr. (2010). CCR5 dictates the equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory Foxp3+ T cells in fungal infection. *J. Immunol.* **184,** 5224–5231.

Lai, Z. W., Hundeiker, C., Gleichmann, E., and Esser, C. (1997). Cytokine gene expression during ontogeny in murine thymus on activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol. Pharmacol.* **52,** 30–37.

Laiosa, M. D., Wyman, A., Murante, F. G., Fiore, N. C., Staples, J. E., Gasiewicz, T. A., and Silverstone, A. E. (2003). Cell proliferation arrest within intrathymic lymphocyte progenitor cells causes thymic atrophy mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *J. Immunol.* **171,** 4582–4591.

Majora, M., Frericks, M., Temchura, V., Reichmann, G., and Esser, C. (2005). Detection of a novel population of fetal thymocytes characterized by preferential emigration and a TCRgammadelta+ T cell fate after dioxin exposure. *Int. Immunopharmacol.* **5,** 1659–1674.

Downloaded from toxsci.oxfordjournals.org at Universitaets- und Landesbibliothek Duesseldorf on March 20, 2011

Marshall, N. B., and Kerkvliet, N. I. (2010). Dioxin and immune regulation: emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the generation of regulatory T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1183,** 25–37.

Martin, B., Hirota, K., Cua, D. J., Stockinger, B., and Veldhoen, M. (2009). Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* **31,** 321–330.

Mowat, A. M., Strobel, S., Drummond, H. E., and Ferguson, A. (1982). Immunological responses to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. *Immunology* **45,** 105–113.

Nguyen, L. P., and Bradfield, C. A. (2008). The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem. Res. Toxicol.* **21,** 102–116.

Platzer, B., Richter, S., Kneidinger, D., Waltenberger, D., Woisetschlager, M., and Strobl, H. (2009). Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits in vitro differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells. *J. Immunol.* **183,** 66–74.

Quintana, F. J., Basso, A. S., Iglesias, A. H., Korn, T., Farez, M. F., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M., and Weiner, H. L. (2008). Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* **453,** 65–71.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* **6,** 507–514.

Roelofs-Haarhuis, K., Wu, X., and Gleichmann, E. (2004). Oral tolerance to nickel requires CD4+ invariant NKT cells for the infectious spread of tolerance and the induction of specific regulatory T cells. *J. Immunol.* **173,** 1043–1050.

Sanos, S. L., Bui, V. L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johner, C., and Diefenbach, A. (2009). RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat. Immunol.* **10,** 83–91.

Schecter, A., Birnbaum, L., Ryan, J. J., and Constable, J. D. (2006). Dioxins: an overview. *Environ. Res.* **101,** 419–428.

Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E. K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W. W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J. Exp. Med.* **206,** 3101–3114.

Shale, M., and Ghosh, S. (2009). How intestinal epithelial cells tolerise dendritic cells and its relevance to inflammatory bowel disease. *Gut* **58,** 1291–1299.

Shepherd, D. M., Dearstyne, E. A., and Kerkvliet, N. I. (2000). The effects of TCDD on the activation of ovalbumin (OVA)-specific DO11.10 transgenic CD4(+) T cells in adoptively transferred mice. *Toxicol. Sci.* **56,** 340–350.

Smith, K. M., Eaton, A. D., Finlayson, L. M., and Garside, P. (2000). Oral tolerance. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162,** S175–S178.

Stockinger, B., Veldhoen, M., and Martin, B. (2007). Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* **19,** 353–361.

Tian, Y. (2009). Ah receptor and NF-kappaB interplay on the stage of epigenome. *Biochem. Pharmacol.* **77**(4), 670–680.

Tong, T., Zhao, W., Wu, Y. Q., Chang, Y., Wang, Q. T., Zhang, L. L., and Wei, W. (2010). Chicken type II collagen induced immune balance of main subtype of helper T cells in mesenteric lymph node lymphocytes in rats with collagen-induced arthritis. *Inflamm. Res.* **59,** 369–377.

Van den, B. M., De, J. J., Poiger, H., and Olson, J. R. (1994). The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **24,** 1–74.

van Leeuwen, F. X., Feeley, M., Schrenk, D., Larsen, J. C., Farland, W., and Younes, M. (2000). Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere* **40,** 1095–1101.

Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J. C., and Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453,** 106–109.

Vetvik, H., Grewal, H. M., Haugen, I. L., Ahren, C., and Haneberg, B. (1998). Mucosal antibodies can be measured in air-dried samples of saliva and feces. *J. Immunol. Methods* **215,** 163–172.

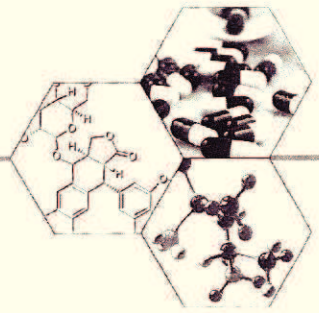
Vorderstrasse, B. A., Bohn, A. A., and Lawrence, B. P. (2003). Examining the relationship between impaired host resistance and altered immune function in mice treated with TCDD. *Toxicology* **188,** 15–28.

Westendorf, A. M., Fleissner, D., Groebe, L., Jung, S., Gruber, A. D., Hansen, W., and Buer, J. (2009). CD4+Foxp3+ regulatory T cell expansion induced by antigen-driven interaction with intestinal epithelial cells independent of local dendritic cells. *Gut* **58,** 211–219.

Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M. W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **203,** 519–527.

Zheng, Y., Valdez, P. A., Danilenko, D. M., Hu, Y., Sa, S. M., Gong, Q., Abbas, A. R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F. J., *et al.* (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat. Med.* **14,** 282–289.

Downloaded from toxsci.oxfordjournals.org at Universitaets- und Landesbibliothek Duesseldorf on March 20, 2011



Small molecules as friends and foes of the immune system

Every organism is in contact with numerous small molecules (<1000 Da). Chemicals may cause or trigger adverse health effects, including diseases of the immune system. They may also be exploited as drugs. In this review, we look at the interaction between small molecules and the immune system. We discuss the hapten and pharmacological interaction concepts of chemical interaction to trigger T cells and how chemicals can participate in cellular signaling pathways. As a sensor of small molecules, the arylhydrocarbon receptor controls expression of many xenobiotic metabolizing enzymes, including those in the immunological barrier organs; the skin and gut. The relevance of the arylhydrocarbon receptor in the dynamic interaction of the immune system with the chemical environment is therefore discussed.

The immune system fights pathogens, such as bacteria, viruses, fungi or parasites and neutralizes their toxic products. A complete failure to do so will inevitably result in the death of the individual and even minor immunodeficiencies can have grave consequences. In principle, any molecular structure, including, but not limited to proteins, lipids or carbohydrates, can be recognized by the immune system. Immune cells can sense them with receptors that are keyed to transmit environmental stimuli into the cells and, thus, trigger appropriate cellular reactions. Equally important, however, is the capacity of the immune system to distinguish between pathogenic and the omnipresent harmless organisms and molecules (**FIGURE 1**), either those that surround us or components of our own bodies. Failure to distinguish between harmful/harmless or self/nonself leads to morbidity or mortality due to allergic or autoimmune reactions. The major evolutionary forces on the immune system were most likely the need to balance between immunity and partial or total unresponsiveness (so-called immunological tolerance). The great discoveries of how the immune system adaptively fights pathogens have dominated early basic and clinical immunology research. In recent years, much research has aimed to understand how the immune system dampens its responses, avoids over-reactions or establishes and maintains tolerance. All in all, a picture of a highly complex system of checks and balances emerges.

Small molecules acting by the immune system

■ Receptors of the immune system & what they 'recognize'

The immune system of vertebrates features various cells with distinct functions. Broadly, they are divided into the cells of the innate immune system (macrophages, granulocytes, dendritic cells, mast cells and innate-like lymphocytes) and the adaptive immune system (T and B cells). Both branches are linked and influence each other in numerous ways. The time frame of reaction by innate immune cells against pathogens is immediate to a few hours, whereas the cells of the adaptive immune system become relevant only after a lag time of several days. However, only the adaptive immune system is capable of immunological memory, making any second encounter with the same pathogen faster and more furious. Immune cells recognize pathogens or other 'foreign' structures via receptors, which are mostly surface bound, although intracellular receptors also exist. In the case of innate immune cells, the receptors are limited to a handful of specificities directed against typical pathogen structures, such as components of bacterial cell walls, single- or double-stranded DNA or products released from stressed cells (e.g., heat shock proteins). **Box 1** gives a brief list of receptors. The innate immune response leads to direct elimination of the pathogen or infected cell, often combined with coordination of subsequent adaptive responses by cytokine secretion or *de novo* expression of surface molecules (e.g., T-cell stimulatory molecules). By

Stephanie Kadow, Bettina Jux, Stefanie Chmill & Charlotte Esser†

†Author for correspondence
Institut für Umweltmedizinische Forschung gGmbH, Heinrich-Heine-University of Düsseldorf, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf, Germany
Tel.: +49 211 338 9253
Fax: +49 211 319 0910
E-mail: chesser@uni-duesseldorf.de

TOLERANCE

Immunological tolerance ensures that immunological responses are directed only at harmful and foreign molecular structures. Major mechanisms of tolerance are elimination of autoreactive B and T cells before they can reach the tissues, physical sequestration of organs, such as brain and eye, and generation of antigen-specific regulatory T cells, which counteract T-cell responses

FUTURE SCIENCE part of fsg

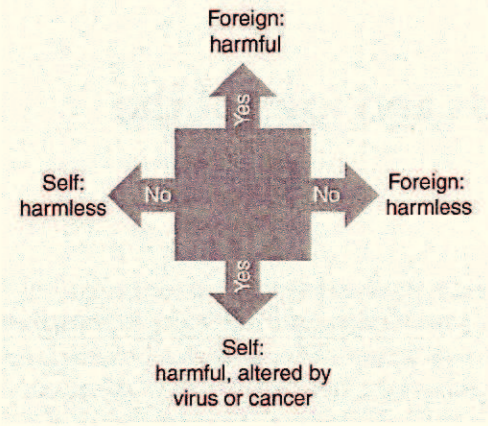


Figure 1. Four possibilities, between which the immune system differentiates. Immune responses normally only target what is harmful: infectious bacteria, fungi, viruses, parasites or cancer cells. However, harmless bacteria in the gut or on the skin, inhaled pollen proteins and the like might be kept in check, but no inflammatory reactions should be mounted. Also, self-proteins, although presented to the immune system, are tolerated. Cancer cells, apoptotic or virus-infected cells often present different self-proteins than normal cells and trigger an immune repsonse. Break of tolerance leads to allergy (against harmless foreign) or autoimmunity (against harmless self). Immunosuppression leads to increased infection incidence and severity or to cancer. Yes: immunity is the necessary reaction; No: tolerance is the necessary reaction, although antigens are presented to the immune system.

contrast, T and B cells, the cells of the adaptive immune response, bear unique cell-surface receptors generated by gene rearrangement from a large pool of gene segments. The process of gene rearrangement and combination of the heterodimeric B- and T-cell receptor results in millions of specifities and each individual newly generated B or T cell expresses receptors of only one specificity. It is important to realize that the receptors of the adaptive immune response are – in principle – capable of detecting and responding to any class of molecule, such as proteins, carbohydrates, lipids or any other. Auxiliary conditions to be met are a certain minimal size of the antigen, minimal affinity and costimulatory signals, such as cell–cell contacts or distinct cytokine milieus (e.g., provided by innate immune cells). Costimulation is often also known as signal 2 (signal 1 being antigen recognition) and is usually provided by the antigen-presenting cells. Note that, for T cells, recognition is restricted to antigens, which are embedded in the groove of the MHC molecules. MHC molecules are found on the surface of specialized antigen-presenting cells (MHC class II) or on all normal body cells (MHC class I). Normally, they are filled with peptides derived either from proteins taken up exogenously by cells or from intracellular proteins, including self and foreign. The normal antigens for T cells are peptides, although small molecules can be bound and recognized together with those peptides.

Recognition is thus the immunologists' term for noncovalent molecular binding of innate or adaptive immune receptors to a chemical structure. Only if the binding affinity is above a certain threshold and accompanied by a second signal (e.g., concomitant binding of T-cell surface receptor CD28 to the surface-bound B7 on antigen-presenting cells) does recognition lead to receptor-associated cytosolic signaling cascades and an immune response.

■ The hapten & pharmacological interaction concepts

Small molecules of less than 1 kDa are ubiquitous as food and lifestyle products, bacterial toxins, environmental substances or anthropogenic pollutants. Flavonoids, fragrances, vitamins, aromatic hydrocarbons, carotenoids, macrolides and many other chemical classes found in nature or made by man have low molecular weights. As discussed, antigens need not be from a certain biochemical class of molecules. Therefore, low-molecular weight molecules can also become targets of immune responses.

Usually, low-molecular weight chemicals are too small to be antigenic. However, they may be immunologically recognized if bound to a tissue peptide, DNA, lipid or other molecule of greater

Box 1. Receptors of the immune system recognizing antigens.

Innate immune cells
- Toll-like receptors 1–10
- Mannose receptor
- Scavenger receptor
- fMet–Leu–Phe receptor

Innate-like lymphocytes
- T-cell receptor-γδ
- NK cell receptors

T cells and B cells
- T-cell receptor
- Surface-bound B-cell receptor
- Soluble immunoglobulin

BARRIER ORGANS

Parts of the body that are in direct contact with the environment, especially the skin the gut and the lung. Cells of the immune system are found throughout the body, but their frequency and subset pattern differ significantly between peripheral organs and barrier organs. Some cells, such as certain T cells, only populate the skin or are found exclusively in the gut. Because they are continuously exposed to both harmful and harmless antigens, in particular, the immune cells of the barrier organs must continuously balance immunogenic and tolerogenic responses

size. As reviewed elsewhere, small molecules can form covalent bonds with macromolecules at body temperature [1]. Others become reactive during metabolic breakdown. Phase I xenobiotic metabolizing enzymes introduce chemically reactive groups (a process known as 'bioactivation'), such as SH- or OH-groups, to prepare them for covalent addition to glutathione, and eventually enable elimination. Aromatic compounds can be epoxidized and aminophenols or hydrochinones can be oxidized, for example. In proteins, such reactive metabolites can bind especially to histidine and cysteine; in nucleic acids, they bind to the nitrogen and oxygen of bases. The possibility of covalent binding of a small molecule to proteins is the basis of the hapten concept.

As early as 1935, Landsteiner showed a strong correlation between the protein reactivity of small molecules and their capacity to induce an (allergic) immune response [2]. Several possibilities exist to explain how small molecules can break tolerance: first, the chemical or its metabolite could bind to a self-peptide presented to T cells (**FIGURE 2B**). Second, the chemical can bind intracellularly to proteins and cause changed proteolytic breakdown, resulting in presentation of normally cryptic peptides (**FIGURE 2C**). In both cases, new antigens are formed, against which the body is not tolerant and might conceivably mount an immune response once the second signal (see earlier discussion) is provided. For neo-antigens, the outcome can be an allergic response; for cryptic antigens, the outcome can be autoimmunity. Typical examples of drug-induced break of immunological tolerance are allergies against drugs such as penicillin, plant compounds such as urushiol [3,4] or autoimmune reactions against procainamid or gold salts [5]. Although only a small percentage of adverse drug-reactions are idiosyncratic [6], they are a major cause of drug attrition, both late in drug development and when identified in clinical trials. Finally, an alternative hypothesis proposes that chemicals can interact with the T-cell receptor (TCR) in a labile, noncovalent way (**FIGURE 2 P-I**) [7]. This seems to be sufficient to stimulate certain, probably preactivated, T cells. Activation of T cells can happen when a drug fits to a given TCR. For full activation, an additional interaction of the TCR with MHC molecules may be needed. This concept was named pharmacological interaction (p-i) [7]. The response can occur within hours, even upon the first exposure to the drug, suggesting that it is due to peptide-specific T cells that happen to be stimulated by a drug. In general, adverse immune reactions are reversible once the chemical is removed. More details and examples of small-molecule immunotoxicology can be found elsewhere [8].

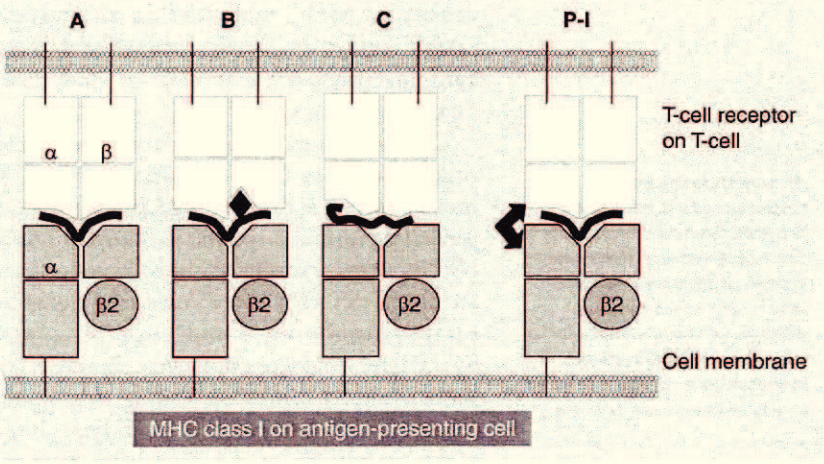


Figure 2. Contact zone of T-cell receptor (white) on T cells and MHC class I molecules (grey) on antigen-presenting cells. (A) 'Normal' situation, where a peptide (thick black line) lies in the groove provided by the MHC class I protein. The peptide can be either foreign or self. However, T cells bearing receptors that would recognize self-peptides are usually eliminated in the thymus. **(B)** Small molecules (black diamond) can break tolerance, either by covalent binding to a normally presented peptide and being recognized along with the peptide or **(C)** by binding to a protein before it is degraded, exposing cryptic sites and changing the normal peptide-degradation pattern. In this case, the chemical does not become part of the recognized antigen. **(P-I)** Small molecules can also noncovalently attach to T-cell receptors of pre-activated T cells (thick double arrow) and trigger further reactions, known as the pharmacological interaction concept. For further details see text. Note also that MHC class II may present haptens/cryptic antigens.
β2: β2-microglobulin chain of the MHC class I dimer.

Small molecules acting on the immune system

Small molecules can also act on the immune system and its cells, a fact that is often exploited pharmacologically. Immunosuppressive drugs, such as FK506 or cyclosporine A, are relevant examples (see later). At the extreme, a chemical can kill (more or less specifically) immune cells. Whether or not this results in sweeping functional impairment of the immune system depends on the cell type killed. For instance, benzene, which is toxic for hematopoietic stem cells, will eventually affect both innate and adaptive immunity [9]. Immunologically and pharmacologically more interesting are chemicals that interfere or interact specifically with cell function, cell differentiation and lineage decisions; thus, chemicals might change the

HAPTEN

A low-molecular weight chemical that is attached to a protein and thereby can be recognized by T and B cells

AUTOIMMUNITY

Immune reactivity against molecules of one's own body. Autoimmune diseases can be organ specific (e.g., diabetes or rheumatoid arthritis) or systemic (systemic lupus erythematosus). The antigens recognized are often unknown. Autoimmunity is caused by autoreactive T cells that have escaped the multi-tiered tolerance mechanisms of the body

ALLERGY

An overshooting immune response against harmless proteins. Several components of the innate and adaptive immune system participate in allergic responses, which can have debilitating consequences for an individual. Allergies against low-molecular weight chemicals and even metals are possible

density of MHC molecules on the surface, inhibit regulatory T cells, increase or decrease cytokine production by cells or slow down their proliferation.

Differentiation, lineage decision and functional responses (e.g., cytokine secretion) of immune cells are based on signaling via various general or immune-specific pathways. MAPK, NFκB, signal transducer and activator of transcription (STAT) and calcineurin signaling pathways, and many others, could be targeted by small molecules or their metabolites (e.g., via protein-adduct formation leading to crippling conformation changes or by inhibitory actions of the catalytic functions). Especially interesting are signaling pathways or intracellular proteins that use small molecules as physiological ligands anyway, such as innate immune receptors, retinoic acid receptors, steroid receptors or immunophilins [10]. The glucocorticoid pathway and its pharmacological exploitation is a typical example. The immunosuppressive activity of the drugs cyclosporine A and FK506 (tacrolimus) are based on specific binding to the immunophilin FKB, which then subverts calcineurin and nuclear factor of activated T cells (NFAT) signaling and cytokine secretion [10–12]. Rapamycin (Sirolimus®), another immunosuppressive agent, is a complex natural substance isolated from fungi. It binds to mTOR, a PI3 kinase. mTOR has important roles in dendritic cell function and activation of both effector and regulatory T cells [13]. Activation of pattern-recognition receptors, such as toll-like receptors (TLRs), with appropriate agonists is a novel strategy to modulate specifically innate and adaptive immune responses. For instance, imiquimod, a TLR7 ligand, triggers a distinct cytokine milieu by dendritic cells and enforces recruitment of certain dendritic cells subtypes [14,15]. σ receptors, proteins that accept, among others, cocaine or amphetamines, are now recognized to also mediate immune functions such as IL-10 secretion [16,17]. Discoveries, such as the role of retinoic acid-like orphan receptors as the necessary transcription factor for induction of regulatory T cells in the gut, have further increased the awareness of small molecules for a healthy immune system [18–20].

It is not within the remit of this article to go into details, but TABLE 1 lists a few more examples of small molecules as immuno-interfering compounds. This list impressively demonstrates the significance of small molecules in physiological processes and the versatile and far-reaching possibilities of using these pathways pharmaceutically.

Table 1. Some immuno-interfering small molecules.

Small molecule	Target	Modulated immune function	Ref.
Endogenous			
Glucocorticoids	Glucocorticoid receptor	Cytokine secretion	[63]
Estrogen	Estrogen receptor	Autoimmunity	[64]
PAF, generated from cell membrane lipids	PAF receptor	IL-10 secretion	[65]
PG-E2	PG-E2 receptor EP4	Inflammation, Th17 cytokine secretion, IDO expression	[66,67]
6-formylindolo[2,3]-b-carbazol, a UVB-generated tryptophan photoproduct	Ah receptor	Cytokine secretion; secondary EGF-receptor signaling	[58]
Vitamin D and receptor agonists	Vitamin D receptor	Tolerogenic dendritic cells	[68]
Exogenous			
O_2	HIF1α	Inflammation	[69]
FK506	FKBP (an immunophilin), calcineurin signaling	Cytokine secretion	[10]
Rapamycin	mTOR	Cytokine secretion	[13]
Thalidomide and similar immunomodulatory imides		TNF-α, macrophages	[70]
Imiquimod	Toll-like receptor 7	Cytokine secretion by dendritic cells, Th1 balance, DC recruitment	
AhR ligands (VAF347, M50367, TCDD)	Ah receptor	Immunosuppression, Th17 cytokine secretion, Th1/Th2 balance	[46,53,61,71]
Cocaine	σ-receptor 1	IL-10 secretion	[16]

AhR: Arylhydrocarbon receptor; DC: Dendritic cell; EP: Prostaglandin E receptor; FKBP: FK506 binding protein; IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase; PAF: Platelet-activating factor; PG: Prostaglandin.

Potential strategies of the immune system to deal with the risk of small molecules

As outlined above, small molecules pose risks to the immune system as haptens and for immunologically important signaling pathways. However, since the body comes into contact with small molecules frequently, immunological strategies are likely to exist to minimize these risks, especially for allergy or autoimmunity. One can imagine that hapten generation is avoided by quick and efficient

metabolic elimination of small molecules, or by preventing bioactivation altogether. In this context, it is noteworthy that the phenotype of slow acetylation by *N*-acetyltransferase, a phase II enzyme, is more common in patients with drug-induced lupus caused by procainamid or hydralazine [21,22]. Variant alleles of *CYP1A1*, which code for enzymes with higher activity, were found to protect against psoriasis [23]. Except for drug-induced autoimmune reactions, most autoimmune diseases remain idiopathic. However, epidemiology, anecdotal evidence or mechanistic studies have suggested links between autoimmune diseases and environmental exposure to small molecules or xenobiotic metabolizing enzyme activity. For instance, the links between rheumatoid arthritis, psoriasis and smoking are strong [24,25].

■ Xenobiotic metabolism

The liver is quantitatively the most important location for xenobiotic metabolism. However, in most cases, the reactive metabolites formed are short-lived and will therefore not reach the circulation or other tissues. The liver protects itself against reactive metabolites (e.g., by high glutathione and *N*-acetylcysteine levels). Moreover, the liver is immunologically privileged, in that it is more prone to induce tolerogenic than immunogenic responses [26,27]. It is noteworthy that the major routes of exposure to small molecules are the mucosal tissues of the gut, skin and lung. For some environmental pollutants, uptake via food can be the major route, as is the case for the infamous small molecule 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin [28]; however, the gut epithelium constitutively expresses a range of xenobiotic metabolizing enzymesxD [29,30]. Furthermore, the skin has metabolic potential and keratinocytes (80–90% of epidermal cells), fibroblasts and melanocytes express a broad range of cytochrome (CYP) 450 enzymes [31,32], capable of activating drugs (e.g., sulfamethoxazol) or prohaptens into contact allergenic metabolites [31,33]. Thus, mucosal surfaces can conceivably degrade small molecules, albeit this carries a risk for neo-antigen generation and adverse immune reactions.

■ Arylhydrocarbon receptor

Xenobiotic metabolism is constitutive in some cells but also, to a varying degree, inducible. The transcription factor arylhydrocarbon receptor (AhR) is a sensor of many small molecules and induces the transcription of important phase I (bioactivation) and phase II (conjugation) metabolizing genes, in particular *CYP1A1*, *CYP1B1*, glutathione transferases, aldehyde dehydrogenases and chinon reductases [34]. The AhR is a cytosol-residing transcription factor and a member of the evolutionarily old PAS-bHLH protein family. The AhR undergoes conformational change upon binding of small ligands (also known as agonists) and translocates to the nucleus where it associates with the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, another member of the PAS-bHLH family. The complex then initiates transcription of genes whose promoters have the consensus sequence 5′-GCGTG-3′, known as 'dioxin-responsive element' (DRE) [35]. Ligands must only meet minimal requirements of size and planar shape to fit into AhR's binding pocket and, consequently, a broad range of low-molecular weight chemicals activate AhR, albeit at different affinities ranging from 10^{-12} to 10^{-3} M. Many ligands have two-carbon ring systems, such as tryptophan derivatives, flavonoids or biphenyls. Thus, AhR activity is central to efficient and fast metabolizing of many small molecules. Cooperative regulation of phase I and II enzymes and conjugate transporters facilitate efficient detoxification together with the AhR-linked Nrf2-controlled gene battery that preferentially upregulates phase II enzymes [36–38]. A detailed graph of the pathways can be found online [101].

■ AhR & Langerhans cells

In a recent study, we identified higher than liver levels of AhR in primary murine Langerhans cells, the antigen-presenting cells in the epidermis. Langerhans cells can mediate contact hypersensitivity reactions by transporting antigen to the lymph nodes and activating T cells. At the same time, their sentinel position in the skin requires that they induce tolerance, depending on the circumstances [39]. Congruent with this, we found that, despite their high AhR expression levels, Langerhans cells were inert to AhR activation and did not upregulate AhR-dependent xenobiotic metabolizing enzymes [40]. Considering that the majority of haptens are formed from metabolites, and that the balance between bio-activation and detoxification determines the probability of hapten-formation [41], we proposed that reducing metabolizing enzyme activity is a risk-reducing strategy of Langerhans cells [40,42]. More research will be needed to verify this hypothesis.

Beyond its role as inducer of xenobiotic enzymes, signaling via the AhR is involved in cell proliferation and differentiation of many organs and tissues [43,44]. With respect to the immune system,

ARYLHYDROCARBON RECEPTOR

Cytosolic latent transcription factor that becomes active upon binding of small-molecule ligands or agonists. A broad array of ligands are accepted by AhR, common features are a certain size and planarity. The best-known toxic ligand is 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, whose binding affinity is approximately 10^{-9}–10^{-12} M

toxic activation of AhR by dioxin, a xenobiotic, high-affinity ligand, leads to systemic immunosuppression [45]. However, activation by quickly degradable ligands, such as the physiological compound formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), is mandatory for secretion of IL-22, a cytokine involved in fighting bacteria [46,47]. The ligand-dependent differential outcome of AhR activation is thus obvious, although little explored until now.

Curiously, we found that murine primary Langerhans cells needed AhR expression for their normal maturation and function [40], and that *in vitro* differentiated human Langerhans cells express AhR [38]. AhR-deficient mice had impaired skin immunity and were incapable of producing the enzyme indoleamine-2,3-deoxygenase, which is important in providing a tolerance-inducing milieu to T cells [40,48,49].

■ AhR & T-cell differentiation

A number of studies have addressed the role of AhR in differentiation of T-cell subsets and antigen-presenting cells [42,46,50,51]. These characteristics led to the idea that AhR can link environmental factors to adverse immune reactions, when AhR was discovered as a factor necessary for secretion of IL-22 by Th17 cells [46,52]. Th17 cells are a novel T-helper cell subset and, in contrast to T-helper cells and cytotoxic T cells, abundantly express AhR. IL-22 might exacerbate autoimmunity [46,53], an example of this is psoriasis; IL-22-producing cells are found in psoriatic plaques [54]. IL-22 is further linked to proinflammatory processes, such as dermal inflammation, inflammatory bowel disease and Crohn's disease. IL-22 has immunoprotective functions in the skin and liver, as well as inducing production of antimicrobial peptides [55]. It was suggested that AhR links environmental factors to autoimmune diseases by promoting Th17 differentiation and cytokine secretion [46]. Some epidemiological evidence exists in this respect, although the exact nature of the link to the environment is still speculative [23,52,56,57]. Exogenous small molecules or the tryptophan photoproduct FICZ as an endogenous, physiological ligand have been suggested. FICZ is generated in the skin by UVB [58] and is a high-affinity ligand for AhR. These findings triggered research into the potential of AhR ligands to manipulate immune responses. For instance, two different AhR binding substances, VAF347 and M50367, could suppress allergies or graft rejection in mouse transplantation experiments [59,60]. The evidence presented so far suggests that shifts in T subset frequencies, as well as effects on dendritic cells, are relevant for the outcome [38,61]. It is of note that dendritic cells also express high levels of AhR [38,40], and that different ligands might drive different AhR-dependent physiological responses [46,47,62]. Much of this is only sketchily understood and is currently the subject of intense research.

Taken together, AhR could contribute to avoidance and initiation/exacerbation of adaptive and adverse immune reactions, which is shown in FIGURE 3. First, AhR controls phase I and II enzymes and is pivotal for fast and efficient elimination of small molecules. Formation of protein adducts and, thereby, new self antigens, against which no tolerance exists, is a collateral risk. Second, AhR is a transcription factor co-modulating immune responses.

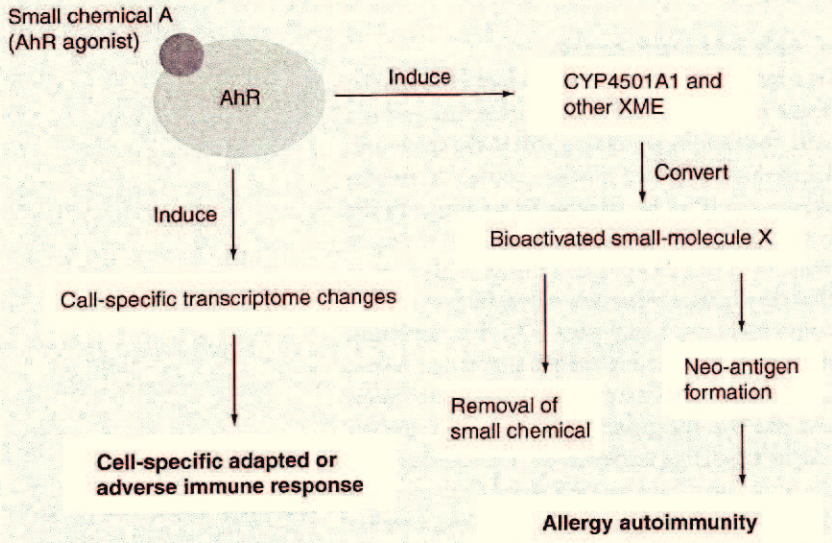


Figure 3. Hypothesis of adaptive and adverse immune activity by the arylhydrocarbon receptor. The latent transcription factor AhR senses small molecules and, upon ligand binding, changes transcription of target genes, including xenobiotic metabolizing phase I and II genes and many genes of the immune system. For instance, AhR is a necessary factor for IL-22 secretion by Th17 cells. AhR-mediated enhanced metabolization of chemicals (its own agonists or other small molecules present in cells) can lead to formation of neo-antigens, but is also necessary to eliminate chemicals.

Future perspective

The discovery of certain small molecules as ligands of immunologically important transcription factors such as AhR and, thus, as pivotal in lineage decisions, has triggered much basic research. A new appreciation of small molecules as real-world players in immunology emerges and will be exploited further to understand and manipulate immune responses. Interdisciplinary approaches reaching out to structural biology, epidemiology, microbiology and many

other fields will be pivotal to eventual integration and exploitation of results in therapeutic and preventive health strategies.

Financial & competing interests disclosure

The authors gratefully acknowlege the financial support of the Bundesministerium für Umwelt and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK1427). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

- Small molecules can become part of antigens, recognized by T cells and trigger adverse immune responses.
- Many receptors have small molecules as agonists in signaling. Mimicking these physiological agonists by chemicals can result in toxicity or can be exploited pharmacologically.
- Elimination of small molecules via phase I and II xenobiotic metabolizing enzymes is not only found in liver, but also in the immunologically active barrier organs, the skin and gut.
- Immunological strategies that deal with the heightened risk of hapten formation during this metabolization are likely but largely unknown.
- The primary sensor of small molecules and inducer of xenobiotic metabolizing enzymes, the arylhydrocarbon receptor, plays a cell-specific, physiological role in the functions of several immune cell subsets.
- Controlling AhR activity in antigen-presenting cells could present an allergy risk minimizing strategy of the skin.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:
- ▪ of interest
- ▪▪ of considerable interest

1 Griem P, Wulferink M, Sachs B, Gonzalez JB, Gleichmann E. Allergic and autoimmune reactions to xenobiotics: how do they arise? *Immunol. Today* 19(3), 133–141 (1998).

2 Landsteiner K, Jacobs J. Studies on the sensitiziation of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* 61, 643–656 (1935).

▪ **Historical paper, describing for the first time the immunogenic possibilities of low molecular weight chemicals.**

3 Padovan E, Bauer T, Tongio MM, Kalbacher H, Weltzien HU. Penicilloyl peptides are recognized as T cell antigenic determinants in penicillin allergy. *Eur. J. Immunol.* 27(6), 1303–1307 (1997).

▪▪ **Exemplifies the hapten-principle for the allergenic drug penicillin.**

4 Kalish RS, Johnson KL. Enrichment and function of urushiol (poison ivy)-specific T lymphocytes in lesions of allergic contact dermatitis to urushiol. *J. Immunol.* 145(11), 3706–3713 (1990).

▪▪ **Demonstration that urushiol, a plant substance, is a specific T cell hapten.**

5 Takahashi K, Kropshofer H, Vogt AB, Gleichmann E, Griem P. Drug-induced inhibition of insulin recognition by T-cells. the antirheumatic drug aurothiomalate inhibits MHC binding of insulin peptide. *Mol. Immunol.* 35(17), 1081–1087 (1998).

6 Pirmohamed M, James S, Meakin S *et al.* Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ* 329(7456), 15–19 (2004).

7 Pichler WJ, Beeler A, Keller M *et al.* Pharmacological interaction of drugs with immune receptors. The p-i concept. *Allergol. Int.* 55(1), 17–25 (2006).

8 Esser C. Immunotoxicology. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry II.* Taylor JB, Triggle DJ (Eds). Elsevier, UK, 215–229 (2007).

9 Recio L, Bauer A, Faiola B. Use of genetically modified mouse models to assess pathways of benzene-induced bone marrow cytotoxicity and genotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 153–164 (2005).

10 Cardenas ME, Sanfridson A, Cutler NS, Heitman J. Signal-transduction cascades as targets for therapeutic intervention by natural products. *Trends Biotechnol.* 16(10), 427–433 (1998).

11 Matsuda S, Koyasu S. Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin – ligand complex. *Curr. Top. Med. Chem.* 3(12), 1358–1367 (2003).

12 Martinez-Martinez S, Redondo JM. Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Curr. Med. Chem.* 11(8), 997–1007 (2004).

13 Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 9(5), 324–337 (2009).

14 Meyer T, Stockfleth E. Clinical investigations of Toll-like receptor agonists. *Expert Opin. Investig. Drugs* 17(7), 1051–1065 (2008).

15 Novak N, Yu CF, Bieber T, Allam JP. Toll-like receptor 7 agonists and skin. *Drug News Perspect.* 21(3), 158–165 (2008).

16 Zhu LX, Sharma S, Gardner B *et al.* IL-10 mediates σ1 receptor-dependent suppression of antitumor immunity. *J. Immunol.* 170(7), 3585–3591 (2003).

17 Cabral GA. Drugs of abuse, immune modulation, and AIDS. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1(3), 280–295 (2006).

18 Strober W. Vitamin A rewrites the ABCs of oral tolerance. *Mucosal. Immunol.* 1(2), 92–95 (2008).

▪▪ **Brief review on how an ordinary food component is required to achieve oral tolerance.**

19 Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30(5), 626–635 (2009).

20 He YW. Orphan nuclear receptors in T lymphocyte development. *J. Leukoc. Biol.* 72(3), 440–446 (2002).

21 von Schmiedeberg S, Fritsche E, Rönnau AC *et al.* Polymorphisms of the xenobiotic-metabolizing enzymes CYP1A1 and NAT-2 in systemic sclerosis and lupus erythematosus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 455, 147–152 (1999).

22 Uetrecht JP, Woosley RL. Acetylator phenotype and lupus erythematosus. *Clin. Pharmacokinet.* 6(2), 118–134 (1981).

23 Richter-Hintz D, Thier R, Steinwachs S *et al.* Allelic variants of drug metabolizing enzymes as risk factors in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 120(5), 765–770 (2003).

24 Kramer U, Esser C. Cigarette smoking, metabolic gene polymorphism and psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 126(3), 693–694 (2006).

25 Klareskog L, Wedren S, Alfredsson L. On the origins of complex immune-mediated disease. the example of rheumatoid arthritis. *J. Mol. Med.* 87(4), 357–362 (2009).

26 Ju C, Pohl LR. Tolerogenic role of Kupffer cells in immune-mediated adverse drug reactions. *Toxicology* 209(2), 109–112 (2005).

27 Park BK, Kitteringham NR, Maggs JL, Pirmohamed M, Williams DP. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 177–202 (2005).

28 Schecter A, Birnbaum L, Ryan JJ, Constable JD. Dioxins: an overview. *Environ. Res.* 101(3), 419–428 (2006).

29 Lindell M, Lang M, Lennernas H. Expression of genes encoding for drug metabolising cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein in the rat small intestine; comparison to the liver. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 28(1), 41–48 (2003).

30 Thelen K, Dressman JB. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *J. Pharm. Pharmacol.* 61(5), 541–558 (2009).

31 Saeki M, Saito Y, Nagano M, Teshima R, Ozawa S, Sawada J. mRNA expression of multiple cytochrome p450 isozymes in four types of cultured skin cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 127(4), 333–336 (2002).

32 Swanson HI. Cytochrome P450 expression in human keratinocytes. an aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chem. Biol. Interact.* 149(2–3), 69–79 (2004).

33 Bergstrom MA, Ott H, Carlsson A *et al.* A skin-like cytochrome P450 cocktail activates prohaptens to contact allergenic metabolites. *J. Invest. Dermatol.* 127(5), 1145–1153 (2007).

▪ **Investigation of xenobiotic metabolizing enzymes in human skin and demonstration that these enzymes indeed can turn a pro-hapten into a hapten.**

34 Schrenk D. Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* 55(8), 1155–1162 (1998).

35 Beischlag TV, Luis MJ, Hollingshead BD, Perdew GH. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18(3), 207–250 (2008).

36 Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334 (2003).

37 Ma Q, Kinneer K, Bi Y, Chan JY, Kan YW. Induction of murine NAD(P)H.quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction. *Biochem. J.* 377(1), 205–213 (2004).

38 Platzer B, Richter S, Kneidinger D, Waltenberger D, Woisetschlager M, Strobl H. Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits *in vitro* differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells. *J. Immunol.* 183(1), 66–74 (2009).

39 Wang L, Bursch LS, Kissenpfennig A, Malissen B, Jameson SC, Hogquist KA. Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions. *J. Immunol.* 180(7), 4722–4727 (2008).

40 Jux B, Kadow S, Esser C. Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J. Immunol.* 182(11), 6709–6717 (2009).

41 Sanderson JP, Naisbitt DJ, Park BK. Role of bioactivation in drug-induced hypersensitivity reactions. *AAPS J.* 8(1), E55–E64 (2006).

42 Esser C, Rannug A, Stockinger B. The aryl hydrocarbon receptor and immunity. *Trends Immunol.* 9, 447–454 (2009).

43 Esser C. The immune system of Ahr null mutant mouse strains – not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. *Biochem. Pharmacol.* 77, 597–607 (2009).

44 McMillan BJ, Bradfield CA. The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics. endogenous function in genetic model systems. *Mol. Pharmacol.* 72(3), 487–498 (2007).

45 Bock KW, Kohle C. Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem. Pharmacol.* 72(4), 393–404 (2006).

46 Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM *et al.* The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453(7191), 106–109 (2008).

▪▪ **Describes the discovery that small molecules that activate the AhR are necessary for the immunological function of Th17 cells and, thus, are involved in autoimmunity.**

47 Stockinger B. Beyond toxicity: aryl hydrocarbon receptor-mediated functions in the immune system. *J. Biol.* 8(7), 61 (2009).

48 von Bubnoff D, Bausinger H, Matz H *et al.* Human epidermal Langerhans cells express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Invest. Dermatol.* 123(2), 298–304 (2004).

49 Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* 113(11), 2394–2401 (2009).

50 Funatake CJ, Marshall NB, Steppan LB, Mourich DV, Kerkvliet NI. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of $CD4^+$ $CD25^+$ cells with characteristics of regulatory T cells. *J. Immunol.* 175(7), 4184–4188 (2005).

▪▪ **Suggests that AhR ligands modulate differentiation and, thus, may enhance regulatory T cells.**

51 Vorderstrasse BA, Dearstyne EA, Kerkvliet NI. Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the antigen-presenting activity of dendritic cells. *Toxicol. Sci.* 72(1), 103–112 (2003).

52 Kobayashi S, Okamoto H, Iwamoto T *et al.* A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 47(9), 1317–1322 (2008).

53 Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH *et al.* Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453(7191), 65–71 (2008).

54 Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10, 857–863 (2009).

55 Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21(2), 241–254 (2004).

56 Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 373(9664), 659–672 (2009).

57 D'Cruz D. Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors. *Toxicol. Lett.* 112–113, 421–432 (2000).

58 Fritsche E, Schafer C, Calles C *et al.* Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(21), 8851–8856 (2007).

59 Hauben E, Gregori S, Draghici E *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance through direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells. *Blood* 112(4), 1214–1222 (2008).

60 Negishi T, Kato Y, Ooneda O *et al.* Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. *J. Immunol.* 175(11), 7348–7356 (2005).

▪ **Nice first example of the pharmacological exploitation of AhR to modulated immune responses.**

61 Lawrence BP, Denison MS, Novak H *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor is essential for mediating the anti-inflammatory effects of a novel low-molecular-weight compound. *Blood* 112(4), 1158–1165 (2008).

62 Flaveny CA, Murray IA, Chiaro CR, Perdew GH. Ligand selectivity and gene regulation by the human aryl hydrocarbon receptor in transgenic mice. *Mol. Pharmacol.* 75(6), 1412–1420 (2009).

63 Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol. Life Sci.* 63(1), 60–72 (2006).

64 Shuster EA. Hormonal influences in multiple sclerosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 318, 267–311 (2008).

65 Walterscheid JP, Ullrich SE, Nghiem DX. Platelet-activating factor, a molecular sensor for cellular damage, activates systemic immune suppression. *J. Exp. Med.* 195(2), 171–179 (2002).

66 Yao C, Sakata D, Esaki Y *et al.* Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through TH1 cell differentiation and TH17 cell expansion. *Nat. Med.* 15(6), 633–640 (2009).

67 Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 106(7), 2375–2381 (2005).

68 Adorini L, Penna G. Induction of tolerogenic dendritic cells by vitamin D receptor agonists. *Handb. Exp. Pharmacol.* 188, 251–273 (2009).

69 Costa-Iborra B, Elorza A, Olazabal IM *et al.* Macrophage oxygen sensing modulates antigen presentation and phagocytic functions involving IFN-γ production through the HIF-1 α transcription factor. *J. Immunol.* 182(5), 3155–3164 (2009).

70 Corral LG, Kaplan G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. *Ann. Rheum. Dis.* 58(Suppl. 1), I107–I113 (1999).

71 Kerkvliet NI. Recent advances in understanding the mechanisms of TCDD immunotoxicity. *Int. Immunopharmacol.* 2(2–3), 277–291 (2002).

■ Website

101 Sabio Sciences www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=ahr_pathway

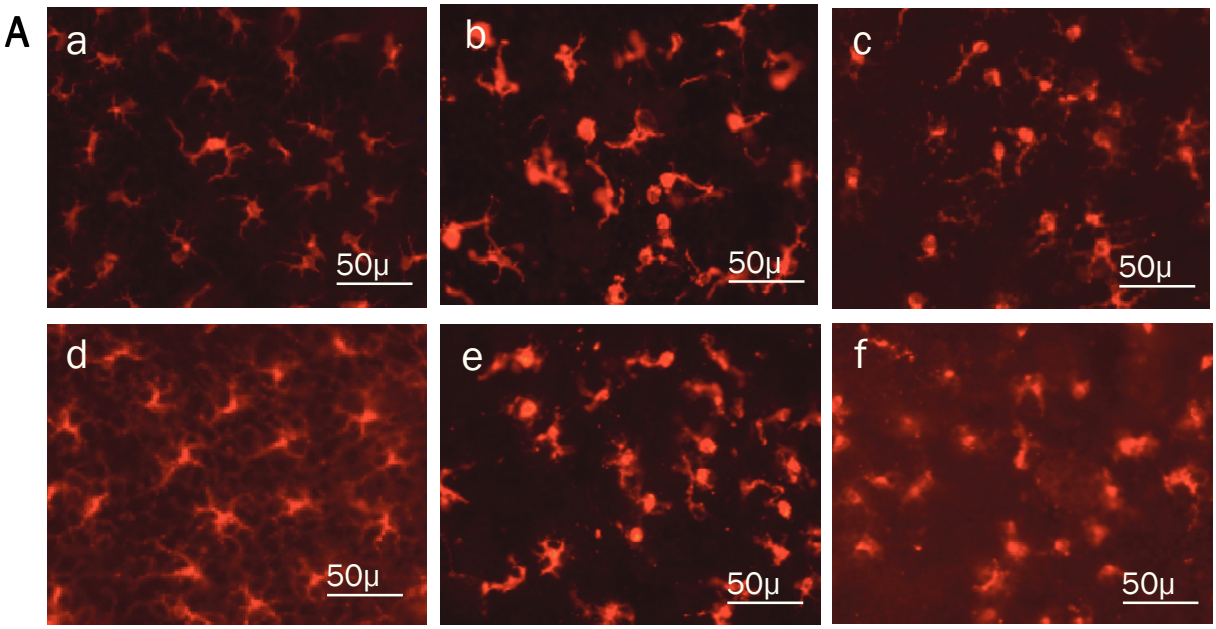
Anhang B: Unveröffentlichte Ergebnisse

Im Folgenden werden bisher noch unveröffentlichte Ergebnisse zusammengefasst, die mit den unter (I) und (II) zusammengefassten Veröffentlichungen die Zielsetzung der Arbeit widerspiegeln

.

B.1. Einfluss der AhR-Defizienz auf die *in vitro* induzierte LZ-Emigration

Um zu migrieren, müssen LZ sich aus dem Keratinozyten-Verband der Epidermis lösen und in der darunter liegenden Dermis zusammen mit dDZ zu sogenannte „dermal cords“ entlang der Lymphgefäße anordnen. Mit diesem Versuch sollte die Frage nach dem möglichen Einfluss der AhR-Defizienz auf die Zelladhäsion und -migration untersucht werden. Dazu wurden im *in vitro* Versuch Hautexplantate für 48 Stunden kultiviert und die LZ mit einem anti-MHC-II TexasRed Antikörper gefärbt und die Anzahl bestimmt.



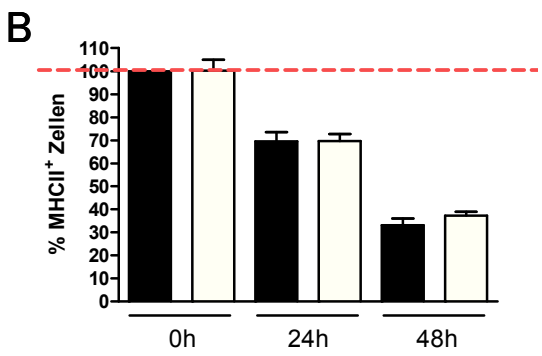


Abb. B1.1: *in vitro* Emigration MHCII+ LZ aus der Epidermis. Ohren von AhR-KO und WT Tieren wurden halbiert und entweder frisch präpariert oder mit der dermalen Seite zum Medium für 48 Stunden kultiviert. Im Anschluss wurden Dermis und Epidermis getrennt und mit einem primären anti-MHCII Antikörper gefolgt von einem Texas-Red Sekundärantikörper gefärbt (rot). (A) Die Anzahl MHC-II$^+$ Zellen der Epidermis von WT (obere Bildreihe) und AhR-KO (untere Bildreihe) wurde nach 0 (a,d), 24 (b,e) und 48 (c,f) Stunden doppelt blind bestimmt und auf 100% des WT (schwarze Balken) zum Zeitpunkt 0h bezogen (B); AhR-Ko (weiße Balken).

Die Daten zeigen, dass sowohl im Emigrationsverhalten als auch in der generellen Formierung von „dermal cords“ keine Unterschiede zwischen WT und AhR-KO bestehen. LZ verlassen über den beobachteten Zeitraum hinweg kontinuierlich die Epidermis und sammeln sich mit dDZ entlang der lymphatischen Gefäße in der Dermis, um von diesen in die drainierenden Lymphknoten einzuwandern.

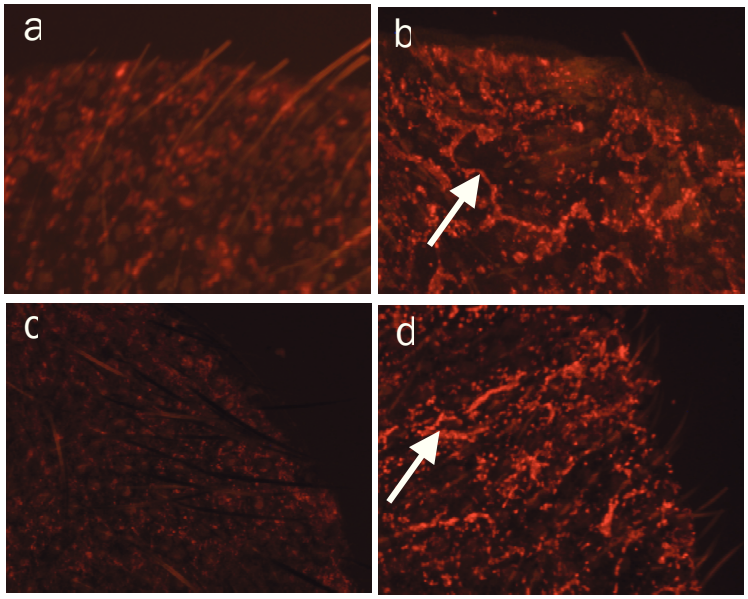


Abb. B 1.2 Formation von „dermal cords“ (weiße Pfeile) in der Dermis von WT (a) und AhR-KO (c) nach 0 Stunden und nach 24 Stunden (WT (b) und AhR-KO (d)) *in vitro* Kultivierung. MHCII$^+$ LZ und dDZ wurden mit einem anti-MHCII Antikörper und im Anschluss mit Texas Red gefärbt. LZ und dDZ sind in rot dargestellt.

B.2. Die Rolle des AhR bei der FITC-induzierte CHS-Reaktion

Die CHS-Reaktion (s. 1.4.3) mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), einem fluoreszenten Hapten, lässt eine Aussage über das Migrationsvermögen der beteiligten APZ (LZ und dDZ) zu. Mit diesem Ansatz kann also der Einfluss des AhR auf entscheidende Punkte der Immunreaktion, wie Migrationskapazität von LZ und dDZ, Aktivierungszustand CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen, Stärke der Effektor-Phase, untersucht werden.

B.2.1 *Die CHS-Reaktion ist konventionellen AhR-KO Mäusen supprimiert*

WT und AhR-KO Mäuse zeigten über den Verlauf der Reaktion eine signifikant erhöhte Ohrschwellung im Vergleich zu den Lösemittel-behandelten Kontrollgruppen. Die Ohrschwellung der AhR-KO Tiere der Versuchsgruppe war im Vergleich zu der WT-Versuchsgruppe über den untersuchten Zeitraum dabei signifikant reduziert.

Um den Einfluss des AhR auf das Migrationsvermögen der LZ und dDZ im Kontext einer FITC induzierten CHS-Reaktion und den Aktivierungsstatus der T-Zellen in den aurikulären Lymphknoten zu ermitteln, wurden diese 24 und 96 Stunden nach 2. Kontakt entnommen und durchflusszytometrisch bestimmt (s. Abb. B2.2). Dabei wurde die MHC-II und CD24 Expression auf FITC$^+$ Zellen ermittelt, um zwischen LZ und dDZ zu unterscheiden[255]. Aktivierte CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen wurden durch die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 nachgewiesen.

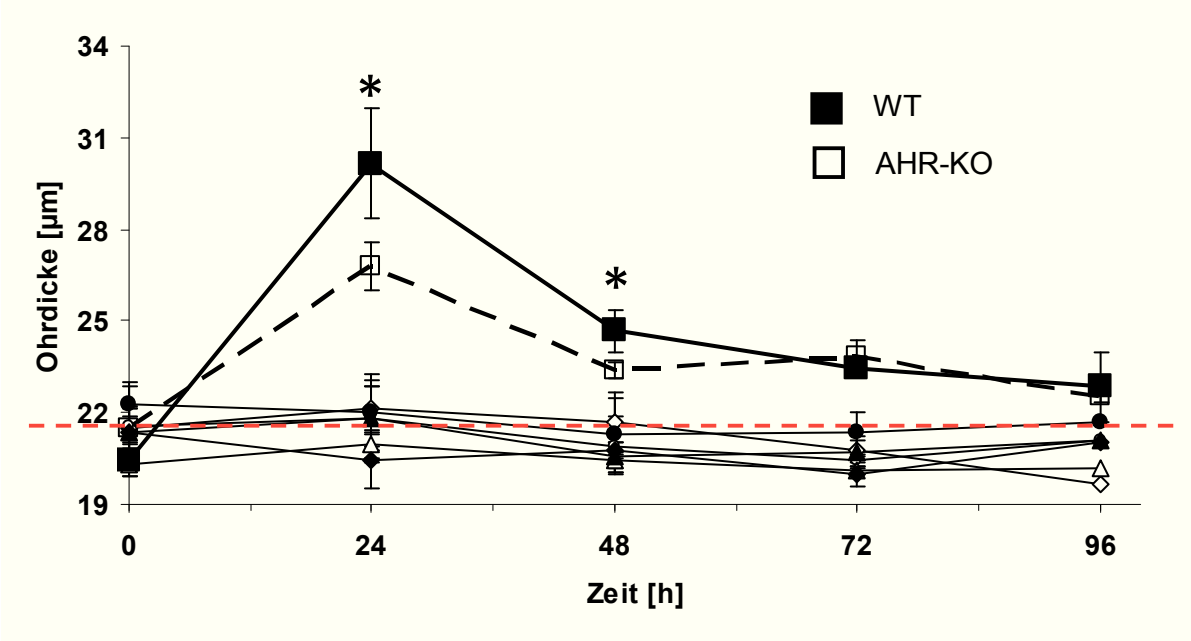


Abb. B 2.1: Verlauf der FITC induzierten CHS-Reaktion in WT und AhR-KO Tieren über einen Zeitraum von 0 bis 96 Stunden. Für die Bestimmung der FITC induzierten Ohrschwellung in WT und AhR-KO Mäusen wurde die Ohrdicke der verschiedenen Versuchs- und Kontrollgruppen in einem doppelt-blind Ansatz über einen Zeitraum von 0-96 Stunden ermittelt. Die Versuchsgruppen wurden an Tag 0 und fünf mit FITC behandelt (+/+), Kontrollgruppen wurden entweder an Tag 0 (+/-) und an Tag fünf (-/+) mit FITC oder nur mit Lösemittel (-/-) behandelt. Die durchschnittliche Ohrdicke einer unbehandelten Maus liegt bei ~20-21µm und ist durch die rot gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die ermittelten Werte aller Kontrollgruppen lagen in diesem Bereich. Dargestellt ist der Mean ± SD mit n = 6. Signifikanzen wurden mittels Student´s t-Test ermittelt. *p<= 0,05.

24 und 96 Stunden nach 2. Kontakt unterschied sich die ermittelte Gesamtzellzahl in den aurikulären Lymphknoten (LN) der WT und AhR-KO Versuchsgruppen signifikant von denen der Kontrollgruppen, was zu erwarten war. Die Zellularität war nach 24h im AhR-KO sogar tendenziell erhöht gegenüber dem WT. Ein Unterschied in der Anzahl $FITC^+$ eingewanderten LZ und dDZ war zwischen den Genotypen nicht zu beobachten. Auch die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen unterschied sich nicht zwischen WT und AhR-KO. Tendenziell konnte eine erhöhte CD69 Expression 24 und 96 Stunden nach 2. Kontakt in AhR-KO Tieren beobachtet werden, die aber nicht signifikant war.

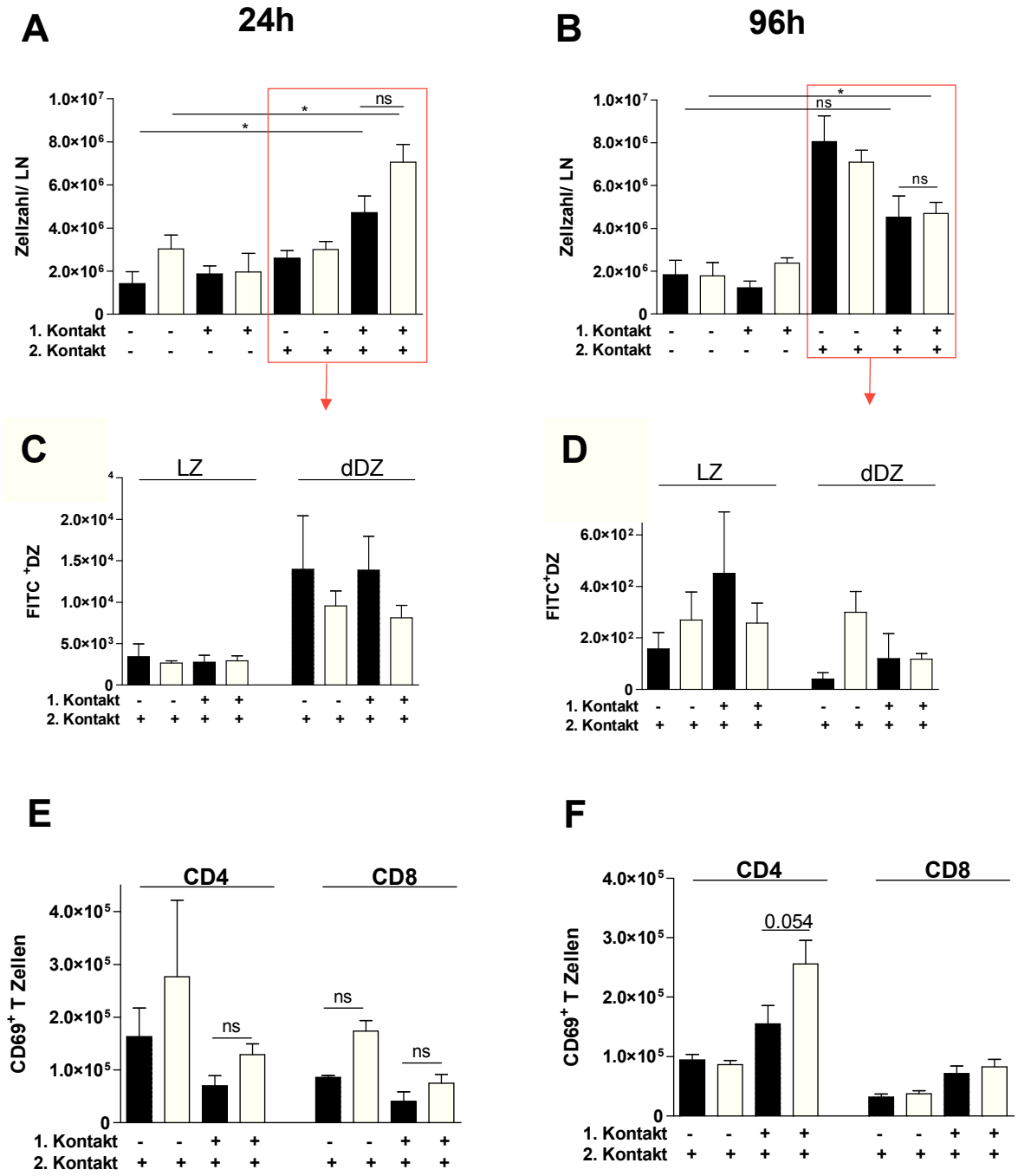


Abb. B 2.2: Zellularität der Lyphknoten und Migrationsverhalten FITC⁺ LZ und dDZ in WT und AhR-KO Tieren während der CHS-Reaktion. WT (schwarze Balken) und AhR-KO (weiße Balken) Mäuse wurden an Tag 0 mit 0,5% FITC auf der rasierten Rückenhaut sensibilisiert. Fünf Tage später wurde die Effektor-Phase durch Applikation von 0,3% FITC am Ohr ausgelöst. Kontrollgruppen erhielten nur Lösemittel (-/-), eine Sensibilisierung an Tag 0 (+/-) oder eine Behandlung an Tag 5 (-/+). 24h und 96h später wurden die drainierenden, aurikulären LN entnommen und die durchschnittliche Zellularität bestimmt (A; B). Die Einzelzellsuspension wurde mit anti-CD11c, MHC-II und CD24 gefärbt. Die Anzahl eingewanderter LZ wurden als FITC⁺ MHCII^{high} CD24^{high} und dDZ als FITC⁺ MHCII^{high} CD24^{low} identifiziert und ihre Anzahl pro LN bestimmt (C; D). Aktivierte T-Zellen wurden mit anti-CD4, CD8 und CD69 gefärbt und ihre Anzahl pro LN nach 24h (E) und 96h (F) bestimmt. Dargestellt ist der Mean ± SD mit n = 6. Signifikanzen wurden mittels Student´s t-Test ermittelt *p < 0,05 student´s t -Test.

B.2.2. *Die CHS-Reaktion in konditionalen K5AhR-KO Tieren ist mit dem WT vergleichbar*

Um den Einfluss einer AhR-Defizienz in Keratinozyten auf die CHS-Reaktion zu untersuchen, wurden K5AhR-KO Tiere im Vergleich zu WT Tieren untersucht.

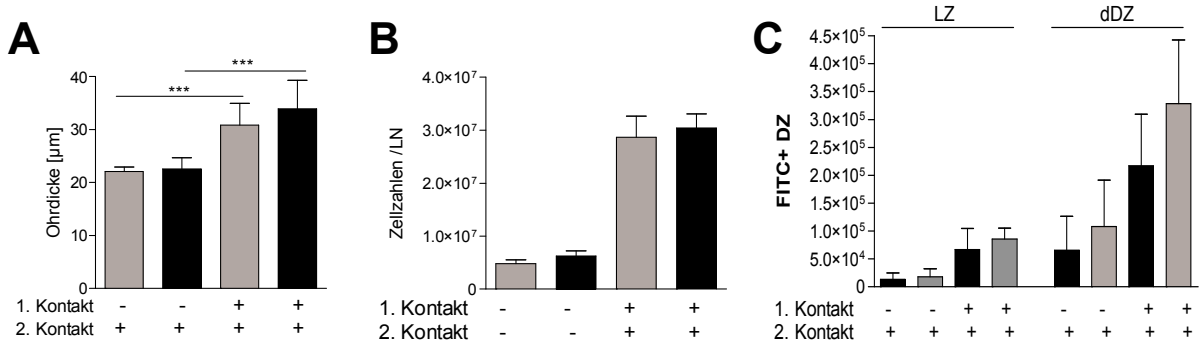


Abb.B 2.3: Die CHS-Reaktion wird durch die keratinozytenspezifische AhR-Defizienz nicht inhibiert. In K5AhR-KO (graue Balken) und WT (schwarze Balken) Mäusen wurde die CHS-Reaktion gemäß Schema A in Abb. 1.4 induziert. 24h nach 2. Kontakt wurde die Ohrschwellung bestimmt (A). Die hautdrainierenden aurikulären LN wurden entnommen und die Zellzahl pro LN bestimmt (B). Die Zellularität der LN wurde ermittelt. Die Anzahl eingewanderter LZ wurde als $FITC^+$ $MHCII^{high}$ $CD24^{high}$ und dDZ als $FITC^+$ $MHCII^{high}$ $CD24^{low}$ identifiziert und ihre Anzahl pro LN bestimmt (C). Dargestellt ist der Mean ± SD mit n = 6. Signifikanzen wurden mittels Student´s t-Test ermittelt (***p<0,001).

Die CHS-Reaktion ist in K5AhR-KO Tieren mit der von WT Tieren vergleichbar. Beide Genotypen zeigten 24h nach 2. Kontakt eine vergleichbar induzierte Ohrschwellung. Die Zellularität der Lymphknoten und Anzahl der eingewanderten LZ und dDZ unterschied sich ebenfalls nicht.

B.2.3. *Einfluss einer AhR-Aktivierung mit TCDD auf die FITC vermittelte CHS-Reaktion*

Immunsuppressive Effekte sind für die AhR-Aktivierung mit TCDD beschrieben. Ein direkter Einfluss auf die CHS-Reaktion und eine Klärung des möglichen zugrundeliegenden Mechanismus in der Maus konnten aber noch nicht dargestellt werden.

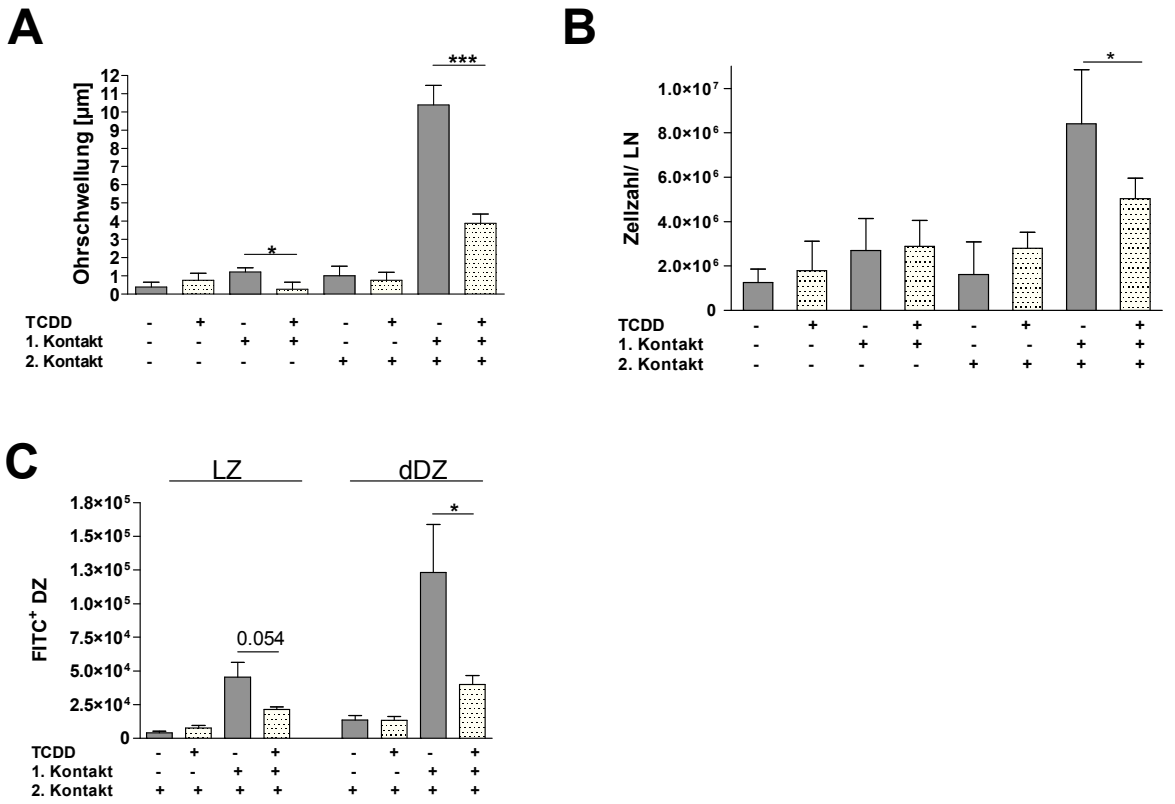


Abb. B 2.4: Die CHS-Reaktion wird durch TCDD inhibiert. TCDD oder Lösemittel-injizierte WT Mäuse wurden fünf Tage nach der Injektion durch Applikation von 0,5% FITC auf die rasierte Rückenhaut sensibilisiert. Weitere fünf Tage später wurde die CHS-Reaktion durch Applikation von 0,3% FITC auf die Ohren initiiert. 24h später wurde die Ohrschwellung in Bezug auf den zuvor ermittelten Nullwert bestimmt (A). Die hautdrainierenden aurikulären LN wurden entnommen und die Zellzahl pro LN bestimmt (B). Die Anzahl eingewanderter LZ wurde als $FITC^+$ $MHCII^{high}$ $CD24^{high}$ und dDZ als $FITC^+$ $MHCII^{high}$ $CD24^{low}$ identifiziert und ihre Anzahl pro LN bestimmt (C). Dargestellt ist der Mean ± SD mit $n \geq 6$. Signifikanzen wurden mittels Student´s t-Test ermittelt. *p<0,05;**p<0,01; ***p<0,001.

TCDD behandelte Tiere zeigten, ähnlich wie AhR-KO Tiere in (II), eine signifikante Reduktion der Ohrschwellung 24 Stunden nach 2. Kontakt mit FITC. Die Zellularität der Lymphknoten TCDD behandelter Tiere war im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert. Zusätzlich konnte eine signifikant verringerte Anzahl $FITC^+$ dDZ 24 Stunden nach

2. Kontakt in der TCDD Versuchsgruppe beobachtet werden. LZ waren davon nur tendenziell betroffen.

B.3. AhR-abhängige Induktion von *Ido1* und *Ido2*

Um den Nachweis einer AhR-abhängigen *Ido1* Induktion zu erbringen, wurden DZ, die aus Knochenmark generiert wurden (BM-DZ), mit den typischen *Ido1* Induktoren IFNγ und LPS in verschiedenen Konzentrationen stimuliert.

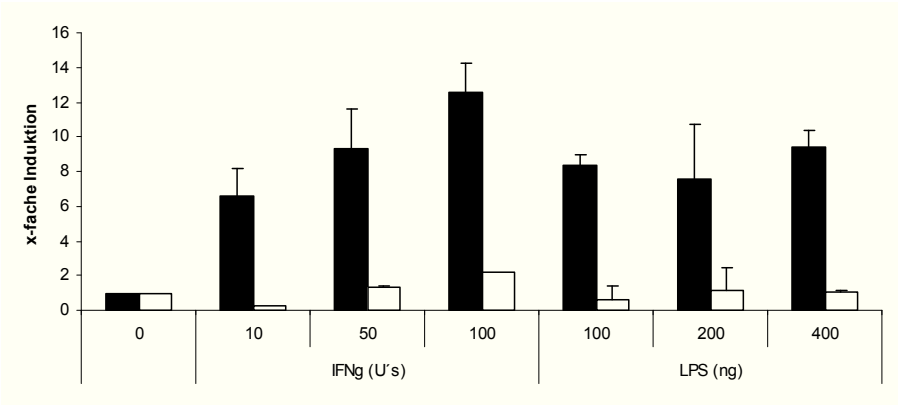


Abb. B 3.1: Dosisabhängige *Ido1* Induktion in WT, aber nicht AhR-KO BM-DZ. Knochenmark von WT und AhR-KO Tieren wurde präpariert und über einen Zeitraum von sieben Tagen mit 2% GM-CSF kultiviert, um dendritische Zellen zu generieren. An Tag 7 wurde der Differenzierungsstatus der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Bei einer Reinheit von > 80% $CD11c^+$ Zellen wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen IFNγ und LPS für 24 Stunden kultiviert. Die Induktion von *Ido1* wurde mittels RT-PCR im Vergleich zum Haushaltsgen *RPS6* bestimmt und die x-fache Induktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen ± SD ermittelt. ($n \geq 3$). WT (schwarze Balken), AhR-KO (weiße Balken).

Ido1 wird in WT BM-DZ über IFNγ dosisabhängig induziert, verschiedene Konzentrationen LPS zeigen keine unterschiedliche Induktionsstärke. In AhR-KO BM-DZ wird *Ido1* im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nicht induziert. Anhand dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Versuche eine IFNγ-Konzentration von 100 Units (U´s) und eine LPS Konzentration von 100ng gewählt.

Ido1 und *2* können auch durch andere TLR Liganden induziert werden. Um zu überprüfen, ob eine Induktion in AhR-defizienten DZ möglich ist, wurden aus Knochenmark generierte BM-DZ mit verschiedenen Konzentrationen unterschiedlicher Liganden für 3 oder 24 Stunden stimuliert.

Ido1 wird in WT BM-DZ nach 3 und 24 Stunden durch LPS und IFNγ stark, durch TCDD nur moderat induziert. Die Induktion in AhR-KO BM-DZ erfolgt durch LPS und IFNγ nur marginal.

Die *Ido1* Expression wird in WT BM-DZ nach 24h Stimulation auch durch die TLR Liganden CpG und P3C induziert, im AhR-KO hingegen nicht (B3.2 (A und B)). *Ido2* wird in WT BM-DZ nach 3h nur durch LPS, nicht aber durch IFNγ induziert, was der Literatur entspricht. TCDD induziert *Ido2* nicht. Nach 24h ist *Ido2* zwar noch durch LPS induziert, die Expression ist aber im Vergleich zum 3h Wert geringer. In AhR-KO BM-DZ ist nur eine geringe *Ido2* Expression durch LPS nach 3h erkennbar (B3.2 (C und D). Die Ergebnisse deuten auf eine AhR-abhängige *Ido1* und *Ido2* Induktion.

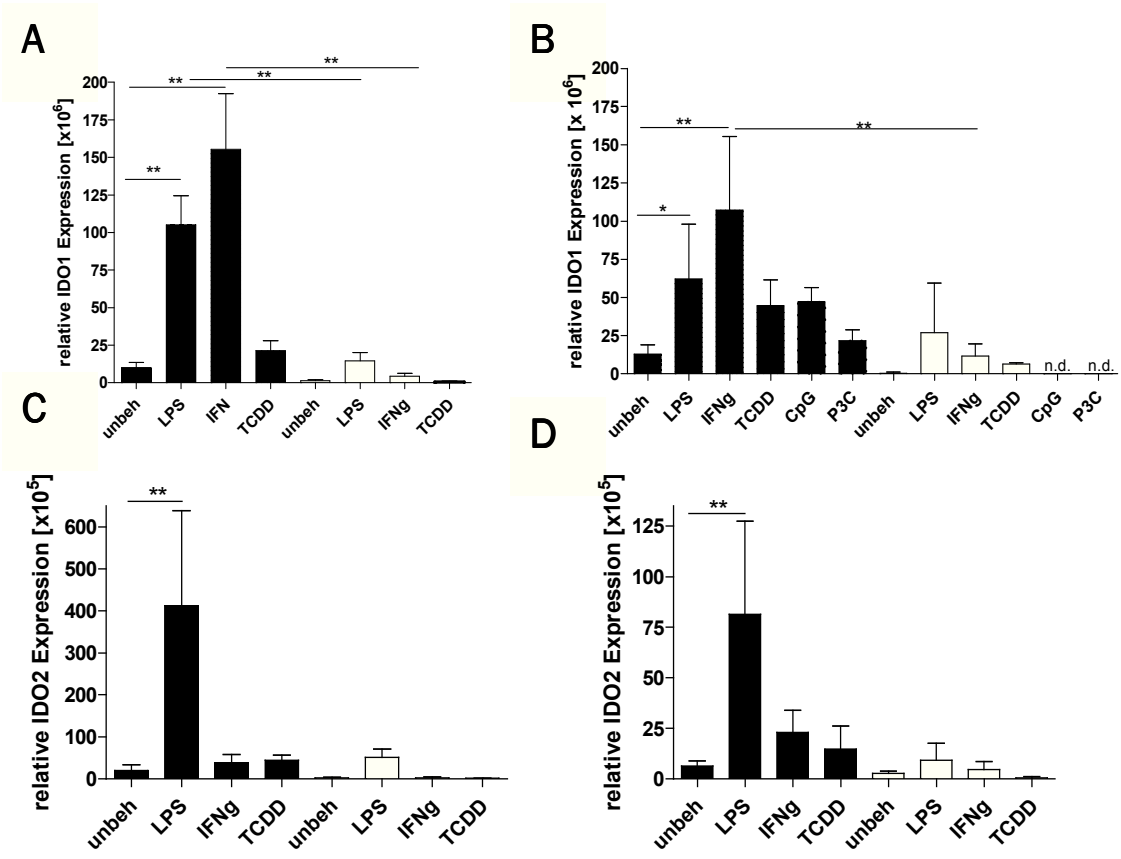


Abb. B3.2: Induktion von *Ido1* und *2* mit verschiedenen TLR Liganden und TCDD nach 3h und 24h Stimulation in BM-DZ. Relative Expression von *Ido1* (A) und IDO2 (C) nach 3h Stimulation mit 100U´s IFNγ, 100ng LPS oder 10nM TCDD im Vergleich zum Haushaltsgen RPS6 in WT (schwarz) und AhR-KO (weiß) BM-DZ. Relative Expression von IDO1 (B) nach 24h Stimulation mit IFNγ. LPS, TCDD und den TLR Liganden CpG (0,5mM), P3C (10µg/ml) und IDO2 nach 24h (D). Werte ± SD mit n =5-8 individuelle Mäuse aus bis zu drei unabhängigen Versuchen. *p<0,05; **p< 0,005; ***p< 0,001 (Student´s t-Test).

B.3.1 *Der AhR hat keinen Einfluss auf die TLR Expression oder nachgeschaltete LPS oder IFNγinduzierte Signalwege*

Um einen möglichen Einfluss des AhR auf die Expression der TLRs und das Signalmolekül MyD88 in AhR-KO BM-DZ auszuschließen (s. AbbB3.3 (A)), wurde deren Expression auf mRNA Ebene untersucht.

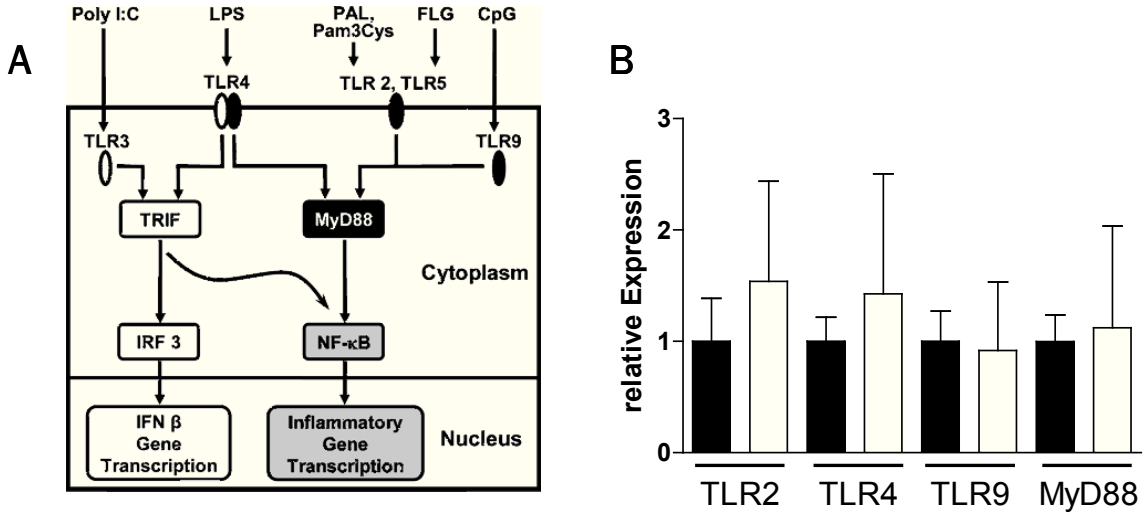
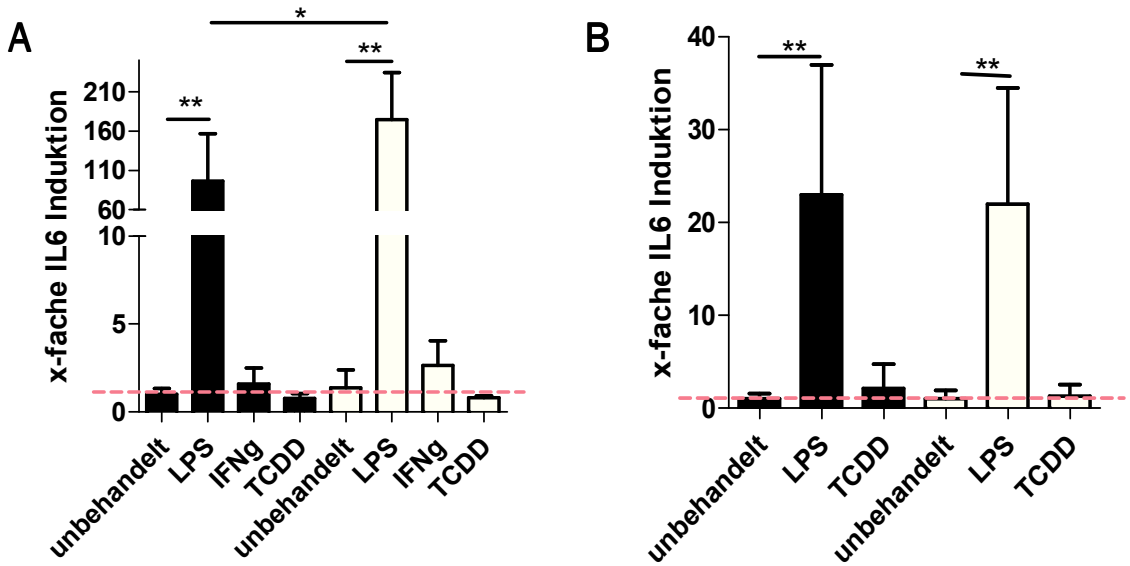


Abb. B3.3: (A) Schematische Darstellung des TLR-Signalweges und Rolle von MyD88 (aus: Bagchi et al., 2006). (B) mRNA Level von TLR2 (P3C), TLR4 (LPS) TLR9 (CpG) und MyD88 in unbehandelten BM-DZ (s.1.4) von AhR-KO Tieren (weiß), jeweils bezogen auf den WT (schwarz). Dargestellt ist der Mean ± SD. N = 5-8 individueller Mäuse.

Sowohl in der Expression der verschiedenen TLRs als auch in der Expression von MyD88 konnten keine Unterschiede zwischen WT und AhR-KO festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob die TLR-induzierten Signalwege in AhR-KO BM-DZ funktional sind, wurde die Induktion der Endpunkte IL-6 und TNF-α untersucht. Zudem wurden die Komponenten des IFNγ induzierten Signalwege IRF-1und IP-10 überprüft.



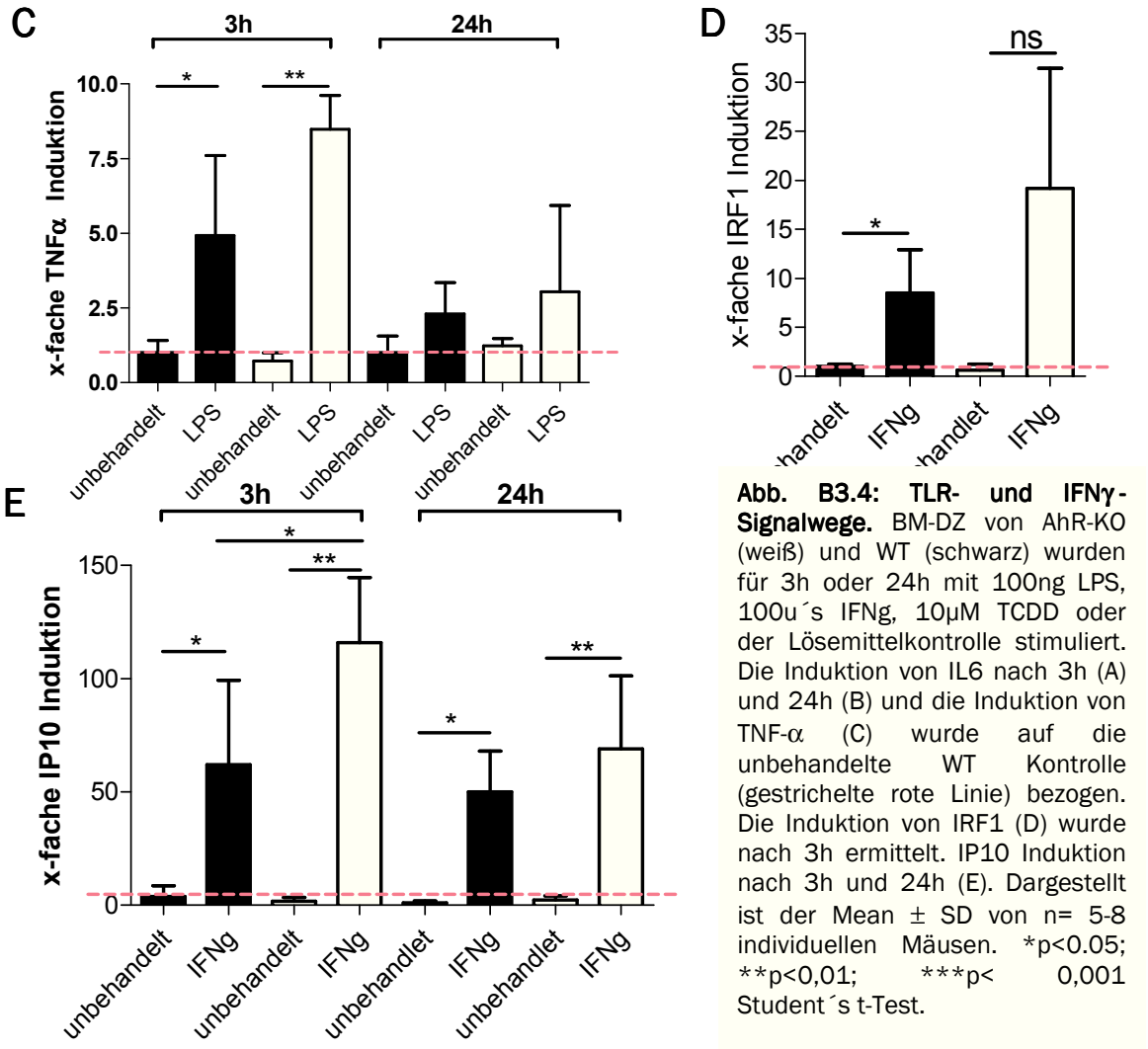


Abb. B3.4: TLR- und IFNγ-Signalwege. BM-DZ von AhR-KO (weiß) und WT (schwarz) wurden für 3h oder 24h mit 100ng LPS, 100u´s IFNg, 10µM TCDD oder der Lösemittelkontrolle stimuliert. Die Induktion von IL6 nach 3h (A) und 24h (B) und die Induktion von TNF-α (C) wurde auf die unbehandelte WT Kontrolle (gestrichelte rote Linie) bezogen. Die Induktion von IRF1 (D) wurde nach 3h ermittelt. IP10 Induktion nach 3h und 24h (E). Dargestellt ist der Mean ± SD von n= 5-8 individuellen Mäusen. *p<0.05; **p<0,01; ***p< 0,001 Student´s t-Test.

Sowohl der LPS induzierte TLR- als auch der IFNγ induzierte Signalweg ist in AhR-KO BM-DZ funktionell. IL-6 ist nur durch LPS, nicht aber durch IFNγ oder TCDD induzierbar. Nach 3h ist die Induktion in AhR-KO BM-DZ signifikant höher als in WT-Zellen (A). TNFα wird nach 3h Stimulation in WT und AhR-KO BM-DZ stärker induziert als nach 24h (C). Tendenziell ist die Induktion in AhR-KO Zellen auch hier höher als im WT. IRF-1 wird durch

IFNγ in beiden Genotypen ähnlich induziert. Die IP10-Induktion ist im AhR-KO nach 3h signifikant höher induziert als im WT.

B.3.2. *Ido2, nicht aber Ido1 verfügt über funktionelle DREs*

Laut Sun et al. verfügt *Ido1* über drei DRE Sequenzen in seiner Promotor Region und *Ido2* über fünf. Um zu testen, ob diese über den AhR aktivierbar sind, wurden zwei DRE Sequenzen von *Ido1* (+896 und +1412) und vier DRE Sequenzen von *Ido2* (+1493, +76, -2600/-2800) einzeln in pGL3-Luziferase-Reporterplasmide kloniert. Die Plasmide wurden in HepG2 Zellen transfiziert, welche mit 10nM TCDD oder DMSO stimuliert wurden, um eine AhR-abhängige Luziferaseaktivität zu induzieren. Als Positivkontrolle wurde ein Plasmid verwendet, das die fünf DRE Sequenzen der Cyp1a1 Promotorregion enthält. Als Negativkontrolle diente das leere pGL3 Plasmid.

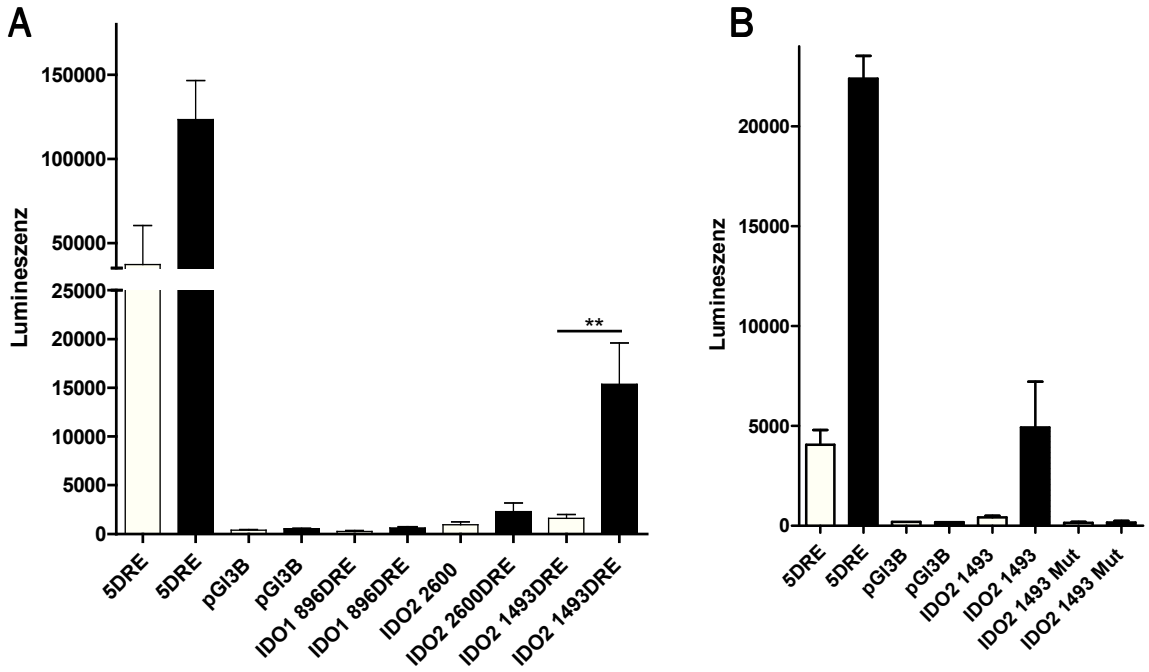


Abb. B3.5: Nur das *Ido2* DRE +1493 wird vom AhR aktiviert. Stimulation der transfizierten HepG2 Zellen mit 10nM TCDD (schwarze Balken) oder DMSO (weiße Balken) führt zu einer messbaren Luziferaseaktivität, die als Lumineszenz photometrisch bestimmt werden kann. (A) Die ermittelten Lumineszenzwerte wurden zur DMSO stimulierten pGL3-Kontrolle normalisiert. (B) Punktmutation in der DRE Sequenz von IDO2 + 1493 (GCGTG zu GATTG) führt zu einem Verlust der Luziferaseaktivität in TCDD-stimulierten Zellen.

Für beide *Ido1* DREs konnte keine TCDD induzierte Luziferaseaktivität nachgewiesen werden, die sich von der DMSO Kontrolle unterschied (DRE +1412 ist hier nicht dargestellt). Dies weist für jedes DRE einzeln betrachtet auf keine direkte Interaktion des AHR hin. Auch das *Ido2* DRE +76 (hier nicht dargestellt) und das Doppel-DRE

+2600/+2800 zeigten keine TCDD induzierte Lumineszenz. Hingegen konnte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine deutliche Zunahme der Luziferaseaktivität für das *Ido2* DRE 1493 nachgewiesen werden. Die AhR-abhängige Regulation des 1493 DREs konnte in einem ersten Versuch durch das Einbringen einer Punktmutation in der DRE-Sequenz bestätigt werden (B3.5 (B)).

B.4. Funktionalität des AhR in epidermale γδ T-Zellen

Um die Funktionalität des AhR zu überprüfen, wurde die Expression der Komponenten des „klassischen“ AhR-Signalwegs (AhRR und ARNT) und die Expression des bekannten AhR-Zielgens *Cyp1a1* nach *in vivo* Exposition mit 10µg/kg in C57BL/6 WT Mäusen untersucht.

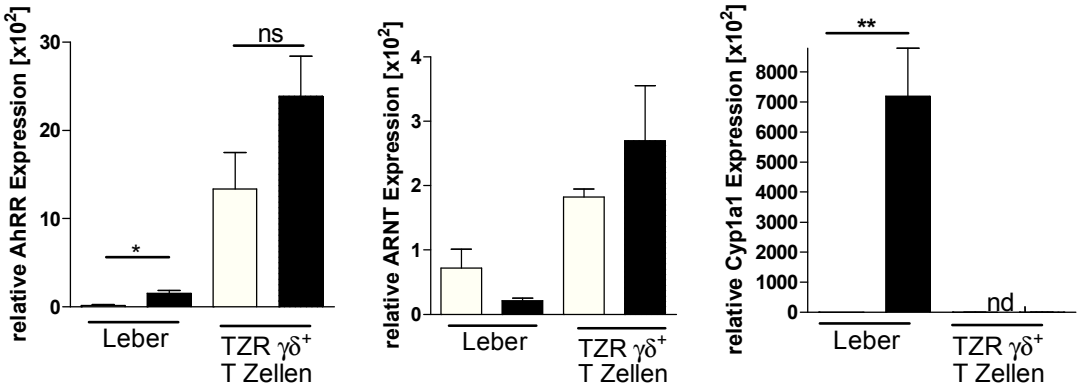


Abb. B4.1: Expression von AhRR, ARNT und Cyp1a1 mRNA in Leber und in isolierten (Reinheit > 96%) TZR γδ+ T-Zellen im Vergleich zum Haushaltsgen RPS6 24 Stunden nach Gabe von 10µg/kg TCDD (schwarze Balken) oder der Lösemittelkontrolle DMSO (weiße Balken) i.p. ± SD. N=3-4 Mäuse. *p<0,05; **p<0,01 (Student´s t-Test). (ns = nicht signifikant; nd = nicht detektierbar).

Die Expression von *Cyp1a1* wird in epidermalen TZR γδ+ T-Zellen durch TCDD im Gegensatz zur Leber nicht induziert. Im Vergleich zur Leber exprimieren γδ T-Zellen große Mengen an *AhRR* mRNA. Der AhRR ist durch TCDD tendenziell, aber nicht signifikant induzierbar. Der AhR-Dimerisierungspartner ARNT wird ebenfalls exprimiert.

Danksagung

Für die Unterstützung bei der erfolgreichen Durchführung meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei sehr vielen Menschen herzlich bedanken.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Charlotte Esser für das spannende Thema, die Unterstützung mit ihren wissenschaftlichen Ratschlägen, die entgegengebrachte Geduld und die Tipps und Tricks, was alles wesentlich zum Gelingen der Arbeit beitrug.

Herrn Prof. Dr. Peter Proksch danke ich für die Übernahme des Ko-Referats.

Ein großer Dank geht aber auch an alle aktuellen und ehemaligen Kollegen (Stefanie Chmill, Rebecca Scholz, Eva Padberg, Bettina Jux, Andreas Goergens, Swantje Steinwachs und Babette Martinsen), die mir mit ihrem Fachwissen, ihrer konstruktiven Kritik, ihren vielen Ideen und einer Tasse Kaffee zwischendurch immer wieder den nötigen Anschwung gegeben haben.

Ich danke auch der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Irmgard Förster für die gute Zusammenarbeit.

Natürlich gilt mein Dank auch besonders meiner Familie und meinen Freunden, die mich in all der Zeit verständnisvoll unterstützt haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Expression und physiologische Funktion des Arylhydrokarbonrezeptors für Zellen der murinen Epidermis“ selbständig verfasst und neben den angegebenen Quellen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keinen erfolglosen Promotionsversuch unternommen.

Essen, den 28. April.2011