



Neue Hautgene und ihre Rolle in kutaner Homöostase und Erkrankungen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Holger Schrumpf

aus Essen

Düsseldorf, Dezember 2016

Aus der Klinik für Dermatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Priv.-Doz. Dr. Peter Arne Gerber
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Summary	1
2	Einleitung	3
2.1	Die menschliche Haut	3
2.1.1	Epidermis	4
2.1.1.1	Stratum basale	5
2.1.1.2	Stratum spinosum	5
2.1.1.3	Stratum granulosum.....	6
2.1.1.4	Stratum corneum	6
2.1.2	Dermis.....	7
2.1.3	Subcutis	8
2.2	Hautkrankheiten	8
2.2.1	Entzündliche Hauterkrankungen.....	8
2.2.1.1	Psoriasis vulgaris	8
2.2.1.2	Atopische Dermatitis	9
2.2.1.3	Prurigo nodularis.....	10
2.2.1.4	Lichen planus.....	11
2.2.1.5	Lupus erythematoses	12
2.2.2	Hauttumoren	12
2.2.2.1	Basalzellkarzinom	12
2.2.2.2	Aktinische Keratose	13
2.2.2.3	Plattenepithelkarzinom.....	14
2.3	Post-Genom-Ära	14
2.3.1	DNA Microarray-Technologie	15
2.3.2	<i>Body Index of human Gene Expression (BIGE)</i>	17
3	Ziel der Arbeit	19
4	Material & Methoden	20

4.1	Puffer und Lösungen	20
4.2	Akquirierung humaner Gewebeproben und Zellmaterial	21
4.3	Datengenerierung und Analyse der Genexpression	23
4.4	Zellkultur	23
4.5	RNA-Isolation humaner Hautbiopsien und Zellen <i>in vitro</i>	24
4.5.1	Humane Hautbiopsien	24
4.5.2	Humane Zellen	25
4.6	Messung der optischen Dichte	26
4.7	<i>Real-time</i> quantitative PCR	27
4.7.1	Komplementäre DNA (cDNA) Synthese	27
4.7.2	<i>Primer</i> Design	29
4.7.3	Quantitative <i>real time</i> (qPCR) Analyse	29
4.8	Immunfluoreszenzfärbung	31
4.8.1	Paraffineinbettung	31
4.8.2	Schneiden der Gewebeproben	31
4.8.3	Färben der Gewebeschnitte	31
4.8.4	Detektion der Immunreaktionen	32
4.9	Western Blot-Analysen	33
4.9.1	Proteinlysate	33
4.9.2	Proteinbestimmung	33
4.9.3	SDS-PAGE Gel-Elektrophorese	33
4.9.4	<i>Semi-dry</i> Transblotting	34
4.9.5	Immundetektion	34
4.10	Statistische Analyse	35
5	Ergebnisse	36
5.1	Identifikation hautspezifischer Gene	36

5.2	Bioinformatische Analysen.....	36
5.3	Genexpressionsprofile hautspezifischer Gene.....	38
5.4	Charakterisierung ausgewählter hautspezifischer Gene	47
6	Diskussion	56
7	Literaturverzeichnis	71
8	Abkürzungen.....	95
	Danksagung.....	103
	Eidesstattliche Versicherung.....	104

1 Zusammenfassung/Summary

In dieser Arbeit wurden mittels bioinformatischer Analyse einer 105 humane Gewebe und Zelltypen umfassenden Genexpressionsdatenbank 687 Gene identifiziert, die spezifisch in humaner Haut exprimiert werden. Für eine nähere Untersuchung wurden aus diesen acht bis dato unbekannte haut-assoziierte Gene ausgewählt, die für sekretierte Proteine oder Rezeptoren kodieren und sich somit als potenzielle therapeutische Angriffspunkte qualifizieren. Fünf der Gene werden spezifisch von epidermalen Keratinozyten exprimiert, wobei zwei für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kodieren (GPR87 und GPR115), zwei sekretierte Proteine repräsentieren (WFDC5 und SERPINB7) und eines für ein neu entdecktes Transmembranprotein kodiert (TMEM45A). Insbesondere GPR115, WFDC5 und TMEM45A zeigten dabei eine Keratinozyten-spezifische Expression, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Analysen zur funktionellen Relevanz dieser Kandidaten zeigten bei Zytokin-aktivierten und ausdifferenzierten humanen primären Keratinozyten distinkte Regulationsmuster: WFDC5 zeigte eine deutliche und signifikante Induktion durch $\text{TNF}\alpha/\text{IL-1}\beta$; die Expression von TMEM45A wurde durch $\text{IFN-}\gamma$ signifikant supprimiert, während die Expression von GPR115 durch $\text{TNF-}\alpha/\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-4, IL-13 und IL-31 vermindert wurde. Um auch eine klinische Relevanz der Gene aufzuzeigen, wurden diese in unterschiedlichen Hauterkrankungen untersucht: WFDC5 zeigt eine signifikante Überexpression in Psoriasis vulgaris, atopischer Dermatitis sowie aktinischen Keratosen. TMEM45A zeigt eine signifikante Überexpression in Psoriasis vulgaris und aktinischen Keratosen, während GPR115 in Psoriasis vulgaris und atopischer Dermatitis signifikant überexprimiert wird. Zusammenfassend liefern die Ergebnisse eine der bis dato umfassendsten vergleichenden molekularen Charakterisierungen der menschlichen Haut. Weiterführende Analysen ausgewählter haut-assoziiierter Gene zeigen deren mögliche Bedeutung als diagnostische Marker oder pharmakologische Ziele zur Behandlung von Hautkrankheiten auf.

In this thesis, bioinformatics analyses of a human gene expression database which represent 105 different tissues and cell types, 687 skin-associated genes that are selectively and highly expressed in human skin were identified. More than 50 of these skin-associated genes represent completely uncharacterized genes which have not been previously associated with skin before. Interestingly, this subset includes novel secreted and plasma membrane proteins. In this thesis, the high levels of skin-associated expression for eight of these novel therapeutic targets could be validated by real time PCR analysis, western blot and immunohistochemical analyses of normal skin and skin-derived cell lines. Five of these are expressed specifically by epidermal keratinocytes; two encode G-protein-coupled receptors (GPR87 and GPR115), two represent secreted proteins (WFDC5 and SERPINB7) and one encodes a new transmembrane protein (TMEM45A). In particular GPR115, WFDC5 and TMEM45A show keratinocyte-specific expression at the mRNA and protein level as could be demonstrated by qPCR analyses and immunofluorescence, respectively. Further analyses using cytokine-activated and terminally differentiated human primary keratinocytes reveal distinct patterns of regulation. WFDC5 shows a marked and significant induction by TNF- α /IL-1 β . The expression of TMEM45A is significantly suppressed by IFN- γ while GPR115 expression is impaired by TNF- α /IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-13 and IL-31. Interestingly, a panel of common inflammatory, autoimmune or malignant skin diseases reveals a significant overexpression of WFDC5 mRNA in psoriasis, followed by actinic keratosis and atopic dermatitis. In addition, TMEM45A mRNA is markedly overexpressed in psoriasis and in actinic keratosis which is similar to the expression profile observed for GPR115. The findings in this thesis suggest, that these genes may point to important roles in cutaneous homeostasis and disease. They may represent interesting targets for the development of future diagnostics and therapeutics.

2 Einleitung

2.1 Die menschliche Haut

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers, wiegt etwa 4 kg und bedeckt eine Gesamtfläche von circa 2 m². Mit ihrer wichtigsten Funktion als Barriere schützt sie den Körper vor vielfältigen Umwelteinflüssen, wie beispielsweise pathogenen Keimen, Sonnenlicht und Austrocknung. Die Haut ist eine sich ständig neuorganisierende, durchblutete und innervierte Struktur, die aus drei Schichten besteht: Epidermis, Dermis und Subkutis (Abb. 2). Die Epidermis bildet die Barriere nach außen, darunter befindet sich die vaskularisierte Dermis, die für die Nährstoffzufuhr der sich teilenden Zellen in der Epidermis zuständig ist. Die Dermis enthält zusätzlich Nerven und Adnexe, wie Schweißdrüsen, Haarfollikel und Talgdrüsen. Die dritte und innerste Schicht der Haut ist das subkutane Fettgewebe (Marks and Miller, 2013; Sterry, 2006).

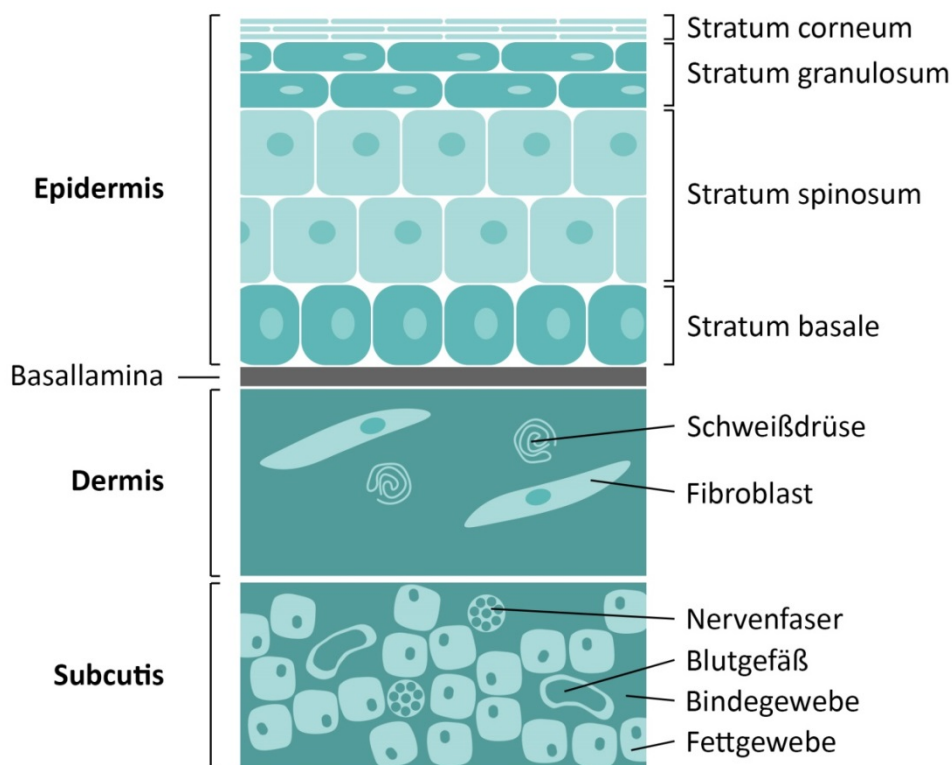


Abb. 2 Schematischer Aufbau der menschlichen Haut (die einzelnen Bestandteile der Haut sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben).

2.1.1 Epidermis

Die Epidermis ist die äußerste Schicht der Haut, wobei ihre Dicke in verschiedenen Hautarealen deutlich variieren kann: Mit 0,05 mm ist sie an den Augenlidern am dünnsten, während sie an den Handinnenflächen und Fußsohlen mit etwa 1,5 mm am dicksten ist (Marks and Miller, 2013; Sterry, 2006). Die Epidermis wird in vier Schichten unterteilt: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum als äußerste Schicht (Abb. 2). Im Stratum basale proliferieren die Zellen, die anschließende Differenzierung findet dann in den Schichten darüber statt (Marks and Miller, 2013). Trotz ihrer geringen Dicke ist die Epidermis eine sehr widerstandsfähige Schicht und stellt die direkte Grenze zur Umwelt dar. Die Epidermis besteht primär aus Keratinozyten, enthält aber auch kleinere Populationen anderer residenter Zelltypen: Melanozyten (Pigment-produzierende Zellen) und Merkelzellen (Mechanorezeptoren für Druck- und Tastempfindung). Darüber hinaus befinden sich in der Epidermis auch migratorische Zellen (Langerhanszellen, intraepidermale T-Zellen), die zu den zellulären Komponenten des Immunsystems gezählt werden (Pasparakis et al., 2014).

Keratinozyten sind mit einem Anteil von über 90% der vorherrschende Zelltyp in der Epidermis (Lulevich et al., 2010; Sun et al., 1979). Hauptfunktion der Keratinozyten ist die Errichtung einer Barriere gegen Umweltfaktoren wie Pathogene, UV-Strahlung, Hitze oder Wasserverlust (Braff et al., 2005; Denecker et al., 2007; Hwang et al., 2011; Maytin et al., 1990).

Beim Befall der oberen Schichten der Epidermis durch Pathogene exprimieren die Keratinozyten proinflammatorische Mediatoren, insbesondere Zytokine und Chemokine wie CXCL8 (IL-8), um Entzündungszellen an den Ort des pathogenen Befalls zu rekrutieren (Braff et al., 2005; Gillitzer and Goebeler, 2001). Strukturproteine (Filaggrin, Keratin), Enzyme (Proteasen), Lipide und antimikrobielle Peptide (Defensine) sind ebenfalls daran beteiligt, die wichtige Barrierefunktion der Haut aufrechtzuerhalten (Heimall and Spergel, 2012; Madison, 2003; Schroder and Harder, 2006; Zeeuwen, 2004).

Die sogenannte Keratinisierung ist Teil der physikalischen Barriereformation durch Verhornung, wobei die Keratinozyten mehr und mehr Keratin produzieren und letztlich dem programmierten Zelltod unterliegen. Vollständig verhornte

Keratinocyten bilden die äußerste Schicht der Epidermis, schuppen sich permanent ab und werden sogleich durch neue Zellen ersetzt (Lippens et al., 2009). In jedem Stadium der Differenzierung exprimieren Keratinocyten spezifische Keratine, wie Keratin 1, Keratin 2, Keratin 5, Keratin 10 und Keratin 14, aber auch andere Marker wie Involucrin, Loricrin, Transglutaminase, Filaggrin und Caspase 14 (Chamcheu et al., 2011; Denecker et al., 2007; Heimall and Spengel, 2012; Hitomi, 2005; Szeverenyi et al., 2008). Innerhalb der Epidermis sind Keratinocyten mit anderen Zelltypen wie Melanocyten und Langerhans-Zellen assoziiert (Sterry, 2006). Keratinocyten modulieren auch das Immunsystem: Abgesehen von den erwähnten antimikrobiellen Peptiden und Chemokinen (Gillitzer and Goebeler, 2001; Schroder and Harder, 2006) sind sie auch wichtige Produzenten von antiinflammatorischen Mediatoren wie IL-10 oder TGF- β (Byun et al., 2009).

2.1.1.1 Stratum basale

Das Stratum basale (auch als Basalzellschicht bezeichnet) besteht hauptsächlich aus basalen Keratinocyten, die als die "Stammzellen" der Epidermis betrachtet werden können (Tsuruta et al., 2011). Sie sind undifferenziert und besitzen eine hohe Proliferationsrate. Tochterzellen des Stratum basale migrieren nach außen und beginnen den Prozess der Differenzierung. In normaler Haut erfolgt die Zellteilung nie oberhalb der Basalzellschicht. Bis die Zellen vom Stratum basale zum oberen Rand des Stratum granulosum gelangen, vergehen ungefähr zwei Wochen, und weitere zwei Wochen vergehen, bis die Zellen die Oberfläche des Stratum corneum erreichen, wo sie sich schließlich abschuppen. Verletzungen oder Entzündungen steigern die Proliferations- und Maturationsrate deutlich (Brandner et al., 2010; Fuchs, 1990; Polakowska and Haake, 1994).

2.1.1.2 Stratum spinosum

Das Stratum spinosum liegt oberhalb des Stratum basale und besteht aus Keratinocyten, die aus den Basalzellen entstehen. Diese Keratinocyten produzieren Keratin, ein Faserprotein, das die Hauptkomponente des verhornten Stratum corneums ausmacht. Der Name des Stratum spinosum (Stachelzell-

schicht) stammt von den *“spines”* (engl. für “Stacheln”), die zwischen den Keratinozyten im Lichtmikroskop sichtbar werden: Die Stachelzellschicht ist durch Desmosomen (Macula adhaerens) verbunden, die wiederum mit Intermediärfilamenten (Keratin) verankert sind und der gesamten Epidermis mechanische Stabilität verleihen (Marks and Miller, 2013).

2.1.1.3 Stratum granulosum

Der Prozess der Differenzierung nimmt im Stratum granulosum (auch Körnerzellschicht genannt) seinen Lauf, indem die Zellen zusätzliches Keratin bilden und zunehmend flacher werden. Zusätzlich enthalten sie distinkte dunkle Granula, die im Lichtmikroskop deutlich erkennbar sind und aus Keratohyalin bestehen. Keratohyalin enthält zwei Proteine, eines davon ist das Profilaggrin, eine Vorstufe des Filaggrins. Filaggrin spielt eine wichtige Rolle bei der Aggregation der Keratinfilamente im Stratum corneum (siehe Kapitel 2.1.1.4). Das zweite Protein, Involucrin, spielt bei der Bildung der hydrophoben Lipidhülle eine wichtige Rolle, die für die Hautbarriereigenschaften der Zellen im Stratum corneum zuständig ist (Marks and Miller, 2013).

2.1.1.4 Stratum corneum

Die äußerste Schicht der Epidermis wird als Stratum corneum bezeichnet. Es besteht aus terminal differenzierten, verhornten Keratinozyten (auch Korneozyten genannt), die keinen Zellkern und keine Organellen mehr besitzen. Ein gesunder Mensch verliert durch Abschuppung etwa 50 bis 60 Milliarden Korneozyten pro Tag, das einem jährlichen Gesamtgewicht von ungefähr 4 kg entspricht. Diese Menge kann beispielsweise bei der hyperproliferativen Hautkrankheit Psoriasis vulgaris (siehe Kapitel 2.2.1.1) dramatisch erhöht sein (Sterry, 2006). Das Stratum corneum ist eine semipermeable, hydrophobe Schicht, die nicht nur Mikroorganismen abwehrt und Wasser oder Chemikalien abweist, sondern auch die sich teilenden Keratinozyten in den tieferen Schichten der Epidermis (Basalzellen) vor Schäden durch UV-Licht schützt. Das Stratum corneum ist mit einem Säureschutzmantel ausgestattet, der durch Schweiß, Talg und den Abbauprodukten der Mikroflora auf der Haut gebildet wird, um die Hautoberfläche feucht und geschmeidig zu halten und das

Wachstum pathogener Mikroorganismen zu verhindern. Zusätzlichen Schutz gegen Infektionen gewährleisten sogenannte antimikrobielle Peptide (wie etwa Dermcidin, Cathelicidin LL37 oder die säugerspezifischen β -Defensine), die durch epidermale Keratinozyten generiert und im Stratum corneum gespeichert werden (Kosciuczuk et al., 2012; Rivas-Santiago et al., 2008; Schitteck et al., 2001; Tomasinsig and Zanetti, 2005; Yang et al., 2002). Selbst in Abwesenheit von T-Zellen und Langerhans-Zellen, die bei der adaptiven Immunabwehr eine Schlüsselrolle einnehmen, bietet ein intaktes Stratum corneum mit seinem Säureschutzmantel eine wirksame Barriere gegenüber potenziellen Pathogenen (Sterry, 2006).

2.1.2 Dermis

Die Dermis des Menschen ist eine widerstandsfähige sowie elastische Stützstruktur, die Blutgefäße, Nerven und Adnexstrukturen, wie Haarfollikel, Schweißdrüsen, Talgdrüsen und apokrine Drüsen, besitzt. Die Dermis steuert viele Zellfunktionen und ist durch ihre Interaktions- und Regulationsfähigkeit beispielsweise an der Geweberegeneration beteiligt. Mit einer Stärke von 1 bis 4 mm ist sie dicker als die Epidermis (Marks and Miller, 2013). Die dermale Matrix besteht primär aus Kollagenfasern als Hauptkomponente, elastischen Fasern und einer Grundsubstanz, der extrafibrillären Matrix, die durch dermale Fibroblasten synthetisiert wird. Bei den Fibroblasten handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation, die in zahlreichen Geweben vorkommt und mesenchymalen Ursprungs ist. Fibroblasten besitzen unabhängig von ihrer Gewebezugehörigkeit eine ähnliche Morphologie, jedoch haben DNA-Microarray-Studien gezeigt, dass Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft ihr eigenes Genexpressionsprofil und charakteristische Phänotypen aufweisen, sowie Extrazellulärmatrix (EZM)-Proteine und Zytokine ortsspezifisch synthetisieren (Chang et al., 2002; Wong et al., 2007). Dermale Fibroblasten sind beispielsweise an der Synthese von EZM-Komponenten sowie an autokrinen und parakrinen Wechselwirkungen beteiligt (Clark, 1996).

Kollagen trägt zu 70% zum Trockengewicht der menschlichen Haut bei. Kollagen und elastische Fasern sind fibröse Proteine, die die mechanisch stabile, aber dennoch nachgiebige Interzellulärsubstanz bilden. Im obersten Teil der

Dermis (papilläre Dermis) sind die Kollagenfasern locker angeordnet, im übrigen Teil der Dermis (retikuläre Dermis) sind die Fasern dicht gepackt. Die elastischen Fasern sind primär in der retikulären Dermis lokalisiert, wobei sie in diesem Bereich im Vergleich zu den Kollagenfasern weniger dicht gepackt sind. Die extrafibrilläre Matrix füllt dabei den Raum zwischen den Fasern aus. Es handelt sich hier um ein nicht-fibröses Material, das aus verschiedenen Mucopolysaccharidmolekülen aufgebaut ist. Diese Moleküle werden allgemein als Proteoglykane oder Glucosaminoglykane bezeichnet. Die extrafibrilläre Matrix verleiht der Dermis eine Elastizität, die die Bewegung von Flüssigkeiten, Molekülen und inflammatorischen Zellen erleichtert (Marks and Miller, 2013).

2.1.3 Subcutis

Die Subcutis wird auch als Unterhaut bezeichnet und besteht hauptsächlich aus lockerem Binde- und Fettgewebe (Richmond and Harris, 2014). Das Bindegewebe wird von zahlreichen Blut- und Lymphgefäßen sowie Nervenfasern durchzogen, um die Sauerstoffversorgung und Sensibilität der Haut zu gewährleisten. Kollagenfasern sorgen für die Verbindung zwischen der Dermis und den unterhalb der Subcutis befindlichen Faszien. Das Fettgewebe in der Subcutis dient sowohl als Isolationsschicht, um den Organismus vor Wärmeverlust zu schützen, als auch zur Speicherung von Energie. Adipozyten sind darüber hinaus in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu produzieren (Richmond and Harris, 2014).

2.2 Hautkrankheiten

2.2.1 Entzündliche Hauterkrankungen

2.2.1.1 Psoriasis vulgaris

Die Psoriasis vulgaris ist eine chronische Erkrankung, die üblicherweise durch Perioden von Exazerbation und Remission gekennzeichnet ist (Johnson-Huang

et al., 2012). Klinisch ist die Psoriasis durch rote Plaques (Dilatation der Blutgefäße) mit silbrigen oder weißlichen Schuppen (extreme Keratinozytenproliferation) charakterisiert, die klar von angrenzender, normal erscheinender, nicht-läsionaler Haut abgegrenzt sind. Folgende Komorbiditäten können unter anderem bei Patienten mit Psoriasis beobachtet werden: Arthritis, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus (hauptsächlich Typ 2), metabolisches Syndrom, Adipositas, beeinträchtigte Lebensqualität und Depression (Azfar and Gelfand, 2008; Christophers, 2001; Davidovici et al., 2010; Gelfand et al., 2006; Mehta et al., 2010; Nijsten and Stern, 2012). Die Pathophysiologie der Psoriasis ist komplex und dynamisch; beteiligt sind sowohl Hautzellen als auch Immunzellen. Histologisch ist die Erkrankung durch Akanthose (Verdickung der Epidermis) und Parakeratose (Retention von Nuklei im Stratum corneum) charakterisiert. Demzufolge wurde zunächst angenommen, dass es sich ausschließlich um eine hyperproliferative Erkrankung der Keratinozyten handelt (Johnson-Huang et al., 2012). Mittlerweile gibt es viele Hinweise, dass das Immunsystem und sein interaktives Netzwerk aus Leukozyten und Zytokinen in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielt. Psoriatische Läsionen sind durch ein Entzündungszellinfiltrat, welches insbesondere aus CD3⁺ T Zellen und CD11c⁺ dendritischen Zellen (DC) besteht, charakterisiert (Chamian et al., 2005; Lowes et al., 2005). Pro-inflammatorische Zytokine, die durch diese Zellen produziert werden – inklusive Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-17 (IL-17), IL-22, IL-23, IL-12 und IL-1 β – wurden mit der Pathogenese der Psoriasis durch Aktivierung von Keratinozyten und anderen ansässigen kutanen Zellen mittels dieser Zytokine in Verbindung gebracht (Johnson-Huang et al., 2012).

2.2.1.2 Atopische Dermatitis

Das Hauptmerkmal der atopischen Dermatitis (AD) als eine chronische inflammatorische Hauterkrankung ist schwerer Pruritus, der assoziiert ist mit kutaner Hyperreaktivität auf verschiedene umweltbedingte Stimuli wie etwa der Kontakt mit Nahrungsmitteln und inhalativen Allergenen, Reizstoffen, Umweltverschmutzung, Luftfeuchtigkeit, mikrobielle Infektionen und Stress (Leung, 2013). Nach neueren Erkenntnissen spielen bei der AD möglicherweise strukturelle Abnormalitäten der Epidermis eine Rolle, die in einer defizitären

epithelialen Barriere sowie chronischer Immunaktivierung resultieren und für die Pathophysiologie dieser weit verbreiteten Hauterkrankung bedeutsam sind (Kuo et al., 2013a; Kuo et al., 2013b; McAleer and Irvine, 2013). Patienten mit AD besitzen eine Prädisposition für die Kolonisierung oder Infektion durch mikrobielle Organismen, vor allem *Staphylococcus aureus* und Herpes-simplex-Virus (HSV). Sobald sich die Patienten kratzen, kommt es zu einer akuten ekzematoiden Eruption (mit erythematösen Papeln), wobei aus chronischen Ekzemen eine Lichenifikation mit epidermaler Hyperplasie hervorgeht (Leung, 2013). Eine Früherkennung verbessert den Verlauf der AD und reduziert die systemische Allergensensibilisierung, die möglicherweise zu assoziierten allergischen Reaktionen in anderen Organsystemen führen würde. Eine effektive Behandlung der AD ist vielschichtig, einschließlich Wiederherstellung der Hautbarriere, Kontrolle der Hautentzündung, Identifikation und Management der allergischen Trigger sowie die Bekämpfung von mikrobiellen Infektionen (Schneider et al., 2013).

2.2.1.3 Prurigo nodularis

Die Prurigo nodularis (PN) ist eine chronische Erkrankung, die durch papulo-noduläre pruriginöse Eruptionen gekennzeichnet ist (Lee and Shumack, 2005). Der Mechanismus, der dieser Erkrankung zugrunde liegt, ist unbekannt, wobei Nervenwachstumsfaktor (NGF) mit der Pathogenese der PN in Verbindung gebracht wurde (Johansson et al., 2002). *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP)- und Substanz P- immunoreaktive Nerven sind, verglichen mit normaler Haut, bei der PN deutlich verstärkt (Abadia Molina et al., 1992; Liang et al., 2000; Vaalasti et al., 1989). Diese Neuropeptide vermitteln möglicherweise kutane neurogene Entzündung und Pruritus in der PN (Tanaka et al., 1995). Möglicherweise wird die PN von kutaner Hypersensitivität auf unterschiedliche Umwelt-Allergene begleitet (Lee and Shumack, 2005). Klassische Läsionen der PN sind feste hyperkeratotische Knötchen, die in ihrer Anzahl von wenigen bis zu hunderten variieren und einen Durchmesser von einigen mm bis zu 2 cm aufweisen können. Häufig sind die PN-Läsionen linear angeordnet; bedeutende Hauptmerkmale sind Krustenbildung sowie Hautabschürfungen mit post-inflammatorischen hyperpigmentierten und hypopigmentierten Maculae. Obwohl die PN möglicherweise mit einer systemischen Störung assoziiert ist, ist es das

permanente Scheuern und/oder Kratzen der Haut, das die Erkrankung aufrechterhält (Lee and Shumack, 2005).

2.2.1.4 Lichen planus

Der Lichen planus ist eine mukokutane entzündliche Erkrankung unbekanntes Ursprungs; dabei sind die Haut sowie die orale Mukosa die am häufigsten betroffenen Areale (Le Cleach and Chosidow, 2012; Pittelkow and Daoud, 2008). Andere muköse Membranen, wie Genitalien, Ösophagus und Bindehäute sowie Hautanhängsel (z.B. Haupthaar und Nägel) können ebenfalls betroffen sein (Assouly and Reygagne, 2009; Goettmann et al., 2012; Piraccini et al., 2010). Klinisch äußert sich der kutane Lichen planus durch violette Papeln mit abgeflachtem Konus, die starken Juckreiz hervorrufen können (Le Cleach and Chosidow, 2012; Pittelkow and Daoud, 2008). Oraler Lichen planus ist durch symmetrische weißliche netzförmige Läsionen der Schleimhaut sowie durch Papeln, Plaques, erythematöse Läsionen und Erosionen charakterisiert (Al-Hashimi et al., 2007). Beim Lichen planus handelt es sich um eine chronische Erkrankung, wobei ihre erosive Form äußerst schmerzhaft sein kann (Bermejo-Fenoll et al., 2010; Carbone et al., 2009). Einzelne Studien formulieren durchaus heterogene diagnostische Kriterien für den Lichen planus, vor allem in Bezug auf begleitend bestehende Risikofaktoren wie Alkohol- oder Zigarettenkonsum (Bermejo-Fenoll et al., 2010; Lodi et al., 2005; Warnakulasuriya, 2011). Obwohl die Pathogenese des Lichen planus unklar bleibt, scheint es eine Autoimmunerkrankung zu sein. Die basale Keratinozytendegeneration, die beim Lichen planus beobachtet werden kann, ist beispielsweise zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten zuzuschreiben. Diese bilden die Hauptkomponente der Infiltrate und sind innerhalb des Epithels in Nachbarschaft zu degenerierten Keratinozyten lokalisiert (Sugerman et al., 2002). Mehrere Autoimmunerkrankungen, darunter vor allem Alopecia areata und Colitis ulcerosa, scheinen bei Patienten mit Lichen planus häufiger aufzutreten als in der Allgemeinbevölkerung (Dermatologia, 1991).

2.2.1.5 Lupus erythematodes

Als klassische Autoimmunerkrankung stellt der systemische Lupus erythematodes (SLE) einen Zustand dar, in dem das Immunsystem gesunde Zellen und Gewebe im gesamten Körper attackiert (Kiriakidou et al., 2013). SLE ist eine herausfordernde Erkrankung, zum einen wegen der noch unbekanntenen Ursache, aber auch aufgrund der klinischen Vielfältigkeit und der komplexen zugrunde liegenden Pathophysiologie. Zur Ausprägung des SLE tragen beispielsweise genetische, umweltbedingte, hormonelle sowie infektiöse Faktoren bei. Die klinischen Manifestationen sind divers, mit signifikanten Unterschieden zwischen einzelnen Patienten (Paz and Tsokos, 2013). Die Aktivierung des Immunsystems ist charakterisiert durch überschießende B- und T-Zell-Antworten ebenso wie durch den Verlust der Immuntoleranz gegenüber Autoantigenen (Kiriakidou et al., 2013). Produktion und gestörter Abbau von Antikörpern, Ablagerungen von Immunkomplexen sowie Zytokin-Aktivierung tragen zu den klinischen Manifestationen bei. Hierunter zählen Fatigue, Schmerz und Schwellungen (Entzündungen), die neben der Haut oft auch Gelenke, Nieren und andere Organe betreffen. Die Symptome können unterschiedlich stark sein und variieren zwischen Akut- und Remissionsphase (Kiriakidou et al., 2013). Aufgrund der vielfältigen Symptome und schwierigen Diagnostizierbarkeit ist unklar, wie viele Patienten tatsächlich von der Erkrankung betroffen sind. Frauen sind etwa neunmal häufiger betroffen als Männer; eine Beteiligung von Geschlechtshormonen sowie spezifischen Genen und Hormonen ist daher nicht auszuschließen. Obwohl der SLE nicht heilbar ist, gibt es heute effektive Therapieoptionen. Dennoch ist die Sterblichkeitsrate gegenüber der Allgemeinbevölkerung weiterhin erhöht (Kiriakidou et al., 2013).

2.2.2 Hauttumoren

2.2.2.1 Basalzellkarzinom

Das Basalzellkarzinom (BCC) ist ein langsam wachsendes, lokalinvasives Karzinom, das sich aus Basalzellen, der Epidermis, der Talgdrüsen und der Haarfollikelzellen entwickeln kann (Owens and Watt, 2003; Pasca di Magliano and Hebrok, 2003; Perez-Losada and Balmain, 2003; Youssef et al., 2010).

BCCs machen ungefähr 80% aller nicht-malignen Hautkrebsarten [engl. *nonmelanoma skin cancers* (NMSCs)] aus und kommen häufiger vor als alle anderen Tumorentitäten des Menschen zusammen (Raasch et al., 2006; Rogers et al., 2010; Sekulic et al., 2013). Über Dekaden epidemiologischer Forschung wurde eine Vielzahl von Risikofaktoren für NMSCs beschrieben, darunter höheres Alter, blonder Haarphänotyp, Sonnenexposition, vorherige präkanzerogene Läsionen (aktinische Keratosen), vorheriger Hautkrebs, chronische Immunsuppression oder Infektion mit dem humanen Papillomavirus (Kadakia et al., 2012; Leiter and Garbe, 2008; Otley et al., 2006). Gut anerkannte Risikofaktoren inklusive chronischer und starker UV-Lichtexposition sowie phänotypische Charakteristiken, wie etwa ein heller Hauttyp, spielen eine essenzielle Rolle in der Entwicklung des BCC und anderer NMSCs (Carcinogenesis, 2002; Sekulic et al., 2013). Chronisch sonnen-exponierte anatomische Areale, inklusive der Kopf- und Nackenregion, sind übliche Stellen für die Entwicklung von BCCs. Auch konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer NMSC-Vorgeschichte einem deutlich erhöhten Risiko für die Entwicklung neuer primärer NMSCs ausgesetzt sind (Kadakia et al., 2012; Marghoob et al., 1993).

2.2.2.2 Aktinische Keratose

Aktinische Keratosen (AK) sind die häufigsten, von Keratinozyten stammenden, präkanzerogenen Läsionen beim Menschen und treten überwiegend bei hellhäutigen Individuen in sonnenexponierten Arealen, speziell im Gesicht, an den Ohren, den Handrücken sowie der männlichen Kopfhaut auf (Ratushny et al., 2012; Rogers et al., 2010; Salasche, 2000). Auf Basis histologischer Befunde werden fünf klassische Typen von AKs beschrieben (Elder, 2008). Neben der hypertrophen, atrophischen, bowenoiden, akantholytischen und pigmentierten Variante wurden auch Formen proliferativer AKs beschrieben (Cassarino et al., 2006; Nashan et al., 2013).

Unklar bleibt der pathophysiologische Hintergrund der Entwicklung von schwach und mäßig über stark ausgeprägte atypische Keratinozyten-Läsionen bis hin zur Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms (siehe Kapitel 2.2.2.3). Diese atypischen Keratinozyten zeigen ähnliche, wenn nicht sogar identische p53-Mutationen. Weitere anormale Expressionen wurden sowohl für KRT16

und KRT17 als auch für KLK6, KLK13 sowie für mehrere Serpine identifiziert, die für die Aufrechterhaltung der Extrazellulärmatrix notwendig sind. Darüber hinaus spielt auch das veränderte Signalprofil des Aktivatorprotein 1 (AP-1) eine Rolle, das an der Regulation der epidermalen Differenzierung von AKs und Plattenepithelkarzinomen beteiligt ist (Fu and Cockerell, 2003; Goldberg et al., 1994; Nashan et al., 2013; Torres et al., 2007).

2.2.2.3 Plattenepithelkarzinom

Die übergroße Mehrheit der Plattenepithelkarzinome [engl. *squamous cell carcinoma*; SCC] betrifft die Haut, und wie alle Hautkrebsarten sind auch diese das Ergebnis übermäßiger UV-Exposition (Brash et al., 1991; Marks and Motley, 1995). Kutane Plattenepithelkarzinome (cSCC) manifestieren sich typischerweise als Spektrum progredient fortschreitender Neoplasien, von einer präkanzerogenen aktinischen Keratose (AK) (siehe Kapitel 2.2.2.2) bis hin zu Plattenepithelkarzinomen *in situ* (SCCIS), invasiven cSCC, und letztlich metastasenbildenden SCC (Ratushny et al., 2012). Dabei ist das klassische Modell der Karzinogenese nützlich, um die Entwicklung von der AK zum cSCC besser zu verstehen (Fearon and Vogelstein, 1990): Mutationen eines Gens, häufig eines Tumorsuppressorgens, führen hierbei zur Ausprägung einer Vorläufer-Läsion mit erhöhter genetischer Instabilität oder dem Verlust der Zellzykluskontrolle. Weitere Mutationen in anderen Onkogenen ermöglichen dann die Entstehung invasiver Karzinome. Der Mechanismus, der zur genetischen Instabilität in den Keratinozyten führt, resultiert dabei wahrscheinlich aus der UVB-induzierten Inaktivierung von p53 (Brash et al., 1991). Gewöhnlich ist es in AKs mutiert, was darauf hindeutet, dass dysplastische Läsionen die initialen genetischen Mutationen erworben haben, bevor es zu einem cSCC kommt (Ortonne, 2002; Ziegler et al., 1994).

2.3 Post-Genom-Ära

Seit dem Jahr 2003 gilt das menschliche Genom offiziell als vollständig entschlüsselt. Die Bedeutung der etwa 30.000 identifizierten Gene hingegen ist bis heute allerdings nicht vollständig bekannt. Eine der zentralen Herausforderun-

gen in der Post-Genom-Ära ist es somit, Funktion und Regulation von Gene zu entschlüsseln, deren medizinische Relevanz aufzuklären und dadurch neue Therapiemöglichkeiten zu eröffnen.

Um diese komplexe Aufgabe bewältigen zu können, bedarf es angepasster und automatisierter Analyseverfahren, wie der *DNA Microarray*-Technologie, die im Folgenden näher erläutert werden soll.

2.3.1 DNA Microarray-Technologie

DNA Microarrays oder Gen-Chips dienen dazu, Genantworten unter einer Vielzahl unterschiedlicher genomweiter Bedingungen zu untersuchen, um letztendlich feststellen zu können, welche Gene im Genom unter bestimmten biologischen Bedingungen eine signifikante Rolle spielen (Hacia et al., 1998; Lockhart et al., 1996).

Bei einem Gen-Chip handelt es sich um ein Feld kleiner Elemente oder Spots auf einem planaren Substrat. Die Spots sind in Reihen und Spalten angeordnet, die die spezifische Bindung der zu untersuchenden Moleküle (sogenannter Analyte) an vordefinierten Orten auf dem Chip erlauben (Abb. 1A).

Während einer Messung kann ein bekannter DNA-Einzelstrang (die *Probe*) an einen zu untersuchenden komplementären DNA-Strang (auch *Target* genannt) binden und eine hochstabile Duplexstruktur bilden (Hacia et al., 1998; Schena, 2003).

In typischen Microarray-Verfahren wird die RNA zunächst mittels Polymerisationsreaktion revers in cDNA transkribiert und anschließend mit fluorophoren Molekülen markiert (Schena, 2003). Die Targets werden gereinigt, zusammengemischt und simultan auf demselben Chip hybridisiert. Im Anschluss an die Hybridisierungsreaktion wird der Microarray zur Eliminierung unspezifisch gebundener Target-Nukleinsäuren gewaschen, getrocknet und zur Detektion der Fluoreszenz auf der DNA-Probe gescannt (Abb. 1B). Die Intensität jedes Spots entspricht dabei dem Expressionslevel eines bestimmten Gens. In der Vergangenheit hat dies in vielen Fällen zur Entdeckung bis dato noch nicht beschriebener Gene geführt, die in konkreten biologisch-medizinischen Vorgängen eine wichtige Rolle spielen und für verschiedene

Erkrankungen verantwortlich sind (Greenberg et al., 2002; Humphreys-Beher et al., 1986; Iwamoto et al., 2004).

Auf Ebene der Haut wurde die DNA-Microarray-Technologie in diversen Expressionsprofil-Experimenten verwendet, um die normale und pathologische Hautbiologie zu verstehen, aber auch die verschiedenen Zelltypen in der Haut auf molekularer Ebene näher zu charakterisieren (Blumenberg, 2006; Curto et al., 2002; Haider et al., 2008; Rinn et al., 2008; Toulza et al., 2007; Wong and Chang, 2005). Unabhängig davon wurden bis dato aber keine Genexpressionsstudien normaler humaner Haut im Vergleich zu anderen humanen Geweben durchgeführt. Daher waren haut-assoziierte Gene bisher kaum in Sequenzdatenbanken zu finden (Toulza et al., 2007).

Aus diesem Grund wurde in Vorexperimenten zu dieser Arbeit die DNA-Microarray-Technologie verwendet, um die Expressionslevel von mehr als 47.000 Einzeltranskripten in 105 verschiedenen adulten humanen Geweben und Zelltypen zu messen.

Aus den daraus resultierenden Ergebnissen konnte eine umfassende Genomweite Datenbank erstellt werden, die sämtliche Expressionssignaturen aller Gewebe des menschlichen Körpers beinhaltet und folglich als "*Body Index of human Gene Expression*" (BIGE) bezeichnet wurde (Lee et al., 2005; Roth et al., 2006).

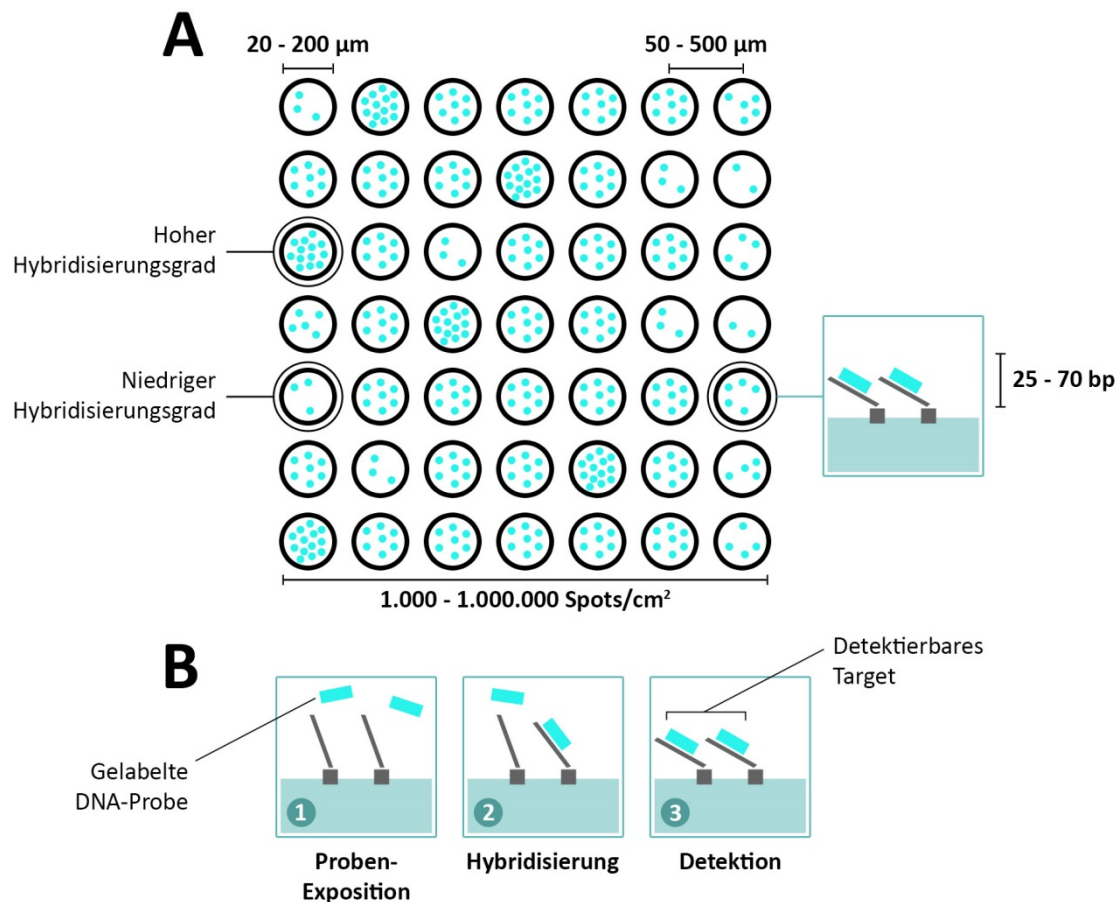


Abb. 1 (A) Schematische Darstellung eines Gen-Chips (die Spots werden nicht maßstabsgetreu wiedergegeben; insgesamt befinden sich auf einem Quadratzentimeter in der Regel bis zu 1 Millionen Spots). **(B)** Vereinfachter Ablauf des Detektionsvorgangs. bp = Basenpaare.

2.3.2 *Body Index of human Gene Expression (BIGE)*

Der aus post-mortem gewonnenem Gewebe erstellte "*Body Index of human Gene Expression*" (BIGE) (siehe auch Kapitel 2.3.1) bietet die Möglichkeit, Gene zu identifizieren, die mit entscheidenden Funktionen unterschiedlicher Organe und Zelltypen assoziiert sind (Lee et al., 2005; Roth et al., 2006). Für die vorliegende Arbeit wurde die BIGE-Datenbank verwendet, um diejenigen Gene zu identifizieren, die die höchste relative Expression in der Haut aufweisen. Diese Gene sind aus dem Grund von besonderem Interesse, da eine organspezifische Expression in der Regel auf eine organspezifische Funktion hindeutet (Lee et al., 2005). Beispiele sind die organ-spezifische Expression des prostata-spezifischen Antigens (PSA) als Tumormarker für das Prostata-

Karzinom (Whittemore et al., 1995) oder die haut-spezifische Expression des Chemokins CCL27 (*Cutaneous T-cell-Attracting Chemokine*, CTACK) als haut-spezifisches T-Zell-Attraktans (Homey et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde also somit die Expression eines bestimmten Gens in der Haut mit seiner relativen Durchschnittsexpression in allen anderen untersuchten Geweben und Zelltypen verglichen und somit genau die Gene identifiziert, die in der Haut stark exprimiert werden, in anderen Geweben hingegen wenig oder keine Expression zeigen. Die daraus resultierende Auswahl an Genen wurde in funktionelle Klassen eingeteilt, wobei hier sowohl manuelle als auch automatisierte Annotationen verwendet wurden, um einerseits den molekularen Aufbau der Haut besser zu verstehen und andererseits wichtige Signalwege zu identifizieren.

In einem nächsten Schritt wurden dann aus den 109 Genen, die die höchste relative Expression in der Haut aufweisen, acht Kandidaten ausgewählt, die für eine weiterführende Charakterisierung am interessantesten erscheinen. Hierbei handelt es sich um solche Gene, die bisher entweder komplett uncharakterisiert waren oder nicht mit der Haut assoziiert wurden und welche aufgrund ihrer Struktur wahrscheinlich für sekretierte oder membranständige Proteine kodieren.

3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine ausgewählte Gruppe von acht haut-assoziierten Genen, die für bis dato nicht charakterisierte sekretierte sowie membranständige Proteine in der menschlichen Haut kodieren, näher zu untersuchen. Die hautspezifische Expression konnte dabei in einem RNA-Panel aus gesunder Haut sowie aus gesunder Haut gewonnenen Primärzelllinien mittels semi-quantitativer PCR (qPCR) bestätigt werden. Für einige dieser Gene wurde die Expression darüber hinaus auch auf Proteinebene mittels Immunhistochemie (IHC) humaner Hautschnitte sowie Western Blot-Analysen untersucht. Dies führt zu der Annahme, eine Reihe potenzieller kutaner Biomarker und/oder Arzneimittel-„Targets“ identifiziert zu haben.

4 Material & Methoden

4.1 Puffer und Lösungen

PBS (<i>phosphate buffer saline</i>), 20 x	160 g NaCl 4 g KCl 28,8 g Na ₂ HPO ₄ + 2 H ₂ O 4,8 g KH ₂ PO ₄ <hr/> ad 1000 ml ddH ₂ O	einstellen auf pH 7,4
Proteinlysepuffer	50 mM HEPES pH 7,4 150 mM NaCl 1% NP40 0,1% SDS 1% Triton X-100	
MOPS-Puffer	83,7 g MOPS 13,6 g Natriumacetat 20 ml 0,5 M EDTA <hr/> ad 1000 ml ddH ₂ O	einstellen auf pH 7,0
Transferpuffer	2,9 g Glycin 5,8 g TRIS-Base 3,7 ml 10% SDS 200 ml Methanol <hr/> ad 1000 ml dH ₂ O	
TBS-Puffer 10x	24,2 g TRIS/HCl 80 g NaCl <hr/> ad 1000 ml ddH ₂ O	einstellen auf pH 7,6

TBS-T-Puffer	1 x TBS, 0,1% Tween [®] 20	
20 mM TRIS-Puffer	0,56 g TRIS	einstellen auf pH 7,9
	<hr/> ad 250 ml ddH ₂ O	

Die oben genannten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) bezogen.

4.2 Akquirierung humaner Gewebeproben und Zellmaterial

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen Hautbiopsien wurden mit schriftlicher Genehmigung entweder von gesunden Probanden, die sich einem plastischen Eingriff unterzogen haben, oder von Patienten mit verschiedenen Hauterkrankungen akquiriert (Tab. 1). Eine Genehmigung der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät, Universität Düsseldorf liegt vor. Die Proben von Zoion Diagnostics (Hawthorne, NY) wurden durch ein Ethikvotum für vorangegangene Studien von Lee und Roth gebilligt (Lee et al., 2005; Roth et al., 2006). Die Hautproben wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Tab. 1 Anzahl untersuchter Proben unterschiedlicher Hauterkrankungen

Hauterkrankung	n
<i>gesund</i>	11
Psoriasis vulgaris	12
Atopische Dermatitis	12
Prurigo nodularis	6
Lupus erythematoses	10
Lichen planus	12
Basalzellkarzinom	12
Aktinische Keratose	6
Plattenepithelkarzinom	9

Für Endothelzellen wurde Endothelzell-spezifisches Medium verwendet. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs)) wurden aus "Buffy coats" mittels Ficoll®-Dichtegradientenzentrifugation (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) isoliert.

Um die Endothelzellen zu gewinnen, wurden Vorhautbiopsien verwendet, die nicht länger als einen Tag gelagert wurden. Diese wurden über Nacht bei 4°C mit Dispase II (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) verdaut und anschließend die Dermis von der Epidermis mittels Collagenase Typ IA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) für 1 - 2 h bei 37°C getrennt. Danach folgte die Filtration der Zellsuspension mittels Nylon-Netz (*Cell Strainer 70 µm Nylon*; Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) sowie die Kultivierung im Endothelzell-spezifischen Medium EGM MV (Lonza, Basel, Schweiz) für 24 h. Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die Endothelzellen abschließend mit dem MACS CD31 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) isoliert und gereinigt.

Beim sogenannten "Buffy coat" handelt es sich um eine konzentrierte Lymphozytensuspension, die während der Verarbeitung von Gesamtblut entsteht. Dabei werden Lymphozyten und Monozyten entsprechend ihrer spezifischen Dichte an der Interphase zwischen der oberen Phase (Plasma, Thrombozyten) und der unteren Phase (Ficoll®) aufkonzentriert. Erythrozyten und Granulozyten mit höherer Dichte bilden hingegen ein Zellpellet.

Das Vorgehen nach Standardprotokoll (*GE Healthcare Life Sciences isolation of mononuclear cells methodology and applications*) in Kurzform: Die "Buffy coat"-Zellsuspension wurde 1:2 mit RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) verdünnt. 37,5 ml Zellsuspension wurden auf 12,5 ml *Ficoll®-Paque™ Plus* - Lösung (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) geschichtet und mittels Zentrifugation (1150 U/min, 20 Minuten, Raumtemperatur) (Rotina 46 R, Hettich, Bäch, Schweiz) ohne Bremse voneinander getrennt. Die Interphase, welche die PBMCs enthält, wurde vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführt, in RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde nun in 25 ml Ammoniumchlorid-Lysepuffer resuspendiert, um die Erythrozyten zu lysieren, und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die restlichen Zellen in PBS (PAA, Pasching,

Österreich) gewaschen und anschließend zentrifugiert (1150 U/min, 10 Minuten, 8°C). Zum Schluss wurden die Zellen in RPMI 1640 resuspendiert.

4.3 Datengenerierung und Analyse der Genexpression

Die Erstellung der *Body Index of Gene Expression database* (BIGE) wurde bereits ausführlich beschrieben (Lee et al., 2005; Roth et al., 2006). Von den fünf zur Verfügung stehenden Hautproben stammten drei aus dem Lendenbereich von zwei weiblichen und einem männlichen Spender, die RNA zweier Gesamthautproben wurde kommerziell bezogen. Die Gewebeproben der Spender wurden drei bis fünf Stunden *post mortem* entnommen und schockgefroren (Zoion Diagnostics, Hawthorne, NY). Die Genexpressionsdaten wurden mittels *Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0* Gen-Arrays nach Standardprotokoll (Affymetrix, Santa Clara, CA) erstellt. Hintergrundanpassung, Signalnormalisierung und Zusammenfassung wurden mittels des *Robust Multi-Array Average* (RMA) -Algorithmus (Irizarry et al., 2003) via ArrayAssist Software (Iobion Labs, La Jolla, CA) durchgeführt.

Um die Gene zu identifizieren, die ausschließlich oder überwiegend in der Haut exprimiert werden (Haut-assoziierte Gene; engl. *skin-associated genes* (SAGs)), wurde die Ratio zwischen der relativen Expression aller Gene in den Hautproben (n = 5) und den Proben, die die übrigen Körpergewebe und Zelltypen repräsentieren (n = 435), ermittelt und Gene mit Expressionsraten $\geq 2,0$ in Bezug auf Haut : Körper ausgewählt.

4.4 Zellkultur

Primäre humane Zellen wurden routinemäßig in einem Inkubator (Memmert INCO 2, Schwabach, Deutschland) bei 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 95% sowie 5% CO₂ in zellspezifischen Medien, versetzt mit L-Glutamin (2 mM) (PAA, Pasching, Österreich) und 1% eines Antibiotikagemisches (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml) (PAA, Pasching, Österreich), kultiviert.

Die primären humanen Keratinozyten wurden in speziellem Keratinozytenmedium (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) kultiviert, das zusätzlich mit rekombinantem EGF (0,1 - 0,2 ng/ml) und Rinderhypophysenextrakt (engl. *bovine*

pituitary extract (BPE)) (20 - 30 µg/ml) versetzt wurde. Die primären humanen Fibroblasten wurden in speziellem Fibroblastenmedium Quantum 333 (PAA, Pasching, Österreich) kultiviert.

Als humane Kontrollproben für Milz, Niere, Gehirn und Leber wurde entsprechende Gesamt-RNA der Firma Clontech (Mountain View, CA) eingesetzt. Für funktionelle Analysen wurden Zytokine (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) verwendet, um primäre humane Keratinozyten zu stimulieren. Dazu wurden folgende Konzentrationen für 24 Stunden eingesetzt (Tab. 2):

Tab. 2 Zytokinkonzentrationen

Zytokin	Konzentration (ng/ml)
GM-CSF	50
TNF- α + IL-1 β	10 + 5
IFN- γ	50
IL-4	50
IL-13	100
IL-31	10
IL-17	50
IL-22	50

4.5 RNA-Isolation humaner Hautbiopsien und Zellen *in vitro*

Die RNA wurde entweder mittels *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder TRizol[®] Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, CA) isoliert.

4.5.1 Humane Hautbiopsien

Das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) basiert auf einer Silica-Membran-Technologie und wird für die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Geweben und Zellen verwendet. Dazu wurden die schockgefrorenen humanen Biopsien in Rundbodenröhrchen (Merck, Darmstadt, Deutschland) überführt.

Für eine einfachere Zertrümmerung und Homogenisierung wurden 600 µl RLT-Puffer plus β-Mercaptoethanol hinzugegeben, bevor die Probe mittels Rotor-Stator Homogenisator Polytron® PT 2500 E (Kinematica AG, Luzern, Schweiz) für etwa 20 bis 40 s (je nach Festigkeit und Größe der Probe) homogenisiert wurde. Der Rotor erreicht extrem hohe Drehgeschwindigkeiten, sodass die Probe durch Kombination aus Wirbelbewegung und mechanischem Scheren zertrümmert und homogenisiert wird.

Mithilfe der im Kit enthaltenen Qiagen RNeasy Mini-Säulen wurde die RNA nach Herstellerprotokoll für die Isolation von RNA aus humanen Zellen isoliert. Um etwaige Kontaminationsstoffe zu eliminieren, wurde eine Kombination aus Spin-Technologie und Wasch-Puffern verwendet. In einem finalen Eluationsschritt wurde die aufgereinigte RNA von der Membran extrahiert.

Im Folgenden das Vorgehen in Kurzform: Zunächst wurde das Lysat für 3 Minuten bei voller Geschwindigkeit (Eppendorf Centrifuge 5415R, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand durch Pipettieren in ein neues Mikrozentrifugationsröhrchen überführt. Ein 1-faches Volumen 70%igen Ethanol wurde zum gereinigten Lysat hinzugefügt und unmittelbar danach durch Pipettieren vermischt. Bis zu 700 µl der Probe wurden, inklusive möglichem Präzipitat, in eine Qiagen RNeasy Spin-Säule überführt, die sich in einem Sammelröhrchen (mit 2 ml Volumen) befindet. Nach Zentrifugation für 15 s bei 8000 g wurden 700 µl RW1-Puffer hinzugegeben und kurz erneut zentrifugiert. Die Säulen wurden mit 2 x 500 µl RPE-Puffer gewaschen und bei 8000 g für weitere 15 s im ersten Waschschrift bzw. 2 Minuten im zweiten Waschschrift zentrifugiert. Zuletzt wurde die RNA aus den Säulen in einem neuen 1,5 ml-Sammelröhrchen mit 30 µl RNase-freiem Wasser mittels Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 g eluiert.

4.5.2 Humane Zellen

TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, die für die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellproben verwendet wird. TRIzol® schließt die Zellen und zellulären Komponenten auf, ohne die Integrität der Nukleinsäuren zu zerstören.

Die Zellen werden durch Entfernen des Mediums, Zugabe von TRIzol[®] und zusätzliches Abschaben der Zellen mittels Pipettenspitze aus dem Napf geerntet. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation separiert das Chloroform-Lysat-TRIzol[®]-Gemisch in eine die RNA enthaltende wässrige Phase und eine organische Phase, die DNA und Proteine enthält. Isopropanol wird zur Präzipitation der RNA verwendet, Ethanol dient dazu, mögliche restliche Salze zu entfernen.

Im Folgenden das Vorgehen in Kurzform: Pro Napf einer 6-Napf-Platte wurden 750 µl TRIzol[®] hinzugegeben und nach zusätzlichem Abschaben der Zellen mittels Pipettenspitze in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf Eis überführt. Anschließend wurde 1/5 Volumen Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben, das Lysat gründlich durchmischt und für 15 Minuten bei 12.000 U/min und 4°C zentrifugiert (Biofuge 13R, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland). Dann wurde die wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und 1/2 Volumen Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben. Nach erneuter gründlicher Durchmischung wurde das Gemisch über Nacht bei -20°C gelagert und danach für 30 Minuten bei 12.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml 80%igem Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gewaschen und erneut für 30 Minuten bei 12.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet (Vorsicht vor Übertrocknung!) und danach in 50 µl DEPC-Wasser (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelöst. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

4.6 Messung der optischen Dichte

Die Ausbeute der RNA wurde mittels eines NanoDrop 2000C Photometers (Thermo Scientific, Wilmington, DE) bestimmt. Die RNA-Konzentrationen wurden gemäß Herstellerprotokoll gemessen. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,1 für die OD 260/280 [Ratio der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von

260/280 nm] zeigt an, dass die extrahierte RNA keine störenden Proteine, Salze oder andere Kontaminationen enthält.

4.7 Real-time quantitative PCR

In vielen Bereichen der biologisch-medizinischen Forschung spielt die quantitative Nukleinsäuresequenzanalyse eine wesentliche Rolle. Bereits Mitte der 1990er-Jahre wurde die Messung der Genexpression (RNA) eingesetzt, um biologische Antworten auf unterschiedliche Stimuli umfassender bewerten zu können (Huang et al., 1995a; Huang et al., 1995b; Prud'homme et al., 1995; Tan et al., 1994). Das PCR-System erlaubt dabei die Analyse kleinster Nukleinsäuremengen. Dazu wird die PCR-Produktmenge in der Log-Phase der Reaktion kurz vor dem Plateau gemessen (Kellogg et al., 1990; Pang et al., 1990). Bei Festlegung eines Schwellenwertes wird der resultierende Kreuzpunkt aus Schwellenwertgerade und gemessener Kurve als C_t -Wert (Schwellenwertzyklus) bezeichnet. Gene, die in größeren Mengen exprimiert werden, haben eine höhere Zahl an Startkopien und erscheinen deshalb früher während der Amplifikation, besitzen also einen niedrigeren C_t -Wert.

Bei dieser Methode ist es wichtig, dass jede Probe die gleiche Menge an Nukleinsäuren beinhaltet und dass jede Probe während der Analyse mit gleicher Effizienz amplifiziert wird. Um dies zu gewährleisten, wird für die Effizienznormalisierung eine Gensequenz verwendet, die in allen Proben in relativ konstanten Mengen enthalten ist, wie etwa die 18S rRNA. Wird die eingesetzte Gensonde mittels Nuklease degradiert, wird ein Fluoreszenzsignal freigesetzt, das in einem Anstieg der Fluoreszenzemission resultiert. Der hier eingesetzte Sequenzdetektor ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA) erlaubt kontinuierliche Messungen der Fluoreszenzspektren während der gesamten PCR-Amplifikation im Thermocycler. Dazu werden die Reaktionen in Echtzeit überwacht.

4.7.1 Komplementäre DNA (cDNA) Synthese

Unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase *Superscript II* (Invitrogen, Carlsbad, CA) wurde cDNA von verschiedenen mRNA-Matrizen synthetisiert. Weil für die weitere Verwendung die Beseitigung jeglicher DNA

notwendig ist, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurde 4 µg Gesamt-RNA mit den folgenden Reagenzien versetzt:

- 1,5 µl 5 x *first strand* Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA)
- 1 µl RNasin Plus (40 U/µl, Promega, Madison, WI)
- 1 µl DNase I rekombinant (Roche, Basel, Schweiz)

Zu einem Endvolumen von 16 µl wurde RNase-freies Wasser hinzugefügt und die vorbereiteten Mixturen für 20 Minuten bei 37°C sowie 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend bei 4°C gehalten. Dann wurde die RNA mit einer Mischung aus 1 µl *Anchored Oligo(dT)₁₂₋₁₈* (0,5 µg/µl, Invitrogen, Carlsbad, CA) und 0,4 µl *Random Hexamer Primern* (500 µg/ml, Promega, Madison, WI) versetzt. Zu einem Endvolumen von 20 µl wurde RNase-freies Wasser hinzugefügt und die Proben für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um RNA-Sekundärstrukturen zu reduzieren. Anschließend wurden die folgenden Reagenzien für die Einzelstrang-Synthese hinzugegeben:

- 4,5 µl 5 x *first strand* Puffer (Invitrogen, Carlsbad, CA)
- 1 µl 0,1 M DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA)
- 1 µl dNTP Mix (10 mM, Biotin USA Inc., Taunton, MA)
- 0,5 µl RNasin Plus (40 U/µl, Promega, Madison, WI)
- 1 µl *Superscript II* (200 U/µl, Invitrogen, Carlsbad, CA)
- 30 µl Gesamtvolumen (Zugabe von RNase-freiem Wasser)

Die Reaktion wurde vorsichtig gemischt; dann wurde nach einem ersten Inkubationsschritt von 2 Minuten bei 42°C für optimales *Primer-Annealing* die cDNA-Synthese für 50 Minuten bei 50°C durchgeführt, gefolgt von einem Inkubationsschritt von 15 Minuten bei 70°C, um das Enzym zu inaktivieren (Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen, Deutschland). Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Die cDNA der Reversen Transkriptase-Reaktion wurde im Folgenden verwendet, um unterschiedliche PCR-Reaktionen herzustellen.

4.7.2 Primer Design

Gen-spezifische Oligonukleotide für die qPCR wurden von Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen (Tab. 3):

Tab. 3 Genspezifische Oligonukleotide für die qPCR (Kontrollgene: ALDOB, DCD, KRT1; alle weiteren Gene sind ausgewählte und näher untersuchte Haut-spezifische Gene aus der Liste der Top 109).

ALDOB	<i>forward</i> 5'-CAAGGCTGCAAACAAGGAG-3' <i>reverse</i> 5'- CCCGTGTGAACATACTGTCCT-3'
DCD	<i>forward</i> 5'-AGACCCAGGGTTAGCCAGAC-3' <i>reverse</i> 5'-CTCCGTCTAGGCCTTTTTTCC-3'
KRT1	<i>forward</i> 5'-GCCTCCTTCATTGACAAGGT-3' <i>reverse</i> 5'-GCTCCCATTTTGTTCAGT-3'
MUCL1	<i>forward</i> 5'-TCTGCCCAGAATCCGACAACAGC-3' <i>reverse</i> 5'-GGGCTTCATCATCAGCAGGACCA-3'
WFDC5	<i>forward</i> 5'-GCCAGATGATGGGCCCTGCC-3' <i>reverse</i> 5'-GCAGCTGCCAGCTTCACAGA-3'
TMEM45A	<i>forward</i> 5'-TCGGGTCTGGTTGCCTTCTTGGA-3' <i>reverse</i> 5'-ACGCCATCTGCCAGAACCAGGT-3'
GPR115	<i>forward</i> 5'-CCCTGCTGGGCTTGGTCGTC-3' <i>reverse</i> 5'-CCCACCCCAACCCTACCCC-3'
CDHR1	<i>forward</i> 5'-CCCTGGATGCCCTGCACAACA-3' <i>reverse</i> 5'-CGGGAGAGGGTCTCAGCATCT-3'
SERPINB7	<i>forward</i> 5'-GGGGGAAAATACCTAGGGCTCAACA-3' <i>reverse</i> 5'-GGCCATTGCAAAATGGAGTGCAGC-3'
C5orf46	<i>forward</i> 5'-ACCCCGTGCTACCAGAATGGCT-3' <i>reverse</i> 5'-TGCCCGAGTCGTCTGGCTTG-3'
GPR87	<i>forward</i> 5'-CACCGTATGAGGTGAATGGA-3' <i>reverse</i> 5'-TGGGTTTCAGCATAGGTTATTCC-3'

4.7.3 Quantitative *real time* (qPCR) Analyse

Die Gen-spezifischen PCR-Produkte wurden mithilfe des ABI PRISM 7000 Sequenzdetektionssystems plus *Power SYBR® Green PCR Master Mix* oder

TaqMan[®] *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA) detektiert. Die Zielgen-Expression wurde auf die Expression von 18S rRNA (*TaqMan*[®]) normalisiert. Für ein Endvolumen von 25 µl pro Reaktion wurden die folgenden Gen-spezifischen Mixturen hergestellt (Tab. 4):

Tab. 4 Genspezifische Mixturen für die qPCR

	Primer forward	Primer reverse	Detektions- Mix	Target Probe	cDNA (25 ng/µl)	dH₂O
SYBR[®] Green	2,5 µl [2 µM]*		12,5 µl	–	10 µl	–
Eukaryotische 18S rRNA (<i>TaqMan</i>[®])	0,15 µl [10 µM]	0,15 µl [10 µM]	12,5 µl	0,15 µl [10 µM]	10 µl	2 µl

*Primer-Mix [2 µM]: 20 µl *forward* Primer [45 µM], 20 µl *reverse* Primer [45 µM], 410 µl dH₂O

Verwendet wurden spezifische Primer für ALDOB, DCD, KRT1, C5orf46, CDHR1, GPR87, GPR115, MUCL1, SERPINB7, TMEM45A und WFDC5 (siehe Tab. 3).

Anschließend wurde das folgende PCR-Programm eingestellt (Tab. 5):

Tab. 5 PCR-Programm

Temperatur	Zeit	
95°C	10 min	} 40 Zyklen
50°C	2 min	
60°C	1 min	
95°C	15 s	

Der Schmelzpunkt kann einfach ermittelt werden, da das Fluoreszenzsignal abnimmt, sobald sich die DNA-Doppelstränge trennen und interkaliertes *SYBR*[®] *Green* freigesetzt wird. Die anschließende Quantifizierung der Zielgen-Expression wurde mittels einer speziellen Sequenzdetektorsystem-Software

(Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt. Für eine absolute Quantifizierung wurden ΔC_T -Werte bestimmt und die Genexpression als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

4.8 Immunfluoreszenzfärbung

4.8.1 Paraffineinbettung

Biopsien humaner Haut wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Biopsien in 4% Formaldehydlösung (Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland) fixiert und in Paraffin eingebettet.

4.8.2 Schneiden der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden mittels Mikrotom (1150/Autocut, Reichert-Jung, Wetzlar, Deutschland) transversal in $5\ \mu\text{m}$ messende Schnitte geteilt und anschließend auf adhäsive Objektträger aufgezogen (Thermo Scientific, Waltham, MA). Dann wurden sie bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

4.8.3 Färben der Gewebeschnitte

Die Schnitte wurden für 1 Stunde bei 56°C gelagert, für 1 Stunde in Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 2 x 10 Minuten in Roti[®]-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 100%, 90%, 70%, 50%) (Merck, Darmstadt, Deutschland) für jeweils 5 Minuten rehydriert. Zum Schluss wurden die Schnitte 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen. Nach Demaskierung mit 3,5 U/ml Protease XXIV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in 20 mM TRIS pH 7,9 bei 37°C für 8 Minuten und einem Waschschrift von 2 x 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5% Eselserum (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) inkubiert, um nicht-spezifische Bindungsstellen zu blocken.

Nach Entfernen des Eselserums wurde der verdünnte Erstantikörper bzw. der entsprechende Isotyp-Kontrollantikörper (Tab. 6) auf die Schnitte gegeben. Nach Inkubation der Erstantikörper wurden die Schnitte 2 x 5 Minuten in PBS

gewaschen. Die Erstantikörperbindung wurde mittels 1-stündiger Inkubation mit den Zweitantikörpern Esel-Anti-Maus oder -Kaninchen IgG AviAlexa 594 (1:200) (Invitrogen, Carlsbad, CA) und Esel-Anti-Maus IgG AviAlexa 488 (1:200) (Invitrogen, Carlsbad, CA) bei Raumtemperatur detektiert, jeweils kombiniert mit DAPI (1:1000) (PromoKine, Heidelberg, Deutschland). Nach abschließendem Waschschrift von 2 x 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte mit Fluoromount G (eBioscience, San Diego, CA) fixiert.

Tab. 6 Primärantikörper, Isotyp-Kontrollen und entsprechende Verdünnungen/ Inkubationszeiten. Alle Antikörper und Antiseren wurden in PBS verdünnt.

Primärantikörper	Verdünnung/Inkubationszeit	Hersteller
<i>Polyclonal mouse anti-human WFDC5, IgG</i>	1:100 ü.N. bei 4°C	Abcam, Cambridge, GB
<i>Polyclonal rabbit anti-human TMEM45A, IgG</i>	1:300 ü.N. bei 4°C	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO
<i>Polyclonal rabbit anti-human GPR115, IgG</i>	1:500 ü.N. bei 4°C	Abcam, Cambridge, GB
<i>Monoclonal mouse anti-human Filaggrin, IgG₁</i>	1:100 ü.N. bei 4°C	Abcam, Cambridge, GB
Isotyp-Kontrolle <i>mouse IgG₁</i>		R&D Systems, Minneapolis, MN
Isotyp-Kontrolle <i>rabbit IgG</i>		Jackson ImmunoResearch, Suffolk, GB

4.8.4 Detektion der Immunreaktionen

Anschließend wurden die Immunreaktionen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 200M (Zeiss, Jena, Deutschland) detektiert. Dazu wurde die Software Axiovision 4.7 (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet.

4.9 Western Blot-Analysen

Für Western Blot-Analysen wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE) durchgeführt, um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Dann wurden die Proteine vom Gel auf eine Membran via Elektrottransfer übertragen und der Blot für den Nachweis der spezifischen Proteine WFDC5, TMEM45A und GPR115 mit entsprechenden Primärantikörpern plus fluoreszierenden Sekundärantikörpern behandelt.

4.9.1 Proteinlysate

Humane Keratinozyten wurden geerntet und in Proteinlysepuffer (50 mM HEPES [pH 7,4], 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS, 1% Triton X-100 und Protease-Inhibitor-Cocktail) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend für 5 Minuten bei 5000 g und 4°C (Eppendorf Centrifuge 5415R, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, um Zelltrümmer zu beseitigen.

4.9.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Für jede Probe wurden 200 µl Bradford-Protein-Reagenz (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) zu 800 µl destilliertem Wasser (dH₂O) – einmal ohne (Kontrolle) und einmal mit Proteinlysat – hinzugefügt. Die optische Dichte (OD) wurde bei 595 nm (NanoDrop 2000C Photometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE) gemessen und eine absolute Quantifizierung mit einer entsprechenden Standardkurve von Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) durchgeführt.

4.9.3 SDS-PAGE Gel-Elektrophorese

Ein Minimum von 20 µg Protein wurde in einem maximalen Volumen von 16 µl in 4 µl Roti[®]-Load (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) für 5 Minuten bei 95°C gelöst. Anschließend wurden die Proben auf ein NuPAGE[®] 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) geladen. Als Proteinstandards wurden der Molekulargewicht-Marker *SeeBlue[®] Plus 2 Prestained Standard* (Invitrogen,

Carlsbad, CA) sowie der *MagicMark™ XP* Western-Protein-Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA) verwendet. Die Proteine wurden in Minigelen bei 200 V für 50 Minuten in einem Elektrophoresesystem (Novex XCell II, San Diego, CA) in MOPS-Puffer (für Inhaltsstoffe siehe Kapitel 4.1) aufgetrennt.

4.9.4 Semi-dry Transblotting

Nach Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham™ Hybond™-ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) transferriert. Dazu wurden die Gele in Transferpuffer äquilibriert (für Inhaltsstoffe siehe Kapitel 4.1) sowie zusätzlich Blotting-Papier in Transferpuffer eingeweicht und auf die untere Elektrode (Anode) des *Semi-Dry* SD Transblotters (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) gelegt. Die Membran und das Gel wurden zwischen diesem und einem weiteren durchtränkten Blotting-Papier platziert. Dann wurde eine Glaspipette über das obere Blotting-Papier gerollt, um etwaige Luftblasen zu entfernen. Zum Schluss wurde das Sandwich mit der oberen Elektrode (Kathode) abgedeckt und bei 15 V für 45 Minuten geblottet.

4.9.5 Immundetektion

Nach dem Protein-Transfer wurde die Membran für 30 Minuten in Blockierlösung (5% (w/v) Milchpulver (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) in TBS-T-Puffer; für Inhaltsstoffe siehe Kapitel 4.1) inkubiert, während sie vorsichtig bei Raumtemperatur geschüttelt wurde. Die Primärantikörper wurden in den entsprechenden Konzentrationen in Blockierlösung (1% (w/v) Milchpulver (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) in TBS-T-Puffer; für Inhaltsstoffe siehe Kapitel 4.1) (Tab. 7) verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C unter vorsichtigem Schütteln. Am nächsten Tag wurden die Blots 3 x 5 Minuten in TBS-T gewaschen und mit Spezies-spezifischen HRP-konjugierten Zweitantikörpern (1:10.000) (Amersham™ ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschvorgängen wurden die Blots für 1 Minute in Chemolumineszenz-Lösung (ECL-Detektionsreagenzien 1 und 2, Amersham™ ECL Western Blotting Analysis System, GE Healthcare,

Buckinghamshire, Großbritannien) getaucht und mit einer Kunststoffolie abgedeckt. Die Blots wurden anschließend auf einen Röntgenfilm (AmershamTM Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) gelegt und der Film durch Chemolumineszenz belichtet. Die Röntgenfilme wurden in einer Dunkelkammer mit Standard-Reagenzien (Entwickler und Fixierer) entwickelt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Tab. 7 Primärantikörper und entsprechende Verdünnungen/Inkubationszeiten

Primärantikörper	Verdünnung/Inkubationszeit	Hersteller
<i>Polyclonal mouse anti-human WFDC5</i>	1:1000 ü.N. 4°C	Abcam, Cambridge, GB
<i>Polyclonal rabbit anti-human TMEM45A</i>	1:1000 ü.N. 4°C	Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO
<i>Polyclonal rabbit anti-human GPR115</i>	1:1000 ü.N. 4°C	Abcam, Cambridge, GB

4.10 Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden entweder als Durchschnittsintensitäten \pm Standardabweichung oder als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Statistische Signifikanzen wurden je nach Gegebenheit mittels Student's t-Test oder Mann Whitney U Test berechnet. P-Werte unterhalb von 0,05 wurden als statistisch signifikant angenommen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

5 Ergebnisse

5.1 Identifikation hautspezifischer Gene

Um in den 105 untersuchten humanen Geweben und Zelltypen diejenigen Gene zu identifizieren, die bevorzugt in humaner Haut exprimiert werden, wurde die oben beschriebene *Body Index of Gene Expression* (BIGE)-Datenbank verwendet. Gene, deren durchschnittliche Expressionsrate in der Haut $\geq 2,0$ -fach höher lag als in den übrigen Geweben und Zelltypen, wurden in einer Liste mit insgesamt 687 Haut-assoziierten Genen [engl. *skin associated genes*; SAGs] zusammengefasst. So konnte mit Hilfe der genomweiten *Microarray*-Plattform ein umfassendes Genexpressionsprofil jeder Probe erstellt werden. Ubiquitär exprimierte „*Housekeeping*“-Gene wurden von der Analyse ausgeschlossen, sodass letztendlich nur Gene übrigblieben, die ausschließlich an hautspezifischen Funktionen und Signalwegen beteiligt sind.

5.2 Bioinformatische Analysen

Um die biologische Bedeutung der 687 identifizierten hautspezifischen Gene genauer zu verstehen, wurden diese von Zlotnik und Mitarbeitern zunächst mit Hilfe eines *Gene Ontology* (GO) *Term Descriptors* durch bereits publizierte Daten sowie den Abgleich mit der Pfam (*Protein families*) -Datenbank umfassenden funktionellen Klassen zugeordnet. Anschließend wurde das *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID)-Tool verwendet, um systematisch diejenigen funktionellen Klassen zu identifiziert, die in den Genlisten besonders häufig vorkommen.

Dabei wird deutlich, dass die Bereiche „Stoffwechsel“, „Signalübertragung“ und „Genexpression“ die größten Genklassen darstellen und zusammen etwa 35% der hautspezifischen Gene repräsentieren (Abb. 3A). Darüberhinaus sind Proteinstoffwechsel- und Strukturgene mit zusammen 20% ebenfalls deutlich vertreten. Gene aus den Bereichen „Zelladhäsion“, „Transport/Kanal“, „Zellzyklus“, „Abwehr“, „Keratine“, „Epidermaler Differenzierungskomplex“, „Nuklein-

säuren“ und „Melanozyten“ sind zu weiteren 35% am Gesamtpool aller identifizierten Hautgene beteiligt. Letztendlich konnten 8% der Gene keiner Genklasse zugeordnet werden, 2% waren nicht kodiert. Neben bereits bekannten Genen (bekannt/bekannt; b/b) in der Gruppe der Top 100 konnte eine große Anzahl an Genen identifiziert werden, die zwar bekannt sind, aber noch nicht mit der Haut in Verbindung gebracht wurden (14% bekannt/neu; b/n), oder gänzlich neu entdeckte Gene darstellen (6% neu/neu; n/n) (Abb. 3B).

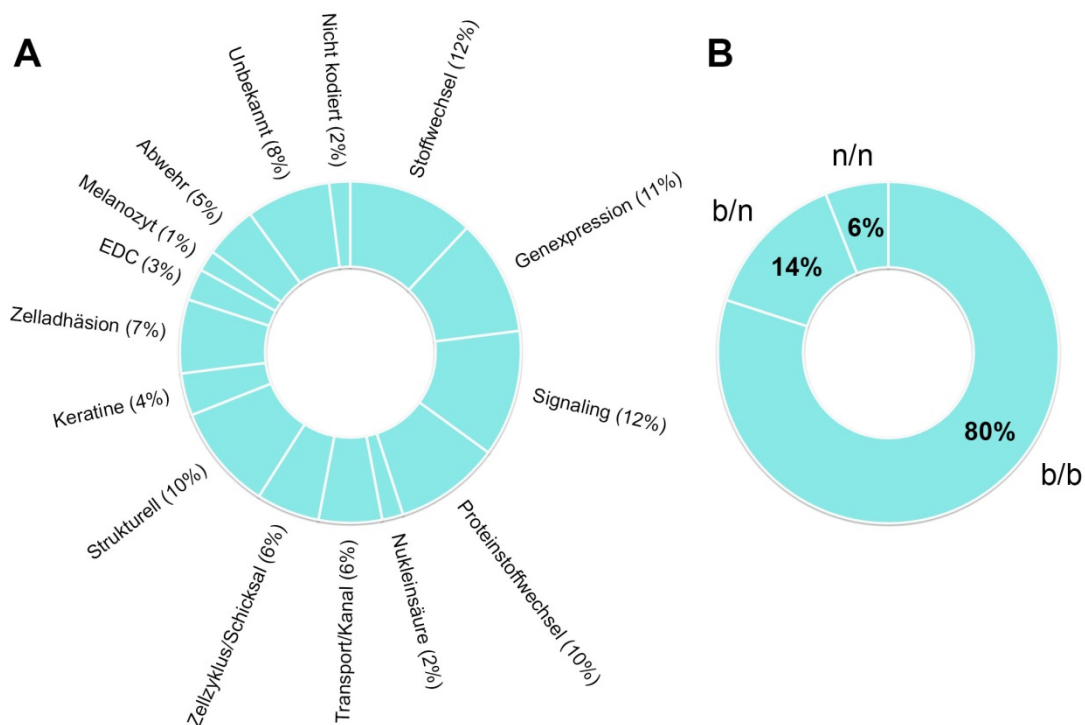


Abb. 3 Umfassende bioinformatische Analyse hautspezifischer Gene mit höchster Priorität. (A) Funktionelle Annotation von 687 hautspezifischen Genen (SAGs). EDC: Epidermaler Differenzierungskomplex (engl. *epidermal differentiation complex*). Kategorien multipler funktioneller Klassen: Stoffwechsel (Aminosäure-Stoffwechsel, Enzyme, Fettstoffwechsel, Membranregeneration/Reparatur, Stoffwechsel), Genexpression (Translation, Transkriptionsfaktoren), Signaling (Rezeptor, Signaling), Proteinstoffwechsel/Trafficking (Chaperone, Protease/ Proteaseinhibitor, Proteinkinase/ Phosphatase, Proteinmodifikation, Proteintrafficking, Proteinumsatz), Nukleinsäurebindung/Stoffwechsel (DNA-Bindung/Stoffwechsel, RNA-Bindung/Stoffwechsel), Transport/Kanal (Kanal, Transporter, vesikuläres Trafficking), Zellzyklus/Zellschicksal (Angiogenese, Apoptose, Zellzyklus, Differenzierung, Wachstumsfaktor/Wachstumsfaktor-Bindungsprotein, Hormon/Hormonbindung), Strukturell (Cytoskelett, Strukturell), Zelladhäsion (Zelladhäsion, Gap junction, Tight junction, Extrazellulärmatrix), Abwehr (Chemokine/Chemokinrezeptor, Koagulation, Zytokin/Zytokinrezeptor, Immunantwort, angeborene Immunität, Bakterizid), Unbekannt (Unbekannt, Plasmamembran). **(B)** Prozentuale Verteilung der Top 100 hautspezifischen Gene: 80% bekannte Gene (b/b); 14% bekannte, aber bisher nicht in der Haut beschriebene Gene (b/n); 6% bisher nicht untersuchte Gene (n/n).

5.3 Genexpressionsprofile hautspezifischer Gene

Die Top 100-Gene mit der höchsten relativen Expression in humaner Haut sind in Tab. 8 gelistet. Mit einer Ratio von 55 ist Dermcidin (DCD) das am spezifischsten in der Haut exprimierte Gen, gefolgt von Keratin 2A (KRT2A), welches mit einer Ratio von 31 das am spezifischsten exprimierte der elf Keratin-Gene darstellt. Auch zwei Mitglieder der Sekretoglobin-Gen-Familie, *Secretoglobin, family 2A, member 2* (SCGB2A2, auch bekannt als Mammaglobin 1) mit einer Ratio von 30 (Rang 3) und *Secretoglobin, family 1D, member 2* (SCGB1D2, auch bekannt als Lipophilin B, Rang 19) sind hoch exprimiert, ebenso wie *Filaggrin family member 2* (FLG2; Rang 4) und Desmocollin 1 (DSC1; Rang 5). Alle weiteren identifizierten Gene der Top 100-Liste liegen unterhalb einer Ratio von 20. Neun der Top 10-Gene werden ausschließlich in der Haut (Kategorie „Strukturell“ (ST)) oder in anderen Haut-enthaltenden Organen, wie z.B. Brustwarze, Penis, Vulva oder Ösophagus (Kategorie „Reproduktion“ (RP)) exprimiert. SCGB2A2 stellt dabei eine Ausnahme dar, da es auch in der Brustdrüse exprimiert wird (Abb. 4 und Abb. 6). Einige der in normaler Haut hoch exprimierten Gene sind dem Immunsystem zugeordnet. Die Liste der 687 SAGs beinhaltet 16 Gene, die für Zytokine, Chemokine und ihre Rezeptoren kodieren, davon vier in den Top 100 (Tab. 8): CCL27, IL-1F7/IL-37, IL-20RB und TNFRSF19. Nach CCL27 ist Interleukin-37 (IL-37) dabei das Zytokin mit der zweithöchsten hautspezifischen Expression.

Tab. 8 BIGE-Expressionsprofile der Top 100 (+GPR87) humanen haut-assoziierten Gene (SAGs). Die Rangfolge zeigt die Ratio (= x-fache Änderung der Expression) im Vergleich zu den Durchschnittswerten der restlichen 104 adulten humanen Gewebe und Zelltypen im BIGE. Einteilung der Klassen (Kategorie): b/b = bekannte haut-assoziierte Gene; b/n = bekannte Gene, die bisher nicht mit der Haut assoziiert wurden; n/n = uncharakterisierte (neue) Gene. Fettgedruckte Gene sind entweder Kontrollgene (DCD, KRT1) oder ausgewählte und in dieser Arbeit näher untersuchte Gene.

Rang	Genbezeichnung	Gen-symbol	RATIO	Funktion	Kategorie
1	Dermcidin	DCD	55,00	Mikrobizid	b/b
2	Keratin 2A	KRT2A	31,15	Keratin	b/b
3	<i>Secretoglobin, family 2A, member 2</i>	SCGB2A2	30,61	Unbekannt	b/b
4	<i>Filaggrin family member 2</i>	FLG2	29,55	Strukturell	b/b
5	Desmocollin 1	DSC1	21,88	Strukturell	b/b
6	Filaggrin	FLG	18,61	Zytoskelett	b/b

7	Keratin 77	KRT77	18,53	Keratin	b/b
8	Late cornified envelope 2B	LCE2B	17,87	Strukturell	b/b
9	Loricrin	LOR	17,65	Strukturell	b/b
10	Late cornified envelope 1B	LCE1B	16,28	Strukturell	b/b
11	Desmoglein 1	DSG1	14,77	Tight junction	b/b
12	Dermokine	DMKN	14,37	Signaling	b/b
13	Cystatin E/M	CST6	14,17	Protease/Proteaseinhibitor	b/b
14	Desmocollin 3	DSC3	12,82	Tight junction	b/b
15	Keratin 1	KRT1	12,38	Keratin	b/b
16	Mucin-like 1	MUCL1	12,35	Mikrobizid	b/n
17	Lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	LGALS7	12,07	Immunantwort	b/b
18	Keratin 10	KRT10	12,06	Keratin	b/b
19	Secretoglobin, family 1D, member 2	SCGB1D2	11,97	Unbekannt	b/n
20	Keratinocyte differentiation-associated protein	KRTDAP	11,18	GF/GF-Bindungsprotein Melaninbiosynthese/ Melanosom	b/b
21	Dopachrome tautomerase	DCT	10,38		b/b
22	WAP four-disulfide core domain 5	WFDC5	10,36	Unbekannt	n/n
23	Calmodulin-like 5	CALML5	9,81	Strukturell	b/b
24	Keratin 14	KRT14	9,73	Keratin	b/b
25	Chemokine (C-C motif) ligand 27	CCL27	9,65	Chemokin/Chemokinrezeptor	b/b
26	POU domain, class 2, transcription factor 3	POU2F3	9,26	Transkriptionsfaktor	b/b
27	Plakophilin 1	PKP1	9,12	Zytoskelett	b/b
28	Aspartic peptidase, retroviral-like 1	ASPRV1	9,12	Protease/Proteaseinhibitor	b/b
29	Suprabasin	SBSN	8,97	Strukturell	b/b
30	Zinc finger protein 750	ZNF750	8,74	Transkriptionsfaktor	b/b
31	Tyrosinase-related protein 1	TYRP1	8,74	Melaninbiosynthese/ Melanosom	b/b
32	Transmembrane protein 45A	TMEM45A	8,72	Unbekannt	n/n
33	Interleukin 1 family, member 7 (zeta)	IL37	8,62	Zytokin/Zytokinrezeptor	b/n
34	Pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	PTX3	8,44	Immunantwort	b/b
35	GATA binding protein 3	GATA3	8,38	Transkriptionsfaktor	b/b
36	Sciellin	SCEL	8,01	Strukturell	b/b
37	Dystonin	DST	7,74	Tight junction	b/b
38	Exophilin 5	EXPH5	7,62	Vesikuläres Trafficking	n/n
39	G protein-coupled receptor 115	GPR115	7,54	Rezeptor	b/n
40	Epiplakin 1	EPPK1	7,49	Strukturell	b/b
41	Cadherin-related family member 1	CDHR1	7,43	Zelladhäsion	b/n
42	Premature ovarian failure, 1B	POF1B	7,35	Strukturell	b/b
43	Kallikrein 5	KLK5	7,34	Protease/Proteaseinhibitor	b/b
44	Arylacetamide deacetylase-like 2	AADACL2	7,32	Enzym	n/n
45	Stratifin	SFN	7,26	Signaling	b/b
46	Desmoplakin	DSP	7,23	Tight junction	b/b
47	Claudin 1	CLDN1	7,19	Tight junction	b/b

48	Lymphocyte antigen 6 complex, locus D	LY6D	7,12	Tight junction	b/b
49	Trichohyalin	TCHH	7,09	Zytoskelett	b/b
50	Keratin 80	KRT80	6,84	Keratin	b/b
51	PERP, TP53 apoptosis effector	PERP	6,83	Tight junction	b/b
52	Serine proteinase inhibitor, clade B, member 7	SERPINB7	6,68	Protease/Proteaseinhibitor	b/b
53	Tripartite motif-containing 29	TRIM29	6,65	Transkriptionsfaktor	b/b
54	Family with sequence similarity 83, member B	FAM83B	6,50	Unbekannt	n/n
55	Interleukin 20 receptor beta	IL20RB	6,48	Zytokin/Zytokinrezeptor	b/b
56	Corneodesmosin	CDSN	6,42	Strukturell	b/b
57	Family with sequence similarity 83, member C	FAM83C	6,35	Unbekannt	n/n
58	Serine proteinase inhibitor, clade B, member 5	SERPINB5	6,29	Protease/Proteaseinhibitor	b/b
59	Keratin 5	KRT5	6,29	Keratin	b/b
60	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	KLF5	6,26	Transkriptionsfaktor	b/b
61	Transkriptionsfaktor CP2-like 2	GRHL1	6,24	Transkriptionsfaktor	b/b
62	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	TNFRSF19	6,20	Zytokin/Zytokinrezeptor	b/b
63	Serine proteinase inhibitor, clade A, member 12	SERPINA12	6,18	Protease/Proteaseinhibitor	b/b
64	Spectrin, beta, non-erythrocytic 2	SPTBN2	6,15	Protein Trafficking	b/n
65	Transcription factor AP-2 alpha	TFAP2A	6,11	Transkriptionsfaktor	b/b
66	SNF1-like kinase	SIK1	6,09	Proteinmodifikation	b/n
67	SH3 domain containing ring finger 2	SH3RF2	5,99	Signaling	b/n
68	LY6/PLAUR domain containing 3	LYPD3	5,96	Zelladhäsion	b/b
69	Now called lectin, galactoside-binding-like	LGALSL	5,88	Unbekannt	n/n
70	AHNAK nucleoprotein 2	AHNAK2	5,76	Strukturell	b/n
71	Tenomodulin	TNMD	5,66	Stoffwechsel	b/n
72	Giant axonal neuropathy (Gigaxonin)	GAN	5,64	Proteinumsatz	b/b
73	Chromosome 5 open reading frame 46	C5orf46	5,64	Unbekannt	n/n
74	Keratin associated protein 2-2	KRTAP2-2	5,63	KRTAP	b/b
75	Tumor protein p73-like	TP63	5,58	Transkriptionsfaktor	b/b
76	Keratin 15	KRT15	5,56	Keratin	b/b
77	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C isoform 2	ATP6V1C2	5,52	Transporter	b/n
78	Xg blood group	XG	5,49	Unbekannt	b/n
79	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	F2RL1	5,42	Koagulation	b/b
80	Ly6/Neurotoxin 1	LYNX1	5,40	Signaling	b/b
81	Keratin 23	KRT23	5,38	Signaling	b/n
82	Forkhead box N1	FOXP1	5,36	Transkriptionsfaktor	b/b
83	Epidermal retinal dehydrogenase 2	SDR16C5	5,35	Enzym	b/b

84	Chloride channel, calcium activated, family member 2	CLCA2	5,35	Kanal	b/b
85	BCL2/Adenovirus E1B 19kD interacting protein like	BNIP1	5,30	Apoptose	b/n
86	Secreted LY6/PLAUR domain containing 1	SLURP1	5,28	GF/GF-Bindungsprotein	b/b
87	Annexin A8	ANXA8	5,22	Signaling	b/b
88	Keratin 17	KRT17	5,22	Keratin	b/b
89	Transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)	TFAP2C	5,21	Transkriptionsfaktor	b/b
90	Death associated protein-like 1	DAPL1	5,21	Apoptose	b/b
91	Degenerative spermatocyte homolog 1, lipid desaturase (Drosophila)	DEGS1	5,17	Fettstoffwechsel	b/n
92	Syndecan 1	SDC1	5,09	Tight junction	b/b
93	Cysteine-rich C-terminal 1	CRCT1	5,05	Strukturell	b/b
94	Chromosome 1 open reading frame 68	C1orf68	5,04	Unbekannt	b/b
95	Epithelial splicing regulatory protein 1	ESRP1	5,03	RNA-Bindung/Stoffwechsel	b/b
96	Intermediate filament family orphan 2	IFFO2	4,99	Zytoskelett	n/n
97	Tuftelin 1	TUFT1	4,97	Zellzyklus	b/b
98	Chromosome 19 open reading frame 33	C19orf33	4,92	Apoptose	b/n
99	Keratin 25	KRT25	4,88	Keratin	b/b
100	S100 calcium binding protein A2	S100A2	4,86	Signaling	b/b
109	G protein-coupled receptor 87	GPR87	4,55	Rezeptor	b/n

Zur näheren Charakterisierung der Top 10 der hautspezifischen Gene wurden deren relative Expressionsraten in allen 105 verschiedenen Organen und Geweben grafisch dargestellt (Abb. 4). Hierbei wird deutlich, dass für Dermcidin (DCD) ebenso wie für Keratin 2A (KRT2A), Secretoglobin 2A2 (SCGB2A2), Keratin77 (KRT77), Late cornified envelope 2B (LCE2B) und Late cornified envelope 1B (LCE1B) die höchsten relativen Expressionsraten in der Haut (Gewebekategorie „Struktur“ (ST)) zu verzeichnen sind, während für Filaggrin 2 (FLG2), Desmocollin 1 (DSC1), Filaggrin (FLG) und Loricrin (LOR) die relativen Expressionsraten in der Haut nach den ebenfalls Haut enthaltenden Reproduktionsorganen (z.B. Vulva, Brustwarze, Penis; Kategorie „Reproduktion“ (RP)) an zweiter Stelle stehen. Secretoglobin 2A2 (Abb. 4C) und Filaggrin (Abb. 4F) sind hingegen zu einem deutlich geringeren Anteil auch im Intestinum (IN) vertreten.

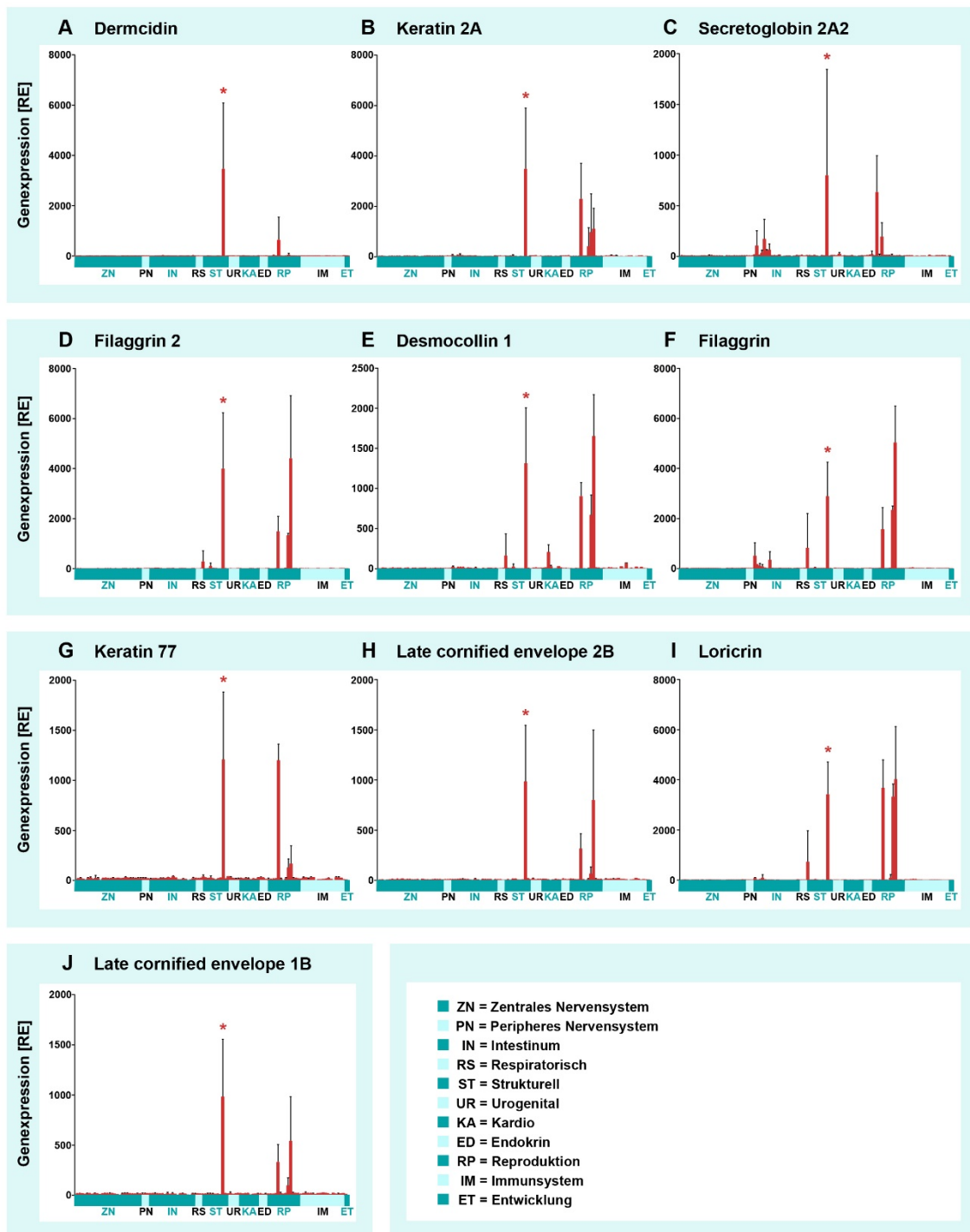


Abb. 4 BIGE-Expressionsprofile ausgewählter humaner hautspezifischer Gene. Affymetrix[®] GeneChip-Daten für die Top 10 SAGs als Mittelwerte der normalisierten Durchschnittsintensität \pm Standardabweichung (y-Achse), aufgetragen gegen die korrespondierenden Proben von 105 humanen Gewebe- und Zelltypen, angeordnet nach Annotation (x-Achse). **(A)** Dermcidin (DCD), **(B)** Keratin 2A (KRT2A), **(C)** Secretoglobin 2A2 (SCGB2A2), **(D)** Filaggrin 2 (FLG2), **(E)** Desmocollin 1 (DSC1), **(F)** Filaggrin (FLG), **(G)** Keratin 77 (KRT77), **(H)** Late cornified envelope 2B (LCE2B), **(I)** Loricrin (LOR), **(J)** Late cornified envelope 1B (LCE1B). Sternchen (*) markiert Haut. RE: Relative Einheiten.

Für die im nächsten Kapitel näher charakterisierten neuen hautspezifischen Gene wurde, analog zu den zuvor beschriebenen Top 10-Genen, ebenfalls deren relative Expression in allen Organen und Geweben des BIGE grafisch dargestellt (Abb. 5). Die Gene wurden drei Kontrollgenen, Aldolase B (ALDOB), Dermcidin (DCD) und Keratin 1 (KRT1) gegenübergestellt: ALDOB wird in der Haut nicht exprimiert und diente als Negativkontrolle, während DCD und KRT1 als Positivkontrollen für die Haut eingesetzt wurden (Abb. 5B; siehe auch Abb. 4A).

Hier wird deutlich, dass für CDHR1 die höchste relative Expressionsrate in der Haut zu verzeichnen ist (Abb. 5H), während für die Positivkontrolle KRT1 (Abb. 5C) ebenso wie für WFDC5, TMEM45A, GPR115 und SERPINB7 die relativen Expressionsraten in der Haut nach den ebenfalls Haut enthaltenden Reproduktionsorganen an zweiter Stelle stehen. C5orf46 (Abb. 5J) und GPR87 (Abb. 5K) sind hingegen in erheblichem Maße auch im Intestinum vertreten, MUCL1 zusätzlich noch in der Kategorie „Immunsystem“ (Abb. 5D).

Wie zu erwarten, zeigte ALDOB (Abb. 5A) als Negativkontrolle keine Expression in Haut oder Haut enthaltenden Reproduktionsorganen.

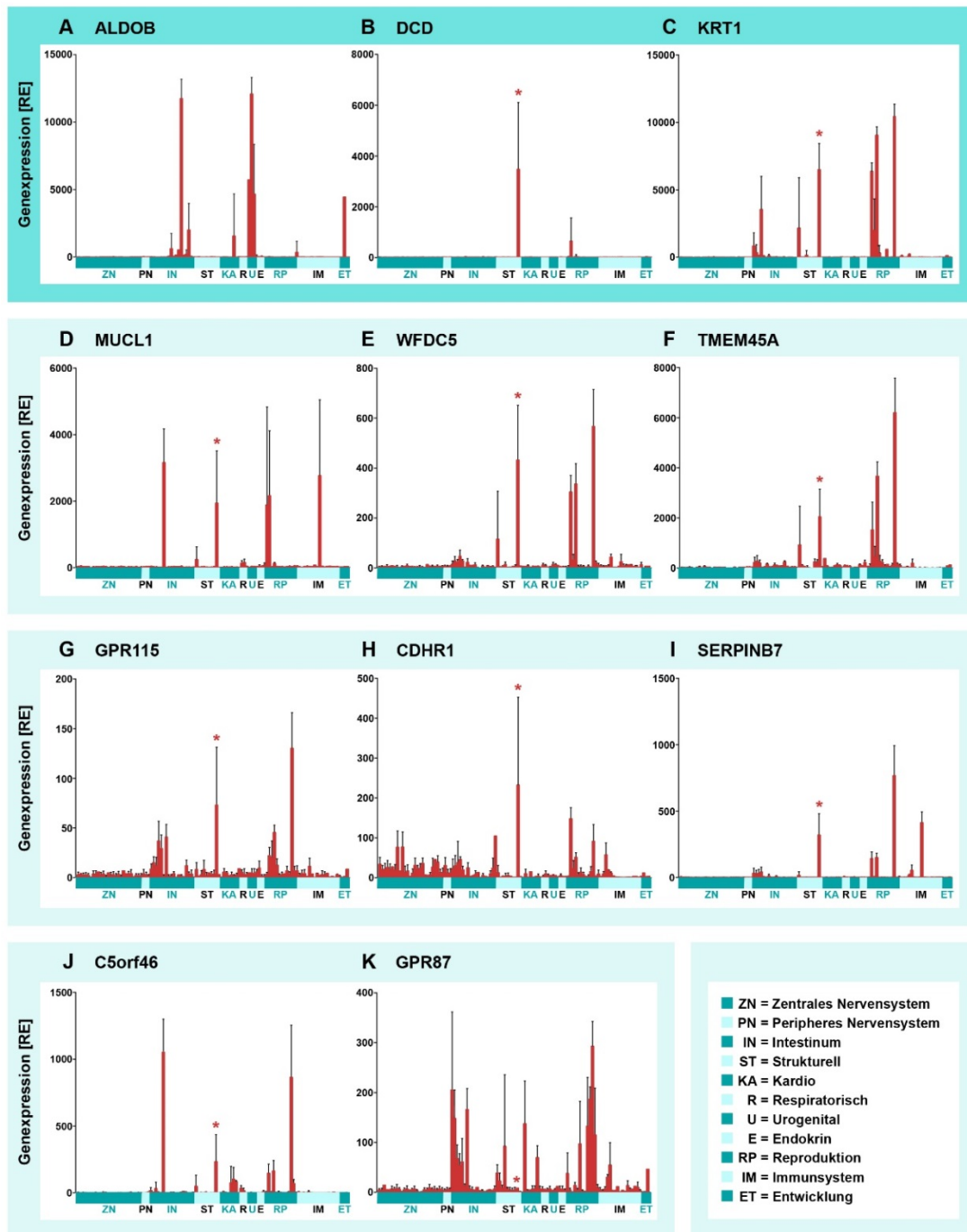


Abb. 5 BIGE-Expressionsprofile von drei Kontrollgenen (A-C) und acht ausgewählten humanen hautspezifischen Genen (D-K). Affymetrix® GeneChip-Daten als Mittelwerte der normalisierten Durchschnittsintensität \pm Standardabweichung (y-Achse), aufgetragen gegen die korrespondierenden Proben von 105 humanen Gewebe- und Zelltypen, angeordnet nach Annotation (x-Achse). **(A)** Aldolase B (ALDOB), **(B)** Dermcidin (DCD), **(C)** Keratin 1 (KRT1), **(D)** *Mucin-like 1* (MUCL1), **(E)** *WAP four disulfide core domain 5* (WFDC5), **(F)** Transmembranprotein 45A (TMEM45A), **(G)** G-Protein-gekoppelter Rezeptor 115 (GPR115), **(H)** *Cadherin-related family member 1* (CDHR1), **(I)** *Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 7* (SERPINB7), **(J)** *Chromosome 5 open reading frame 46* (C5orf46), **(K)** G-Protein-gekoppelter Rezeptor 87 (GPR87). Sternchen (*) markiert Haut. RE: Relative Einheiten.

In einer weiteren Untersuchung wurden die Gene jeweils denjenigen zehn wichtigsten Geweben bzw. Zelltypen zugeordnet, in denen die höchsten Expressionsraten zu verzeichnen waren (Abb. 6). Gezeigt werden die aus Abb. 5 bekannten Kontrollgene ALDOB, DCD und KRT1, ebenso wie weitere Gene aus der Top 10 Liste, sowie sieben der ausgewählten und in Folge näher beschriebenen neuen Hautgene. Analog zu den in Abb. 5 beschriebenen Ergebnissen ist die relative Expressionsrate für DCD in der Haut am höchsten, gefolgt von Brustwarze, Penis und Vulva (also Haut enthaltenden Reproduktionsorganen), während sich für KRT1 die Haut nach Vulva, Penis und Brustwarze auf Rang 4 befindet.

Für die zehn am höchsten exprimierten Gene aus der Liste [Keratin 2A (KRT2A), Secretoglobin 2A2 (SCGB2A2), Filaggrin 2 (FLG2), Desmocollin 1 (DSC1), Filaggrin (FLG), Keratin 77 (KRT77), Late cornified envelope 2B (LCE2B), Loricrin (LOR) und Late cornified envelope 1B (LCE1B)] sind die Expressionsraten in der Haut am höchsten, gefolgt von unterschiedlichen Haut enthaltenden Reproduktionsorganen. Auch die neuen Hautgene WFDC5, TMEM45A, GPR115, CDHR1 und SERPINB7 werden hauptsächlich in Haut oder Haut enthaltenden Organen exprimiert, während die Gene MUCL1 und C5orf46 vor der Haut auf Rang 3 auch in der Speicheldrüse exprimiert werden. MUCL1 wird vor allem in aktivierten Monozyten exprimiert (siehe auch Abb. 5D).

ALDOB		DCD		KRT1	
R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.
1 Nierenrinde	10985	1 Haut	6351	1 Vulva	13339
2 Leber	10696	2 Brustwarze	799	2 Penis	13036
3 Niere	8106	3 Penis	395	3 Brustwarze	11223
4 Nierenmark	6266	4 Vulva	83	4 Haut	7683
5 Fetale Leber	4376	5 Jejunum	70	5 Mundschleimhaut	3470
6 Dünndarm	3594	6 Monozyten (ruhend)	67	6 Körperfett	3242
7 Aorta	1631	7 Monozyten (aktiviert)	64	7 Vagina	2544
8 Jejunum	1088	8 Fetale Leber	64	8 Zunge	1216
9 Magenfundus	615	9 Skelettmuskeln	57	9 Uterus	706
10 Prostata	460	10 Niere	56	10 Zunge/Meckelknorpel	564

KRT2A		SCGB2A2		FLG2		DSC1	
R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.
1 Haut	5951	1 Haut	1291	1 Penis	2978	1 Penis	1907
2 Brustwarze	3724	2 Brustdrüse	1089	2 Haut	2893	2 Haut	1848
3 Penis	2042	3 Superior lingualis	270	3 Vulva	1606	3 Brustwarze	1267
4 Vulva	1437	4 Brustwarze	251	4 Brustwarze	1114	4 Vulva	1113
5 Vagina	731	5 Rachenschleimhaut	142	5 Körperfett	200	5 Herzvorhof	266
6 Zunge	128	6 Ösophagus	68	6 Zunge	25	6 Körperfett	211
7 Mundschleimhaut	93	7 Penis	57	7 Zunge/Meckelknorpel	17	7 CD8+ T-Zellen	98
8 B-Zellen (ruhend)	91	8 Speicheldrüse	51	8 Ventrales Tegmentum	15	8 Hohlvene	48
9 Zunge/Meckelknorpel	91	9 Zunge	38	9 Stria medullaris	15	9 Herz	44
10 Tonsille	85	10 Harnröhre	24	10 Monozyten (ruhend)	15	10 T-Zellen (ruhend)	43

FLG		KRT77		LCE2B		LOR	
R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.
1 Penis	2491	1 Haut	1098	1 Haut	817	1 Vulva	5800
2 Vulva	2276	2 Brustwarze	1097	2 Penis	556	2 Brustwarze	4967
3 Haut	1861	3 Vulva	123	3 Brustwarze	331	3 Haut	4488
4 Brustwarze	1091	4 Penis	116	4 Vulva	78	4 Penis	4339
5 Körperfett	623	5 Stria medullaris	55	5 Monozyten (ruhend)	43	5 Körperfett	925
6 Mundschleimhaut	313	6 Körperfett	52	6 T-Zellen (aktiviert)	43	6 Zunge	248
7 Ösophagus	186	7 Thymusdrüse	51	7 B-Zellen (ruhend)	40	7 Vagina	181
8 Rachenschleimhaut	126	8 B-Zellen (ruhend)	51	8 T-Zellen (ruhend)	38	8 Mundschleimhaut	164
9 Zunge	81	9 Monozyten (aktiviert)	46	9 Hohlvene	35	9 T-Zellen (ruhend)	78
10 Zunge/Meckelknorpel	81	10 T-Zellen (ruhend)	45	10 Monozyten (aktiviert)	35	10 Pankreas	77

LCE1B		MUCL1		WFDC5		TMEM45A	
R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.
1 Haut	958	1 Monozyten (aktiviert)	2536	1 Penis	539	1 Vulva	3673
2 Penis	700	2 Speicheldrüse	2178	2 Haut	472	2 Penis	3640
3 Brustwarze	417	3 Haut	2088	3 Vulva	411	3 Brustwarze	1685
4 Vulva	127	4 Brustwarze	1959	4 Brustwarze	394	4 Haut	1635
5 B-Zellen (ruhend)	51	5 Brustdrüse	698	5 Körperfett	162	5 Körperfett	1031
6 Hohlvene	50	6 Körperfett	288	6 Mundschleimhaut	57	6 Perikard	550
7 Vermis cerebelli	50	7 Vulva	212	7 Tonsille	50	7 Vagina	474
8 Monozyten (aktiviert)	49	8 PBMC (aktiviert)	162	8 Zunge/Meckelknorpel	44	8 Zunge/Meckelknorpel	335
9 Stria medullaris	47	9 Bronchus	162	9 Rachenschleimhaut	44	9 Zervix	264
10 Cerebellum	46	10 Trachea	137	10 Superior lingualis	38	10 Zunge	260

GPR115		CDHR1		SERPIN7		C5orf46	
R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.	R. Gewebe	Expre.
1 Penis	86	1 Haut	464	1 Penis	621	1 Speicheldrüse	1588
2 Haut	70	2 Brustwarze	220	2 Haut	354	2 Penis	1108
3 Vulva	39	3 Colon	163	3 Monozyten (aktiviert)	350	3 Haut	467
4 Ösophagus	24	4 Nucleus accumbens	141	4 Vulva	211	4 Brustwarze	303
5 Rachenschleimhaut	23	5 Putamen	132	5 Brustwarze	176	5 Vulva	295
6 Mundschleimhaut	20	6 Vulva	121	6 Zunge	87	6 Aorta	193
7 Brustwarze	18	7 Penis	111	7 Mundschleimhaut	78	7 Stammvene	167
8 Vagina	16	8 Pons	110	8 Tonsille	77	8 Koronararterie	139
9 Zunge/Meckelknorpel	12	9 Mundschleimhaut	104	9 Zunge/Meckelknorpel	75	9 Hoden	128
10 Zervix	10	10 Mittelhirn	81	10 Superior lingualis	65	10 Körperfett	113

Abb. 6 Top 10 Gewebe oder Zelltypen mit den höchsten SAG-Expressionsraten.

Aufgenommen wurden die Kontrollgene (ALDOB, DCD, KRT1) bzw. Top 10 Gene sowie die ausgewählten hautspezifischen Gene aus der Top 100-Liste nach Rang.

R. = Rang; Expre. = Expression

5.4 Charakterisierung ausgewählter hautspezifischer Gene

Für weiterführende Untersuchungen wurden, wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, acht wenig charakterisierte hautspezifische Gene ausgewählt, denen eine potenzielle diagnostische und/oder therapeutische Relevanz zugerechnet werden kann. Die relativen Expressionsraten dieser Kandidaten in der Haut gegenüber der Expression in allen anderen Organen liegen bei Ratios zwischen 4,6 für den G-Protein-gekoppelten Rezeptor 87 (GPR87; Rang 109) und 12,4 für *Mucin-like 1* (MUCL1; Rang 16) (Tab. 8). Vier der Gene, d.h. MUCL1, WFDC5 (Rang 22), SERPINB7 (Rang 52) und C5orf46 (Rang 73), kodieren für Proteine mit N-terminalen Signalsequenzen, während die restlichen vier Gene, d.h. TMEM45A (Rang 32), GPR115 (Rang 39), CDHR1 (Rang 41) und GPR87 (Rang 109) aufgrund ihrer Bezeichnung bzw. Funktion (Tab. 8) Membran-assoziiert sind.

Mit Hilfe der quantitativen PCR konnte sowohl für die acht ausgewählten sowie für zwei etablierte Hautmarker (DCD (Rang 1) und KRT1 (Rang 15)) eine spezifische Expression in elf unabhängigen normalen humanen Hautproben gegenüber anderen Organen gezeigt und somit die Validität und Qualität der DNA-Microarray-Analysen nachgewiesen werden (Abb. 7). Darüber hinaus zeigt das als Negativkontrolle genutzte Gen Aldolase B (ALDOB) eine spezifische Expression in Niere und Leber, sowie keine Expression in Milz, Gehirn und insbesondere in der Haut (Abb. 7A).

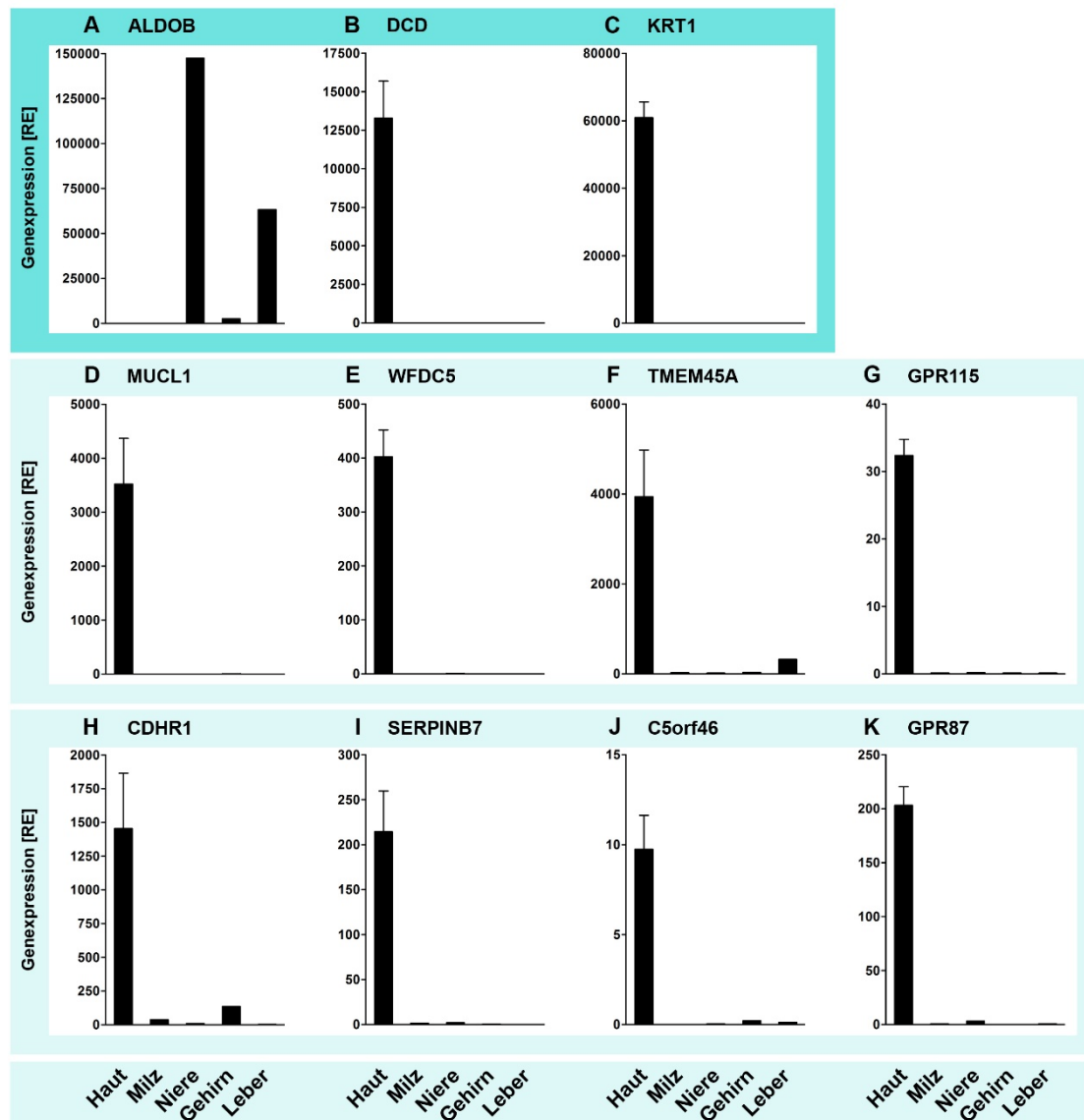


Abb. 7 Semi-quantitative PCR kaum charakterisierter hautspezifischer Gene und Kontrollgene (Gesamt-RNA aus gesunder Haut). Expression ausgewählter SAGs sowie von Kontrollgenen (A-C) in gesunder Haut (jeweils Durchschnittswerte von elf unabhängigen Proben) und gepoolter Gesamt-RNA jeweils aus Milz, Niere, Gehirn und Leber. **(A)** Aldolase B (ALDOB), **(B)** Dermcidin (DCD), **(C)** Keratin1 (KRT1), **(D)** *Mucin-like 1* (MUCL1), **(E)** *WAP four disulfide core domain 5* (WFDC5), **(F)** Transmembranprotein 45A (TMEM45A), **(G)** G-Protein-gekoppelter Rezeptor 115 (GPR115), **(H)** Cadherin-related family member 1 (CDHR1), **(I)** *Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 7* (SERPINB7), **(J)** *Chromosome 5 open reading frame 46* (C5orf46), **(K)** G-Protein-gekoppelter Rezeptor 87 (GPR87). Werte relativ zum Kontrollgen (18S rRNA). Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler. RE: Relative Einheiten.

Zusätzlich wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR die Expression der acht ausgewählten Gene in strukturellen Zellen der Haut untersucht (Abb. 8). So wurden GPR87, GPR115, SERPINB7 und WFDC5 ausschließlich durch Keratinozyten (PHKs) exprimiert. TMEM45A wurde darüber hinaus auch durch Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert, CDHR1 hingegen in Keratinozyten und PBMCs. DCD, C5orf46 und MUCL1 wurden in den getesteten Hautzellen nicht exprimiert. Auch KRT1 wurde nur auf niedrigem Niveau in Keratinozyten exprimiert, während die Negativkontrolle ALDOB in den untersuchten Zelltypen nicht detektiert werden konnte.

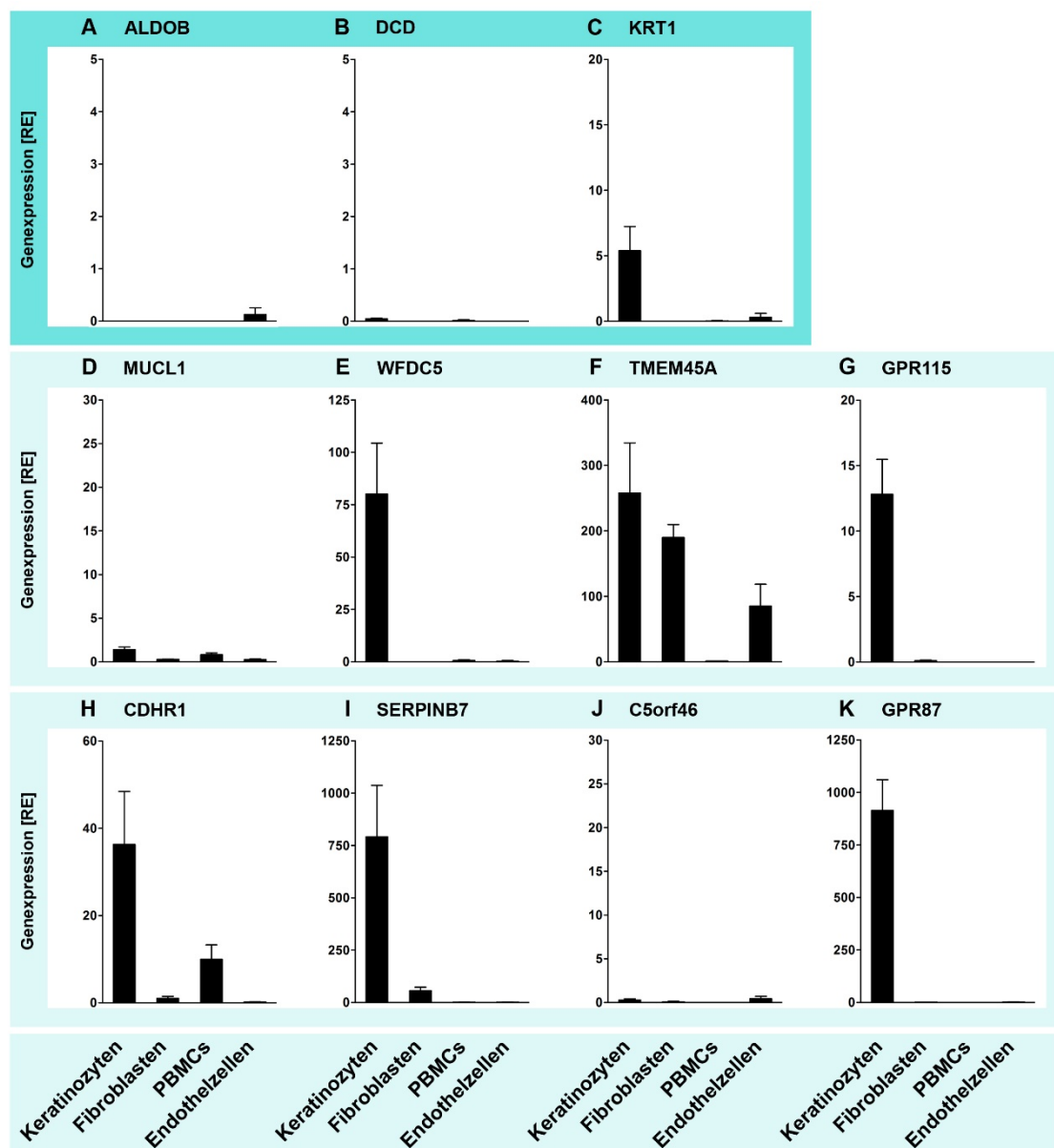


Abb. 8 Semi-quantitative RT-PCR kaum charakterisierter hautspezifischer Gene und Kontrollgene (Zelllinien aus humaner Haut). Expression ausgewählter SAGs sowie von Kontrollgenen (A-C) in epidermalen Keratinozyten (n=9), dermalen Fibroblasten (n=7), peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) (n=3) und dermalen Endothelzellen (n=2). **(A)** Aldolase B (ALDOB), **(B)** Dermcidin (DCD), **(C)** Keratin1 (KRT1), **(D)** *Mucin-like 1* (MUCL1), **(E)** *WAP four disulfide core domain 5* (WFDC5), **(F)** Transmembranprotein 45A (TMEM45A), **(G)** G-Protein-gekoppelter Rezeptor 115 (GPR115), **(H)** Cadherin-related family member 1 (CDHR1), **(I)** *Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 7* (SERPINB7), **(J)** *Chromosome 5 open reading frame 46* (C5orf46), **(K)** G-Protein-gekoppelter Rezeptor 87 (GPR87). Werte relativ zum Kontrollgen (18S rRNA). Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler. RE: Relative Einheiten.

In einem nächsten Schritt wurde die Expression von WFDC5, TMEM45A und GPR115 auf Proteinebene durch Immunohistochemie in gesunden Hautschnitten bestätigt (Abb. 9). Die Färbung von WFDC5 zeigte eine deutliche Lokalisation im Cytoplasma von Keratinozyten im gesamten Stratum basale (SB), Stratum spinosum (SS) und Stratum granulosum (SG) der Epidermis. Im Stratum corneum (SC) blieb die Expression auf die äußerste Schicht beschränkt. Darüber hinaus zeigte sich eine zusätzliche Anfärbung von Endothelzellen der kleinen Gefäße in der Dermis (Abb. 9A). Auch TMEM45A wurde in der Epidermis exprimiert und zeigte einen Intensitätsanstieg vom SB zum SC (Abb. 9D). TMEM45A konnte ebenso in dermalen Fibroblasten detektiert werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung auf Genexpressionsebene (Abb. 8F). GPR115 zeigte eine schwache Expression im SB und eine deutliche Expression sowohl im SG als auch SC.

Die Keratinozyten-spezifische Expression auf Proteinebene wurde letztendlich für alle drei Gene mittels Western Blot-Analysen bestätigt. Lysate primärer epidermaler Keratinozyten zeigten Banden für WFDC5 (13 kDa), TMEM45A (32 kDa) und GPR115 (77 kDa). β -Aktin wurde jeweils als Positivkontrolle eingesetzt (Abb. 9C, F, I).

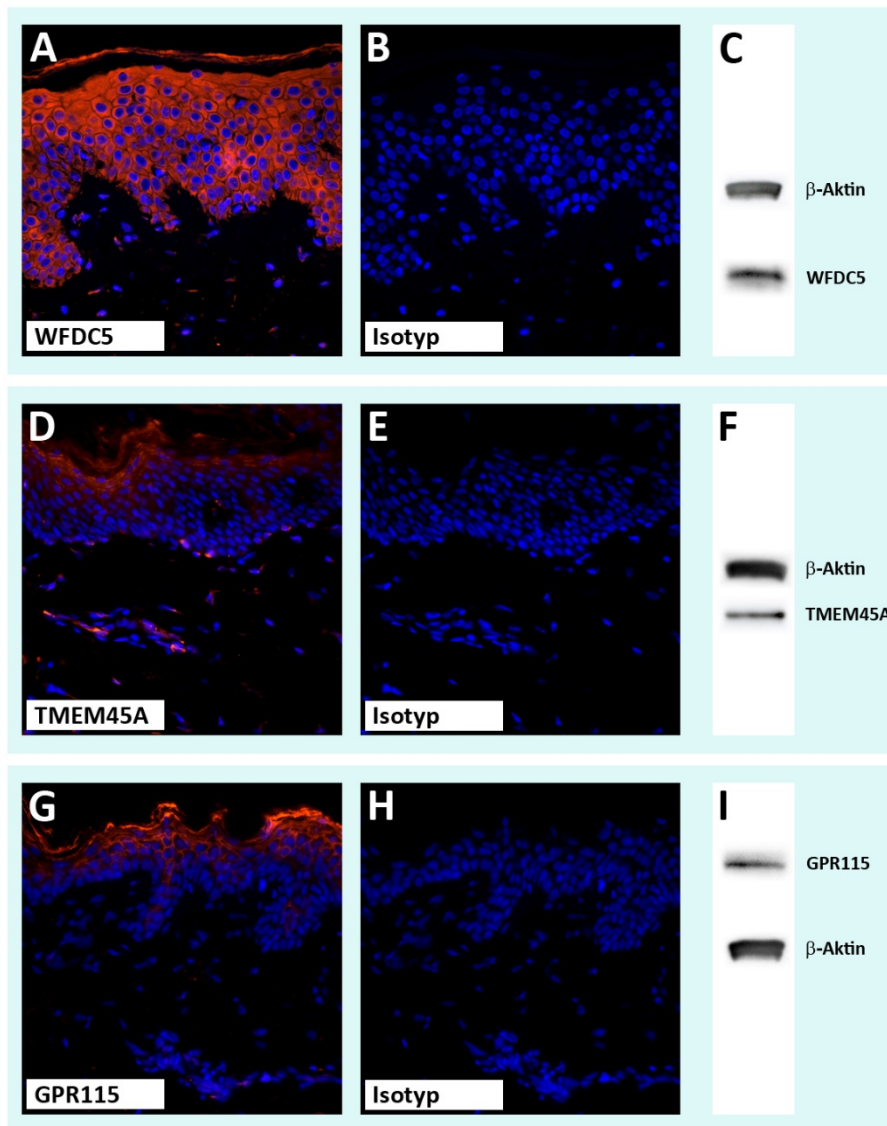


Abb. 9 Lokalisation und Proteinexpression kaum charakterisierter hautspezifischer Gene in gesunder humaner Haut. Konsekutive Schnitte (Formalin-Fixierung, Paraffineinbettung) gesunder humaner Haut wurden mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen (A) WFDC5, (D) TMEM45A und (G) GPR115 bzw. Isotypkontrolle HRP-konjugierter Antikörper (B, E, H), sowie mit DAPI (Kernfärbung; blau) gefärbt. Proteinexpression in Lysaten primärer epidermaler Keratinozyten mittels Western Blot für (C) WFDC5, (F) TMEM45A, (I) GPR115 und β -Aktin (Kontrolle). Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind 400-fach vergrößert dargestellt.

Um die funktionelle Regulation der ausgewählten SAGs auf zellulärer Ebene näher zu untersuchen, wurden primäre humane Keratinozyten *in vitro* mit einer Reihe dermatologisch relevanter Mediatoren stimuliert, darunter GM-CSF, TNF- α /IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-31, IL-17 und IL-22. Quantitative RT-PCR-Untersuchungen zeigten spezifische Regulationsmuster für die meisten der unter-

suchten SAGs (Abb. 10). Da C5orf46 in primären Keratinozyten keine Expression zeigte (Abb. 8J), wurde dieses Gen von obiger Analyse ausgeschlossen. MUCL1 wurde durch IL-31 signifikant supprimiert (Abb. 10A). WFDC5 zeigte eine deutliche und signifikante Induktion durch TNF- α /IL1- β (Abb. 10B). Die Expression von TMEM45A wurde durch IFN- γ ebenso wie von IL-31 signifikant supprimiert (Abb. 10C), während die Expression von GPR115 vor allem durch TNF- α /IL1- β , IFN- γ , IL-4, IL-13 und IL-31 gemindert wurde (Abb. 10D). Die CDHR1-Expression wurde durch IFN- γ supprimiert, während eine deutliche Induktion durch IL-31 und IL-22 beobachtet werden konnte (Abb. 10E). Die Expression von SERPINB7 wurde in deutlichem Maße durch IFN- γ und IL-4 positiv beeinflusst (Abb. 10F). GPR87 hingegen wurde vor allem durch IL-4 und IL-22 induziert, während die TNF- α /IL1- β -Stimulation eine signifikante Suppression zur Folge hatte (Abb. 10G).

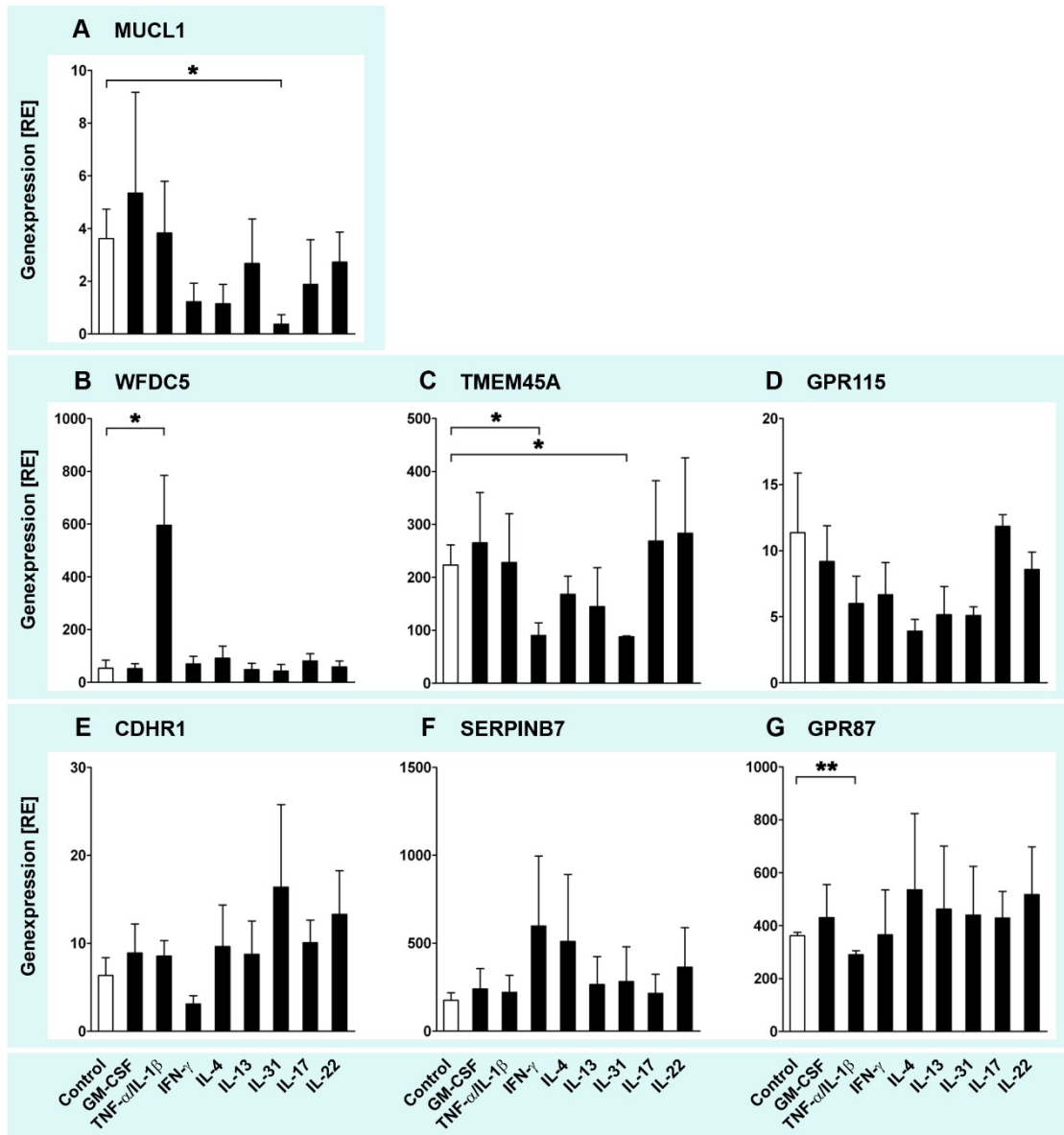


Abb. 10 In vitro-Regulation kaum charakterisierter hautspezifischer Gene in primären humanen Keratinozyten. Regulation ausgewählter, Keratinozyten-spezifisch exprimierter SAGs durch GM-CSF (50 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) + IL-1 β (5 ng/ml), IFN- γ (50 ng/ml), IL-4 (50 ng/ml), IL-13 (100 ng/ml), IL-31 (10 ng/ml), IL-17 (50 ng/ml), IL-22 (50 ng/ml) oder Medium-Kontrollen. Analysen erfolgten mittels semi-quantitativer PCR nach Inkubation über 24 h. **(A)** *Mucin-like 1* (MUCL1), **(B)** *WAP four disulfide core domain 5* (WFDC5), **(C)** Transmembranprotein 45A (TMEM45A), **(D)** G-Protein-gekoppelter Rezeptor 115 (GPR115), **(E)** *Cadherin-related family member 1* (CDHR1), **(F)** *Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 7* (SERPINB7), **(G)** G-Protein-gekoppelter Rezeptor 87 (GPR87). Die Expression von *Chromosome 5 open reading frame 46* (C5orf46) wurde in Keratinozyten nicht detektiert. Expression relativ zum Kontrollgen (18S rRNA). Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Student's t-test). RE: Relative Einheiten.

Um festzustellen, ob die ausgewählten SAGs als krankheitsspezifische Marker dienen können, wurden Expressionsanalysen in gesunder Haut (GH) und verschiedenen Hautkrankheiten durchgeführt, darunter Psoriasis vulgaris (PV), atopische Dermatitis (AD), Prurigo nodularis (PN), Lupus erythematoses (LE), Lichen planus (LP), Basalzellkarzinom (BCC), aktinische Keratose (AK) und Plattenepithelkarzinom (SCC) (Abb. 11).

MUCL1 wurde dabei im Lupus erythematoses signifikant induziert (Abb. 11A), während WFDC5 in Psoriasis vulgaris signifikant induziert wurde, gefolgt von aktinischer Keratose und atopischer Dermatitis (Abb. 11B). TMEM45A zeigte durch signifikante Hochregulation ebenfalls Assoziationen zu Psoriasis vulgaris und aktinischer Keratose (Abb. 11C). GPR115 zeigte eine signifikante Induktion in entzündlichen Hauterkrankungen wie der Psoriasis vulgaris und der atopischen Dermatitis, sowie eine signifikante Suppression im Plattenepithelkarzinom (Abb. 11D). Der zweite G-Protein-gekoppelte Rezeptor, GPR87, wurde hingegen in Psoriasis vulgaris und aktinischer Keratose überexprimiert (Abb. 11H). Für den Proteinaseinhibitor SERPINB7 zeigte sich eine signifikante Suppression bei Psoriasis vulgaris und Plattenepithelkarzinom (Abb. 11F), C5orf46 wurde in Psoriasis vulgaris und atopischer Dermatitis signifikant herunterreguliert (Abb. 11G). Für CDHR1 zeigte sich bei jeder der untersuchten Hauterkrankungen eine signifikante Suppression, mit Ausnahme von Prurigo nodularis (Abb. 11E).

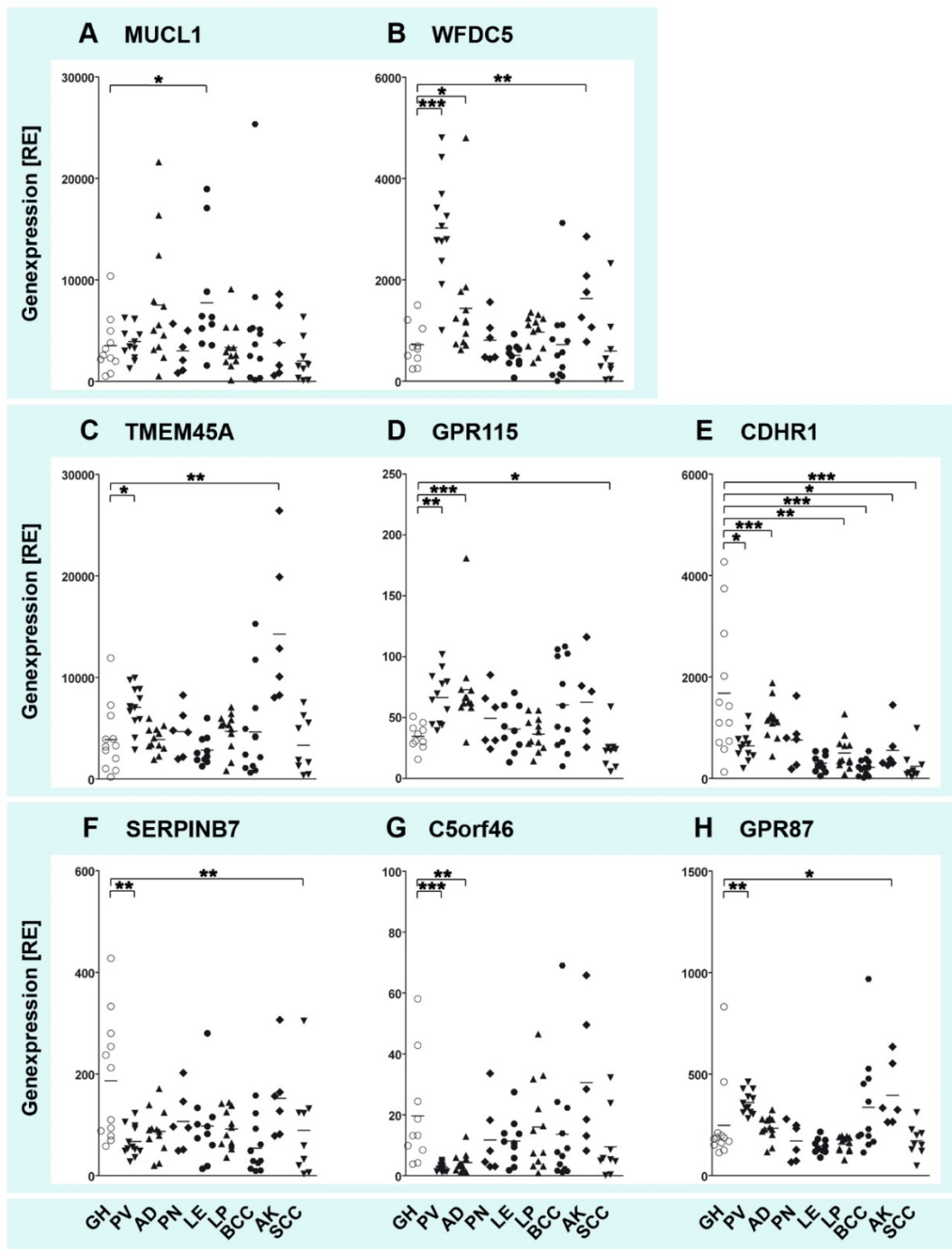


Abb. 11 Semi-quantitative PCR kaum charakterisierter hautspezifischer Gene von gesunder Haut vs. Hautkrankheiten. Expression ausgewählter SAGs in gesunder Haut (GH) sowie Psoriasis vulgaris (PV), Atopische Dermatitis (AD), Prurigo nodularis (PN), Lupus erythematosus (LE), Lichen planus (LP), Basalzellkarzinom (BCC), Aktinische Keratose (AK) und Plattenepithelkarzinom (SCC). **(A)** *Mucin-like 1* (MUCL1), **(B)** *WAP four disulfide core domain 5* (WFDC5), **(C)** Transmembranprotein 45A (TMEM45A), **(D)** G-Protein-gekoppelter Rezeptor 115 (GPR115), **(E)** *Cadherin-related family member 1* (CDHR1), **(F)** *Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 7* (SERPINB7), **(G)** *Chromosome 5 open reading frame 46* (C5orf46), **(H)** G-Protein-gekoppelter Rezeptor 87 (GPR87). Expression relativ zum Kontrollgen (18S rRNA). Daten zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Mann-Whitney-U test). RE: Relative Einheiten.

6 Diskussion

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde ein genomweiter Microarray-Datensatz, der sogenannte *Body Index of Gene Expression* (BIGE), analysiert, um solche Gene zu identifizieren, die höchste gewebespezifische Expression im Organ Haut aufweisen. Hierbei wurden 687 Gene identifiziert, die gegenüber allen anderen Geweben eine $\geq 2,0$ -fach höhere Expression aufweisen und als haut-spezifische Gene, *Skin Associated Genes* (SAGs), definiert wurden. Eine genaue Analyse dieser 687 SAGs zeigt, dass etwa 20% bis dato weitestgehend unbekannt waren. Bioinformatische Analysen zeigen ferner auf, dass eine Vielzahl an haut-spezifischen Genen identifiziert wurde, deren Funktion sowohl mit der kutanen Hautbarriere als auch dem angeborenen oder erworbenen Immunsystem assoziiert ist. Dabei zeigte sich, dass die Expression vieler SAGs nicht auf die Haut beschränkt ist, sondern ebenfalls hohe Expressionsraten in Brustwarze, Penis, Vulva oder dem Ösophagus detektiert werden konnten. Einzelne Gene besitzen gemeinsame Expressionsmuster, die sehr wahrscheinlich auf ein konserviertes Genexpressionsprogramm in diesen Barriereorganen hindeuten. Abweichende Expressionsraten bestimmter SAGs in verschiedenen Proben bzw. Barriereorganen könnten sich aber auch durch qualitative Unterschiede in diversen Arealen des Integuments wie etwa Haut, Brustwarze oder Penis erklären, je nachdem, ob Haarfollikel, Schweißdrüsen oder deutlich verhornte epidermale Schichten vorhanden sind. Mit Hilfe der DAVID-Analyse konnten die detektierten SAGs zu 45% den vier großen Genklassen in der Datenbank (*Metabolismus*, *Genexpression*, *Signalübertragung* und *Proteinmetabolismus/-Trafficking*) zugeordnet werden. Dies zeigt deutlich, dass selbst normale Haut ein hochaktives Gewebe darstellt, während andere funktionelle Klassen die Barrierefunktion der Haut widerspiegeln. Viele der Zelladhäsionsgene kodieren für Desmosomen- und *Tight junction*-Komponenten (Franke, 2009), die mit Zytoskelettfilamenten assoziiert sind. Diese wiederum bilden die verhornte schuppenartige Zellschicht der humanen Haut. Eine große Zahl an Genen, die im humanen Genlokus 1q21, dem sogenannten Epidermis-Differenzierungskomplex-Lokus geclustert sind, kodieren für Komponenten der verhornten Zelloberfläche und Intermediärfilament-assoziierte sowie Kalzium-bindende Proteine (Mischke et al., 1996; Volz et al., 1993). Während also viele Gene eine Rolle in der Barrierefunktion der Haut spielen, sind andere an diversen Hautfunktions-

störungen beteiligt (Hoffjan and Stemmler, 2007). Vor allem die Hautbarriere ist deshalb von zentraler Bedeutung, da sie den Körper vor Wasserverlust schützt und zusätzlich verhindert, dass Bakterien, Viren oder andere unerwünschte Stoffe in die Haut eindringen.

Auffällig ist, dass die Expression vieler bekannter SAGs auf die Haarfollikel beschränkt ist. Andere Arbeitsgruppen haben die Genexpression in den Haarfollikeln mittels Lasermikrodissektion (LCM) untersucht, allerdings wurden Genomweite Microarrays wie in dieser Arbeit bisher nicht verwendet (Kim et al., 2006; Ohyama et al., 2006). *Ohyama et al.* beschreiben, dass eine große Zahl an Genen in der Wulstregion des Haarfollikels exprimiert wird (Ohyama et al., 2006). Die ungewöhnlich hohe Anzahl an Genen, die für metabolische Enzyme kodieren, kann möglicherweise durch die Anwesenheit von Talgdrüsen erklärt werden, die lipidreiches Sebum sekretieren. Mehrere der identifizierten Gene, darunter SCGB2A2 (Rang 3) und CST6 (Rang 13), wurden in den Schweißdrüsen lokalisiert (Sjodin et al., 2003; Zeeuwen et al., 2009).

Desweiteren konnten 37 Gene identifiziert werden, die mit Abwehrmechanismen der Haut assoziiert sind. Darunter fanden sich viele Gene, die zuvor mit angeborenen oder adaptiven Immunantworten in Zusammenhang gebracht wurden, sowie mehrere Gene, die für antimikrobielle Peptide (AMPs) kodieren. Die Expression dieser Gene in normaler Haut suggeriert eine sehr aktive Kontrolle des Mikrobioms, die in gesunder Haut dafür zuständig ist, bakterielle, virale oder Pilz-bedingte Infektionen zu verhindern.

Das am stärksten exprimierte hautspezifische Gen, Dermcidin (DCD) (Ratio 55; Rang 1), ist ein gut charakterisiertes antimikrobielles Peptid, das durch ekkrine Schweißdrüsen produziert wird (Schitteck et al., 2001). Es reduziert die Gefahr von Hautinfektionen in den ersten Stunden nach einer bakteriellen Kolonisierung und bekämpft effektiv *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*. Zusätzlich ist DCD auch proteolytisch aktiv (Lee Motoyama et al., 2007). Das DCD-Gen kodiert dabei für ein multifunktionelles Vorläufer-Protein, das entweder in ein antimikrobiell aktives C-terminales, aus relativ wenigen Aminosäuren bestehendes Peptid gespalten wird, oder in ein N-terminales Peptid, das als pleiotroper löslicher Faktor agiert und mit Zellüberleben und Kachexie in Verbindung gebracht wird. Lediglich das C-

terminale Peptidfragment wird dabei in den humanen Schweiß sekretiert und als DCD-1 bezeichnet (Stewart et al., 2008).

Das am zweithäufigsten exprimierte Gen in der Haut, Keratin 2A (KRT2A) (Ratio 31; Rang 2), ist das am höchsten exprimierte der elf Keratin-Gene in der Top 100-Liste. Keratine sind Strukturproteine, die an der Bildung von Intermediärfilamenten beteiligt sind und der Zelle Stabilität und Form verleihen. Keratin kommt beim Menschen sowohl in der Epidermis als auch in Haaren und Nägeln vor. Eine kürzlich veröffentlichte Untersuchung zeigt dabei eine neue Funktion für das Protein Keratin an und unterstreicht neben der hier beobachteten hohen Expressionsrate seine Wichtigkeit für die menschliche Haut: Keratin-Fasern sorgen dafür, dass sich die Haut bei Wasseraufnahme ausdehnen kann, aber nach Trocknung auch die Möglichkeit besteht, sich wieder zusammenzuziehen. Gäbe es diese einer Spiralfeder ähnelnden Eigenschaft der Haut nicht, würde sie sich nach längerem Wasserkontakt nicht mehr zusammenziehen können (Evans and Roth, 2014). Besonders anschaulich ist dieser Prozess an den temporär faltigen und aufgequollenen Fingerkuppen während des Badens (Evans and Roth, 2014).

Transkripte der Proteine Filaggrin 2 (FLG2) (Ratio 29; Rang 4) (Wu et al., 2009) und Desmocollin 1 (DSC1) (Ratio 21; Rang 5), ein desmosomales Cadherin, sind in der Haut ebenfalls hoch angereichert. Beide Gene sind für die Formation der oben beschriebenen Hautbarriere notwendig (Garrod et al., 2002; Wu et al., 2009).

Zwei Mitglieder der Sekretoglobin-Gen-Familie, Sekretoglobin *Family 2A Member 2* (SCGB2A2, Ratio 30; Rang 3), auch bekannt als Mammaglobin 1, und Sekretoglobin *Family 1D Member 2* (SCGB1D2, Ratio 12; Rang 19), auch bekannt als Lipophilin B, werden in der Haut ebenfalls stark exprimiert. In der Brustdrüse wurde die spezifische Expression beider Sekretoglobine zum ersten Mal vor mehr als zehn Jahren beschrieben. Die Proteine wurden daraufhin als spezifische Biomarker des Mammakarzinoms propagiert, während ihre starke Expression in der Haut unbekannt blieb (Carter et al., 2002; Culleton et al., 2007; Li et al., 2011; Sjodin et al., 2003; Sjodin et al., 2008; Watson and Fleming, 1996).

Auch die Effekte von Hauterkrankungen auf die Serumspiegel von SCGB2A2 und SCGB1D2 sind bisher kaum untersucht worden (Gargano et al., 2006; Zafrakas et al., 2006). Während die Funktion dieser beiden Sekretoglobine in gesunden Geweben unklar bleibt, wirken andere Mitglieder der Familie, wie etwa das Uteroglobin, anti-inflammatorisch (Mukherjee et al., 2007; Ray et al., 2005; Yoon et al., 2010). Auffällig ist, dass SCGB1D2 auf hohem Niveau auch in der Tränenflüssigkeit exprimiert wird (Remington et al., 2008; Stoeckelhuber et al., 2006). Dies könnte auf eine protektive Wirkung entweder bei der Immunabwehr oder als Barriereprotein hindeuten (Remington et al., 2008). SCGB2A2 besitzt ähnliche BIGE-Expressionsprofile wie das oben beschriebene DCD mit hoher Expression in der Haut, aber relativ niedrige Expressionsraten in anderen Körperarealen. Da die Expression beider Gene auf ekkrine Schweißdrüsen beschränkt ist, deuten diese Daten möglicherweise auf die signifikanten Unterschiede bezüglich Vorkommen und Aufbau der Schweißdrüsen in unterschiedlichen Körperarealen hin, nämlich einer flächigen Verteilung ekkriner Schweißdrüsen gegenüber einer begrenzten, ortsspezifischen Verteilung apokriner Drüsen.

CCL27 (Rang 25) ist das am höchsten exprimierte immun-assoziierte Gen, das bisher identifiziert wurde. Es handelt sich dabei um ein hautspezifisches Chemokin, das durch epidermale basale Keratinozyten exprimiert wird und spezifische T-Zellen anlockt, die kutane Lymphozytenantigene tragen (CLA⁺ T-Zellen) (Homey et al., 2002). Es wird mit allergischen Reaktionen, Reizreaktionen und Atopischer Dermatitis in Verbindung gebracht (Kakinuma et al., 2003; Spiekstra et al., 2005). Ein anderes homöostatisches Chemokin, CXCL14, wird ebenfalls verstärkt in dermalen und mukösen Geweben exprimiert (Frederick et al., 2000; Meuter and Moser, 2008). Durch seine direkte mikrobizide Aktivität (Burkhardt et al., 2012; Maerki et al., 2009) spielt es möglicherweise bei der Kontrolle des Hautmikrobioms eine wichtige Rolle. Auch zwei Mitglieder der IL-1-Familie, IL-36G und IL-37, werden in der Haut deutlich exprimiert und übernehmen bei dermalen Immunantworten möglicherweise antagonistische Funktionen. Pro-inflammatorisches IL-36G induziert die Expression antimikrobieller Peptide durch Keratinozyten in der Psoriasis vulgaris (Johnston et al., 2011), während IL-37 als ein Repressor der angeborenen Immunantwort fungiert (Debets et al., 2001; Nold et al., 2010). Ein Gleichgewicht

dieser beiden Zytokine trägt möglicherweise zur kontrollierten Entzündungsreaktion in der Haut bei. Das IL-37-Gen ist aus evolutionärer Sicht ein recht junges Gen und kommt in der Maus nicht vor. Letzteres ist möglicherweise der Grund dafür, dass es bisher nicht mit der Haut assoziiert wurde. In einer Studie, in der IL-37 mit psoriatischer Arthritis in Verbindung gebracht wurde, konnte gezeigt werden, dass dieses Gen möglicherweise auch eine Rolle bei der Autoimmunität spielen könnte (Rahman et al., 2006).

Von großem Interesse sind in dieser Arbeit ausgewählte kaum charakterisierte Gene, die für hoch-exprimierte sekretierte oder Transmembran-Proteine kodieren. Für weiterführende Untersuchungen wurden schließlich acht Haut-spezifische Gene ausgewählt, denen aufgrund ihrer möglichen Rolle bei der Diagnose und/oder Behandlung von Hautkrankheiten eine potenzielle Bedeutung zugerechnet werden kann. Dabei handelt es sich um die Gene *Mucin-like 1* (MUCL1; Rang 16), *WAP four disulfide core domain 5* (WFDC5; Rang 22), Transmembranprotein 45A (TMEM45A; Rang 32), G-Protein-gekoppelter Rezeptor 115 (GPR115; Rang 39), *Cadherin-related family member 1* (CDHR1; Rang 41), *Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 7* (SERPINB7; Rang 52), *Chromosome 5 open reading frame 46* (C5orf46; Rang 73) und G-Protein-gekoppelter Rezeptor 87 (GPR87; Rang 109). Als Negativkontrolle für die Untersuchungen wurde Aldolase B (ALDOB) ausgewählt, denn die zuvor publizierte deutliche Expression in Niere und Leber konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, während ALDOB in Milz, Gehirn oder Haut nicht exprimiert wird (Gregori et al., 1998).

Da Keratinozyten mit einem Anteil von mehr als 90% die dominante Zellpopulation der Haut darstellen (Lulevich et al., 2010; Sun et al., 1979), ist letztendlich nicht überraschend, dass die vier Gene WFDC5, GPR115, SERPINB7 und GPR87 überwiegend von Keratinozyten exprimiert werden. Im Gegensatz dazu konnten DCD, MUCL1 oder C5orf46 – hierbei handelt es sich um einen offenen Leserahmen mit bis dato unbekannter Funktion – trotz ihrer vorderen Ränge in den getesteten Hautzellen nicht detektiert werden.

Wie oben erwähnt, beschränkt sich beispielsweise die DCD-Expression auf ekkrine Schweißdrüsen (Schitteck et al., 2001). Denkbar wäre also, dass auch

MUCL1 und C5orf46 in gleicher oder ähnlicher Weise von Drüsen sekretiert und nicht von den getesteten Hautzellen selbst exprimiert werden.

Das *Mucin-like 1* (MUCL1; auch bekannt als *Small Breast Epithelial Mucin* (SBEM)) ist ein kleines sekretiertes *Mucin-like*-Protein mit starker Ähnlichkeit zu vielen Sialomucinen (ähnlich wie SCGB2A2 und SCGB1D2), das zuerst in normalem Brustgewebe sowie Brusttumoren identifiziert wurde (Hube et al., 2004; Lacroix, 2006; Skliris et al., 2008). In einer Studie mit 43 normalen humanen Geweben war das SBEM im Wesentlichen auf die Brust- und Speicheldrüsen beschränkt. In Krebsgeweben wurde SBEM in Brust und Prostata detektiert (Miksicek et al., 2002). In mehr als 90% der invasiven duktalem Karzinome wurde SBEM exprimiert, allerdings mit signifikant unterschiedlichen Expressionsleveln; es korrelierte zudem interessanterweise mit der Expression von SCGB2A2 (Miksicek et al., 2002). Ebenso wie MUCL1 werden auch die Gene Keratin 5, Keratin 14, Keratin 15 und Keratin 17 sowie Desmoplakin, ein *Tight junction*-Protein, signifikant in Brustdrüsen exprimiert (Colpitts et al., 2002; Liu et al., 2010; Miksicek et al., 2002). Dies deutet auf gemeinsame Eigenschaften des Proteoms von Haut und Brustdrüsen hin, denn tatsächlich besteht das Myoepithelium, das in glandulären Strukturen der Schweiß-, Brust, Tränen- und Speicheldrüsen gefunden wurde, aus Keratin-reichen Epithelzellen und ist möglicherweise die Quelle gemeinsam exprimierter Transkripte in Haut und Brustdrüse (Raubenheimer, 1987). Interessanterweise befinden sich MUCL1- und DCD-Gen im gleichen Locus auf Chromosom 12 (12q13) neben dem Gen eines anderen kleinen sekretierten Glycoproteins, dem Lacritin, das ebenfalls in Tränen- und Brustdrüsen sowie in Brustkrebs gefunden wurde (Samudre et al., 2011; Weigelt et al., 2003).

Das *whey four disulfide core 5* (WFDC5)-Gen gehört zu einer bis dato wenig untersuchten, achtzehn Mitglieder umfassenden Familie kleiner sekretierter Proteine. WAP (whey acidic protein) ist ein wichtiges Milchserum-Protein (Whey-Protein), das in der Milch von Säugetieren vorkommt (Wilkinson et al., 2011). WAP besitzt charakteristische Domänen, die reich an Cysteinresten sind und als 4-DSC (four-disulfide core domain) bezeichnet werden. Zunächst wurden sie als Antiproteasen beschrieben, die in der Lage sind, vor allem

neutrophile Proteasen wie NE (Neutrophile Elastase), Cathepsin-G und Proteinase-3 zu hemmen und dafür zu sorgen, maladaptive Gewebeschäden während einer Entzündung zu verringern. Später zeigte sich aber, dass diese Moleküle noch eine Vielzahl anderer Funktionen besitzen wie beispielsweise direkte antimikrobielle Aktivität, bakterielle Opsonisation, Induktion von adaptiven Immunantworten oder Förderung von Gewebsneubildung (Bingle and Vyakarnam, 2008; Clauss et al., 2002; Scott et al., 2011; Wilkinson et al., 2011). In weiteren Untersuchungen wurde das WAP der Maus als prototypisches Mitglied einer Unterfamilie von Proteinen mit vier Disulfid-Kerndomänen eingestuft, woraufhin die Mitglieder dieser Unterfamilie, die alle ein Motiv mit identischer Ausstattung an Disulfidbindungen besitzen, seitdem auch whey four disulfide core (WFDC)-Proteine genannt werden. WFDC-Domänen kommen nicht nur in WAP vor, sondern auch in zahlreichen anderen Proteinen, wobei nicht alle diese Proteine im Milchserum vorhanden sind (Ranganathan et al., 1999). Die vier WAP-Familienmitglieder SLPI, WFDC2, WFDC5 und WFDC12 werden beispielsweise in der Luftröhre, der Zunge und den Speicheldrüsen exprimiert (Idoji et al., 2008). Ihre WAP-Domänen spielen dabei eine zentrale Rolle bei antimikrobiellen und/oder Antiprotease-Wirkmechanismen. In Säugtieren haben die meisten N-terminalen WAP-Domänen in SLPI und die WAP-Domänen von WFDC12 antimikrobielle Eigenschaften, während die meisten C-terminalen WAP-Domänen in SLPI sowie die WAP-Domänen von Elafin Antiprotease-Aktivität aufweisen (Idoji et al., 2008). Die spezifische Funktion sowie Expression von WFDC5 ist bisher aber nicht untersucht worden. Einhergehend mit der Beobachtung, dass die gesamte WFDC-Protein-Familie sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Inflammation spielt, lassen die eigenen Untersuchungen vermuten, dass es sich beim WFDC5 um ein pro-inflammatorisches Protein handelt. Sowohl in Psoriasis-Hautproben als auch nach TNF- α -Stimulation primärer humaner Keratinozyten *in vitro* konnte in dieser Arbeit eine signifikant erhöhte Genexpression von WFDC5 gezeigt werden. Die Psoriasis vulgaris repräsentiert eine der häufigsten inflammatorischen Hauterkrankungen, wobei TNF- α als eines der Schlüssel-Zytokine an der Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt ist (Arican et al., 2005; Ettehadi et al., 1994). Bemerkenswerterweise hat sich die Anti-TNF- α -Therapie als eine effektive Strategie im Management der Psoriasis vulgaris etabliert (Nestle et al., 2009;

Reich et al., 2005). Da auch andere WFDC-Proteine antimikrobielle Aktivität aufweisen (Bingle and Vyakarnam, 2008), könnte WFDC5 ebenfalls als antimikrobielles Peptid wirken. Diese Hypothese wird durch die klinische Beobachtung gestützt, dass Psoriasis-Patienten selten Haut-Infektionen entwickeln. Auch enthalten die Hautschuppen, die bei der Psoriasis vulgaris entstehen, große Mengen hauteigener antimikrobieller Proteine (Harder and Schroder, 2005). Insgesamt sind aber weitere Studien notwendig, um die potenzielle Rolle von WFDC5 in der Pathogenese der Psoriasis vulgaris zu klären.

Das Transmembran-Protein 45A (TMEM45A) -Gen gehört zu den Genen jener TMEM-Familie, die für Transmembran-Proteine kodieren, und wird in epidermalen Keratinozyten signifikant exprimiert (Hayez et al., 2014).

Aktuell wird TMEM45A mit verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht. Hier führt die Inhibition von TMEM45A zu geringerer Proliferation, wobei der Zellzyklus-Arrest induziert und eine Zellinvasion beispielsweise in humanen Ovarialkarzinom-Zellen reduziert wird (Guo et al., 2015). Bereits zuvor wurde TMEM45A grundsätzlich als antiapoptotisch identifiziert (Flamant et al., 2012). Dabei wird TMEM45A bei der Differenzierung von Keratinozyten induziert, das mit einem Arrest der Zellproliferation einhergeht. Zudem wird es in Krebszellen des Epithelgewebes und besonders in differenzierten Keratinozyten exprimiert, könnte also bei der normalen Funktion von Wachstums-arretierten Epithelzellen eine Rolle spielen. TMEM45A könnte dabei die Apoptose durch Förderung der Expression von Transglutaminase inhibieren (Flamant et al., 2012; Jang et al., 2010). TMEM45A ist ein hoch konserviertes Protein mit umfassender, auf Vertebraten beschränkter Sequenzkonservierung (47% Übereinstimmung mit seinem Zebrafisch-Ortholog) und begrenzter Übereinstimmung mit 2'-5'-Oligoadenylat- Synthetase 1 (OAS1), die an der angeborenen anti-viralen Immunantwort beteiligt ist (Justesen et al., 2000). Da TMEM45A auch eine Pfam-Domäne (DUF716; engl. *domain of unknown function 716*) enthält, die mit einer Antwort auf virale Infektionen in Pflanzen assoziiert ist, spielt es möglicherweise auch eine Rolle bei der viralen Immunantwort der Haut. Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigt, dass TMEM45A in Brustkrebsgewebe überexprimiert wird und mit einer schlechten Prognose bei diesen Patienten einhergeht (Flamant et al., 2012). Auf der anderen Seite fördert eine Suppression von TMEM45A *in situ*

die Progression duktaler Karzinome zu invasivem Brustkrebs (Lee et al., 2012). Ob TMEM45A möglicherweise eine ähnliche Rolle bei der Entwicklung von der aktinischen Keratose zum Plattenepithelkarzinom spielt, wurde bisher nicht näher untersucht. *In vivo* konnten TMEM45A-mRNA und -Protein vor allem im Stratum granulosum der Epidermis gefunden werden (Hayez et al., 2014). Welche funktionelle Rolle TMEM45A im Stratum granulosum spielt, konnte bisher allerdings nicht aufgeklärt werden (Hayez et al., 2016). Die Expressionsmuster von TMEM45A erinnern dabei an die Expressionsmuster von Filaggrin und Transglutaminase, bekannten Markern des Stratum granulosum (Malaisse et al., 2014). Die Expression von TMEM45A steht demnach wohl in direktem Zusammenhang mit der Keratinisierung, da eine Akkumulation des Proteins in nativer und rekonstruierter Epidermis ebenso wie in den Hassall-Körperchen des Thymus nachgewiesen wurde, nicht aber in nicht-verhornten Epithelien (Hayez et al., 2014). Auf subzellulärer Ebene offenbart die Co-Lokalisation mit ER- und Golgi-Markern *in vitro* einen Zusammenhang mit dem Golgi-Apparat, genauer mit dem trans-Golgi-Netzwerk (Hayez et al., 2014). Die zugrundeliegenden Daten zeigen eine starke Korrelation zwischen TMEM45A-Expression und epidermaler Keratinisierung und deuten so auf die Relevanz des Gens in diesem Prozess hin (Hayez et al., 2014). In murinen und humanen *Loss of function*-Modellen konnte die Funktion von TMEM45A in epidermaler Morphogenese, Keratinisierung oder Barriereformation allerdings bis dato nicht bestätigt werden (Hayez et al., 2016).

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde TMEM45A, ebenso wie zwei weitere hautspezifische Gene – WFDC5 und GPR115 – mittels Immunfluoreszenzfärbungen näher analysiert. Diese zeigten für TMEM45A eine graduelle Färbung von den basalen Schichten der Epidermis bis zum Stratum corneum. Ähnliche Färbemuster zeigten in diesem Zusammenhang sowohl GPR115 als auch in geringerem Maße WFDC5. Somit scheinen alle drei Proteine differenzierungsabhängig induziert zu werden. Die Verteilung von WFDC5 in der Dermis zeigte außerdem, dass es zusätzlich auch im Endothel der kleinen Gefäße vorhanden ist, möglicherweise aufgrund von Protein-Akkumulation an der Innenfläche dieser Gefäße (Gerber et al., 2013).

Darüber hinaus konnte die Keratinozyten-spezifische Expression auf Proteinebene für die drei Gene mittels Western Blot-Analysen bestätigt werden. Bezüglich TMEM45A deckt sich der hier beschriebene Befund interessanterweise mit den oben beschriebenen Untersuchungen, denn eine Induktion der TMEM45A-Expression in primären humanen Keratinozyten während der Differenzierung konnten auch Flamant und Mitarbeiter beobachten (Flamant et al., 2012).

Eine im letzten Jahr veröffentlichte Studie hatte das Ziel, die Rolle von TMEM45A bei der Regulation des biologischen Verhaltens von Ovarialkarzinom-Zellen aufzuklären (Guo et al., 2015). Sowohl TCGA (*The Cancer Genome Atlas*)-Daten als auch RT-PCR-Ergebnisse konnten die Überexpression von TMEM45A im Ovarialkarzinom bestätigen. Darüber hinaus konnte mittels *Silencing* von TMEM45A eine durch die erhöhte Zellpopulation in der G1-Phase bedingte signifikante Inhibition der Zellproliferation erreicht werden. Ein *Knock-down* von TMEM45A inhibierte zusätzlich sowohl Zelladhäsion als auch Zellinvasion im Ovarialkarzinom (Guo et al., 2015). Die Funktion der Mehrheit der TMEMs bleibt hingegen weiterhin unklar (Wrzesinski et al., 2015). Bei zehn analysierten TMEMs konnte kürzlich allerdings eine signifikante Deregulation der Expression in CCRCC (*Clear Cell Renal Cell Carcinoma*)-Tumoren beobachtet werden (Wrzesinski et al., 2015). Inwieweit sich diese Befunde auf die Haut übertragen lassen, muss weiter untersucht werden. Denkbar wäre eine Rolle von TMEM45A bei der Steuerung der Keratinisierung beispielsweise in Psoriasis vulgaris und aktinischer Keratose, denn in beiden Erkrankungen konnte eine signifikante Expressionsinduktion beobachtet werden.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), auch Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren genannt, bilden die größte Membranprotein-Superfamilie und vermitteln zelluläre Antworten auf Hormone und Neurotransmitter (Alonso and Friedman, 2013). Der genaue Umfang der GPCR-Superfamilie ist bisher nicht bekannt, allerdings wurden etwa 800 verschiedene humane Gene (entsprechend etwa 4% des gesamten Protein-kodierenden Genoms) mittels Genom-Sequenz-Analyse als mögliche Kandidaten eingestuft (Bjarnadottir et al., 2006). GPCRs sind insgesamt ein wichtiges Target für zukünftige Arzneimittelentwicklungen, da sie an vielen physiologischen und pathologischen Mecha-

nismen regulierend beteiligt sind. Dazu gehören beispielsweise kardiovaskuläre und neurologische Störungen, immunologische, endokrine, renale und pulmonale Erkrankungen sowie Schmerzen und Tumorerkrankungen (Mason et al., 2012). In Vertebraten werden GPCRs aufgrund ihrer Sequenz- und Primärstrukturähnlichkeiten in vier Klassen unterteilt: Rhodopsin (Klasse A), Sekretin (Klasse B), Glutamat (Klasse C) und Frizzled (Klasse 4) (Sharman et al., 2011). GPCRs stellen eine essentielle Schnittstelle zwischen der intra- und extrazellulären Kommunikation dar: Werden die GPCRs aktiviert, durchlaufen sie diverse Konformationsänderungen, die eine Aktivierung von heterodimären G-Proteinen erleichtern. Dazu zählen drei wichtige molekulare Mechanismen: 1) Regulation der G-Protein-Kopplung, 2) Rezeptor-vermittelte Endozytose und 3) Signalgebung über G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege (Ferguson et al., 1996; Ferguson and Caron, 1998; Hall et al., 1999; Krupnick and Benovic, 1998; Lefkowitz, 1993; Luttrell et al., 1999; Schoneberg et al., 1999).

Der *G Protein-Coupled Receptor 115* (GPR115) wurde kürzlich in *Adhesion G Protein-Coupled Receptor F4* (ADGRF4) umbenannt (Hamann et al., 2015). GPR115 ist eines von 33 im humanen Genom vorkommenden Adhäsions-GPCRs, die durch lange extrazelluläre N-terminale Domänen charakterisiert sind (Fredriksson et al., 2002). GPR115 wurde durch die systematische Suche nach einem *Glukokortikosteroid-Response-Gen* identifiziert und spielt möglicherweise eine Rolle in der Effektvermittlung des genannten Hormons in der Haut (Wang et al., 2004). Sowohl das Screening für neue haut-assoziierte Gene in dieser Arbeit als auch das Screening für *Glukokortikosteroid-Response-Gene* zeigten eine Lokalisation von GPR115 in Keratinozyten (Wang et al., 2004). Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit wird GPR115, wie auch die Adhäsions-GPCRs 111 und 116, in nur wenigen Zelltypen und Organen exprimiert, darunter auch in der Haut der Maus (Promel et al., 2012). Promel und Mitarbeiter konnten die exklusive Assoziation von GPR115 mit der Haut also schon im Vorfeld der hier für den Menschen beschriebenen Ergebnisse in der Maus beobachten. Die Existenz von GPR115 ebenso wie die von GPR111 im Genom von Vertebraten koinzidiert mit der terrestrischen Evolution, weshalb diese Adhäsions-GPCRs möglicherweise eine Rolle bei der Hautspezialisierung spielen, die essentiell für das Leben an Land ist (Promel et al., 2012). In der

Maus-Embryogenese werden beide GPCRs sehr früh während der Entwicklung der Epidermis im mehrschichtigen Plattenepithel exprimiert. GPR115 und GPR111 sind dabei hoch homolog (Promel et al., 2012).

Der *G Protein-Coupled Receptor 87* (GPR87) ist hingegen ein neu entdecktes deorphanisiertes Mitglied der *transmembrane G protein-coupled receptor family* und wurde mittels Sequenzdatenanalysen (*Sequence Data-Mining*) als ein Rhodopsin-ähnlicher G-Protein-gekoppelter Rezeptor der Klasse A identifiziert (Chassain et al., 2001; Wittenberger et al., 2001). Später konnte eine Überexpression in Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden (Gugger et al., 2008). Darüberhinaus wurde GPR87 als ein p53-induziertes Gen beschrieben (Zhang et al., 2009b), welches das Überleben fördert und als neues therapeutisches Target bei Tumorerkrankungen dienen könnte. Der *Knock-down* von GPR87 führt beispielsweise bei Brust- und Kolon-Krebszellen zu einer p53-abhängigen, DNA-Schäden hervorrufenden Wachstumssuppression. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass GPR87 möglicherweise ähnliche Funktionen beim Hautkrebs übernimmt.

Kürzlich wurde auch beschrieben, dass GPR87 eventuell einen Beitrag zur Viabilität humaner Tumorzellen leistet, wobei eine Überexpression von GPR87-mRNA in einigen malignen Tumoren, einschließlich Lungenkrebs gezeigt werden konnte (Nii et al., 2014). Im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) korreliert die Überexpression von GPR87 mit einer signifikant geringeren Tumor-Differenzierung sowie einer höheren Tumor-Proliferation (Nii et al., 2014). Während der Progression des NSCLC ist die Überexpression von GPR87 möglicherweise mit dem Erwerb eines aggressiveren Phänotyps assoziiert, weshalb hier ein potenzielles Target für die konkrete Voraussage und Behandlung des NSCLC vorhanden ist (Nii et al., 2014). Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass GPR-Signaling allgemein nicht nur eine Rolle bei der Förderung von Zellwachstum und -überleben bzw. Metastasierung spielt, sondern auch bei der Arzneimittelresistenz (Zhang et al., 2015). In diesem Zusammenhang wurde die Überexpression von GPR87 auch in humanen Blasenkrebs-Zellen beschrieben (Zhang et al., 2015). GPR87 scheint auch hier ein vielversprechendes therapeutisches Target zu sein, denn die Inhibition mit Ad-shGPR87 (*Replication-deficient recombinant adenoviral vector expressing*

shRNA targeting GPR87) führt beispielsweise zu starken Antitumor-Effekten, insbesondere zu anti-proliferativen und pro-apoptotischen Effekten gegen GPR87-exprimierende humane Blasenkrebs-Zellen (Zhang et al., 2015).

Das Cadherin-verwandte Familienmitglied 1 (engl. *Cadherin-related family member 1*; CDHR1; früher bekannt als Protocadherin 21, PCDH21) ist ein auf dem Chromosom 10q23 lokalisiertes, Kalzium-abhängiges Adhäsionsprotein und gehört zur ϵ -Gruppe nicht-geclusterter Protocadherine (Ba-Abbad et al., 2013; Cohen et al., 2012; Kim et al., 2011). Cadherine sind durch die Präsenz von extrazellulären Cadherin (EC)-Domänen charakterisiert, welche hoch konservierte Ca^{2+} -Bindungsmotive beinhalten. Variationen in den zytoplasmatischen Domänen vermitteln funktionelle Spezifität, indem sie jedem Molekül die Fähigkeit verleihen, mit verschiedenen Liganden zu interagieren (Shapiro and Weis, 2009). CDHR1 besteht aus sechs EC-Domänen mit einer einzelnen intrazellulären Domäne.

CDHR1 ist vermutlich ein Photorezeptor-spezifisches Gen, das an der humanen retinalen Degeneration beteiligt ist, denn ein Mangel an CDHR1 in der Retina wird mit einer Funktionsstörung der Zapfen-Photorezeptoren in Verbindung gebracht (Ba-Abbad et al., 2013; Lazar et al., 2015; Nakajima et al., 2001; Ostergaard et al., 2010; Rattner et al., 2001).

Die Expression von CDHR1 in der Haut war bisher unbekannt (Henderson et al., 2010; Kim et al., 2011). In gesunder Haut deckt CDHR1 ein breites Expressionsspektrum ab: von nahezu Null bis >4000 Relative Einheiten. Die physiologische Funktion dieser Beobachtung ist allerdings nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für CDHR1 bei jeder der untersuchten Hauterkrankungen eine signifikante Suppression, ein Hinweis darauf, dass dieses Gen in Zukunft als ein Indikator für gesunde Haut genutzt werden könnte.

Serpine (*SERine Protease INhibitors*) sind die größte Familie von Serinprotease-Inhibitoren und wurden in allen höheren Eukaryonten ebenso wie in Bakterien und Viren beschrieben (Olson and Gettins, 2011). Serpine werden als die wichtigste Protease-Inhibitor-Familie in höheren Eukaryonten angesehen und besitzen eine Vielzahl an biologischen Funktionen. In öffentlichen Datenbanken sind derzeit ungefähr 10.000 Serpin-Sequenzen verzeichnet.

Humane Serpine können in neun unterschiedliche Gruppen (A-I) eingeteilt werden, wobei Protease-Inhibitoren generell resistent sind gegenüber Protease-bedingter Degradierung (Kubo, 2014). Trotz dieser Resistenz haben einige Serpine ihre Protease-Inhibitor-Aktivität im Laufe der Evolution verloren und übernehmen andere Funktionen wie etwa den Hormon-Transport (Flink et al., 1986), die Blutdruck-Regulation (Doolittle, 1983) oder die Protein-Speicherung (Hunt and Dayhoff, 1980; Kubo, 2014). Zu den Speicherproteinen gehört beispielsweise das Ovalbumin, ein Homolog der Gruppe B-Serpine, weshalb diese alternativ auch als "Ov-Serpine" bezeichnet werden (Kubo, 2014).

Humane B-Serpine gehören zu einer Gruppe von Proteinaseinhibitoren, die Zellen vor Proteolyse schützen (Kubo et al., 2013; Silverman et al., 2004). *Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 7* (SERPINB7; auch Megsin genannt) wird spezifisch in der Niere sowie in den Epithelzellen des Uterus exprimiert (Miyata et al., 2002; Zhang et al., 2009a). Die Überexpression von humanem SERPINB7 in transgenen Mäusen führte zu einer gesteigerten mesangialen Zellproliferation (Miyata et al., 2002) sowie in einem *In vitro* Zell-Invasions-/Migrations-Assay zu einer deutlich supprimierten Zellmotilität (Chou et al., 2012). Demzufolge scheint dieses Genprodukt durch die Aufrechterhaltung der Extrazellulärmatrix-Homöostase an der Gewebeintegrität beteiligt zu sein, während der Verlust der Expression möglicherweise zum Verlust von Zelladhäsion und Gewebeintegrität führt. Die Rolle von SERPINB7 in Hauterkrankungen ist unklar. Shiiba und Mitarbeiter konnten jedoch nachweisen, dass SERPINB7 und andere Gene der SERPIN-Gen-Cluster auf Chromosom 18q21 in Zelllinien, die von oralen SCC abstammen, signifikant herunterreguliert werden und schlossen daraus, dass diese SERPIN-Mitglieder möglicherweise Tumor-Suppressor-Gene repräsentieren (Shiiba et al., 2010). Die in dieser Arbeit generierten Daten unterstützen diese Hypothese. Es konnte gezeigt werden, dass SERPINB7 im Vergleich zur gesunden Haut im Plattenepithelkarzinom signifikant supprimiert wird.

Grundsätzlich sind Serpine metastabile Proteine, die strukturell konservierte „Selbstmord-Substrate“ darstellen (Huber and Carrell, 1989; Huntington et al., 2000). Sie kommen dabei intra- und extrazellulär vor. Die meisten Serpine inhibieren Serinproteasen des Chymotrypsin-Typs, einige sind „Cross Class“-Inhibitoren, die auch Cysteinproteasen beeinflussen können (Kantyka and

Potempa, 2011; Schick et al., 1997). Kürzlich wurde von Kubo und Mitarbeitern beschrieben, dass Mutationen in SERPINB7 zur Palmoplantarkeratose Typ Nagashima (NPPK) führen, einer autosomal-rezessiven, diffusen, nicht-epidermolytischen palmoplantaren Keratose (Kubo, 2014; Kubo et al., 2013). In der Epidermis ist SERPINB7 ubiquitär verteilt, insbesondere im Stratum granulosum und im apikalen Teil des Stratum corneum. Ein Funktionsverlust (*“Loss-of-Function”*) von SERPINB7 induziert möglicherweise eine Überaktivität von Proteasen in NPPK-Haut-Läsionen. Dies führt schließlich zur Proteindegradation der Keratinozyten und einem erleichterten Eindringen von Wasser in das Stratum corneum (Kubo et al., 2013), denn der Verlust der Protease-Inhibitor-Aktivität resultiert grundsätzlich in unkontrollierter Protease-Aktivität und Gewebe-Zerstörung (Kubo, 2014).

In Zusammenschau liefert diese Arbeit eine der bis dato umfassendsten vergleichenden molekularen Charakterisierungen gesunder menschlicher Haut. Die Tatsache, dass allein innerhalb der Top 100 hautspezifischen Gene einerseits 14 charakterisierte Gene identifiziert werden konnten, die noch nicht in der Haut beschrieben wurden, und andererseits sechs vollkommen uncharakterisierte Transkripte entdeckt wurden, unterstreicht das Potential der hier durchgeführten Analysen ebenso wie die Identifikation stimulations- und krankheitsspezifischer Expressionsmuster ausgewählter Haut-assoziiierter Gene.

7 Literaturverzeichnis

- ABADIA MOLINA, F., BURROWS, N. P., JONES, R. R., TERENGI, G. & POLAK, J. M. 1992. Increased sensory neuropeptides in nodular prurigo: a quantitative immunohistochemical analysis. *Br J Dermatol*, 127, 344-51.
- AL-HASHIMI, I., SCHIFTER, M., LOCKHART, P. B., WRAY, D., BRENNAN, M., MIGLIORATI, C. A., AXELL, T., BRUCE, A. J., CARPENTER, W., EISENBERG, E., EPSTEIN, J. B., HOLMSTRUP, P., JONTELL, M., LOZADA-NUR, F., NAIR, R., SILVERMAN, B., THONGPRASOM, K., THORNHILL, M., WARNAKULASURIYA, S. & VAN DER WAAL, I. 2007. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 103 Suppl, S25 e1-12.
- ALONSO, V. & FRIEDMAN, P. A. 2013. Minireview: ubiquitination-regulated G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *Mol Endocrinol*, 27, 558-72.
- ARICAN, O., ARAL, M., SASMAZ, S. & CIRAGIL, P. 2005. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm*, 2005, 273-9.
- ASSOULY, P. & REYGAGNE, P. 2009. Lichen planopilaris: update on diagnosis and treatment. *Semin Cutan Med Surg*, 28, 3-10.
- AZFAR, R. S. & GELFAND, J. M. 2008. Psoriasis and metabolic disease: epidemiology and pathophysiology. *Curr Opin Rheumatol*, 20, 416-22.
- BA-ABBAD, R., SERGOUNIOTIS, P. I., PLAGNOL, V., ROBSON, A. G., MICHAELIDES, M., HOLDER, G. E. & WEBSTER, A. R. 2013. Clinical characteristics of early retinal disease due to CDHR1 mutation. *Mol Vis*, 19, 2250-9.
- BERMEJO-FENOLL, A., SANCHEZ-SILES, M., LOPEZ-JORNET, P., CAMACHO-ALONSO, F. & SALAZAR-SANCHEZ, N. 2010. A retrospective clinicopathological study of 550 patients with oral lichen planus in south-eastern Spain. *J Oral Pathol Med*, 39, 491-6.

- BINGLE, C. D. & VYAKARNAM, A. 2008. Novel innate immune functions of the whey acidic protein family. *Trends Immunol*, 29, 444-53.
- BJARNADOTTIR, T. K., GLORIAM, D. E., HELLSTRAND, S. H., KRISTIANSOON, H., FREDRIKSSON, R. & SCHIOTH, H. B. 2006. Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 88, 263-73.
- BLUMENBERG, M. 2006. DNA microarrays in dermatology and skin biology. *OMICS*, 10, 243-60.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- BRAFF, M. H., ZAIYOU, M., FIERER, J., NIZET, V. & GALLO, R. L. 2005. Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens. *Infect Immun*, 73, 6771-81.
- BRANDNER, J. M., HAFTEK, M. & NIESSEN, C. M. 2010. Adherens Junctions, Desmosomes and Tight Junctions in Epidermal Barrier Function. *The Open Dermatology Journal*, 4, 14-20.
- BRASH, D. E., RUDOLPH, J. A., SIMON, J. A., LIN, A., MCKENNA, G. J., BADEN, H. P., HALPERIN, A. J. & PONTEN, J. 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 10124-8.
- BURKHARDT, A. M., TAI, K. P., FLORES-GUITERREZ, J. P., VILCHES-CISNEROS, N., KAMDAR, K., BARBOSA-QUINTANA, O., VALLE-RIOS, R., HEVEZI, P. A., ZUNIGA, J., SELMAN, M., OUELLETTE, A. J. & ZLOTNIK, A. 2012. CXCL17 is a mucosal chemokine elevated in idiopathic pulmonary fibrosis that exhibits broad antimicrobial activity. *J Immunol*, 188, 6399-406.
- BYUN, J. Y., CHOI, H. Y., MYUNG, K. B. & CHOI, Y. W. 2009. Expression of IL-10, TGF-beta(1) and TNF-alpha in Cultured Keratinocytes (HaCaT Cells) after IPL Treatment or ALA-IPL Photodynamic Treatment. *Ann Dermatol*, 21, 12-7.
- CARBONE, M., ARDUINO, P. G., CARROZZO, M., CAIAZZO, G., BROCCOLETTI, R., CONROTTO, D., BEZZO, C. & GANDOLFO, S. 2009. Topical clobetasol in the treatment of atrophic-erosive oral lichen

- planus: a randomized controlled trial to compare two preparations with different concentrations. *J Oral Pathol Med*, 38, 227-33.
- CARCINOGENESIS 2002.
- Notice of Availability of 10th Report on Carcinogenesis.
- CARTER, D., DOUGLASS, J. F., CORNELLISON, C. D., RETTER, M. W., JOHNSON, J. C., BENNINGTON, A. A., FLEMING, T. P., REED, S. G., HOUGHTON, R. L., DIAMOND, D. L. & VEDVICK, T. S. 2002. Purification and characterization of the mammaglobin/lipophilin B complex, a promising diagnostic marker for breast cancer. *Biochemistry*, 41, 6714-22.
- CASSARINO, D. S., DERIENZO, D. P. & BARR, R. J. 2006. Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification--part two. *J Cutan Pathol*, 33, 261-79.
- CHAMCHEU, J. C., NAVSARIA, H., PIHL-LUNDIN, I., LIOVIC, M., VAHLQUIST, A. & TORMA, H. 2011. Chemical chaperones protect epidermolysis bullosa simplex keratinocytes from heat stress-induced keratin aggregation: involvement of heat shock proteins and MAP kinases. *J Invest Dermatol*, 131, 1684-91.
- CHAMIAN, F., LOWES, M. A., LIN, S. L., LEE, E., KIKUCHI, T., GILLEAUDEAU, P., SULLIVAN-WHALEN, M., CARDINALE, I., KHATCHERIAN, A., NOVITSKAYA, I., WITTKOWSKI, K. M. & KRUEGER, J. G. 2005. Alefacept reduces infiltrating T cells, activated dendritic cells, and inflammatory genes in psoriasis vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2075-80.
- CHANG, H. Y., CHI, J. T., DUDOIT, S., BONDRE, C., VAN DE RIJN, M., BOTSTEIN, D. & BROWN, P. O. 2002. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12877-82.
- CHASSAIN, C., ESCHALIER, A. & DURIF, F. 2001. Assessment of motor behavior using a video system and a clinical rating scale in parkinsonian monkeys lesioned by MPTP. *J Neurosci Methods*, 111, 9-16.
- CHOU, R. H., WEN, H. C., LIANG, W. G., LIN, S. C., YUAN, H. W., WU, C. W. & CHANG, W. S. 2012. Suppression of the invasion and migration of

- cancer cells by SERPINB family genes and their derived peptides. *Oncol Rep*, 27, 238-45.
- CHRISTOPHERS, E. 2001. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol*, 26, 314-20.
- CLARK, R. A. F. 1996. Wound repair: overview and general considerations. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, New York, NY: Plenum Press, 3-35.
- CLAUSS, A., LILJA, H. & LUNDWALL, A. 2002. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *Biochem J*, 368, 233-42.
- COHEN, B., CHERVINSKY, E., JABALY-HABIB, H., SHALEV, S. A., BRISCOE, D. & BEN-YOSEF, T. 2012. A novel splice site mutation of CDHR1 in a consanguineous Israeli Christian Arab family segregating autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Mol Vis*, 18, 2915-21.
- COLPITTS, T. L., BILLING, P., GRANADOS, E., HAYDEN, M., HODGES, S., ROBERTS, L., RUSSELL, J., FRIEDMAN, P. & STROUPE, S. 2002. Identification and immunohistochemical characterization of a mucin-like glycoprotein expressed in early stage breast carcinoma. *Tumour Biol*, 23, 263-78.
- CULLETON, J., O'BRIEN, N., RYAN, B. M., HILL, A. D., MCDERMOTT, E., O'HIGGINS, N. & DUFFY, M. J. 2007. Lipophilin B: A gene preferentially expressed in breast tissue and upregulated in breast cancer. *Int J Cancer*, 120, 1087-92.
- CURTO, E. V., LAMBERT, G. W., DAVIS, R. L., WILBORN, T. W. & DOOLEY, T. P. 2002. Biomarkers of human skin cells identified using DermArray DNA arrays and new bioinformatics methods. *Biochem Biophys Res Commun*, 291, 1052-64.
- DAVIDOVICI, B. B., SATTAR, N., PRINZ, J., PUIG, L., EMERY, P., BARKER, J. N., VAN DE KERKHOFF, P., STAHL, M., NESTLE, F. O., GIROLOMONI, G. & KRUEGER, J. G. 2010. Psoriasis and systemic inflammatory diseases: potential mechanistic links between skin disease and co-morbid conditions. *J Invest Dermatol*, 130, 1785-96.
- DEBETS, R., TIMANS, J. C., HOMEY, B., ZURAWSKI, S., SANA, T. R., LO, S., WAGNER, J., EDWARDS, G., CLIFFORD, T., MENON, S., BAZAN, J. F.

- & KASTELEIN, R. A. 2001. Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J Immunol*, 167, 1440-6.
- DENECKER, G., HOSTE, E., GILBERT, B., HOICHEPIED, T., OVAERE, P., LIPPENS, S., VAN DEN BROECKE, C., VAN DAMME, P., D'HERDE, K., HACHEM, J. P., BORGONIE, G., PRESLAND, R. B., SCHOONJANS, L., LIBERT, C., VANDEKERCKHOVE, J., GEVAERT, K., VANDENABEELE, P. & DECLERCQ, W. 2007. Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat Cell Biol*, 9, 666-74.
- DERMATOLOGIA 1991. Gruppo Italiano Studi Epidemiologici in Dermatologia; Epidemiological evidence of the association between lichen planus and two immune-related diseases. Alopecia areata and ulcerative colitis. *Arch Dermatol*, 127, 688-91.
- DOOLITTLE, R. F. 1983. Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family. *Science*, 222, 417-9.
- ELDER, D. E. 2008. Lever's Histopathology of the Skin. *Gebundene Ausgabe – 1. September 2008*.
- ETTEHADI, P., GREAVES, M. W., WALLACH, D., ADERKA, D. & CAMP, R. D. 1994. Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin Exp Immunol*, 96, 146-51.
- EVANS, M. E. & ROTH, R. 2014. Shaping the skin: the interplay of mesoscale geometry and corneocyte swelling. *Phys Rev Lett*, 112, 038102.
- FEARON, E. R. & VOGELSTEIN, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-67.
- FERGUSON, S. S., BARAK, L. S., ZHANG, J. & CARON, M. G. 1996. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol*, 74, 1095-110.
- FERGUSON, S. S. & CARON, M. G. 1998. G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*, 9, 119-27.
- FLAMANT, L., ROEGIERS, E., PIERRE, M., HAYEZ, A., STERPIN, C., DE BACKER, O., ARNOULD, T., POUMAY, Y. & MICHIELS, C. 2012. TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells. *BMC Cancer*, 12, 391.

- FLINK, I. L., BAILEY, T. J., GUSTAFSON, T. A., MARKHAM, B. E. & MORKIN, E. 1986. Complete amino acid sequence of human thyroxine-binding globulin deduced from cloned DNA: close homology to the serine antiproteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 7708-12.
- FRANKE, W. W. 2009. Discovering the molecular components of intercellular junctions--a historical view. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a003061.
- FREDERICK, M. J., HENDERSON, Y., XU, X., DEAVERS, M. T., SAHIN, A. A., WU, H., LEWIS, D. E., EL-NAGGAR, A. K. & CLAYMAN, G. L. 2000. In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. *Am J Pathol*, 156, 1937-50.
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., HOGLUND, P. J. & SCHIOTH, H. B. 2002. Novel human G protein-coupled receptors with long N-terminals containing GPS domains and Ser/Thr-rich regions. *FEBS Lett*, 531, 407-14.
- FU, W. & COCKERELL, C. J. 2003. The actinic (solar) keratosis: a 21st-century perspective. *Arch Dermatol*, 139, 66-70.
- FUCHS, E. 1990. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol*, 111, 2807-14.
- GARGANO, G., AGNESE, V., CALO, V., CORSALE, S., AUGELLO, C., BRUNO, L., LA PAGLIA, L., GULLO, A., OTTINI, L., RUSSO, A., FULFARO, F., RINALDI, G., CROSTA, A., CICERO, G., MAJORANA, O., PALMERI, L., CIPOLLA, C., AGRUSA, A., GULOTTA, G., MORELLO, V., DI FEDE, G., ADAMO, V., COLUCCI, G., TOMASINO, R. M., VALERIO, M. R., BAZAN, V., RUSSO, A. & GRUPPO ONCOLOGICO DELL'ITALIA, M. 2006. Detection and quantification of mammaglobin in the blood of breast cancer patients: can it be useful as a potential clinical marker? Preliminary results of a GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol*, 17 Suppl 7, vii41-5.
- GARROD, D. R., MERRITT, A. J. & NIE, Z. 2002. Desmosomal cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 537-45.
- GELFAND, J. M., NEIMANN, A. L., SHIN, D. B., WANG, X., MARGOLIS, D. J. & TROXEL, A. B. 2006. Risk of myocardial infarction in patients with psoriasis. *JAMA*, 296, 1735-41.

- GERBER, P. A., HEVEZI, P., BUHREN, B. A., MARTINEZ, C., SCHRUMPF, H., GASIS, M., GREYER-BECK, S., KRUTMANN, J., HOMEY, B. & ZLOTNIK, A. 2013. Systematic identification and characterization of novel human skin-associated genes encoding membrane and secreted proteins. *PLoS One*, 8, e63949.
- GILLITZER, R. & GOEBELER, M. 2001. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*, 69, 513-21.
- GOETTMANN, S., ZARAA, I. & MOULONGUET, I. 2012. Nail lichen planus: epidemiological, clinical, pathological, therapeutic and prognosis study of 67 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 26, 1304-9.
- GOLDBERG, L. H., JOSEPH, A. K. & TSCHEN, J. A. 1994. Proliferative actinic keratosis. *Int J Dermatol*, 33, 341-5.
- GREENBERG, S. A., SANOUDOU, D., HASLETT, J. N., KOHANE, I. S., KUNKEL, L. M., BEGGS, A. H. & AMATO, A. A. 2002. Molecular profiles of inflammatory myopathies. *Neurology*, 59, 1170-82.
- GREGORI, C., PORTEU, A., LOPEZ, S., KAHN, A. & PICHARD, A. L. 1998. Characterization of the aldolase B intronic enhancer. *J Biol Chem*, 273, 25237-43.
- GUGGER, M., WHITE, R., SONG, S., WASER, B., CESCATO, R., RIVIERE, P. & REUBI, J. C. 2008. GPR87 is an overexpressed G-protein coupled receptor in squamous cell carcinoma of the lung. *Dis Markers*, 24, 41-50.
- GUO, J., CHEN, L., LUO, N., YANG, W., QU, X. & CHENG, Z. 2015. Inhibition of TMEM45A suppresses proliferation, induces cell cycle arrest and reduces cell invasion in human ovarian cancer cells. *Oncol Rep*, 33, 3124-30.
- HACIA, J. G., BRODY, L. C. & COLLINS, F. S. 1998. Applications of DNA chips for genomic analysis. *Mol Psychiatry*, 3, 483-92.
- HAIDER, A. S., LOWES, M. A., SUAREZ-FARINAS, M., ZABA, L. C., CARDINALE, I., BLUMENBERG, M. & KRUEGER, J. G. 2008. Cellular genomic maps help dissect pathology in human skin disease. *J Invest Dermatol*, 128, 606-15.
- HALL, R. A., PREMONT, R. T. & LEFKOWITZ, R. J. 1999. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol*, 145, 927-32.

- HAMANN, J., AUST, G., ARAC, D., ENGEL, F. B., FORMSTONE, C., FREDRIKSSON, R., HALL, R. A., HARTY, B. L., KIRCHHOFF, C., KNAPP, B., KRISHNAN, A., LIEBSCHER, I., LIN, H. H., MARTINELLI, D. C., MONK, K. R., PEETERS, M. C., PIAO, X., PROMEL, S., SCHONEBERG, T., SCHWARTZ, T. W., SINGER, K., STACEY, M., USHKARYOV, Y. A., VALLON, M., WOLFRUM, U., WRIGHT, M. W., XU, L., LANGENHAN, T. & SCHIOTH, H. B. 2015. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev*, 67, 338-67.
- HARDER, J. & SCHRODER, J. M. 2005. Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol*, 77, 476-86.
- HAYEZ, A., MALAISSE, J., ROEGIERS, E., REYNIER, M., RENARD, C., HAFTEK, M., GEENEN, V., SERRE, G., SIMON, M., DE ROUVROIT, C. L., MICHIELS, C. & POUMAY, Y. 2014. High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization. *Exp Dermatol*, 23, 339-44.
- HAYEZ, A., ROEGIERS, E., MALAISSE, J., BALAU, B., STERPIN, C., ACHOURI, Y., LAMBERT DE ROUVROIT, C., POUMAY, Y., MICHIELS, C. & DE BACKER, O. 2016. TMEM45A Is Dispensable for Epidermal Morphogenesis, Keratinization and Barrier Formation. *PLoS One*, 11, e0147069.
- HEIMALL, J. & SPERGEL, J. M. 2012. Filaggrin mutations and atopy: consequences for future therapeutics. *Expert Rev Clin Immunol*, 8, 189-97.
- HENDERSON, R. H., LI, Z., ABD EL AZIZ, M. M., MACKAY, D. S., ELJININI, M. A., ZEIDAN, M., MOORE, A. T., BHATTACHARYA, S. S. & WEBSTER, A. R. 2010. Biallelic mutation of protocadherin-21 (PCDH21) causes retinal degeneration in humans. *Mol Vis*, 16, 46-52.
- HITOMI, K. 2005. Transglutaminases in skin epidermis. *Eur J Dermatol*, 15, 313-9.
- HOFFJAN, S. & STEMMLER, S. 2007. On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *Br J Dermatol*, 157, 441-9.

- HOMEY, B., ALENIUS, H., MULLER, A., SOTO, H., BOWMAN, E. P., YUAN, W., MCEVOY, L., LAUERMA, A. I., ASSMANN, T., BUNEMANN, E., LEHTO, M., WOLFF, H., YEN, D., MARXHAUSEN, H., TO, W., SEDGWICK, J., RUZICKA, T., LEHMANN, P. & ZLOTNIK, A. 2002. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med*, 8, 157-65.
- HUANG, S. K., XIAO, H. Q., KLEINE-TEBBE, J., PACIOTTI, G., MARSH, D. G., LICHTENSTEIN, L. M. & LIU, M. C. 1995a. IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J Immunol*, 155, 2688-94.
- HUANG, S. K., YI, M., PALMER, E. & MARSH, D. G. 1995b. A dominant T cell receptor beta-chain in response to a short ragweed allergen, Amb a 5. *J Immunol*, 154, 6157-62.
- HUBE, F., MUTAWE, M., LEYGUE, E. & MYAL, Y. 2004. Human small breast epithelial mucin: the promise of a new breast tumor biomarker. *DNA Cell Biol*, 23, 842-9.
- HUBER, R. & CARRELL, R. W. 1989. Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry*, 28, 8951-66.
- HUMPHREYS-BEHER, M. G., KING, F. K., BUNNEL, B. & BRODY, B. 1986. Isolation of biologically active RNA from human autopsy for the study of cystic fibrosis. *Biotechnol Appl Biochem*, 8, 392-403.
- HUNT, L. T. & DAYHOFF, M. O. 1980. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*, 95, 864-71.
- HUNTINGTON, J. A., READ, R. J. & CARRELL, R. W. 2000. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407, 923-6.
- HWANG, Y. P., OH, K. N., YUN, H. J. & JEONG, H. G. 2011. The flavonoids apigenin and luteolin suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. *J Dermatol Sci*, 61, 23-31.
- IDOJI, Y., WATANABE, Y., YAMASHITA, A., YAMANISHI, K., NISHIGUCHI, S., SHIMADA, K., YASUNAGA, T. & YAMANISHI, H. 2008. In silico study of

- whey-acidic-protein domain containing oral protease inhibitors. *Int J Mol Med*, 21, 461-8.
- IRIZARRY, R. A., HOBBS, B., COLLIN, F., BEAZER-BARCLAY, Y. D., ANTONELLIS, K. J., SCHERF, U. & SPEED, T. P. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4, 249-64.
- IWAMOTO, K., KAKIUCHI, C., BUNDO, M., IKEDA, K. & KATO, T. 2004. Molecular characterization of bipolar disorder by comparing gene expression profiles of postmortem brains of major mental disorders. *Mol Psychiatry*, 9, 406-16.
- JANG, G. Y., JEON, J. H., CHO, S. Y., SHIN, D. M., KIM, C. W., JEONG, E. M., BAE, H. C., KIM, T. W., LEE, S. H., CHOI, Y., LEE, D. S., PARK, S. C. & KIM, I. G. 2010. Transglutaminase 2 suppresses apoptosis by modulating caspase 3 and NF-kappaB activity in hypoxic tumor cells. *Oncogene*, 29, 356-67.
- JOHANSSON, O., LIANG, Y. & EMTESTAM, L. 2002. Increased nerve growth factor- and tyrosine kinase A-like immunoreactivities in prurigo nodularis skin -- an exploration of the cause of neurohyperplasia. *Arch Dermatol Res*, 293, 614-9.
- JOHNSON-HUANG, L. M., LOWES, M. A. & KRUEGER, J. G. 2012. Putting together the psoriasis puzzle: an update on developing targeted therapies. *Dis Model Mech*, 5, 423-33.
- JOHNSTON, A., XING, X., GUZMAN, A. M., RIBLETT, M., LOYD, C. M., WARD, N. L., WOHN, C., PRENS, E. P., WANG, F., MAIER, L. E., KANG, S., VOORHEES, J. J., ELDER, J. T. & GUDJONSSON, J. E. 2011. IL-1F5, -F6, -F8, and -F9: a novel IL-1 family signaling system that is active in psoriasis and promotes keratinocyte antimicrobial peptide expression. *J Immunol*, 186, 2613-22.
- JUSTESEN, J., HARTMANN, R. & KJELDGAARD, N. O. 2000. Gene structure and function of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase family. *Cell Mol Life Sci*, 57, 1593-612.
- KADAKIA, K. C., BARTON, D. L., LOPRINZI, C. L., SLOAN, J. A., OTLEY, C. C., DIEKMANN, B. B., NOVOTNY, P. J., ALBERTS, S. R., LIMBURG, P. J. & PITTELKOW, M. R. 2012. Randomized controlled trial of acitretin

- versus placebo in patients at high-risk for basal cell or squamous cell carcinoma of the skin (North Central Cancer Treatment Group Study 969251). *Cancer*, 118, 2128-37.
- KAKINUMA, T., SAEKI, H., TSUNEMI, Y., FUJITA, H., ASANO, N., MITSUI, H., TADA, Y., WAKUGAWA, M., WATANABE, T., TORII, H., KOMINE, M., ASAHINA, A., NAKAMURA, K. & TAMAKI, K. 2003. Increased serum cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27) levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Allergy Clin Immunol*, 111, 592-7.
- KANTYKA, T. & POTEPA, J. 2011. Human SCCA serpins inhibit staphylococcal cysteine proteases by forming classic "serpin-like" covalent complexes. *Methods Enzymol*, 499, 331-45.
- KELLOGG, D. E., SNINSKY, J. J. & KWOK, S. 1990. Quantitation of HIV-1 proviral DNA relative to cellular DNA by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 189, 202-8.
- KIM, S. J., DIX, D. J., THOMPSON, K. E., MURRELL, R. N., SCHMID, J. E., GALLAGHER, J. E. & ROCKETT, J. C. 2006. Gene expression in head hair follicles plucked from men and women. *Ann Clin Lab Sci*, 36, 115-26.
- KIM, S. Y., YASUDA, S., TANAKA, H., YAMAGATA, K. & KIM, H. 2011. Non-clustered protocadherin. *Cell Adh Migr*, 5, 97-105.
- KIRIAKIDOU, M., COTTON, D., TAICHMAN, D. & WILLIAMS, S. 2013. Systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med*, 159, ITC4-1.
- KOSCIUCZUK, E. M., LISOWSKI, P., JARCZAK, J., STRZALKOWSKA, N., JOZWIK, A., HORBANCZUK, J., KRZYZEWSKI, J., ZWIERZCHOWSKI, L. & BAGNICKA, E. 2012. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep*, 39, 10957-70.
- KRUPNICK, J. G. & BENOVIC, J. L. 1998. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 38, 289-319.
- KUBO, A. 2014. Nagashima-type palmoplantar keratosis: a common Asian type caused by SERPINB7 protease inhibitor deficiency. *J Invest Dermatol*, 134, 2076-9.

- KUBO, A., SHIOHAMA, A., SASAKI, T., NAKABAYASHI, K., KAWASAKI, H., ATSUGI, T., SATO, S., SHIMIZU, A., MIKAMI, S., TANIZAKI, H., UCHIYAMA, M., MAEDA, T., ITO, T., SAKABE, J., HEIKE, T., OKUYAMA, T., KOSAKI, R., KOSAKI, K., KUDOH, J., HATA, K., UMEZAWA, A., TOKURA, Y., ISHIKO, A., NIIZEKI, H., KABASHIMA, K., MITSUHASHI, Y. & AMAGAI, M. 2013. Mutations in SERPINB7, encoding a member of the serine protease inhibitor superfamily, cause Nagashima-type palmoplantar keratosis. *Am J Hum Genet*, 93, 945-56.
- KUO, I. H., CARPENTER-MENDINI, A., YOSHIDA, T., MCGIRT, L. Y., IVANOV, A. I., BARNES, K. C., GALLO, R. L., BORKOWSKI, A. W., YAMASAKI, K., LEUNG, D. Y., GEORAS, S. N., DE BENEDETTO, A. & BECK, L. A. 2013a. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *J Invest Dermatol*, 133, 988-98.
- KUO, I. H., YOSHIDA, T., DE BENEDETTO, A. & BECK, L. A. 2013b. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 131, 266-78.
- LACROIX, M. 2006. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*, 13, 1033-67.
- LAZAR, C. H., MUTSUDDI, M., KIMCHI, A., ZELINGER, L., MIZRAHI-MEISSONNIER, L., MARKS-OHANA, D., BOLEDA, A., RATNAPRIYA, R., SHARON, D., SWAROOP, A. & BANIN, E. 2015. Whole exome sequencing reveals GUCY2D as a major gene associated with cone and cone-rod dystrophy in Israel. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56, 420-30.
- LE CLEACH, L. & CHOSIDOW, O. 2012. Clinical practice. Lichen planus. *N Engl J Med*, 366, 723-32.
- LEE, J., HEVER, A., WILLHITE, D., ZLOTNIK, A. & HEVEZI, P. 2005. Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues. *FASEB J*, 19, 1356-8.
- LEE MOTOYAMA, J. P., KIM-MOTOYAMA, H., KIM, P., NAKAGAMA, H., MIYAGAWA, K. & SUZUKI, K. 2007. Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 357, 828-33.

- LEE, M. R. & SHUMACK, S. 2005. Prurigo nodularis: a review. *Australas J Dermatol*, 46, 211-18; quiz 219-20.
- LEE, S., STEWART, S., NAGTEGAAL, I., LUO, J., WU, Y., COLDITZ, G., MEDINA, D. & ALLRED, D. C. 2012. Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer Res*, 72, 4574-86.
- LEFKOWITZ, R. J. 1993. G protein-coupled receptor kinases. *Cell*, 74, 409-12.
- LEITER, U. & GARBE, C. 2008. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer--the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol*, 624, 89-103.
- LEUNG, D. Y. 2013. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int*, 62, 151-61.
- LI, G., ZHANG, J., JIN, K., HE, K., WANG, H., LU, H. & TENG, L. 2011. Human mammaglobin: a superior marker for reverse-transcriptase PCR in detecting circulating tumor cells in breast cancer patients. *Biomark Med*, 5, 249-60.
- LIANG, Y., JACOBI, H. H., REIMERT, C. M., HAAK-FRENDSCHO, M., MARCUSSON, J. A. & JOHANSSON, O. 2000. CGRP-immunoreactive nerves in prurigo nodularis--an exploration of neurogenic inflammation. *J Cutan Pathol*, 27, 359-66.
- LIPPENS, S., HOSTE, E., VANDENABEELE, P., AGOSTINIS, P. & DECLERCQ, W. 2009. Cell death in the skin. *Apoptosis*, 14, 549-69.
- LIU, Z. Z., XIE, X. D., QU, S. X., ZHENG, Z. D. & WANG, Y. K. 2010. Small breast epithelial mucin (SBEM) has the potential to be a marker for predicting hematogenous micrometastasis and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Exp Metastasis*, 27, 251-9.
- LOCKHART, D. J., DONG, H., BYRNE, M. C., FOLLETTIE, M. T., GALLO, M. V., CHEE, M. S., MITTMANN, M., WANG, C., KOBAYASHI, M., HORTON, H. & BROWN, E. L. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 14, 1675-80.
- LODI, G., SCULLY, C., CARROZZO, M., GRIFFITHS, M., SUGERMAN, P. B. & THONGPRASOM, K. 2005. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and

- etiopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 100, 40-51.
- LOWES, M. A., CHAMIAN, F., ABELLO, M. V., FUENTES-DUCULAN, J., LIN, S. L., NUSSBAUM, R., NOVITSKAYA, I., CARBONARO, H., CARDINALE, I., KIKUCHI, T., GILLEAUDEAU, P., SULLIVAN-WHALEN, M., WITTKOWSKI, K. M., PAPP, K., GAROVOY, M., DUMMER, W., STEINMAN, R. M. & KRUEGER, J. G. 2005. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 19057-62.
- LULEVICH, V., YANG, H. Y., ISSEROFF, R. R. & LIU, G. Y. 2010. Single cell mechanics of keratinocyte cells. *Ultramicroscopy*, 110, 1435-42.
- LUTTRELL, L. M., DAAKA, Y. & LEFKOWITZ, R. J. 1999. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 177-83.
- MADISON, K. C. 2003. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol*, 121, 231-41.
- MAERKI, C., MEUTER, S., LIEBI, M., MUHLEMANN, K., FREDERICK, M. J., YAWALKAR, N., MOSER, B. & WOLF, M. 2009. Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of CXCL14 suggests an immediate role in skin infections. *J Immunol*, 182, 507-14.
- MALAISSÉ, J., HERMANT, M., HAYEZ, A., POUMAY, Y. & LAMBERT DE ROUVROIT, C. 2014. Meaning of relative gene expression in multilayered cultures of epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol*, 23, 754-6.
- MARGHOOB, A., KOPF, A. W., BART, R. S., SANFILIPPO, L., SILVERMAN, M. K., LEE, P., LEVY, E., VOSSAERT, K. A., YADAV, S. & ABADIR, M. 1993. Risk of another basal cell carcinoma developing after treatment of a basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*, 28, 22-8.
- MARKS, J. G. & MILLER, J. J. 2013. Looking bill and Marks Principles of Dermatology.
- MARKS, R. & MOTLEY, R. J. 1995. Skin cancer. Recognition and treatment. *Drugs*, 50, 48-61.

- MASON, J. S., BORTOLATO, A., CONGREVE, M. & MARSHALL, F. H. 2012. New insights from structural biology into the druggability of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 33, 249-60.
- MAYTIN, E. V., WIMBERLY, J. M. & ANDERSON, R. R. 1990. Thermotolerance and the heat shock response in normal human keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol*, 95, 635-42.
- MCALEER, M. A. & IRVINE, A. D. 2013. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *J Allergy Clin Immunol*, 131, 280-91.
- MEHTA, N. N., AZFAR, R. S., SHIN, D. B., NEIMANN, A. L., TROXEL, A. B. & GELFAND, J. M. 2010. Patients with severe psoriasis are at increased risk of cardiovascular mortality: cohort study using the General Practice Research Database. *Eur Heart J*, 31, 1000-6.
- MEUTER, S. & MOSER, B. 2008. Constitutive expression of CXCL14 in healthy human and murine epithelial tissues. *Cytokine*, 44, 248-55.
- MIKSICEK, R. J., MYAL, Y., WATSON, P. H., WALKER, C., MURPHY, L. C. & LEYGUE, E. 2002. Identification of a novel breast- and salivary gland-specific, mucin-like gene strongly expressed in normal and tumor human mammary epithelium. *Cancer Res*, 62, 2736-40.
- MISCHKE, D., KORGE, B. P., MARENHOLZ, I., VOLZ, A. & ZIEGLER, A. 1996. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol*, 106, 989-92.
- MIYATA, T., INAGI, R., NANGAKU, M., IMASAWA, T., SATO, M., IZUHARA, Y., SUZUKI, D., YOSHINO, A., ONOGI, H., KIMURA, M., SUGIYAMA, S. & KUROKAWA, K. 2002. Overexpression of the serpin megsin induces progressive mesangial cell proliferation and expansion. *J Clin Invest*, 109, 585-93.
- MUKHERJEE, A. B., ZHANG, Z. & CHILTON, B. S. 2007. Uteroglobin: a steroid-inducible immunomodulatory protein that founded the Secretoglobin superfamily. *Endocr Rev*, 28, 707-25.
- NAKAJIMA, D., NAKAYAMA, M., KIKUNO, R., HIROSAWA, M., NAGASE, T. & OHARA, O. 2001. Identification of three novel non-classical cadherin genes through comprehensive analysis of large cDNAs. *Brain Res Mol Brain Res*, 94, 85-95.

- NASHAN, D., MEISS, F. & MULLER, M. 2013. Therapeutic strategies for actinic keratoses--a systematic review. *Eur J Dermatol*, 23, 14-32.
- NESTLE, F. O., KAPLAN, D. H. & BARKER, J. 2009. Psoriasis. *N Engl J Med*, 361, 496-509.
- NII, K., TOKUNAGA, Y., LIU, D., ZHANG, X., NAKANO, J., ISHIKAWA, S., KAKEHI, Y., HABA, R. & YOKOMISE, H. 2014. Overexpression of G protein-coupled receptor 87 correlates with poorer tumor differentiation and higher tumor proliferation in non-small-cell lung cancer. *Mol Clin Oncol*, 2, 539-544.
- NIJSTEN, T. & STERN, R. S. 2012. How epidemiology has contributed to a better understanding of skin disease. *J Invest Dermatol*, 132, 994-1002.
- NOLD, M. F., NOLD-PETRY, C. A., ZEPP, J. A., PALMER, B. E., BUFLER, P. & DINARELLO, C. A. 2010. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol*, 11, 1014-22.
- OHYAMA, M., TERUNUMA, A., TOCK, C. L., RADONOVICH, M. F., PISE-MASISON, C. A., HOPPING, S. B., BRADY, J. N., UDEY, M. C. & VOGEL, J. C. 2006. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest*, 116, 249-60.
- OLSON, S. T. & GETTINS, P. G. 2011. Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 99, 185-240.
- ORTONNE, J. P. 2002. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 146 Suppl 61, 20-3.
- OSTERGAARD, E., BATBAYLI, M., DUNO, M., VILHELMSSEN, K. & ROSENBERG, T. 2010. Mutations in PCDH21 cause autosomal recessive cone-rod dystrophy. *J Med Genet*, 47, 665-9.
- OTLEY, C. C., STASKO, T., TOPE, W. D. & LEBWOHL, M. 2006. Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer with systemic retinoids: practical dosing and management of adverse effects. *Dermatol Surg*, 32, 562-8.
- OWENS, D. M. & WATT, F. M. 2003. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer*, 3, 444-51.

- PANG, S., KOYANAGI, Y., MILES, S., WILEY, C., VINTERS, H. V. & CHEN, I. S. 1990. High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature*, 343, 85-9.
- PASCA DI MAGLIANO, M. & HEBROK, M. 2003. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*, 3, 903-11.
- PASPARAKIS, M., HAASE, I. & NESTLE, F. O. 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 14, 289-301.
- PAZ, Z. & TSOKOS, G. C. 2013. New therapeutics in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*, 25, 297-303.
- PEREZ-LOSADA, J. & BALMAIN, A. 2003. Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat Rev Cancer*, 3, 434-43.
- PIRACCINI, B. M., SACCANI, E., STARACE, M., BALESTRI, R. & TOSTI, A. 2010. Nail lichen planus: response to treatment and long term follow-up. *Eur J Dermatol*, 20, 489-96.
- PITTELKOW, M. R. & DAOUD, M. S. 2008. Lichen planus. *Dermatology in general medicine. 7th ed. New York: Mc-Graw-Hill*, 244-55.
- POLAKOWSKA, R. R. & HAAKE, A. R. 1994. Apoptosis: the skin from a new perspective. *Cell Death Differ*, 1, 19-31.
- PROMEL, S., WALLER-EVANS, H., DIXON, J., ZAHN, D., COLLEDGE, W. H., DORAN, J., CARLTON, M. B., GROSSE, J., SCHONEBERG, T., RUSS, A. P. & LANGENHAN, T. 2012. Characterization and functional study of a cluster of four highly conserved orphan adhesion-GPCR in mouse. *Dev Dyn*, 241, 1591-602.
- PRUD'HOMME, G. J., KONO, D. H. & THEOFILOPOULOS, A. N. 1995. Quantitative polymerase chain reaction analysis reveals marked overexpression of interleukin-1 beta, interleukin-1 and interferon-gamma mRNA in the lymph nodes of lupus-prone mice. *Mol Immunol*, 32, 495-503.
- RAASCH, B. A., BUETTNER, P. G. & GARBE, C. 2006. Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. *Br J Dermatol*, 155, 401-7.
- RAHMAN, P., SUN, S., PEDDLE, L., SNELGROVE, T., MELAY, W., GREENWOOD, C. & GLADMAN, D. 2006. Association between the

- interleukin-1 family gene cluster and psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum*, 54, 2321-5.
- RANGANATHAN, S., SIMPSON, K. J., SHAW, D. C. & NICHOLAS, K. R. 1999. The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. *J Mol Graph Model*, 17, 106-13, 134-6.
- RATTNER, A., SMALLWOOD, P. M., WILLIAMS, J., COOKE, C., SAVCHENKO, A., LYUBARSKY, A., PUGH, E. N. & NATHANS, J. 2001. A photoreceptor-specific cadherin is essential for the structural integrity of the outer segment and for photoreceptor survival. *Neuron*, 32, 775-86.
- RATUSHNY, V., GOBER, M. D., HICK, R., RIDKY, T. W. & SEYKORA, J. T. 2012. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*, 122, 464-72.
- RAUBENHEIMER, E. J. 1987. The myoepithelial cell: embryology, function, and proliferative aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 25, 161-93.
- RAY, R., CHOI, M., ZHANG, Z., SILVERMAN, G. A., ASKEW, D. & MUKHERJEE, A. B. 2005. Uteroglobin suppresses SCCA gene expression associated with allergic asthma. *J Biol Chem*, 280, 9761-4.
- REICH, K., NESTLE, F. O., PAPP, K., ORTONNE, J. P., EVANS, R., GUZZO, C., LI, S., DOOLEY, L. T., GRIFFITHS, C. E. & INVESTIGATORS, E. S. 2005. Infliximab induction and maintenance therapy for moderate-to-severe psoriasis: a phase III, multicentre, double-blind trial. *Lancet*, 366, 1367-74.
- REMINGTON, S. G., CROW, J. M. & NELSON, J. D. 2008. Secretoglobins: lacrimal gland-specific rabbit lipophilin mRNAs. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49, 2856-62.
- RICHMOND, J. M. & HARRIS, J. E. 2014. Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4, a015339.
- RINN, J. L., WANG, J. K., LIU, H., MONTGOMERY, K., VAN DE RIJN, M. & CHANG, H. Y. 2008. A systems biology approach to anatomic diversity of skin. *J Invest Dermatol*, 128, 776-82.
- RIVAS-SANTIAGO, B., HERNANDEZ-PANDO, R., CARRANZA, C., JUAREZ, E., CONTRERAS, J. L., AGUILAR-LEON, D., TORRES, M. & SADA, E. 2008. Expression of cathelicidin LL-37 during Mycobacterium

- tuberculosis infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect Immun*, 76, 935-41.
- ROGERS, H. W., WEINSTOCK, M. A., HARRIS, A. R., HINCKLEY, M. R., FELDMAN, S. R., FLEISCHER, A. B. & COLDIRON, B. M. 2010. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006. *Arch Dermatol*, 146, 283-7.
- ROTH, R. B., HEVEZI, P., LEE, J., WILLHITE, D., LECHNER, S. M., FOSTER, A. C. & ZLOTNIK, A. 2006. Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. *Neurogenetics*, 7, 67-80.
- SALASCHE, S. J. 2000. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*, 42, 4-7.
- SAMUDRE, S., LATTANZIO, F. A., JR., LOSSEN, V., HOSSEINI, A., SHEPPARD, J. D., JR., MCKOWN, R. L., LAURIE, G. W. & WILLIAMS, P. B. 2011. Lacritin, a novel human tear glycoprotein, promotes sustained basal tearing and is well tolerated. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52, 6265-70.
- SCHENA, M. 2003. *Microarray Analysis*. Wiley-Liss., Hoboken, NJ.
- SCHICK, C., KAMACHI, Y., BARTUSKI, A. J., CATALTEPE, S., SCHECHTER, N. M., PEMBERTON, P. A. & SILVERMAN, G. A. 1997. Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J Biol Chem*, 272, 1849-55.
- SCHITTEK, B., HIPFEL, R., SAUER, B., BAUER, J., KALBACHER, H., STEVANOVIC, S., SCHIRLE, M., SCHROEDER, K., BLIN, N., MEIER, F., RASSNER, G. & GARBE, C. 2001. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol*, 2, 1133-7.
- SCHNEIDER, L., TILLES, S., LIO, P., BOGUNIEWICZ, M., BECK, L., LEBOVIDGE, J., NOVAK, N., BERNSTEIN, D., BLESSING-MOORE, J., KHAN, D., LANG, D., NICKLAS, R., OPPENHEIMER, J., PORTNOY, J., RANDOLPH, C., SCHULLER, D., SPECTOR, S., TILLES, S. & WALLACE, D. 2013. Atopic dermatitis: a practice parameter update 2012. *J Allergy Clin Immunol*, 131, 295-9 e1-27.

- SCHONEBERG, T., SCHULTZ, G. & GUDERMANN, T. 1999. Structural basis of G protein-coupled receptor function. *Mol Cell Endocrinol*, 151, 181-93.
- SCHRODER, J. M. & HARDER, J. 2006. Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci*, 63, 469-86.
- SCOTT, A., WELDON, S. & TAGGART, C. C. 2011. SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family. *Biochem Soc Trans*, 39, 1437-40.
- SEKULIC, A., MANGOLD, A. R., NORTHFELT, D. W. & LORUSSO, P. M. 2013. Advanced basal cell carcinoma of the skin: targeting the hedgehog pathway. *Curr Opin Oncol*, 25, 218-23.
- SHAPIRO, L. & WEIS, W. I. 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a003053.
- SHARMAN, J. L., MPAMHANGA, C. P., SPEDDING, M., GERMAIN, P., STAELS, B., DACQUET, C., LAUDET, V., HARMAR, A. J. & NC, I. 2011. IUPHAR-DB: new receptors and tools for easy searching and visualization of pharmacological data. *Nucleic Acids Res*, 39, D534-8.
- SHIIBA, M., NOMURA, H., SHINOZUKA, K., SAITO, K., KOUZU, Y., KASAMATSU, A., SAKAMOTO, Y., MURANO, A., ONO, K., OGAWARA, K., UZAWA, K. & TANZAWA, H. 2010. Down-regulated expression of SERPIN genes located on chromosome 18q21 in oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep*, 24, 241-9.
- SILVERMAN, G. A., WHISSTOCK, J. C., ASKEW, D. J., PAK, S. C., LUKE, C. J., CATALTEPE, S., IRVING, J. A. & BIRD, P. I. 2004. Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cell Mol Life Sci*, 61, 301-25.
- SJODIN, A., GUO, D., HOFER, P. A., HENRIKSSON, R. & HEDMAN, H. 2003. Mammaglobin in normal human sweat glands and human sweat gland tumors. *J Invest Dermatol*, 121, 428-9.
- SJODIN, A., LJUSLINDER, I., HENRIKSSON, R. & HEDMAN, H. 2008. Mammaglobin and lipophilin B expression in breast tumors and their lack of effect on breast cancer cell proliferation. *Anticancer Res*, 28, 1493-8.
- SKLIRIS, G. P., HUBE, F., GHEORGHIU, I., MUTAWE, M. M., PENNER, C., WATSON, P. H., MURPHY, L. C., LEYGUE, E. & MYAL, Y. 2008.

- Expression of small breast epithelial mucin (SBEM) protein in tissue microarrays (TMAs) of primary invasive breast cancers. *Histopathology*, 52, 355-69.
- SPIEKSTRA, S. W., TOEBAK, M. J., SAMPAT-SARDJOEPERSAD, S., VAN BEEK, P. J., BOORSMA, D. M., STOOFF, T. J., VON BLOMBERG, B. M., SCHEPER, R. J., BRUYNZEEL, D. P., RUSTEMEYER, T. & GIBBS, S. 2005. Induction of cytokine (interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure. *Exp Dermatol*, 14, 109-16.
- STERRY, W. 2006. *Dermatology*.
- STEWART, G. D., SKIPWORTH, R. J., ROSS, J. A., FEARON, K. & BARACOS, V. E. 2008. The dermcidin gene in cancer: role in cachexia, carcinogenesis and tumour cell survival. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 11, 208-13.
- STOECKELHUBER, M., MESSMER, E. M., SCHMIDT, C., XIAO, F., SCHUBERT, C. & KLUG, J. 2006. Immunohistochemical analysis of secretoglobin SCGB 2A1 expression in human ocular glands and tissues. *Histochem Cell Biol*, 126, 103-9.
- SUGERMAN, P. B., SAVAGE, N. W., WALSH, L. J., ZHAO, Z. Z., ZHOU, X. J., KHAN, A., SEYMOUR, G. J. & BIGBY, M. 2002. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13, 350-65.
- SUN, T. T., SHIH, C. & GREEN, H. 1979. Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 2813-7.
- SZEVERENYI, I., CASSIDY, A. J., CHUNG, C. W., LEE, B. T., COMMON, J. E., OGG, S. C., CHEN, H., SIM, S. Y., GOH, W. L., NG, K. W., SIMPSON, J. A., CHEE, L. L., ENG, G. H., LI, B., LUNNY, D. P., CHUON, D., VENKATESH, A., KHOO, K. H., MCLEAN, W. H., LIM, Y. P. & LANE, E. B. 2008. The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Hum Mutat*, 29, 351-60.
- TAN, X., SUN, X., GONZALEZ-CRUSSI, F. X., GONZALEZ-CRUSSI, F. & HSUEH, W. 1994. PAF and TNF increase the precursor of NF-kappa B p50 mRNA in mouse intestine: quantitative analysis by competitive PCR. *Biochim Biophys Acta*, 1215, 157-62.

- TANAKA, M., AIBA, S., MATSUMURA, N., AOYAMA, H. & TAGAMI, H. 1995. Prurigo nodularis consists of two distinct forms: early-onset atopic and late-onset non-atopic. *Dermatology*, 190, 269-76.
- TOMASINSIG, L. & ZANETTI, M. 2005. The cathelicidins--structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci*, 6, 23-34.
- TORRES, A., STOREY, L., ANDERS, M., MILLER, R. L., BULBULIAN, B. J., JIN, J., RAGHAVAN, S., LEE, J., SLADE, H. B. & BIRMACHU, W. 2007. Microarray analysis of aberrant gene expression in actinic keratosis: effect of the Toll-like receptor-7 agonist imiquimod. *Br J Dermatol*, 157, 1132-47.
- TOULZA, E., MATTIUZZO, N. R., GALLIANO, M. F., JONCA, N., DOSSAT, C., JACOB, D., DE DARUVAR, A., WINCKER, P., SERRE, G. & GUERRIN, M. 2007. Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function. *Genome Biol*, 8, R107.
- TSURUTA, D., HASHIMOTO, T., HAMILL, K. J. & JONES, J. C. 2011. Hemidesmosomes and focal contact proteins: functions and cross-talk in keratinocytes, bullous diseases and wound healing. *J Dermatol Sci*, 62, 1-7.
- VAALASTI, A., SUOMALAINEN, H. & RECHARDT, L. 1989. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in prurigo nodularis: a comparative study with neurodermatitis circumscripta. *Br J Dermatol*, 120, 619-23.
- VOLZ, A., KORGE, B. P., COMPTON, J. G., ZIEGLER, A., STEINERT, P. M. & MISCHKE, D. 1993. Physical mapping of a functional cluster of epidermal differentiation genes on chromosome 1q21. *Genomics*, 18, 92-9.
- WANG, J. C., DERYNCK, M. K., NONAKA, D. F., KHODABAKHSH, D. B., HAQQ, C. & YAMAMOTO, K. R. 2004. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15603-8.
- WARNAKULASURIYA, S. 2011. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: prevention. *Periodontol 2000*, 57, 38-50.
- WATSON, M. A. & FLEMING, T. P. 1996. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. *Cancer Res*, 56, 860-5.

- WEIGELT, B., BOSMA, A. J. & VAN 'T VEER, L. J. 2003. Expression of a novel lacrimal gland gene lacritin in human breast tissues. *J Cancer Res Clin Oncol*, 129, 735-6.
- WHITTEMORE, A. S., LELE, C., FRIEDMAN, G. D., STAMEY, T., VOGELMAN, J. H. & ORENTREICH, N. 1995. Prostate-specific antigen as predictor of prostate cancer in black men and white men. *J Natl Cancer Inst*, 87, 354-60.
- WILKINSON, T. S., ROGHANIAN, A., SIMPSON, A. J. & SALLENAVE, J. M. 2011. WAP domain proteins as modulators of mucosal immunity. *Biochem Soc Trans*, 39, 1409-15.
- WITTENBERGER, T., SCHALLER, H. C. & HELLEBRAND, S. 2001. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors. *J Mol Biol*, 307, 799-813.
- WONG, D. J. & CHANG, H. Y. 2005. Learning more from microarrays: insights from modules and networks. *J Invest Dermatol*, 125, 175-82.
- WONG, T., MCGRATH, J. A. & NAVSARIA, H. 2007. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br J Dermatol*, 156, 1149-55.
- WRZESINSKI, T., SZELAG, M., CIESLIKOWSKI, W. A., IDA, A., GILES, R., ZODRO, E., SZUMSKA, J., POZNIAK, J., KWIAS, Z., BLUYSSSEN, H. A. & WESOLY, J. 2015. Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors. *BMC Cancer*, 15, 518.
- WU, Z., HANSMANN, B., MEYER-HOFFERT, U., GLASER, R. & SCHRODER, J. M. 2009. Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. *PLoS One*, 4, e5227.
- YANG, D., BIRAGYN, A., KWAK, L. W. & OPPENHEIM, J. J. 2002. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol*, 23, 291-6.
- YOON, J. M., LEE, K. H., LEE, S. M., LIM, J. J., YANG, S. C., YOO, C. G., LEE, C. T., HAN, S. K., SHIM, Y. S. & KIM, Y. W. 2010. The immune modulation of Clara cell-10 in human peripheral monocytes and dendritic cells. *Int J Mol Med*, 26, 415-23.
- YOUSSEF, K. K., VAN KEYMEULEN, A., LAPOUGE, G., BECK, B., MICHAUX, C., ACHOURI, Y., SOTIROPOULOU, P. A. & BLANPAIN, C. 2010.

- Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol*, 12, 299-305.
- ZAFRAKAS, M., PETSCHKE, B., DONNER, A., FRITZSCHE, F., KRISTIANSEN, G., KNUCHEL, R. & DAHL, E. 2006. Expression analysis of mammaglobin A (SCGB2A2) and lipophilin B (SCGB1D2) in more than 300 human tumors and matching normal tissues reveals their co-expression in gynecologic malignancies. *BMC Cancer*, 6, 88.
- ZEEUWEN, P. L. 2004. Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur J Cell Biol*, 83, 761-73.
- ZEEUWEN, P. L., CHENG, T. & SCHALKWIJK, J. 2009. The biology of cystatin M/E and its cognate target proteases. *J Invest Dermatol*, 129, 1327-38.
- ZHANG, X., HOANG, E. & NOTHNICK, W. B. 2009a. Estrogen-induced uterine abnormalities in TIMP-1 deficient mice are associated with elevated plasmin activity and reduced expression of the novel uterine plasmin protease inhibitor serpinb7. *Mol Reprod Dev*, 76, 160-72.
- ZHANG, X., LIU, D., HAYASHIDA, Y., OKAZOE, H., HASHIMOTO, T., UEDA, N., SUGIMOTO, M. & KAKEHI, Y. 2015. G Protein-Coupled Receptor 87 (GPR87) Promotes Cell Proliferation in Human Bladder Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 16, 24319-31.
- ZHANG, Y., QIAN, Y., LU, W. & CHEN, X. 2009b. The G protein-coupled receptor 87 is necessary for p53-dependent cell survival in response to genotoxic stress. *Cancer Res*, 69, 6049-56.
- ZIEGLER, A., JONASON, A. S., LEFFELL, D. J., SIMON, J. A., SHARMA, H. W., KIMMELMAN, J., REMINGTON, L., JACKS, T. & BRASH, D. E. 1994. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, 372, 773-6.

8 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AD	Atopische Dermatitis
ADGRF4	[<i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor F4</i>]
Ad-shGPR87	[<i>Replication-deficient recombinant adenoviral vector expressing shRNA targeting GPR87</i>]
AG	Aktiengesellschaft
AK	Aktinische Keratose
ALDOB	Aldolase B
AMP	Antimikrobielles Peptid
AOD	[<i>Assay on demand</i>]
AP	Aktivatorprotein
b/b	bekannt/bekannt
b/n	bekannt/neu
BCC	[<i>Basal cell carcinoma</i>] Basalzellkarzinom
BIGE	[<i>Body Index of Gene Expression</i>]
bp	Basenpaar
BPE	[<i>Bovine pituitary extract</i>] Rinderhypophysenextrakt
BSA	[<i>Bovine serum albumin</i>] Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CA	[<i>California</i>] Kalifornien

CCL	Chemokine der CC-Familie (C = Cystein, L = Ligand)
CCRCC	[<i>Clear Cell Renal Cell Carcinoma</i>]
CD	[<i>Cluster of differentiation</i>] „Unterscheidungsgruppe“
CDHR	[<i>Cadherin-related family member</i>] Cadherin-verwandtes Familienmitglied
cDNA	[<i>Complementary DNA</i>] Komplementäre DNA
CGRP	[<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>] Calcitonin-Genverwandtes Peptid
CK	Chemokin
CLA	[<i>Cutaneous lymphocyte antigen</i>] Kutanes Lymphozytenantigen
cSCC	[<i>Cutaneous squamous cell carcinoma</i>] Kutanes Plattenepithelkarzinom
CST	Cystatin
C_t	[<i>Threshold cycle</i>] Schwellenwertzyklus
CXCL	Chemokine der CXC-Familie (C = Cystein, X = austauschbare Aminosäure, L = Ligand)
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAVID	[<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>]
DC	[<i>Dendritic cell</i>] Dendritische Zelle
DCD	Dermcidin
ddH₂O	Doppelt-destilliertes Wasser
DE	Delaware
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	[<i>Desoxyribonucleic acid</i>] Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSC	[1.] [<i>Disulfide core domain</i>] Disulfidkerndomäne [2.] Desmocollin
DTT	Dithiothreitol

DUF	[<i>Domain of unknown function</i>]
EC-Domäne	Extrazelluläre Cadherin-Domäne
ECL	[<i>Enhanced chemiluminescence</i>]
EDC	[<i>Epidermal differentiation complex</i>] Epidermidifferenzierungskomplex
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	[<i>Epidermal growth factor</i>] Epidermaler Wachstumsfaktor
EGM MV	[<i>Endothelial growth media microvascular</i>]
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EZM	Extrazellulärmatrix
FLG	Filaggrin
g	Gramm
GB	Großbritannien
GE	General Electric
GH	Gesunde Haut
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	[<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>]
GO	[<i>Gene ontology</i>] Genontologie
GPCR/GPR	[<i>G protein-coupled receptor</i>] G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	[<i>Hour(s)</i>] Stunde(n)
H₂O	Wasser
HCl	[<i>Hydrogen chloride</i>] Chlorwasserstoff/Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
HRP	[<i>Horseradish peroxidase</i>] Meerrettichperoxidase
HSV	<i>Herpes simplex-Virus</i>

http	[<i>Hypertext transfer protocol</i>]
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Inc.	[<i>Incorporated</i>]
IPR	Datensatz der InterPro-Datenbank
IUPAC	[<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>] Internationale Union für reine und angewandte Chemie
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KG / Co. KG	Kommanditgesellschaft / Compagnie Kommanditgesellschaft
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KLK	Kallikrein
KRT	Keratin
KRTAP	Keratin-assoziiertes Protein
LCE	[<i>Late cornified envelope</i>]
LCM	[<i>Laser capture microdissection</i>] Lasermikrodissektion
LE	Lupus erythematodes
LOR	Loricrin
M	Molar
MA	Massachusetts
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
MN	Minnesota
MO	Missouri
MOPS	[3-(<i>N-morpholino</i>)propanesulfonic acid] 3-(<i>N</i> -Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	[<i>Messenger RNA</i>] Boten-RNA
MUCL	[<i>Mucin-like</i>]
n	Statistische Variable für den Erhebungsumfang
n/n	neu/neu
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NCBI	[<i>National Center for Biotechnology Information</i>]
NE	Neutrophile Elastase
ng	Nanogramm
NGF	[<i>Nerve growth factor</i>] Nervenwachstumsfaktor
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten
NJ	New Jersey
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMSCs	[<i>Nonmelanoma skin cancers</i>] Nicht-maligne Hautkrebsarten
NP40	Nonylphenol-Derivat mit 40 Ethylenoxid-Einheiten
NSCLC	[<i>Non-Small-Cell Lung Cancer</i>] Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NY	New York
OAS	2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase

OD	Optische Dichte
Oligo(dT)	Desoxythymidin-Oligonukleotid
ORF	[<i>Open reading frame</i>] Offener Leserahmen
PBMC	[<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>] Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	[<i>Phosphate buffer saline</i>] Phosphatgepufferte Salzlösung
PCDH	Protocadherin
PCR	[<i>Polymerase chain reaction</i>] Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
Pfam	Datenbank für Proteinfamilien (Pfam = Proteinfamilie)
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> ; Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PHK	Primärer humaner Keratinozyt
PN	Prurigo nodularis
PNS	Peripheres Nervensystem
PV	Psoriasis vulgaris
qPCR	[<i>Quantitative real time PCR</i>] Quantitative Echtzeit-PCR
RE	Relative Einheit
RLT	Produktbezeichnung der Firma Qiagen
RNA	[<i>Ribonucleic acid</i>] Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPE	Produktbezeichnung der Firma Qiagen
RPMI	[<i>Roswell Park Memorial Institute</i>]
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RW1	Produktbezeichnung der Firma Qiagen
S	Svedberg-Einheit (z.B. in 18S rRNA)

s	Sekunde
SAG	[<i>Skin associated gene</i>] Haut-assoziiertes Gen
SB	Stratum basale
SBEM	[<i>Small Breast Epithelial Mucin</i>]
SC	Stratum corneum
SCC	[<i>Squamous cell carcinoma</i>] Plattenepithelkarzinom
SCCIS	[<i>Squamous cell carcinoma in situ</i>] Plattenepithelkarzinom <i>in situ</i>
SCGB	Sekretoglobin
SDS	[<i>Sodium dodecyl sulfate</i>] Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	[<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>] Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERPIN	Serpin-Peptidase-Inhibitor
SG	Stratum granulosum
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SLPI	Sekretorischer Leukozyten-Protease-Inhibitor
SS	Stratum spinosum
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TaqMan	Kombination aus "Taq-Polymerase" und "PacMan" (Videospiel)
TBS	[<i>Tris buffered saline</i>]
TBS-T	TBS-Tween® 20
TCGA	[<i>The Cancer Genome Atlas</i>]
TGF	[<i>Transforming Growth Factor</i>] Transformierender Wachstumsfaktor
TMEM	Transmembranprotein
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween® 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	[1.] [<i>Unit</i>] Einheit [2.] Umdrehung
ü.N.	über Nacht
USA	[<i>United States of America</i>] Vereinigte Staaten von Amerika
usw.	und so weiter
UVB	Ultraviolett B
V	Volt
w/v	[<i>Weight per volume</i>] Gewicht pro Volumen
WAP	[<i>Whey acidic protein</i>]
WF	Wachstumsfaktor
WFDC	[<i>Whey acidic protein (WAP) four-disulfide core</i>]
WI	Wisconsin
www	[<i>World Wide Web</i>]
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Arne Gerber und Herrn Prof. Dr. Bernhard Homey für die Überlassung des hochinteressanten Themas, ihre freundliche Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

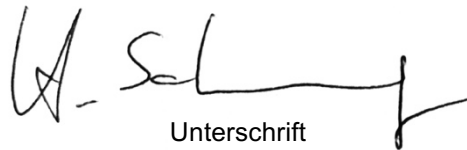
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold für die freundliche Unterstützung der Arbeit als Zweitgutachter. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Bettina Alexandra Buhren, sie gewährte mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit jederzeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Peter Hevezi und dem Forschungslabor von Prof. Dr. Albert Zlotnik an der University of California Irvine, ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Auch ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf für die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium der Biologie ermöglicht haben und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Herr Dipl.-Biol. Holger Schrumpf, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, der 16. Dezember 2016


Unterschrift