

Der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR) ist in Keratinozyten notwendig für die Integrität der murinen Hautbarriere

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Katharina Haas aus Bad Kreuznach

Düsseldorf, den 09. Mai 2016

aus dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. Charlotte Esser 2. Prof. Dr. Johannes Hageman

2. Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. November 2016

Eidesstattliche Erklärung

"Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt worden ist."

Düsseldorf, den 09.Mai.2016

Kathannia Hoas

Ort, Datum

Katharina Haas

Für Oma Leni "sometimes is goodbye a second chance"



Summary	i
Zusammenfassung	ii
Abkürzungsverzeichnis	.iii
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	x
I. Einleitung	1
1. Der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR)	3
1.1. Die Entdeckung des AhR	3
1.2. Die biochemische Struktur des AhR	3
1.3. Die Aktivierung des AhR abhängigen Signalweges	4
2. Die Haut und ihre Barrierefunktion	7
2.1. Der anatomische Aufbau der Haut	7
2.2. Der architektonische Vergleich zwischen humaner und muriner Haut	8
2.3. Die Ausbildung der physikalischen Hautbarriere	10
2.3.1. Epidermale terminale Differenzierung	12
2.3.2. Assemblierung des cornified envelopes	14
3. Der AhR, die Hautbarriere und das Hautmikrobiom	16
3.1. Die Expression von AhR in epidermalen Zellen	16
3.2. Die Genregulation von Filaggrin und anderen Hautbarriere relevanten Proteinen über den AhR:TCDD Komplex	?- 17
3.3. Der Verlust sowie eine Überexpression des AhR führen zu pathologischen epidermalen Veränderungen	18
3.4. Mikroorganismen auf der Haut produzieren AhR-Liganden	20
3.4.1. Das Hautmikrobiom	20
3.4.2. Die Haut - ein Ökosystem für Mikroorganismen	20
4. Fragestellung	23

II. Material & Methoden	24
IIa. Material	24
1. Laborchemikalien	24
2. Laborgeräte	26
3. Labormaterialien	28
4. Lösungen, Puffer & Kulturmedien	29
5. Zelllinie & Medien mit Zusätzen	32
6. Escherichia coli	32
7. Vektoren	32
8. Kits	33
9. Antikörper	33
10. Oligonukleotide	34
11. Enzyme & Größenstandards	38
12. Software	39
13. Mäuse	40
13.1. Mauslinien	40
13.2. Tierexperimentelle Materialien	41
IIb. Methoden	43
1. TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	43
1.1. Generierung konditionaler KO-Mäuse	43
1.2. Haltungsbedingungen der Mäuse	44
1.3. Nachweis des Genotyps	45
1.3.1. Kennzeichnung der Versuchstiere	45
1.3.2. Genotypisierung der Knock-Out (KO) Mauslinien	45

	1.3.3. Verifizierung des konditionalen K5 KOs	46
	1.4. Allgemeinanästhesie mit Isofluran	46
	1.5. Opferung und Sektion der Versuchstiere	48
	1.6. Messung des transepidermalen Wasserverlustes	48
	1.6.1. Durchführung der TEWL-Messung	50
	1.7. Fütterungsexperiment	52
2.	ZELLKULTURARBEITEN	53
	2.1. Isolierung von murinen Zellen	53
	2.1.1. Isolierung von Keratinozyten	53
	2.1.2. Isolierung von Milzzellen	53
	2.2. Kultivierung und Passagierung der humanen Krebszelllin	ie
	HepG2	54
	2.2.1. Kyrokonservierung der HepG2 Zelllinie	54
	2.2.2. Auftauen von Kryokulturen	55
	2.3. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer	55
3.	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	56
	3.1. Agarose-Gelelektrophorese	56
	3.2. Gel-Extraktion zur Isolierung von DNS	56
	3.3. Nachweis der Funktionalität von DRE-Sequenzen in	
	Hautbarriere relevanten Genen	57
	3.3.1. Klonierung der DRE-Sequenz	57
	3.3.2. Restriktionsspaltung von DNS durch Endonukleasen	58
	3.3.3. Ligation des interessierendem DNS-Fragmentes mit der	50
	Plasmid DNS	59 60
	3.3.5 Isolation der Plasmid-DNS aus E coli	61
	3.3.6. Funktionale Analyse der putativen DRE-Sequenzen in	01
	HepG2 Zellen	61
	3.3.7. Ortsspezifische Mutagenese	64
	3.4. Isolierung von genomischer DNS	64
	3.4.1. Schnelle DNS-Isolierung	64
	3.4.2. High Pure PCR Template Preparation Kit	65
	3.5. Isolierung von Gesamt RNS aus epidermalen Zellen	65
	3.5.1. my Budget RNAmagic	65

3.5.2. RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	66
3.5.3. Bestimmung der gRNS Integrität	67
3.5.4. DNase Behandlung der gRNS	68
3.5.5. cDNS Synthese	68
3.5.6. Echt-Zeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	71
3.6. Microarray	72
3.7. Isolierung von bakterieller DNS aus der Epidermis	74
3.7.1. Gewinnung von gDNS sowie bakterieller DNS	74
3.7.2. Nachweis von bakteriellen Kontaminationen	74
3.7.3. Next Generation Sequencing (NGS)	76
4. HISTOLOGIE	78
4.1. Einbettung der Haut	78
4.2. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	78
5. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE BILDER	80
6. DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE	81
6.1. Durchflusszytometrie	81
6.2. Überprüfung der Isolierung muriner epidermaler Keratinozyten	82
7. BIOINFORMATISCHE ANALYSEN	84
7.1. Statistische Auswertung der Daten	84
7.2. Korrelationsanalyse	84
7.3. Hauptkomponentenanalyse	84
III. Ergebnisse	85
1. Einsatz von AhR-defizienten Mäusen	86
1.1. Genotypisierung der eingesetzten Mäuse	86
1.2. Überprüfung des konditionalen KOs in Keratinozyten	87
2. Optimierungen zur Messung des transepi-dermalen	
Wasserverlustes	91
2.1. Anpassung der Abrissmethode an die Maushaut	91

2.2. Der TEWL der AhR K5-KO Mäusen reagiert empfindlicher	auf
Veränderungen in der Umgebung	95
2.3. Der TEWL von verschiedenen Wildtyp-Kontroll-Mäusen	98
3. FÜHRT DER VERLUST DES AHR ZU EINER	
BEEINTRÄCHTIGEN INTEGRITÄT DER MURINEN	
HAUTBARRIERE?	99
3.1. Morphologische Untersuchungen	99
3.1.1. Der Einfluss des AhR auf die Dicke der Epidermis	99
3.1.2. Strukturelle und molekulare Veränderungen in der gestressten AhR-KO Epidermis	101
3.2. Funktionale Untersuchungen	104
3.2.1. Putative DRE-Sequenzen im E-Cadherin und Occludin Promoter	104
3.2.2. Junge AhR-KO sowie AhR K5-KO Mäuse haben eine beeinträchtigte Hautbarriere	106
3.2.3. Im Alter steigt der TEWL auch bei den Wildtypen (WT)	108
3.3. Molekularbiologische Untersuchungen	112
3.3.1. Verifizierung des mechanischen Stresses	112
3.3.2. Strategie zur Auswertung der Microarray Daten	113
3.3.3. Auswertung der Hauptkomponentenanalyse	114
3.3.4. Auswertung der Wärmekarten	
3.3.5. Der ANR beeinflüsst die Expression von vielen Hautbarr relevanten Genen	116 116
4. BEEINFLUSST DER AHR DAS HAUT-MIKROBIOM?	126
4.1. Verifizierung der bakteriellen DNS Isolierung	127
4.2. Der Einfluss des AhR auf das Ohrmikrobiom	128
4.3. Der Einfluss des AhR auf das Rückenmikrobiom	132
5. IST DER AHR EIN MÖGLICHES ZIELPROTEIN FÜR	
EINE DIÄTETISCHE INTERVENTIONS-STUDIE?	136
5.1. Eine frühe Gabe von I3C scheint eine "Erinnerungsfunkti	on"
in aer Hautbarriere auszulosen	130
5.2. Der hohe TEWL einer alternden Hautbarriere kann durch verbessert werden	13C 141

5.3. Der AhR wird durch die Gabe von I3C aktiviert	145
5.4. Eine kontinuierliche Gabe von I3C verstärkt die	
Genexpression von AD assoziierten Genen	145
IV. Diskussion	150
1. Der AhR ist in Keratinozyten notwendig für die	
Integrität der murinen Hautbarriere	154
2. Der AhR ist ein gutes Zielprotein für die Entwic	klung
neuer therapeutische Strategie zur Behandlung ein	ler
atopischen Dermatitis	162
V. Ausblick	168
VI. Literaturverzeichnis	171
VII. Anhang	192
VIIa) Genotypisierungsprotokolle	192
AhR-KO Mausstamm	192
Flox-PCR-Protokoll	193
Flox-Cre-PCR-Protokoll	194
konditionale Cre-PCR-Protokoll	195
VIIb) Vektorkarte	196
VIIc) AhR abhängige Regulation von Hautbarriere-	
relevanten Genen: Genexpression zwischen 1,0 un	d 2,0
(Microarray Tabellen)	197
VIId) Der Verbrauch des Futters sowie das Gewicht	der
Mäuse aus den beiden Fütterungsexperimenten	202
VIII. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge	203
IX. Lebenslauf	204

Х.	anksagung206
----	--------------

Summary

The skin interacts with the external environment and is thus exposed to external factors such as UV-B irradiation, bacteria, allergens or mechanical stress, all of these can be dangerous. The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a sensor in the skin that recognizes chemical environmental stimuli. It is expressed in epidermal cells such as keratinocytes or $\gamma\delta$ T-cells. AhR is of great relevance in dermatological science because it is critical for various functions in the skin. It controls the aging processes as well as the homeostasis of the immune cells, for instance. The function of AhR in the skin barrier, however, is unknown. Recent murine studies have shown that both the constitutive AhR expression as well as AhR deficiency can cause pathological changes in the skin such as an inflammatory phenotype. Data from in vitro experiments demonstrate that activation of AhR enhances the transcription of skin barrier relevant genes such as filaggrin (FLG), involucrin (IVL) or transglutaminase1 (TGM1). In this dissertation AhR-deficient mice (AhR-KO) were used to characterize the skin barrier on functional, morphological and molecular levels. On the functional level it can be shown that the AhR-KO mice have a higher transepidermal water loss (TEWL) after mechanical stress. Furthermore, the time required to restore the skin barrier function was longer in the AhR-KO mice than in the wild type (WT) mice. Using conditional AhR-KO mice, in which AhR is deleted only in keratinocytes, it is demonstrated that AhR is necessary in keratinocytes to preserve the integrity of the murine skin barrier. Electronic microscope images confirmed that the mechanically stressed back skin of AhR-KO mice react more strongly to mechanical stress. In addition, the intercellular spaces between keratinocytes were greater and more dead cells were detected in the stressed AhR-KO skin compared to the WT-controls. In order to investigate the consequences of an AhR deficiency on the gene expression of skin barrier relevant genes, a transcriptome analysis was conducted at 6 hours and 24 hours after mechanical stress. This data revealed that the gene expression of many skin barrier-relevant genes decreased in AhR-KO mice compared to the WT-controls. For instance, 6 hours after the mechanical stress 3929 genes were found to be differentially expressed in the AhR-KO mice compared to the WT-controls. A common feature of skin diseases such as atopic dermatitis (AD) is an impaired skin barrier and an altered skin microbiome. The skin microbiome of AhR-KO mice, AhR K5-KO and their WT-controls were investigated for the first time. The microbial diversity appeared to be higher in AhR-KO mice compared with the WT-controls. Furthermore, it was checked whether it is possible to improve the physical skin barrier through the oral administration of the naturally occurring AhR-ligand indole-3-carbinol (I3C). For this purpose C57BL/6 mice were fed with either a synthetic AhR-ligand free diet (NALD), or with the same diet supplemented with 2g/ kg I3C. The data confirmed that it is indeed possible to improve the physical skin barrier by dietary I3C.

To conclude, my results demonstrate clearly that AhR in keratinocytes is very important for the integrity of the murine skin barrier. These observations make AhR an interesting target for improving the physical skin barrier. These findings might also be used to develop new therapeutic approaches for skin diseases such as AD.

Zusammenfassung

Die Haut interagiert mit der äußeren Umwelt und ist somit der UV-B Strahlung, Bakterien, Allergenen oder mechanischem Stress ausgesetzt, die zur äußeren Umwelt gehören und für den Organismus gefährlich werden können. Ein Sensor in der Haut, der chemisch Umweltreize erkennt, ist der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR). Der AhR wird in Hautzellen wie beispielsweise in Keratinozyten oder in $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert. Die Bedeutung des AhR in der dermatologischen Forschung wird immer größer, denn der AhR übernimmt die verschiedenartigsten Aufgaben in der Haut, wie beispielsweise beim Alterungsprozess oder bei der Homöostase von Immunzellen. Allerdings ist über seine Funktion in der Hautbarriere bisher wenig bekannt. Bis dato zeigten murine Studien, dass sowohl eine konstitutive AhR-Expression als auch die Defizienz des AhR zu pathologischen Hautveränderungen führt wie beispielsweise Entzündungen. Daten aus in vitro Experimenten belegen, dass die Aktivierung des AhR zu einer verstärkten Transkription von Hautbarriererelevanten Genen wie Filaggrin (FLG), Involucrin (IVL) und Transglutaminase1 (TGM1) führt. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Hautbarriere von AhRdefizienten Mäusen (AhR-KO) auf funktionaler, morphologischer und molekularer Ebene charakterisiert. Auf funktionaler Ebene konnte gezeigt werden, dass AhR-KO Mäuse nach mechanischem Stress einen erhöhten transepidermalen Wasserverlust (TEWL) aufweisen. Auch die Wiederherstellung einer funktionalen Hautbarriere dauerte bei den AhR-KO Mäusen länger als bei den Wildtyp (WT)-Kontrollen. Dass der AhR in Keratinozyten für die Integrität der murinen Hautbarriere notwendig ist, konnte durch den Einsatz von konditionalen AhR K5-KO demonstriert werden. Bei der AhR K5-KO Mauslinie fehlt der AhR nur in den Keratinozyten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen belegten, dass die mechanisch gestresste Haut von AhR-KO Mäuse stärker auf den Stress reagiert. So waren beispielsweise die Interzellularräume zwischen Keratinozyten größer und es konnten vermehrt tote Zellen gefunden werden. Um die Auswirkungen eines fehlenden AhR auf die Genexpression von Hautbarriere-relevanten Genen untersuchen zu können, wurde 6Stunden (Std.) und 24Std. nach dem mechanischen Stress eine Transkriptomanalyse durchgeführt. 6Std. nach dem mechanischen Stress wurden 3929 Gene als differentiell exprimiert gefunden. Eine genaue Analyse der Daten zeigte, dass die Genexpression von vielen Hautbarriere-relevanten Genen im Vergleich zu den WT-Kontrollen vermindert war. Kennzeichnend für Hauterkrankungen, wie beispielsweise einer atopischen Dermatitis (AD), ist eine beeinträchtigte Hautbarriere sowie ein verändertes Hautmikrobiom. Daher wurde das Rückenmikrobiom von AhR-KO und AhR K5-KO Mäusen sowie deren WT-Kontrollen untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die mikrobielle Diversität bei den AhR-KO Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen größer war. Zum anderen wurde überprüft, ob die physikalische Hautbarriere durch die orale Gabe des natürlichen AhR-Liganden Indol-3-Carbinol (I3C) gestärkt werden kann. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse mit einer synthetischen Diät gefüttert, die entweder AhR-Liganden frei war oder der 2g/kg IC3 zugefügt wurde. Die Daten demonstrierten eindeutig, dass die Hautbarriere über eine AhR-Liganden modifizierte Ernährung beeinflusst werden kann. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass der AhR in Keratinozyten für die Integrität der murinen Hautbarriere notwendig ist. Darüber hinaus legen die Daten nahe, dass der AhR ein mögliches Zielprotein sein könnte, um die physikalische Hautbarriere zu stärken. Dieser Befund könnte genutzt werden, um neue therapeutische Strategien gegen eine AD zu entwickeln.

Abkürzungsverzeichnis

AD	atopische Dermatitis
AhR	Arylhydrokarbonrezeptor
AhR K5-KO	Keratinozyten spezifische AhR-KO-Maus
AhR-KO	AhR defiziente KO-Maus
AhR LC-KO	Langerhanszell-spezifische AhR-KO-Maus
AhRR	AhR Repressor
ALD	AhR-Liganden-haltige Diät
ARNT	AhR nuclear translocator
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
bHLH	basic helix-loop-helix
°C	Grad Celsius
cDNS	komplementäre DNS
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cre	causes recombination
C _T	Cycle Threshold
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRE	Dioxin response elements
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
ES	embryonale Stammzelle
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Association
FICZ	6-Formylindolol [3,2-b] Carbazol
FSC	foward scatter
g	Gramm
γδ T-Zellen	epidermale dendritische T-Zellen
gDNS	genomische DNS
gRNS	genomische RNS
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
I3C	Indol-3-Carbinol
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
K5	Keratin 5
КО	Knock-Out
loxP	locus of crossing over (x), P1
mcs	Multiple cloning site
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minute
ml	Milliliter
μg	Mikrogramm
μ1	Mikroliter
μΜ	Mikromolar
mM	Millimolar
NALD	AhR-Liganden-freie Diät
ng	Nanogramm

NGS	Next Generation Sequencing
ns	nicht signifikant
PAS	PER ARNT SIM
PBS	phosphate buffered saline
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
РНАН	polyhalogenierte, aromatische Kohlenwasserstoffe
qRT-PCR	quantitative Echt-Zeit Polymerase-Kettenreaktion
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
RPS6	ribosomales Protein S6
RT	Raumtemperatur
SDT	Alleinfuttermittel für die Mäuse-Zucht
SDS	Natriumlaurylsulfat
Sek.	Sekunde
SEM	Standard Error of Mean
SPF	specific pathogene free
SSC	side scatter
Std.	Stunde
TCDD	2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (= Dioxin)
TEWL	transepidermaler Wasserverlust
vgl.	vergleiche
v/v	Verhältnisangabe Volumen zu Volumen
w/v	Verhältnisangabe Gewicht zu Volumen
WT	Wildtyp
x	mal
xg	Gravitationskraft

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der AhR könnte ein mögliches Bindeglied zwischen einer atopischen Dermatitis, der Hautbarriere und von Umweltverschmutzungen sein.	2
Abbildung 2:	Die funktionalen Domänen des AhR.	4
Abbildung 3:	Die Aktivierung des AhR abhängigen Signalweges.	5
Abbildung 4:	Der anatomische Aufbau der Haut.	8
Abbildung 5:	Der architektonische Vergleich zwischen humaner und muriner Haut.	9
Abbildung 6:	Funktionen der epidermalen "inneren-äußeren" und "äußeren-inneren" Barriere.	11
Abbildung 7:	Die Ausbildung der physikalischen Barriere.	13
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der <i>cornified envelope</i> Struktur und der Lipidbarriere.	15
Abbildung 9:	Die Besiedlung der Haut durch Mikroorganismen.	22
Abbildung 10:	Die Generierung einer konditionalen KO-Mauslinien.	44
Abbildung 11:	Schema für die Kennzeichnung der Versuchstiere.	45
Abbildung 12:	Die Mäuse in Narkose.	47
Abbildung 13:	Das Messprinzip der Tewameter-Sonde.	49
Abbildung 14:	Die Durchführung der TEWL Messung nach dem mechanischen Stress.	51
Abbildung 15:	Identifizierungsstrategie von von MHCII ⁺ und CD3 ⁺ Zellen.	81
Abbildung 16:	Repräsentatives Agarose-Gel einer AhR-KO Genotypisierung.	86
Abbildung 17:	Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen sowie epidermalen Zellen.	88
Abbildung 18:	Der Nachweis des loxP markierten AhR.	89

Abbildung 19:	Repräsentatives Agarosegel einer konditionalen AhR K5-KO Überprüfung.	90
Abbildung 20:	Vergleich der Induzierbarkeit des TEWLs durch die Abrissmethode mit Tegaderm TM 3M TM Film und herkömmlichen Tesafilm.	92
Abbildung 21:	Die Menge an entfernter Haut korreliert nicht mit dem 0Min. TEWL bei den AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.	93
Abbildung 22:	Die Menge an entfernter Haut bei der AhR K5-KO und der AhR LC-KO Mauslinie.	94
Abbildung 23:	Der TEWL von AhR K5-KO Mäusen korreliert mittelmäßig mit der Raumtemperatur.	95
Abbildung 24:	Der TEWL von AhR K5-KO Mäusen korreliert schwach mit der Luftfeuchtigkeit.	96
Abbildung 25:	Die TEWL Kinetik von C57BL/6, AhR K5-WT und AhR LC-WT Mäusen.	98
Abbildung 26:	Repräsentative Ausmessung der Epidermis vom Rücken und dem Ohr einer WT-Maus.	99
Abbildung 27:	Die Bestimmung der epidermalen Schichtdicke von AhR-KO und AhR K5-KO-Mäusen sowie deren WT-Kontrollen.	100
Abbildung 28:	Strukturelle Veränderungen in der AhR-KO Epidermis 6Std. nach dem mechanischen Stress.	102
Abbildung 29:	Expression von Hautbarriere-relevanten Genen 6Std. nach der mechanischen Stressung in der Epidermis von AhR-KO Mäusen und WT-Mäusen.	103
Abbildung 30:	Funktionale Untersuchungen der putativen DRE-Sequenzen im E-Cadherin Promoter (-359 sowie -2113/-2121) und im Occludin Promoter (-117/-550/-715 und -2603).	104
Abbildung 31:	Ortsspezifische Mutagenese in den putativen DRE-Sequenzen im E-Cadherin Promoter (-2113/-2121) und im Occludin Promoter (-117/-550/-715).	105
Abbildung 32:	Die TEWL Kinetik von jungen AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen nach dem mechanischen Stress.	106

Abbildung 33:	Die TEWL Kinetik von jungen (=10Wochen) AhR K5-KO sowie AhR LC-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen nach dem mechanischen Stress.	107
Abbildung 34:	Der TEWL von alten (=9Monaten) und sehr alten (=18Monaten) AhR-KO, AhR K5-KO und AhR LC-KO Mäusen sowie deren WT-Kontrollen nach dem mechanischen Stress.	109
Abbildung 35:	Die AhR Expression in jungen (=10Wochen) versus sehr alten (=18Monaten) AhR-WT-Kontrollen.	110
Abbildung 36:	Genexpression von Hautbarriere-relevanten Genen in sehr alten (=18Monaten) AhR-KO und AhR K5-KO Mäusen sowie deren WT-Kontrollen.	111
Abbildung 37:	Die TEWL Kinetik und die Menge an entfernter Haut von jungen (=10Wochen) AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.	113
Abbildung 38:	Überblick über die möglichen Kombinationen zur Auswertung der generierten Microarray Daten.	113
Abbildung 39:	Hauptkomponenten Analyse (PCA) von den 18 Microarray Proben	114
Abbildung 40:	Visualisierung der "Excel-Urtabellen" in Form von Wärmekarten	115
Abbildung 41:	Genexpressionsprofil von Hautbarriere- relevanten Genen.	120
Abbildung 42:	Verifizierung der Gene <i>OCLN, SPRR2H, KRT6A</i> <i>KRT16</i> und <i>MFGE8</i> in der qRT-PCR (AhR-KO und deren WT-Kontrollen).	121
Abbildung 43:	Die TEWL Kinetik und die Menge an entfernter Haut von jungen (=10Wochen) AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.	123
Abbildung 44:	qRT-PCR Überprüfung der AhR-KO Microarray Daten in dem AhR K5-KO Stamm.	124
Abbildung 45:	Nachweis der Abwesenheit von bakteriellen Kontaminationen.	127
Abbildung 46:	Häufigkeitsverteilung von verschiedenen Bakterien- stämmen auf der Ohrhaut von AhR-defizienten Mäusen.	128
Abbildung 47:	Die Bestimmung der α-Diversität vom Ohr von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.	130

Abbildung 48:	Die Bestimmung der β-Diversität vom Ohr von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.	131
Abbildung 49:	Häufigkeitsverteilung von verschiedenen Bakterien- stämme auf dem Rücken von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.	132
Abbildung 50:	Die Bestimmung der α-Diversität von der Rückenhaut von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.	134
Abbildung 51:	Die Bestimmung der β-Diversität von der Rückenhaut von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.	135
Abbildung 52:	Schema des zeitlichen Ablaufs des Futter-Tausch Experimentes.	137
Abbildung 53:	Der TEWL kann durch I3C moduliert werden.	138
Abbildung 54:	Ein erhöhter TEWL kann durch die Supplementation von I3C gesenkt werden.	139
Abbildung 55:	Schema des zeitlichen Ablaufs des Futter- Pause Experimentes.	141
Abbildung 56:	Der I3C Effekt ist auch in einer alternden Hautbarriere erkennbar.	142
Abbildung 57:	Der TEWL von acht Monaten alten Mäusen kann durch die Gabe von I3C verbessert werden.	143
Abbildung 58:	Der Nachweis eines aktiven AhR in der Epidermis.	145
Abbildung 59:	Ein Venn-Diagramm von Hautbarriere-relevanten Genen, die mit einer atopischen Dermatitis assoziiert sind.	146
Abbildung 60:	Die Genexpression von <i>CLDN1, FLG, OVOL1</i> und <i>TSLP</i> 190 Tage nach dem Start des Futter-Tausch Experimentes.	147
Abbildung 61:	Die Genexpression von <i>CLDN1, FLG, OVOL1</i> und <i>TSLP 237 Tage nach dem Start des</i> Futter-Pausen Experimentes.	149
Abbildung 62:	Die Vektorkarte des pGL3B/5DRE Vektors (5.235bp).	196
Abbildung 63:	Der Verbrauch des Futters sowie das Gewicht der Mäuse aus den beiden Fütterungsexperimenten.	202

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Die Haut und deren Adnexe	10
Tabelle 2:	Laborchemikalien	24
Tabelle 3:	Laborgeräte	26
Tabelle 4:	Labormaterialien	28
Tabelle 5:	Lösungen, Puffer & Kulturmedien	29
Tabelle 6:	Kits	33
Tabelle 7:	Antikörper	33
Tabelle 8:	Oligonukleotide	34
Tabelle 9:	Enzyme & Größenstandards	38
Tabelle 10:	Software	39
Tabelle 11:	Mauslinien	40
Tabelle 12:	Tierexperimentelle Materialien	41
Tabelle 13:	Überblick über die Narkosestadien	47
Tabelle 14:	Zusammensetzung der Mausdiäten	52
Tabelle 15-17:	Klonierung der DRE-Sequenzen (Mastermix, Thermozykler Programm)	57-58
Tabelle 18:	Pipettierschema cDNS Synthese	69
Tabelle 19-20:	Überprüfung der cDNS (Mastermix, Thermozykler Programm)	70
Tabelle 21:	Zusammensetzung Mastermix qRT-PCR	72
Tabelle 22-23:	Nachweis von bakteriellen Kontaminationen (Mastermix, Thermozykler Programm)	75
Tabelle 24-25:	Vorbereitung der Proben für das NGS (Mastermix, Thermozykler Programm)	76-77
Tabelle 26:	Antikörper für die Überprüfung der Reinheit von epidermalen Keratinozyten	82
Tabelle 27:	Bestimmtheitsmaß r ² : TEWL und Raumtemperatur	96
Tabelle 28:	Bestimmtheitsmaß r ² : TEWL und Luftfeuchtigkeit	97

Tabelle 29:	Differentiell exprimierte Transkripte mit einer Genexpression ≥3,0	117
Tabelle 30:	Vergleich der x-fachen Genexpression von AhR-KO Microarray und der AhR-KO qRT-PCR	122
Tabelle 31:	Vergleich der x-fachen Genexpression von AhR-KO sowie der AhR K5-KO qRT-PCR	125
Tabelle 32:	Vergleich der prozentualen Anteilen der vier am häufigsten vorkommenden Bakterienstämme auf den Ohren von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen	129
Tabelle 33:	Vergleich der prozentualen Anteilen der vier am häufigsten vorkommenden Bakterienstämme auf dem Rücken von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen	133
Tabelle 34:	Zusammenfassung der OMin. TEWL Werte von den vier TEWL Kinetiken (Futter-Tausch Experiment)	140
Tabelle 35:	Zusammenfassung der OMin. TEWL Werte von den vier TEWL Kinetiken (Futter-Pausen Experiment)	144
Tabelle 36-37:	Genotypisierung: Ahr-KO Mausstamm (Mastermix, Thermozykler Programm)	192
Tabelle 38-39:	Genotypisierung: Flox-PCR-Protokoll (Mastermix, Thermozykler Programm)	193
Tabelle 40-41:	Genotypisierung: Flox-Cre-PCR-Protokoll (Mastermix, Thermozykler Programm)	194
Tabelle 42-43:	Genotypisierung: konditionale Cre-PCR-Protokoll (Mastermix, Thermozykler Programm)	195
Tabelle 44-46:	AhR abhängige Regulation von Hautbarriere- relevanten Genen: Genexpression zwischen 1,0 und 2,0 (Microarray Tabellen)	197-201

I. Einleitung

Als Grenzflächenorgan steht die Haut im ständigen Kontakt mit der Umwelt und ist Umweltreizen wie UV-B Strahlung, Bakterien oder Allergenen ausgesetzt, die für den Organismus gefährlich werden können. Aus diesem Grund ist die Ausbildung einer effektiven Schutzbarriere einer der wichtigsten Funktionen der Haut [siehe [181] für eine Übersicht]. Ist die Funktionalität der Barriere nicht mehr gegeben, können entzündliche Hauterkrankungen entstehen [siehe [189, 181] für eine Übersicht] wie beispielsweise eine atopische Dermatitis (AD) [siehe [7, 121] für eine Übersicht].

Die am weitesten verbreitete entzündliche Hauterkrankung ist die atopische Dermatitis (AD), auch atopisches Ekzem genannt [siehe [204, 158, 121, 133] für eine Übersicht], mit einer steigenden Prävalenz in Industrienationen [208]. Die Pathogenese ist komplex [siehe [46] für eine Übersicht], aber es wird vermutet, dass die Entstehung der Erkrankung aus einer Kombination von genetischen und umweltbedingten Faktoren sowie Mikroorganismen resultiert [siehe [121, 158] für eine Übersicht]. So konnte beispielsweise anhand einer Zwillingsstudie [231] aufgeklärt werden, dass die Genetik den größeren Risikofaktor (82%) darstellt an einer AD zu erkranken, während umweltbedingte Faktoren nur ein kleines Risiko (18%) ausmachen [231, 133]. Kennzeichnend für die Pathogenese einer AD ist die mangelhafte Integrität der Hautbarriere, hervorgerufen durch den Funktionsverlust im Filaggrin (FLG) Protein [siehe [46] für eine Übersicht]. Entscheidend für den Schweregrad der Erkrankung scheint aber das Zusammenspiel zwischen Genetik und Umwelt zu sein, sodass auch die Umwelt immer mehr in den Fokus der Forschung rückt. Dass ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Langzeitexposition mit Luftschadstoffen aus dem Straßenverkehr und atopischen Erkrankungen existiert, konnte in einer epidemiologische Untersuchung [147] aufgezeigt werden.

An diesem Punkt rückt der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR) in den Vordergrund, wie die Abbildung 1 verdeutlicht.



Abbildung 1: Der AhR könnte ein mögliches Bindeglied zwischen einer atopischen Dermatitis, der Hautbarriere und von Umweltverschmutzungen sein.

Ein Sensor in der Haut, der Umweltreize wie UV-B Strahlung erkennt, ist der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR) [87, 91, 175, 165][siehe [221, 62] für eine Übersicht]. So entstehen beispielsweise beim Autofahren Abgase, die unter anderem 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin (TCDD) enthalten, ein AhR Ligand [47, 33, 70]. Somit könnte der AhR ein mögliches Bindeglied zwischen einer AD [103], Umweltverschmutzungen wie Luftschadstoffen aus dem Straßenverkehr [147] und der Hautbarriere [224] sein. Der AhR wird durch TCDD aktiviert [176], bei AD Patienten konnte eine erhöhte Aktivierung des AhR festgestellt werden [103] und die Filaggrin *(flg)* Expression wird über den AhR gesteuert [224].

Die vorliegende Doktorarbeit beschäftigt sich mit dem AhR, der Hautbarriere sowie dem Hautmikrobiom. Aus diesem Grund wird im ersten Teil der Einleitung ein grober Überblick über den AhR gegeben. Der zweite Teil befasst sich mit der Haut und deren physikalischen Barriere. Am Ende der Einleitung soll ein Überblick über den aktuellen Stand der Forschung bezüglich der Funktion des AhR in der Hautbarriere sowie ein kurzer Überblick über das Hautmikrobiom gegeben werden.

1. Der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR)

1.1. Die Entdeckung des AhR

Phylogenetische Analysen beweisen, dass der Arylhydrokarbonrezeptor vor über 550 Millionen Jahren entstanden ist [66] [siehe [65, 218] für eine Übersicht]. Allerdings konnten Alan Poland und Edward Glover seine Existenz sowie seine Aufgabe im xenobiotischen Metabolismus erst 1976 experimentell nachweisen und aufklären [176].

Die chemische Existenz von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) wurde eher zufällig entdeckt. Während der Synthese von Octachlordibenzo-p-dioxin (OCDD) aus Pentachlorphenol entstand TCDD als Nebenprodukt. Bei Arbeiten mit Chlorierungsprodukten wurden Hautsymptome wie starkes Kribbeln, Hautrötungen sowie Komedonen und Pusteln bei den Arbeitern beobachtet [238]. Die kausale Ätiologie, die diese pathologischen Hautveränderungen hervorgerufen hat, war eine Vergiftung mit TCDD [89]. Aber erst ab 1970 wurde TCDD zu einem "nationalen Thema" [238] und das Interesse der Wissenschaft an TCDD stieg [84, 141, 137, 238]. Sowohl in vivo [176] als auch in vitro [154, 153] Experimente wiesen nach, dass eine Vielzahl von xenobiotischen Stoffen, besonders aromatische Verbindungen [155] wie TCDD [176] über die Arylhydrokarbonhydroxylase metabolisiert werden. Bei diesem Enzym handelte es sich um eine Cytochrome P-450 vermittelte mikrosomale Monooxygenase [155, 152]. Schlussendlich zeigten die in vitro Experimente von Poland und Glover, dass TCDD an den AhR bindet, der wiederum die Expression der Arylhydrokarbonhydroxylase (=CYP1A1) induziert [176].

1.2. Die biochemische Struktur des AhR

Biochemisch ist der AhR ein Transkriptionsfaktor [66][siehe [65] für eine Übersicht] und gehört zur evolutionär, hochkonservierten Familie der bHLH-PAS-Domänen-Transkriptionsfaktoren (**b**asic **h**elix-loop-**h**elix/**P**ER **A**RNT **S**IM) [siehe [221, 45, 52, 101] für eine Übersicht].

Das bHLH/PAS Motiv wurde in einer Vielzahl von mehrzelligen Organismen wie Mollusken, Arthropoden oder Nematoden, aber auch in einer Vielzahl von Wirbeltieren wie Säugetieren gefunden [siehe [52] für eine Übersicht]. Eine schematische Darstellung der funktionalen Domänenstruktur des AhR wird in der nachfolgenden Abbildung 2 gezeigt.



Abbildung 2: Die funktionalen Domänen des AhR.

Der AhR besteht aus vier funktionellen Domänen. Einer bHLH Domäne (schwarzes Rechteck) am N-Terminus, die sowohl für die DNS Bindung als auch für Dimerisation essentiell ist. An diese Domäne grenzt die PAS Domäne an, die aus zwei Teilen besteht, A und B. Generell ist die Domäne an der Dimerisierung beteiligt verantwortlich. Und der C-Terminus ist für die Rekrutierung von Kofaktoren sowie der Transaktivierung. Abkürzungen: bHLH: basic helix-loophelix; PAS: PER-ARNT-SIM. Modifiziert nach [221, 101, 52, 51].

Der AhR ist aus verschiedenen Domänen aufgebaut, die spezifische Funktionen besitzen [51]. So werden beispielsweise die basische Binderegion sowie die angrenzende Dimerisierungsregion für die Ausbildung eines funktionalen DNS-Bindekomplexes benötigt. Das bHLH Motiv (Abbildung 2, schwarzes Rechteck) ist am N-Terminus lokalisiert [85] und notwendig für die Bindung des AhR an die DNS. Die erste sowie die zweite Helix aus dem bHLH Motiv sowie die PAS Region (Abbildung 2 dunkel, graue Rechtecke) werden für die Dimerisierung benötigt. Die Ligandenbindung wird durch die PAS-B Region vermittelt [51]. Der C-Terminus des AhR Gens wird durch eine Glutamin (Q)-reiche Domäne geprägt und ist für die Rekrutierung von Kofaktoren sowie der Transaktivierung verantwortlich [51, 114].

1.3. Die Aktivierung des AhR abhängigen Signalweges

Dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors über Signale [siehe [101] für eine Übersicht] sehr eng kontrolliert wird [siehe [221] für eine Übersicht], könnte auf die Vielzahl an identifizierten AhR Liganden zurückgeführt werden [siehe [44, 36] für eine Übersicht]. Hierbei reicht das Spektrum von exogenen Liganden wie TCDD [47, 33, 70] oder Benzo[a]pyren [32] über natürliche Liganden, die hauptsächlich in Nahrungsmitteln [siehe [37, 38] für eine Übersicht] wie Äpfeln und Zwiebeln (Quercetin), Brassicaceae (Indol-3-Carbinol) oder Gewürzen (Curcumin) [siehe [45] für eine Übersicht] gefunden werden, bis hin zu endogenen Liganden zu denen beispielsweise Indirubin [1] oder Bilirubin [213] gehören.

Die liganden- sowie zellspezifischen-AhR vermittelte Effekte [siehe [44] für eine Übersicht] werden durch bestimmte Aminosäurereste in der Ligandenbindungsdomäne vermittelt [215]. Abbildung 3 skizziert den genauen molekularbiologischen Signalweg, der durch die Bindung eines Liganden an den AhR induziert wird.



Abbildung 3: Die Aktivierung des AhR abhängigen Signalwegs.

(1) Ohne Ligand residiert der AhR in inaktiver Form im Zytoplasma zusammen mit einem Multiproteinkomplex bestehend aus: AIP, p23 und zwei Molekülen HSP90. Nachdem der Ligand (2) ins Zytoplasma gelangt ist, bindet dieser an den AhR und aktiviert diesen (3). In Folge dessen transloziert der AhR:Ligand Komplex in den Nukleus und der Multiproteinkomplex dissoziiert ab (4). Im Nukleus bindet der AhR:Ligand Komplex ARNT (5). Dieser neu formierte Komplex erkennt eine bestimmte Basenabfolge in den Promoterbereichen verschiedenster Gene (6) und induziert so die Genexpression. (7) Zu den AhR abhängigen Genen zählen CYP1A1, AHRR, FLG oder IVL. (8) CYP1A1 baut im Zytoplasma wiederum den Liganden ab. Abkürzungen: ARNT: AhR nuclear translocator, cyp1A1: Cytochrome P450 Familie1, SubfamilieA Mitglied1, AhRR: AhR Repressor, flg: Filaggrin, ivl: Involucrin. Modifiziert nach [221, 101, 52].

Der AhR Ligand TCDD [47] gelangt durch passive Diffusion ins Zytoplasma [176].

(1) *DER INAKTIVE KOMPLEX:* Der AhR liegt in ungebundenem Zustand als inaktiver Multiproteinkomplex im Zytoplasma vor. Dieser Multiproteinkomplex besteht aus zwei 90kDA Hitzeschockprotein (HSP-90) Molekülen [35, 169], Prostaglandin E Synthase 3 (p23) [28, 98, 210] und Hepatitis B Virus X-assoziierten Protein (XAP2/ AIP/Ara9) [140, 129, 14]. Die beiden HSP-90 Moleküle sorgen zusammen mit p23 dafür, dass der AhR die richtige Konformation einnimmt. Dadurch kann der Ligand binden und simultan wird verhindert, dass ARNT (*AhR nuclear translocator*) bindet. Außerdem schützen diese 3 Proteine den AhR vor der Proteolyse [27, 210, 15, 178, 242]. AIP interagiert mit dem Carboxylende von HSP-90 und verdeckt so das AhR Kernlokalisierungssignal (engl. *nuclear localization sequence*; NLS) und verhindert somit den Transfer des Rezeptors in den Zellkern [16, 170, 171].

(2) *DIE REZEPTOR AKTIVIERUNG:* Erst durch die Bindung des Liganden wird der AhR aktiviert. Als Resultat der Ligandenbindung wird AIP freigelassen. Dies führt dazu, dass die NLS Sequenz freigesetzt wird [74] und dadurch kommt es zur Translokalisation des AhR:Liganden Komplexes in den Nukleus [177]. Auch HSP-90 dissoziiert vom Rezeptor ab. Dies hat zur Folge, dass die PAS Domänen frei werden und der *AhR nuclear translocator* (ARNT) kann binden [242, 68, 179, 184]. Dieser hochaffine DNS-Bindungskomplex kann entweder direkt oder indirekt mit der DNS interagieren [242, 179, 40].

(3) *DIE DNS BINDUNG:* Das klassische Bindungsmotiv, das durch den AhR:Ligand:ARNT Komplex erkannt wird, wird als *dioxin response element* (DRE) bezeichnet und enthält die Kernsequenz 5`-GCGTG-3` [209, 223] mit der Konsensussequenz 5`-^{T/}_GNGCGTG^{A/}C^{G/}CA-3` [248, 128]. Diese Kernsequenz befindet sich in der Promoterregion von den unterschiedlichsten Genen [223]. Während ARNT das Motiv 3`-GTG erkennt, erkennt der AhR das Motiv 5`T(C/T)GC und GT (A/G)C [3, 226]. Das klassische AhR abhängige Gen ist Cytochrome P450 1A1 (*CYP1A1*) [siehe [221, 45, 44] für eine Übersicht]. Im Hinblick auf meine Dissertation konnten in den letzten Jahren viele *in vitro* Studien zeigen, dass der AhR auch die Genexpression von Hautbarriere-relevanten Genen wie Filaggrin (*FLG*) [224], Involucrin (*IVL*), Transglutaminase (*TGM*) und Interleukin (IL)1 beta (*IL-1β*) steuert [124, 167, 224].

2. Die Haut und ihre Barrierefunktion

Das Immunsystem (lateinisch "im-munis": eigentlich steuerfrei, im übertragenen Sinn unberührt, frei, rein) ist ein biologisches Abwehrsystem, um den Organismus vor pathologischen Erregern wie Viren oder Bakterien, aber auch vor anormalen z.B. maligne entarteter - Körperzellen zu schützen, um somit der Entstehung einer Krankheit entgegen zu wirken.

Klassisch lässt sich das Abwehrsystem in zwei übergeordnete Systeme einteilen: die angeborene, unspezifische Immunität sowie die erworbene, spezifische Immunität. Das **angeborene System (= nicht adaptive Immunität)** ist phylogenetisch älter und bildet die erste Barriere gegen eindringende Pathogene. Dieses ist vor allem durch eine schnelle Einsatzbereitschaft, jedoch auch durch eine mangelnde Spezifität charakterisiert. Im Gegensatz dazu steht das **erworbene System (= adaptive Immunität)**, welches zur Eliminierung einer Infektion aktiviert wird, wenn die Schutzbarrieren sowie die verschiedenen Mechanismen der angeborenen Immunität durchbrochen wurden. Die Haut zählt zu den anatomischen Barrieren, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden können [77]. Ohne die Permeabilitätsbarriere der Haut wäre ein Leben außerhalb des Wassers unmöglich. In der Literatur wird diese Permeabilitätsbarriere auch als *"Bricks and Mortar"* bezeichnet [42]. Die "Bricks" bestehen aus terminal differenzierten, toten Korneozyten, deren Plasmamembran durch eine Protein- und Lipidhülle ersetzt wurde. Der *"Mortar"* steht für eine spezielle Lipidmatrix [42, 156].

2.1. Der anatomische Aufbau der Haut

In Folge des Landganges vor über 360 Millionen Jahren entwickelten die Wirbeltiere eine äußere Schicht, die den Organismus vor der Umwelt schützen sollte und von dieser abgrenzte. Für eine dauerhafte Anpassung an ein Leben außerhalb des Wasser, entwickelte sich die einzellige Schicht [135, 168] zu einem hochkomplexen Organ weiter, das die verschiedensten Funktionen ausübt. Zu diesen Aufgaben gehören beispielsweise der Abwehr von eingedrungen Keimen und Allergenen, die Regulation von Temperatur, die Sinneswahrnehmung oder der Schutz vor Kälte, Hitze oder dem Wasserverlust.

Die humane Haut ist das größte Organ mit einem Gewicht von 3,5-10,0kg und einer Fläche von 1,5-2,0m². Morphologisch besteht die Haut aus 3 Schichten: der **Epidermis (Oberhaut)**, der **Dermis (Lederhaut)** sowie der **Subkutis (Unterhaut)** [220]. Die Epidermis ist ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel [135], besteht hauptsächlich aus Keratinozyten und ist aus 4 Schichten (siehe Abbildung 4) aufgebaut [237]. Die Epidermis ist mit der Dermis über die Basalmembran verbunden [220]. Die Dermis verankert die Epidermis und versorgt diese mit Nährstoffen [17]. Die funktionelle Aufgabe der Subkutis, die unterhalb der Dermis liegt, ist die Wärmeisolation und sie dient als Druckpolster [220]. Der anatomische Aufbau der Haut wird in der nachfolgenden Abbildung 4 gezeigt.



Abbildung 4: Der anatomische Aufbau der Haut.

Die Haut besteht aus der Epidermis, der Dermis und der Subkutis. Die Epidermis, ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel, lässt sich wiederum in die Schichten Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum unterteilen. Modifiziert nach [189, 203, 220].

2.2. Der architektonische Vergleich zwischen humaner und muriner Haut

Die humane und murine Haut sind sich sehr ähnlich [164], aber es gibt auch architektonische Unterschiede, zu denen die Dicke der Epidermis und der Dermis, die Dichte der Haarfollikel, die dermale Architektur, die Muskelschicht oder die Lokalisation der Melanozyten gehören. Die Abbildung 5 illustriert den architektonischen Vergleich zwischen humaner und muriner Haut.



Abbildung 5: Der architektonische Vergleich zwischen humaner und muriner Haut.

Histologische Bilder von HE gefärbter humaner und muriner Haut (obere Bilder: 5x Vergrößerung, untere Bilder: 20x Vergrößerung). Die Hautbiopsien wurden aus dem Rückenbereich entnommen und zeigen bedeutende Unterschiede zwischen beiden Spezies, wie die epidermale und dermale Dicke, die Dichte an Haarfollikeln (HF), die dermale Architektur, die Muskelschicht und die Lokalisation von Melanozyten (Pfeil, unteres rechtes Bild). Abkürzungen: B, Basalschicht; BMZ, Basalmembranzone; G, Granularschicht; SC, Stratum corneum. Maßstabbalken=100 μ m. Mit freundlicher Genehmigung von der Nature Publishing Group aus [102].

Ferner besteht die adulte murine Epidermis aus drei Zellschichten und ist ≤25µm dick, wohingegen die humane Epidermis aus sechs bis zehn Zellschichten besteht und ≥100µm dick ist [siehe [102] für eine Übersicht]. Die Gemeinsamkeiten liegen unter anderem in der Basalmembran, bei den basalen Keratinozyten sowie bei den Hauptbestandteilen der Keratohyalinkörnchen. Die Hauptbestandteile sind die beiden Proteine: Filaggrin (FLG) und Loricrin (LOR).

Die Dicke der Epidermis variiert bei den Mäusen. Während die Epidermis bei der Geburt dick ist, so verliert sie an Dicke, hervorgerufen durch das Haarwachstum. Nach dem Erreichen der tatsächlichen Dicke, bleibt diese über die gesamte Lebensdauer konstant. Wie auch beim Menschen hängt die Dicke der Epidermis von der anatomischen Lage ab. Um die Schnauze ist die Epidermis reibungsbedingt dick, während die Epidermis am Rumpf dünner ist. Die Epidermis, die die Ohren bedeckt, ist sehr ähnlich zur Epidermis am Rumpf, jedoch dicker. Interessanterweise enthalten nur die murinen Fußsohlen ekkrine Schweißdrüsen. Die Tabelle 1 vergleicht die wichtigsten Bestandteile der Haut und deren Adnexe zwischen der Maus und dem Menschen [164].

Bestandteil	Maus	Mensch
Dicke der Epidermis		
- dünne Bereiche	10-15µm	50-100µm
- dicke Bereiche	20-400µm	300-400µm
Körperbehaarung	schützend	Vellushaar
Drüsen		
-Talgdrüsen	ja	ja
- modifizierte Talgdrüsen	5 Typen	2 Typen
- ekkrine Drüsen	ja, Fußsohle	ja, am gesamten Körper
		incl. Fußsohle und
		Handfläche
Nägel	ja	ja

Tabelle 1: Die Haut und deren Adnexe

2.3. Die Ausbildung der physikalischen Hautbarriere

Die Haut interagiert mit der äußeren Umwelt und ist somit der UV-B Strahlung, Bakterien oder Allergenen ausgesetzt, die zur äußeren Umwelt gehören und für den Organismus gefährlich werden können. Aus diesem Grund ist die Ausbildung einer effektiven Schutzbarriere einer der wichtigsten Funktionen der Haut [siehe [181] für eine Übersicht]. Die Abbildung 6 fasst die Funktionen der epidermalen Barriere kurz zusammen.



Abbildung 6: Funktionen der epidermalen "inneren-äußeren und "äußeren-inneren" Barriere. Die Hautbarriere schützt vor einem extremen Wasserverlust (innere-äußere Barriere) und bietet Schutz vor gefährlichen Substanzen aus der Umwelt (äußere-innere Barriere). Modifiziert nach [181].

Die Bedrohungen können physikalischer Natur sein, wie beispielsweise mechanische Verletzungen oder UV-Strahlung, aber auch mikrobieller oder chemischer Herkunft wie z.B. Bakterien, Viren, Pilze, Allergene oder Reizstoffe. Dem gegenüber steht an vorderster Stelle die physikalische Barriere mit dem Stratum corneum und der kernhaltigen Epidermis. Die kernhaltige Epidermis besitzt Zell-Zell Verbindungen (= *Tight Junction*), die die Zellzwischenräume abdichten. Dahinter warten die chemische/biochemische (antimikrobielle, angeborene Immunität) und die erworbene Immunität. Die chemische/biochemische Barriere besteht hauptsächlich aus Lipiden, Säuren, hydrolytischen Enzymen, antimikrobiellen Peptiden und Makrophagen. Zelluläre sowie humorale Bestandteile, wie z.B. Langerhanszellen, T-Zellen, Zytokine und pathogenspezifische Antikörper, bilden die immunologischen Barriere [siehe [181] für eine Übersicht]. Die Ausbildung der physikalischen Hautbarriere ist ein hochkomplexer Vorgang, der während der Embryogenese stattfindet [siehe [26, 93, 92, 111] für eine Übersicht]. Charakteristisch für die physikalische Hautbarriere sind ein festgelegter Differenzierungsprozess der Keratinozyten (siehe Kapitel 2.3.1.) sowie die Ausbildung des *cornified envelope* (siehe Kapitel 2.3.2.).

2.3.1. Epidermale terminale Differenzierung

Kennzeichnend für die Epidermis ist die Fähigkeit, sich lebenslang selbst zu erneuern [siehe [9] für eine Übersicht]. Träger dieser Selbsterneuerung sind Stammzellen [50]. Bei der Teilung der Stammzelle entsteht eine neue Stammzelle, die in der Basalschicht bleibt und eine Tochterzelle, die als Keratinozyt in die nächst höhere Schicht entlassen wird [110, 163]. Inhaltliche sowie morphologische Veränderungen definieren die unterschiedlichen Differenzierungsstadien, die der Keratinozyt beim Verlassen der Basalschicht erfährt [siehe [13] für eine Übersicht].

Der Beginn des Differenzierungsprozesses liegt im **Stratum basale**. Hier entsteht aus einer epidermalen Stammzelle ein würfel- bis säulenförmig aussehender Keratinozyt, der in das **Stratum spinosum** entlassen wird. Die Zellachse beginnt sich horizontal auszurichten. Das Zytoplasma verändert sich durch eine gesteigerte Proteinbiosynthese sowie Keratinsynthese. Keratin ist ein hochpolymeres, cysteinreiches Protein und Grundbestandteil des Keratinozyten-Zytoskeletts. Lagern sich mehrere Keratin-Intermediärfilamente zusammen, dann entstehen Tonofilamente. Ein kompaktes und netzartiges Gerüst aus Tonofilamenten entsteht, das der Zelle den nötigen Halt verleiht. Desmosomen verbinden Keratinozyten untereinander und tragen so zur Form und Stabilität der Zelle bei. Der Golgi-Apparat beginnt langsam mit der Produktion von Lamellen-Körnchen, die hauptsächlich aus Gucosylceramiden, freien Sterolen und Phospholipiden bestehen.

Kennzeichnend für das **Stratum granulosum** ist, dass der Keratinozyt immer flacher wird und sich parallel zur Oberfläche des Stratum corneum anordnet. In dieser Schicht beginnt die Zelle zwei verschiedene Typen von Keratohyalin-Körnchen zu produzieren, die sich dicht gepackt um die Tonofilamente legen. Zum einen F-Körnchen, die aus Profilaggrin bestehen, und zum anderen L-Körnchen, die Loricrin enthalten.

Der Übergang in die letzte Schicht der Epidermis erfolgt schnell. Der Eintritt in das **Stratum corneum** bedeutet das Ende des Differenzierungsprozesses und der

Keratinozyt stirbt: Die Zelle flacht immer mehr ab und verliert ihren Zellkern. Die Plasmamembran wird durch eine Protein und Lipidhülle, dem *cornified envelope* (siehe Kapitel 3.2.2.), ersetzt und zusammen mit der Lipidmatrix wird eine Permeabilitätsbarriere ausgebildet. Der gesamte terminale Differenzierungsprozess dauert durchschnittlich vier Wochen [siehe [107, 237, 189, 163, 145, 220, 139, 13, 26] für eine Übersicht]. Eine graphische Darstellung der Ausbildung der physikalischen Barriere wird in der Abbildung 7 gezeigt.



Abbildung 7: Die Ausbildung der physikalischen Barriere.

Dargestellt sind die wichtigsten Faktoren, die zur Ausbildung der physikalischen Barriere beitragen. Grundlage ist ein wohldefinierter Differenzierungsprozess von Keratinozyten. Dieser Prozess ist durch morphologische sowie inhaltliche Veränderungen geprägt sowie der Ausbildung des CE und einer Lipidmatrix. Modifiziert nach [181, 189, 130, 202]. Abkürzung: CE: cornified envelope.

2.3.2. Assemblierung des cornified envelopes

Im Zuge des Differenzierungsprozesses eines Keratinozyten entsteht das *cornified envelope* (CE), das den toten Keratinozyten umhüllt. Das CE besteht aus zwei Schichten, einer Proteinschicht (~10nm) und einer Lipidschicht (~5nm). Die Proteinschicht besteht aus einem Gerüst von verschiedenen kovalent verbunden Proteinen, während die Aufgabe der Lipidschicht darin besteht, die toten Korneozyten mit der Lipidmatrix zu verbinden [siehe [156] für eine Übersicht]. Der Zusammenbau des CE findet in 3 Schritten statt und beginnt in dem oberen Bereich des Stratum spinosum [siehe [93, 92] für eine Übersicht].

SCHRITT 1: Der Zusammenbau beginnt mit der Herstellung der Proteine Envoplakin (EVPL) und Periplakin (PPL). Diese Proteine sind mit dem intermediären Keratinfilamentnetzwerk und den desmosomalen Verbindungsstellen verbunden. Ein langsamer Anstieg der intrazellulären Calcium (Ca²⁺) Konzentration initiiert, die Formation von Heterotetramere Komplexe an der Plasmamembran, die aus Envoplakin (EVPL) und Periplakin (PPL) bestehen. Als Nächstes werden die Proteine Involucrin (IVL) und Transglutaminase1 (TGM1) hergestellt, die sich spontan an der Membran anlagern. Involucrin (IVL) Moleküle quervernetzen sich untereinander, als Folge eines weiteren Ca²⁺ Einstroms. Darüber hinaus können Vernetzungen zwischen Envoplakin (EVPL) und Involucrin (IVL) hergestellt werden. Diese Quervernetzungen werden durch die Transglutaminase1 (TGM1) durchgeführt. Am Ende ist ein Grundgerüst entstanden, das hauptsächlich aus den Proteinen Involucrin (IVL), Periplakin (PPL) und Envoplakin (EVPL) besteht [siehe [92] für eine Übersicht].

SCHRITT 2: Dieser Schritt wird geprägt durch die Ausschüttung von Lipiden in die intrazelluläre Matrix. Während des Differenzierungsprozesses (vgl. 2.3.1.) werden Lamellen-Körnchen gebildet, deren Hauptbestandteile Gucosylceramide, freie Sterole und Phospholipide sind. Diese Körnchen werden zur Zellmembran transloziert, verschmelzen mit der Phospholipidschicht und sekretieren ihren Inhalt in das extrazelluläre Milieu [siehe [93] für eine Übersicht].
SCHRITT 3: Geprägt wird der letzte Schritt durch die Stärkung des Grundgerüstes, indem weitere Proteine wie Loricrin (LOR) und die kleine Prolin-reiche Proteine (SPRR) mit dem Grundgerüst verbunden werden. Im Gegensatz zu Loricrin (LOR) sind die kleinen Prolin-reichen Proteine (SPRR) sehr löslich. Infolge der Ouervernetzung von Loricrin (LOR) mit den kleinen Prolin-reichen Proteinen (SPRR) entsteht ein löslicher Komplex, der in die Zellperipherie transloziert wird. Dieser neu formierte LOR:SPRR Komplex wird mit dem CE-Grundgerüst verknüpft [siehe [92] für eine Übersicht]. Im letzten Schritt spielt Filaggrin (FLG) eine wichtige Rolle. Keratohyalin-Körnchen (= F-Körnchen) enthalten Profilaggrin, die Vorstufe von Filaggrin (FLG). Durch Filaggrin (FLG) werden die Keratinfilamente (KRT) in dichte Bündel gepackt. Dies fördert den Zusammenbruch des Korneozyten in eine flache Form [siehe [13] für eine Übersicht]. Keratinfilamente werden über Loricrin (LOR), kleine Prolin-reiche Proteine (SPRR), Envoplakin (EVPL) und Involucrin (IVL) an das CE-Gerüst angebracht [siehe [92] für eine Übersicht]. In der Abbildung 8 wird eine schematische Darstellung der cornified envelope Struktur sowie der Lipid Barriere gezeigt.



Abbildung 8: Schematische Darstellung der *cornified envelope* Struktur und der Lipidbarriere. Abkürzungen: FLG: Filaggrin; KRT: Keratinfilament Netzwerk; LOR: Loricrin; SPRR: kleine Prolin-reiche Proteine; EVPL: Envoplakin; PPL: Periplakin; IVL: Involucrin; CER: Ceramide. Modifiziert nach [156].

3. Der AhR, die Hautbarriere und das Hautmikrobiom

Mit wenigen Ausnahmen ist über die Funktion des AhR in der murinen Hautbarriere wenig bekannt [224, 230, 48].

In diesem Kapitel soll ein Überblick über die aktuelle Forschung bezüglich der Funktion des AhR in der Haut und die daraus resultierende Konsequenz für deren Barrierefunktion gegeben werden. Im letzten Teil dieses Kapitels wird eine kurze Einführung über das Mikrobiom der Haut gegeben.

3.1. Die Expression von AhR in epidermalen Zellen

Die Haut kommuniziert mit der Umwelt [siehe [181], in der die verschiedensten AhR-Liganden wie beispielsweise TCDD [47, 33, 70] oder Benzo[a]pyren [32] vorkommen. Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass sowohl Keratinozyten wie auch Melanozyten, Langerhanszellen [87, 175] und murine, epidermale dendritische T-Zellen (DETCs oder $\gamma\delta$ T-Zellen) [91] den AhR exprimieren [87, 91, 175]. Auch in dermalen Fibroblasten sowie dermale Immunzellen wie z.B. den dendritische Zellen, Th17 und $\gamma\delta$ T-Zellen konnte AhR mRNS nachgewiesen werden [165][siehe [221] für eine Übersicht].

Darüber hinaus ist bekannt, dass der AhR spezifische Funktionen von diversen Zellen in der Haut moduliert. Dies konnten Arbeiten mit AhR-defizienten Mäusen [88, 91, 104, 120] eindrucksvoll beweisen. Somit nimmt der AhR eine wichtige Rolle in dem Barriereorgan Haut [88, 91, 87] ein. Dabei scheint der AhR Signalweg essentiell für den Aufenthalt der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Epidermis zu sein [91]. Fehlt der AhR in den Langerhanszellen, dann ist deren Reifung beeinträchtigt, die Langerhanszellen sind nicht mehr in der Lage die Expression von kostimulierende Molekülen zu verstärken und die Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und IL-10 ist vermindert [87].

3.2. Die Genregulation von Filaggrin und anderen Hautbarriererelevanten Proteinen über den AhR:TCDD Komplex

Im vorherigen Abschnitt wurde erläutert, dass der AhR in epidermalen Zellen exprimiert wird [87, 91, 175] und der Transkriptionsfaktor spezifische Funktionen von Hautzellen steuert [88, 91, 87]. Ob der AhR die Expression von Hautbarriererelevanten Genen steuert, wurde durch eine TCDD induzierte AhR Aktivierung untersucht, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* [124, 125, 99, 224, 225, 105].

So führt beispielsweise die tägliche Behandlung von HRS/J Mäusen mit TCDD oder verwandten halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen zu einer epidermalen Hyperplasie, Hyperkeratose und einer Metaplasie der Talgdrüsen [105]. Einen großen Beitrag zur Aufklärung der Funktion des AhR in der Haut leisten die Ergebnisse von Loertscher und Sutter [124, 125, 99, 224, 225]. So bewiesen Loertscher et al. (2001) als Erste [125], dass die Kultivierung von humanen Keratinozyten in einem 3D Hautäquivalent-Modell mit 10nM TCDD über acht Tage deren Differenzierung verbessert. Dieses Phänomen konnte auf eine beschleunigte Ausbildung des CE zurückgeführt werden. Dabei scheint TCDD das Genexpressionsmuster von Filaggrin (FLG), Involucrin (IVL) sowie Transglutaminase1 (TGM1) zu verändern [125]. Zehn Jahre später gelang Sutter et al. (2011) [224] der Beweis, dass Filaggrin (FLG) ein direktes Zielgen des AhR ist, indem putative DRE-Sequenzen im Filaggrin Promoter ausfindig gemacht wurden. Hierfür wurden in die funktionalen Filaggrin DRE-Kernsequenz Mutationen eingeführt und die Luziferaseaktivität gemessen. Die Mutationen verursachten eine verminderte Luziferaseaktivität [224]. Die orale Gabe von 5 oder 10µg TCDD pro kg Körpergewicht pro Maus am 12. oder 13. Tag der Trächtigkeit führt zu einer beschleunigten Fertigstellung der fötalen Hautbarriere, eingeleitet durch eine erhöhte Expression der Gene: Filaggrin (FLG) und Loricrin (LOR) [224, 124]. Dass Hautbarriere-relevante Gene wie Occludin (OCLN) und E-Cadherin (CDH1) putative DRE-Sequenzen enthalten, konnte die Studie von die Sun et al. (2004) [223] zeigen.

Kürzlich konnte eine Studie [235] bestätigen, dass der AhR eine physiologische Funktion in der epidermalen Differenzierung hat. Hierfür wurden murine AhR-WT und AhR-KO Keratinozyten entweder unter niedrigen (0,05mM) oder hohen (0,12mM) Ca²⁺ Konzentrationen kultiviert und anschließend eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Unter niedrigen Ca²⁺ Konzentrationen konnte eine signifikante Reduktion der Genexpression von Keratin (KRT) *KRT1* und *KRT10* sowie den kleinen Prolin-reichen Proteinen (*SPRR*) *SPRR2A1*, *SPRR2B*, *SPRR2G* und *SPRR2H* in den AhR-KO Keratinozyten beobachtet werden. Wird das Calcium im Kulturmedium erhöht, dann sinkt die Genexpression von Involucrin *(IVL)* und Loricrin *(LOR)* in den AhR-KO Keratinozyten im Vergleich zu den AhR-WT Keratinozyten [235]. Weiterhin deckten *in vitro* Studien mit humanen Keratinozyten auf, dass eine Stimulation der Keratinozyten mit 10nM TCDD für 24Std. die Genexpression von vielen Hautbarriere-relevanten Genen wie Filaggrin *(FLG)*, Filaggrin 2 *(FLG2)*, Repetin *(RPTN)*, aber auch von den verschiedensten kleinen Prolin-reichen Proteinen *(SPRR)* wie *SPRR1A*, *SPRR2A*, *SPRR2B*, *SPRR2D*, *SPRR2E*, *SPRR2G*, *SPRR2* und *SPRR4* verstärkt [224, 99]. Auch die Expression von Genen, die für die *de novo* Ceramidbiosynthese verantwortlich sind, werden durch eine TCDD Stimulation gestärkt [99].

3.3. Der Verlust sowie eine Überexpression des AhR führen zu pathologischen epidermalen Veränderungen

Außerdem zeigten Studien mit genetisch modifizierten Mäusen, in denen der AhR entweder überexprimiert wird [230] oder komplett fehlt [48], dass der AhR Signalweg eine Rolle in der epidermalen Pathophysiologie spielt [48, 230]. So untersuchte die Studie von Tauchi et al. (2005) [230] beispielsweise die Auswirkungen einer konstitutiven AhR Expression in Keratinozyten [230], während die Forscher um Fernandez-Salguero das Fehlen des AhR in der Haut untersuchten [48]. Interessanterweise konnten beide Studien aufzeigen, dass sowohl eine Überexpression, als auch das absolute Fehlen des AhR sich nachteilig auf die Physiologie der Haut auswirkten [48, 230].

Fernandez-Salguero et al. (1997) [48] untersuchten, welche Auswirkungen der Verlust des AhR in einer alternden Maus hat. Im Alter von sechs Monaten konnten bei den AhR-KO Mäusen starke epidermale Veränderungen beobachtet werden. Hierzu gehörten ein kreisrunder Haarausfall und eine verstärkte Narbenbildung mit einer Verdickung der oberen Hautschichten. Außerdem kam es bei manchen Mäusen zu einer schlechteren Wundheilung. Weiterhin zeigten die histologischen Untersuchungen, dass die Haarfollikel der AhR-KO Mäuse verändert waren. Dies äußert sich in einer follikulären Dystrophie, die mit einer Dilatation der Haarfollikel (engl. *piliary canal*) einhergeht. Des Weiteren wiesen die Haarfollikeln der AhR-KO Mäuse eine Ruptur auf. Histologisch waren klare Ulzera mit einem unterschiedlichen Ausmaß erkennbar, in Bezug auf Tiefe und Breite. In seltenen, aber schweren Fällen entwickelten sich die Läsionen weiter, wie sie bei einer Psoriasis beobachtet wurden und papilläre Hyperplasien konnten nachgewiesen werden. Der Schwerpunkt in dieser Studie lag mehr auf der generellen Charakterisierung des AhR-KO Stammes und nicht in der Aufklärung der Rolle des AhR in der Haut und deren Barriere. Deshalb fehlen weiterführende Experimente, die die beobachteten Hautphänomen erklären könnten [48].

Die murine Epidermis neigt zu einem entzündlichen Phänotypen, wenn der AhR in den Keratinozyten konstitutiv exprimiert wird. Diese Beobachtung wurde 2005 von Tauchi et al. (2005) veröffentlicht [230]. Erst mit einem Alter von fünf Wochen traten bei den transgenen Mäusen im Vergleich zu den WT-Kontrollen erste ekzematöse Veränderungen im Nacken auf. Phänotypisch waren diese Veränderungen mit einem beginnenden Haarverlust und einer geröteten Haut im Nackenbereich assoziiert. Gleichzeitig konnten die Forscher bei den transgenen Tieren ein erhöhtes Kratzverhalten sowie eine gesteigerte Fellpflege beobachten. Mit zehn Wochen war das Rückenfell komplett ausgefallen. Dermatologisch konnte eine erosive Dermatitis mit Krustenbildung festgemacht werden. Bei zwanzig Wochen alten transgenen Mäusen kam es zu einem vollständigen Fellverlust und dem Einsetzen einer Reepithelialisierung. Durch die Analyse des Transkriptoms stellte sich heraus, dass in den transgenen Mäusen hauptsächlich Gene verstärkt exprimiert wurden, die im Zusammenhang mit einer Inflammation stehen. Auch wiesen diese Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen eine erhöhte zelluläre Immunantwort auf. Aus den gewonnen Daten zogen die Forscher das Resümee, dass der inflammatorische Phänotyp das Resultat einer Überexpression des AhR ist. Dieser inflammatorische Phänotyp wurde gekennzeichnet durch einen erhöhten Serumspiegel an IgE und IgG1 sowie einer dominierenden TH_2 Antwort [230]. Interessanterweise konnte in den Wunden von AD Patienten vermehrt AhR-RNS nachgewiesen werden [103]. Da bei der AD teils ähnliche Symptome vorliegen, wie in den von Tauchi et al. (2005) [230] beschrieben Mäusen, insbesondere entzündliche Phänomene [230]. So liegt es nahe, dass eine verstärkte Expression des AhR beim Menschen eine (vielleicht sogar ursächliche) Rolle bei der Entstehung einer AD spielt. Auf der anderen Seite schreiben van den Bogaard et al. (2013) [234], dass die tägliche Applikation von medizinischem Teer auf die atopische Haut eine seit langem bewährte Therapieform ist. Der medizinische Teer verbessert die Symptome einer AD. Die Forscher fanden in einer in vitro Studie heraus, dass der medizinische Teer die epidermale Differenzierung über den AhR Signalweg induziert, indem die Expression von Filaggrin (FLG) beispielsweise wiederhergestellt wird. Gleichzeitig wird über den nuclear factor, erythroid 2 like 2 (NRF2) Signalweg eine TH₂ Immunantwort über die Dephosphorylierung von signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) in Keratinozyten unterdrückt [234].

Anhand der Literatur ziehe ich das Fazit, dass der AhR in der Haut wichtige Funktionen moduliert und dass die Auswirkung einer AhR Aktivierung durch die Stärke der Aktivierung bestimmt wird. Aber was seine genaue Aufgabe in der Hautbarriere ist, dass konnte noch nicht gezeigt werden.

3.4. Mikroorganismen auf der Haut produzieren AhR-Liganden

Auch manche Mikroorganismen produzieren AhR-Liganden [115, 131], so werden beispielsweise Indirubin, FICZ oder Indolo [3,2-b] Carbazol (ICZ) von *Malassezia*, insbesondere von den Arten *M. furfur* und *M. globosa*, produziert [131]. Somit wäre es denkbar, dass der AhR über das Mikrobiom beeinflusst wird und dass das Mikrobiom die Aktivitäten des AhR beeinflusst. Allerdings fehlen *bis dato* Daten, die eine Verbindung zwischen AhR und dem Hautmikrobiom beweist [24].

3.4.1. Das Hautmikrobiom

Der Begriff Mikrobiom wurde von Joshua Lederberg im Jahre 2001 geprägt, "als ökologische Gemeinschaft bestehend aus kommensalen, symbiotischen und pathogenen Mikroorganismen, die sämtliche Körperregionen besiedeln. Das Mikrobiom wurde lange Zeit als Determinante für Gesundheit und Krankheit ignoriert" [118].

Die Besiedlung der Haut mit Mikroorganismen beginnt mit der Geburt [siehe [191] für eine Übersicht]. Kaum vorstellbar ist, dass auf einem Quadratzentimeter Haut bis zu 1x10¹² Mikroorganismen leben sollen [siehe [241] für eine Übersicht], dazu gehören Bakterien, Viren, Pilze, aber auch Milben [siehe [60] für eine Übersicht]. Im Laufe der Evolution sind Säugetiere und die Mikroorganismen eine Beziehung mit gegenseitigen Vorteilen eingegangen. Eine normale Hautflora beispielsweise verhindert die Überkolonisation mit pathogenen Bakterien und trainiert die angeborene Immunität [siehe [150, 69] für eine Übersicht]. Ist die normale Hautflora gestört, kann dies in einer Hauterkrankung wie beispielsweise einer AD [204] oder einer Infektion resultieren [siehe [60] für eine Übersicht].

3.4.2. Die Haut - ein Ökosystem für Mikroorganismen

Die Haut gleicht einem Ökosystem, hervorgerufen durch die unterschiedlichsten physiologischen sowie anatomischen Bedingungen, die auf der Haut herrschen bzw. vorzufinden sind. Der pH-Wert, die Temperatur, die Feuchtigkeit sowie die Produktion von Talg definieren physiologische Bedingungen, während anatomische Bedingungen durch die Dicke der Haut, die Hautfalten sowie die Dichte an Haarfollikeln und Drüsen bestimmt werden [siehe [193, 60] für eine Übersicht]. Anhand von Sequenzanalysen des 16S rRNA Gens wurde herausgefunden, dass die vier Bakterienklassen: **Actinobakterien**, **Bacteroidetes**, **Firmicutes** und **Proteobakterien** am häufigsten auf der humanen Epidermis vorkommen [siehe [193] für eine Übersicht]. Im Allgemeinen wird die humane Haut als kühl, sauer und trocknen beschrieben [siehe [193] für eine Übersicht].

Physiologische Bedingungen: Talgdrüsen sezernieren eine lipidhaltige Substanz, die als Sebum bezeichnet wird. Aufgrund der hohen Dichte an Talgdrüsen können Hautbereiche wie beispielsweise im Gesicht, dem Rücken oder im Brustbereich als anoxisch (= sauerstofffrei) beschrieben werden. Diese Bereiche werden durch fakultativ anaerobe Bakterien wie dem *Propionibakterium acnes* besiedelt. *Propionibakterium acnes* metabolisiert die im Sebum enthaltenden Triglyceride zu freien Fettsäuren. Die freien Fettsäuren sowie der Schweiß, der von den ubiquitär vorkommenden ekkrinen Schweißdrüsen sezerniert wird, sorgen für den saueren Charakter der Hautoberfläche. Das Wachstum von vielen pathogen Mikroorganismen wie *Staphylokokkus aureus* und *Streptokokkus pyogenes* wird durch den saueren pH-Wert gehemmt, während das Wachstum von *Staphylokokki* und *Corynebakterien* gefördert wird.

Anatomische Bedingungen: Bereiche, wie beispielsweise der Bauchnabel, die Achselhöhle, die Fußsohle oder die Kniekehle werden durch das Tragen von Kleidung bedeckt. Diese Bereiche sind durch eine erhöhte Temperatur und Feuchtigkeit gekennzeichnet. Im feuchten Klima wachsen hauptsächlich gramnegative *Bacilli, Corynebakterien* und *Staphylokokkus aureus*. Hautflächen mit einer hohen Dichte an Talgdrüsen, wie z.B. das Gesicht, die Brust oder der Rücken fördern das Wachstum von lipophilen Mikroorganismen wie beispielsweise *Propionibakterium spp.* und *Malassezia spp.* Im Vergleich zu anderen Hautbereichen ist die Haut an den Händen und Füßen sehr trocknen [siehe [193, 60] für eine Übersicht]. In dieser Nische konnte die größte Diversität an mikrobiellen Mitbewohner aller vier Bakterienklassen nachgewiesen werden [siehe [193] für eine Übersicht].

Wie die Abbildung 9 zeigt, konnten auf der humanen Haut auch Pilze wie *Malassezia* [131], Viren [159] und Milben [siehe [193] für eine Übersicht] gefunden werden.



Abbildung 9: Die Besiedlung der Haut durch Mikroorganismen.

Mikroorganismen (Viren, Bakterien und Pilze) sowie Milben besiedeln die Oberfläche der Haut sowie die Haare und Drüsen. Die Hautanhangsgebilde beinhalten die Haarfollikeln, Talg- und Schweißdrüsen. Modifiziert nach [60].

4. Fragestellung

Die Haut ist ständig Umweltreizen wie beispielsweise UV-B Strahlung oder Bakterien und Allergenen ausgesetzt, die den Organismus schädigen können. Somit ist die Ausbildung einer effektiven Schutzbarriere für die Haut unerlässlich [siehe [181] für eine Übersicht]. Ein Sensor in der Haut, der Umweltreize wie UV-B Strahlung erkennt, ist der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR) [87, 91, 175, 165][siehe [221, 62] für eine Übersicht]. Der AhR wird in epidermalen Zellen wie Keratinozyten, Melanozyten [87, 175] oder in $\gamma\delta$ T-Zellen [91] exprimiert. Die Bedeutung des AhR in der dermatologischen Forschung wird immer größer [39, 224, 234, 235, 87, 88, 91], denn der AhR übernimmt die verschiedenartigsten Aufgaben in der Haut wie beispielsweise bei der Hautpigmentierung [88] oder bei der Homöostase von γδ T-Zellen [87, 91]. Aber seine Rolle in der Hautbarriere ist noch wenig erforscht [48, 230, 224]. Bis dato ist zum einen aus murinen Studien bekannt [230, 48], dass sowohl eine konstitutive AhR-Expression [230] als auch die Defizienz des AhR [48] zu pathologischen Hautveränderungen führt [230, 48]. Auf der anderen Seite zeigen in vitro Studien, dass der AhR die Genexpression von Hautbarriere-relevanten Genen wie Filaggrin (FLG) [224], Involucrin (IVL) oder Transglutaminase (TGM) steuert [124, 167, 224].

Anhand der beschriebenen Daten aus Literatur liegt es nahe, dass der AhR eine zentrale Funktion in der physikalischen Hautbarriere einnimmt. Allerdings fehlt bis heute eine *in vivo* Charakterisierung einer AhR-defizienten Hautbarriere. An diesem Punkt knüpft die vorliegende Doktorarbeit an, die im **ersten Teil** untersucht, ob **der Verlust des AhR zu einer beeinträchtigten Integrität der murinen Hautbarriere führt?** Hierfür wurde eine funktionale, morphologische sowie molekularbiologische Charakterisierung der Hautbarriere von verschiedenen konditionalen AhR-defizienten Mäusen durchgeführt. Ebenso sollte die Frage geklärt werden, in welcher Hautzelle, also Keratinozyt oder Langerhanszelle, der AhR wichtig ist bezüglich der Integrität der murinen Hautbarriere?

Da eine beschädigte Hautbarriere zu Veränderungen im Mikrobiom führen kann, beschäftigte sich der **zweite Teil** der Doktorarbeit mit der Frage, **ob der Verlust des AhR die Zusammensetzung des Hautmikrobioms beeinflusst?** Hierfür wurde erstmals das Mikrobiom des Rückens und der Ohren von konditionalen AhRdefizienten Mäusen bestimmt.

Falls die Defizienz des AhR zu einer beeinträchtigten Hautbarriere führt, so stellte sich im Umkehrschluss die Frage, ob die Hautbarriere durch eine Aktivierung des AhR gestärkt werden kann? Deshalb wurde im **dritten Teil** der Doktorarbeit die Frage untersucht, ob der **AhR ein mögliches Zielprotein für eine diätetische Interventionsstudie ist?** Hierfür wurden zwei langfristige Fütterungsstudien mit dem natürlichen AhR-Liganden Indol-3-Carbinol (I3C) durchgeführt. Die Veränderungen der Hautbarriere wurden funktional sowie molekularbiologisch festgestellt.

II. Material & Methoden

IIa. Material

1. Laborchemikalien

Tabelle 2: Laborchemikalien

Laborchemikalien	Hersteller
Aceton	Carl Roth; Karlsruhe
Agarose Standard Roti®agarose für DNS/ RNS Elektrophorese	BioRad Laboratories GmbH; München
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth; Karlsruhe
Ampicillin (p [-] α Aminobenzylpenicillin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim
Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH; Bad Homburg
Bacto TM Agar	DIFCO Laboratories; USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich; St. Louis (USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich; St. Louis (USA)
Chloroform	Carl Roth; Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
DTT; [100 mM]	Promega; Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA; Darmstadt
Ethidiumbromidlösung (EtBr); 1 %ige Lösung in Wasser [10 mg/ml]	Carl Roth; Karlsruhe
Eisessig (= 99ige% Essigsäure)	Fluka Chemie GmbH; Buchs
Entellan	Merck KGaA; Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth; Karlsruhe
Ethanol (EtOH) reinst und vergällt	Carl Roth; Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth; Karlsruhe
Ficoll TM Typ 300	Amersham Pharmacia Biotech; Schweden
Glutardialdehyd; [25%]	Merck KGaA; Darmstadt
Glycine	Carl Roth; Karlsruhe

Laborchemikalien	Hersteller		
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinhein		
Hefeextrakt	DIFCO Laboratories; USA		
Indol-3- Carbinol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim		
Isopropanol (= 2 Propanol)	Carl Roth; Karlsruhe		
Kakodylsäure (engl. <i>Sodium cacodylate</i> <i>trihydrate</i>)	Sigma-Aldrich; St. Louis (USA)		
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA; Darmstadt		
Kaliumdihydrogenphosphat (KH2PO4)	Merck KGaA; Darmstadt		
my Budget RNAmagic	Bio Budget Technologies GmbH; Krefeld		
my Budget Universal Agarose	Bio Budget Technologies GmbH; Krefeld		
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth; Karlsruhe		
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinhein		
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA; Darmstadt		
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck KGaA; Darmstadt		
Natriumhydroxid; [2N]	Merck KGaA; Darmstadt		
Natriumlaurylsulfat (engl. sodium lauryl sulfate, SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheir		
Nonidet P-40	Roche Deutschland Holding GmbH; Mannheim		
Paraformaldehyd zur Synthese	Merck KGaA; Darmstadt		
Phenol	Sigma-Aldrich; St. Louis (USA)		
RBS®T 105	Carl Roth; Karlsruhe		
Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion 5	Serva, Heidelberg		
RNAse away	Molecular BioProducts Inc.; San Diego		
Salzsäure (HCl); [25%]	Merck KGaA; Darmstadt		
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth; Karlsruhe		
Trypton	DIFCO Laboratories; USA		
TritonX100 reinst	Carl Roth; Karlsruhe		
Tween 20	Carl Roth; Karlsruhe		
Wasser doppelt destilliert	Carl Roth; Karlsruhe		
Xylene Cyanol FF	Serva; Heidelberg		
Xylol	Carl Roth; Karlsruhe		

2. Laborgeräte

Tabelle 3: Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller	
BD FACS Canto ^{TM} II	BD Bioscience; USA	
BioRad "Mini Protean Tetra Cell"	BioRad Laboratories GmbH; München	
Butterfly, Mikrozentrifuge	Carl Roth; Karlsruhe	
CO ₂ Auto Hero; Brutschrank	Heraeus; Hanau	
Elektrophorese Power Supply EPS 300	Pharmacia Biotech; Uppsala (Schweden)	
Eppendorf Pipetten 1000, 200, 100, 20 und 10 μl	Eppendorf; Hamburg	
Eppendorf Thermomixer Comfort	Eppendorf; Hamburg	
Eppendorf Zentrifuge 5415D; Tischzentrifuge	Eppendorf; Hamburg	
Feinwaage	Sartorius AG; Göttingen	
GELARE R B5B6 und KN Biomedicals BSBGA; Sterilbänke	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts (USA)	
Geldokumentationssystem; E-Box VX2 2.0 MP	PEQLAB Biotechnologies GmbH; Erlangen	
Heraeus Fresco	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts (USA)	
Heraeus Fresco 17; Kühltischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts (USA)	
Heraeus Multifuge 1 S-R; Zelllabor	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts (USA)	
Hera Safe; Sterilbank	Heraeus; Hanau	
Hera Cell 150; Brutschrank	Heraeus; Hanau	
Heidolph Polymax 1040; Schüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG; Schwabach	
HEMLE Z326K; Zentrifuge	Labortechnik GmbH; Wehingen	
HTL Discovery Comfort	HTL Lab Solutions; Polen	
IKAMAG [®] RET; Magnetrührer	IKA® Werke GmbH & Co.KG; Staufen	
nnOva TM 4200; Schüttelinkubator New Brunswick Scientific: USA		

Laborgeräte	Hersteller	
Leica CM 3050 S (Cryostat)	Leica Microsystems Nussloch GmbH; Nussloch	
Laufkammer Modell EO763	Sigma Chemical; USA	
Leica DM 2500	Leica Microsystems Nussloch GmbH; Nussloch	
Leica DM/L	Leica Microsystems Nussloch GmbH; Nussloch	
Neubauer improved Zählkammer; 0.0025 m^2	Superior; Marienfeld	
OPTIMAX®	Protea GmbH & Co Kg; Oberstenfeld	
PeqLab autoklavierbare Pipetten 1000, 200, 100, 20 und 10 µl	PEQLAB Biotechnologies GmbH; Erlangen	
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & CO.KG; Eberstadt	
Power Pac Basic, 300 und Power Supply Model 250/2.5	BioRad Laboratories GmbH; München	
Ω 32 pH Meter	Beckmann Instruments, INc.; Fullerton Ca (USA)	
Rotor-Gene Q	Qiagen; Hilden	
Tecan Reader infinite M200 Pro	Tecan Trading AG; Schweiz	
T ₃₀₀ Thermocycler	Biometra GmbH; Göttingen	
Tgrandient	Biometra GmbH; Göttingen	
Tissue Lyser II	Qiagen; Hilden	
Vortex Mixer	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH; Heidelberg	
Waage Kern 440-35N; max. 400g		
Zeiss Imager M2	ZEISS Deutschland	

3. Labormaterialien

Tabelle 4: Labormaterialien

Labormaterialien	Hersteller		
BD Falcon [™] 5 ml Polystrene Round Bottom Tube	BD Falcon; Heidelberg		
Biosphere [®] Filter Tip 1000, 100 und 20 μ l	Sarstedt; Nümbrecht		
Deckglas für die Neubauerzählkammer	Menzel GmbH & Co KG; Braunschweig		
Einbettschälchen für Kryoschnitte; Cryomolds Square Intermediate Tissue Tek	Sakura Finetek Europe B.V. KvK; Niederlande		
Falcon 14ml	Becton & Dickinson Labware; USA		
Gewebekulturflaschen; 25ml	Sarstedt; Nümbrecht		
Gewebekulturplatten; 6 und 12 Lochplatten	Sarstedt; Nümbrecht		
Glasperlen; Ø 1.25 - 1.65 mm	Carl Roth; Karlsruhe		
Glasplatten "Glass Plates Mini-PROTEAN 3 System"	BioRad Laboratories GmbH; München		
Injekt [®] Luer Solo, 20ml	Braun Melsungen AG; Melsungen		
Lochplatte; 96 und 6 Vertiefungen	Sarstedt; Nümbrecht		
Messerklingen "low profile microtome blades type 819"	Leica AG; Wetzlar		
Metallkugeln; 5 mm, stainless steal beads	Qiagen; Hilden		
Multiply [®] Strip 0,2 ml	Sarstedt; Nümbrecht		
Nunc TM cyro Tube TM vials; 1.8 ml	Nuncbrand; Dänemark		
PCR SingleCap 8er Soft Strips 0.2 ml	Biozyme Scientific GmbH; Oldenburg		
Petrischalen	Sarstedt; Nümbrecht		
Pipettenspitzen 1000, 100, 20 und 10μ l	Sarstedt; Nümbrecht		
Quick DRAW TM blotting Paper	Sigma Chemical Company; St. Louis (USA)		
Reagiergefäße "Safe Seal" 2,0; 1,5 und 0,5ml	Sarstedt; Nümbrecht		
Reagiergefäße "Safe Seal" 2,0 und 1,5ml PCR Performance Tested	Sarstedt; Nümbrecht		
Reaktionsröhrchen 15 und 50ml	Sarstedt; Nümbrecht		
Schnittstrecker Glas 70 mm	Leica AG; Wetzlar		
Serologische Pipetten 50, 25, 10, 5, 2 und 1ml	Sarstedt; Nümbrecht		

Labormaterialien	Hersteller
Strip Tubes 0,1ml für Rotor Gene	LTF Labortechnik; Wasserburg
S&S gebrauchsfertige Filtereinheiten 0.2µm	Schleicher & Schuell GmbH; Dassel
SUPERFROST ULTRA PLUS; Objektträger	Menzel GmbH & Co KG; Braunschweig
Tork Waschtuch	SCA Hygiene Products AFH Sales GmbH; Mannheim
Zellschaber 16cm	Sarstedt; Nümbrecht

4. Lösungen, Puffer & Kulturmedien

Lösungen, Puffer und Kulturmedien	Zusammensetzung/Hersteller
ACT Puffer für die Erythrozytenlyse	2,6 g/l Tris; 8,55 g/l NH ₄ Cl
	→ pH auf 7,2 einstellen; steril filtrieren und bei 4°C aufbewahren
Ampicillin Stammlösung	100 mg/ml in Ampuwa Wasser
	\rightarrow Lagerung bei -20°C
Bakterienmedium, flüssig; nach Luria Bertani (LB)	10g Tryptan; 5g Hefeextrakt; 10g NaCl; 50µg/ml Ampicillin
	→ in 1 l Aqua destilliertes Wasser (Aqua dest.) und autoklavieren → Carl Roth; Karlsruhe
Differenzierungslösung für die H&E Färbung	0.5% HCL in 70% Ethanol
Direct PCR Tail; Lysis Reagent	PEQLAB Biotechnologies GmbH; Erlangen
Dulbecco`s Modified Eagles Medium (DMEM High Glucose Medium	GE Healthcare Life Science; Buckinghamshire (England)
EDTA; [0,5M]	93,08g EDTA in 500ml Aqua dest.
	→ pH Wert auf 8,0 mit NaOH Plätzchen einstellen
Einbettmedium (Leica Cryocompound)	Jung GmbH; Nussloch

Tabelle 5: Lösungen, Puffer & Kulturmedien

Lösungen, Puffer und Kulturmedien	Zusammensetzung/Hersteller	
Einfriermedium für Zellen	90% FCS; 10% DMSO	
Eosin Lösung; Gebrauchslösung	Sigma Aldrich; St. Louis (USA)	
	0.5 % (w/v) in 90 % Ethanol; unverdünnt einsetzen	
FACS Puffer	500 ml PBS; 10 ml FCS; 2 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)	
Fixierungspuffer; [2%] (Elektronenmikroskopie (EM))	4% Paraformaldehyd; 4% Glutardialdehyd	
fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH; Aidenbach	
Glutardialdehyd; [4%]	0,8ml 25%iges Glutardialdehyd; 4,2ml 0,2M Cacodylat Puffer	
	→ Lagerung bei 4°C	
Hämalaun Lösung; Gebrauchslösung	6g/l; unverdünnt einsetzen	
	→ Sigma Aldrich; St. Louis (USA)	
Kakodylsäure Puffer; [0,2M]	2,1403g auf 50ml Aqua dest.	
	→ pH Wert auf 7,35 einstellen und bei 4°C lagern	
Ladepuffer für DNS/RNS Gele; [6x]	0,25% Xylen; 1,5% Ficoll Typ 400; 0,25% Bromphenolblau in TAE Puffer	
Laufpuffer; [10x] für Western Blot	30g Tris; 144g Glycine, 10g SDS	
	→ mit 11 Aqua dest. auffüllen; pH 8,3	
LB Platten	5g Hefeextrakt; 10g Trypton; 10g NaCl; 50µg/ml Ampicillin; 10g Agar-Agar	
	→ mit 11 Aqua dest. auffüllen	
Lysis Puffer für die DNS Isolierung	100mM Tris; 200mM NaCl; 5mM EDTA; 0,2% SDS	
	→ mit 500ml Aqua dest. auffüllen; pH 8,5	
Lysis Puffer für die DNS Isolierung modifiziert	100mM Tris; 200mM NaCl; 5mM EDTA; 0,2% SDS; 2,0% TritonX100; 1% Tween 20	
	→ mit 500ml Aqua dest. auffüllen; pH 8,5	

Lösungen, Puffer und Kulturmedien	Zusammensetzung/Hersteller	
Medium für die Isolierung von Milzzellen und Keratinozyten	500ml DMEM; 50ml FCS; 5ml Pen/Strep	
my Budget dGTP; dATP; dTTP; dCTP; [100 mM]	Bio-Budget Technologies GmbH; Krefeld	
Paraformaldehyd; [4%]	20g Paraformaldehyd in 250ml Aqua dest. bei 60°C für 4 bis 5h auf dem Heizblock rühren. Die Lösung mit ca. 8 Tropfen 1N NaOH klären. Mit 250 ml 0,2 M PBS auf 500ml auffüllen, abkühlen lassen und filtrieren.	
	→ pH Wert 7,0; Lagerung bei 4 °C	
phosphate buffered saline (PBS); [10x]	80g/l NaCl; 2g/l KCl; 11,5g/l Na ₂ HPO ₄ x2 H ₂ O; 2g/l KH ₂ PO ₄	
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom GmbH; Berlin	
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep); [100x]] PAA Laboratories GmbH; Cölbe	
Primer poly (dT) 12-18; [0.5 µg/ml]	Carl Roth; Karlsruhe	
	→in Ampuwa Wasser auflösen	
Propidiumiodide Lösung	Sigma Aldrich; Taufkirchen	
Ribolock RNAse Inhibitor; [2500 U]	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts (USA)	
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI)	GE Healthcare Life Science; Buckinghamshire (England)	
RQ1 DNAse Stop Lösung	Promega; USA	
SDS; [10%]	10g SDS in 100ml Aqua dest. auflösen	
SOC-Medium; Outgrowth Medium	New England BioLabs GmbH; Frankfurt am Main	
TAE; [50x]	242g Tris; 57,1ml Eisessig; 100ml 0,5 M EDTA	
	→ pH 8,0; auf 11 mit Aqua dest. auffüllen	
Trypsin; [25x]	GIBCO [®] life technologies	
Trypsin/PBS; [2,5x]	1ml 25x Trypsin + 9ml PBS	
TCDD in DMSO	LGC Promochem GmbH; Wesel	

Lösungen, Puffer und Kulturmedien	Zusammensetzung/Hersteller
Trypsin/ETDA	PAA Laboratories GmbH; Paschingen
Trypanblau Lösung; [0,4%]	Fluka Chemie AG; Schweiz

5. Zelllinie & Medien mit Zusätzen

Für die Transfektion wurde die humane Leberkarzinom Zelllinie HepG2 verwendet. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂). Folgende Medien wurden eingesetzt: DMEM Vollmedium (+ 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)) und für die Transfektion entweder DMEM nur mit FCS oder DMEM ohne Zusätze.

6. Escherichia coli

Für molekularbiologische Arbeiten diente der *Escherichia coli (E.coli)* Stamm "DH5 α^{TM} derivative" von New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main) als Wirtsstamm. *Genotyp: fhuA2* Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

7. Vektoren

Ein Vektor ist ein DNS-Molekül, das von einem Wirt vermehrt wird und rekombinante DNS aufnehmen kann [157]. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Vektoren eingesetzt: pGL3-Basis Vektor, pGL3B/5DRE sowie pRL-SV 40 Vektor von der Firma Promega (USA). Die Vektorkarte des pGL3B/5DRE Vektor befindet sich im Anhang 2 Vektorkarte.

8. Kits

Tabelle 6: Kits

Kit	Hersteller
BCA TM Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts (USA)
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega; USA
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Deutschland Holding GmbH; Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Deutschland Holding GmbH; Mannheim
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen; Hilden
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG Life Sciences & Chemical Analysis; Waldbronn
peqGOLD Gel Extraction Kit (S-Line)	PEQLAB Biotechnologies GmbH; Erlangen
Pure Link [®] Genomic DNS Mini Kit	Invitrogen TM by life technologies
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen; Hilden
Rotor Gene SybrGreen PCR Kit	Qiagen; Hilden

9. Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Primär Antikörper	Markierung	Klon	Applikation/ Verdünnung	Hersteller
CD3	APC	145-2C11	FACS 1:200	BioLegend; Fell
CD16/CD32	ohne	93	FC Block 1:100	BioLegend; Fell
MHC II (I-A/I-E)	PE	M5/114.15.2	FACS 1:2000	BD; Heidelberg

Abkürzungen: - α -:anti; APC:Allophycocyanin; CD:Differenzierungscluster; FACS: *fluorescence activated cell sorting*; PE:Phycoerythrin

10. Oligonukleotide

Ein Oligonukleotid ist ein einzelsträngiges DNS-Fragment aus ca. 10 bis 50 Nukleotidbasen. Die eingesetzten Oligonukleotide stammen von der Firma Biolegio; Nimwegen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in Ampuwa Wasser aufgelöst, um Gebrauchslösungen von 10 bzw. 20mM herzustellen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die Sequenzen stammen aus der Literatur oder wurden mit Hilfe von Ugene (Primer 3) generiert. Hierfür wurde die Gensequenz bei http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene gesucht, im Genbank Format abgespeichert und mit Primer3 in Ugene mögliche Oligonukleotid-paare generiert und mittels *in silico PCR* (UCSC Genome Browser) überprüft. Eine Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotide wird in der nachfolgenden Tabelle 8 gegeben.

interner Name	Sequenz 5`→3`	Referenz/ Quelle	
3Vf ^a	CCAGACTCCTACGGGAGGCAG	Alland et al.	
3Vr ^a	CGTATTACCGCGGCTGCTG	(2007) [210]	
3Vf-IonTorrentA-Adapter ^b	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTC AGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG	Alland et al. (2007) [2];	
3Vr-IonTorrent trP1-Adapter ^b	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATCGTA TTACCGCGGCTGCTG	Harmsen et al. (2012) [1]	
V3_IonXpress_ 71_FV ^c	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTC AGTGAGGCTCCGACGATCCAGACTCCT ACGGGAGGCAG	Biomedizi- nisches Forschungsz	
V3_IonXpress_ 72_FV ^c	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTC AGCGAAGGCCACACGATCCAGACTCCT ACGGGAGGCAG	entrum der Heinrich Heine	
V3_universal_ RV ^c	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT <i>CGTAT</i> TACCGCGGCTGCTG	Universität; Düsseldorf	
IB06RPS6RTf ^d	TACTGTGCCTCGTCGGTTG	Imke Bargen	
IB06RPS6RTr ^d	TGAATCTTGGGTGCTTTGGT	Imke Bargen	
Claudin 1FW ^d	TTAGTGGCCACAGCATGGTA	Katharina Haas	
Claudin 1RV ^d	GAAGGTGTTGGCTTGGGATA		

Tabelle 8: Oligonukleotide

Material

interner Name	Sequenz 5`→3`	Referenz/ Quelle	
Cyp1A1_qPCR_For ^d	TCCTTGCATGTCCATGTTTC	Katharina Haas	
Cyp_1A1_qPCR_Rev d	TGCATAAGCAAAATACAGTCCA		
DB_2AhR for ^d	AGACCGGCTGAACACAGAGT	Daniel Biljes	
DB_2AhR rev ^d	GTCAGCAGGGGTGGACTTTA		
E-Cadherin FW ^d	AGTTTACCCAGCCGGTCTTT	Katharina Haas	
E-Cadherin RV ^d	CCGGTGTCCCTATTGACAGT		
ELOVL3_FV3 ^d	ATGAACTTTGGCGTCCATTC	Katharina	
ELOVL3_RV3 ^d	CTTTCTCCTGCCTCCAGATG	naas	
FilaSGFv ^d	ATGTCCGCTCTCCTGGAAAG	Susanne	
FilaSGRv ^d	TGGATTCTTCAAGACTGCCTGTA	Ground	
InvolFV_4 ^d	GACTCTGCTGGAAGCCTCTG	Katharina Haas	
InvolRV_4 ^d	CTTGAGAGGTCCCTGAACCA		
LoriFV_1 ^d	CTCATCTTCCCTGGTGCTTC	Katharina Haas	
LoriRV_1 ^d	CAGCTAGAGCCTCCTCCAGA		
Occludin FW ^d	ACTCCTCCAATGGCAAAGTG	Katharina Haas	
Occludin RV ^d	CCCCACCTGTCGTGTAGTCT		
OVOL1_FV2 d	GCGCTCTAACACCTCACTCC	Katharina	
OVOL1_RV2 ^d	AGGACCCCCTCTTAGCACAT	Haas	
Ppl_FV2 ^d	AGCTCGCTGCAGGATTACAT	Katharina	
Ppl_RV2 ^d	TCTTTCTTCTTTGGCCTCCA	11005	
Sprr2h-p-fwd ^d	GACACTTGGTACTCAAGCTCTGG	Schäfer et al.	
Sprr2h-p-rev ^d	TGCACTGCTGCTGTTGGTAA	(2012) [196]	

interner Name	Sequenz 5`→3`	Referenz/ Quelle	
TSLP-P-fwd ^d	CCAGGCTACCCTGAAACTGA	Demehri et	
TSLP-P-rev ^d	TCTGGAGATTGCATGAAGGA	al. (2008)[34]	
Claud1DRE -1545FV3 ^e	ggggaagcttTTCATTGTCCTGCTCCTGT	Katharina	
Claud1DRE -1545RV3 ^e	ccccagatct GATTGACATTTCATCTGCCT GA	Haas	
ECadDRE-359FV2LÄSRE ^e	gggCCCaagctt TTGACTCTTGAAGGCTGT CG	Katharina	
ECadDRE-359RV2LÄSRE ^e	cccGGAagatct TGGTTGGATGAGTTTGTT TGC	Haas	
ECadDRE-2113/-2121FV4 LÄSRE ^e	gggCCCaagctt CAAGAAGCGGAAATCCA AAA	Katharina	
ECadDRE-2113/-2121RV4 LÄSRE ^e	cccGGAagatct CTAGCCCACGTAACCCA CAC	11005	
LoRIDRE-252FV1 ^e	ggggaagcttTGTGGATGGCAGAAATTGTTT	Katharina Haas	
LoRIDRE-252RV1 ^e	ccccagatctAAGGCTGCTTCACAAGTCTG	11223	
OccDRE-2603 FV1LÄSRE ^e	gggCCCaagcttATGTATTTACAACCTTCC TGCCTCT	Katharina Haas	
OccDRE-2603RV1LÄSRE ^e	cccGGAagatct CCGTCTTCTTGACAGAT GGA	Katharina Haas	
Occludin715 -550 -117Fv1 ^e	ggggaagctt AAATGAATATGAAATACAAC AAAATCG	Katharina Haas	
Occludin715 -550 -117Rv1 ^e	ccccagatctGCTCACCACCAGAGCAAG		
Ecad-2113mMCaGt ^f	GTGTGTGTGTGCGTGTGCCGATTGCTTG GAAAGCCATTAAA Ka		
Ecad-2113oM ^f	TTTAATGGCTTTCCAAGCAATCGCACAC GCACACACACAC	11aa5	
Ecad-2121mMCaGt ^f	GTGTGTGTGTGTGTGTGT <u>GATTG</u> TGCGCG TGCTTGGAA	Katharina Haas	

interner Name	Sequenz 5`→3`	Referenz/ Quelle	
Ecad-2121oM ^f	TTCCAAGCACGCGCACAATCACACACA CACACACAC		
Ecad-359mMCaGt ^f GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG		Katharina Haas	
Ecad-359oM ^f	ad-359oM ^f CTCGCCCGCGCAATCACCCCTCCCCC		
Ecad-2113/-2121mMCaGt ^f TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG		Katharina	
Ecad-2113/-21210M ^f	TGTTTTAATGGCTTTCCAAGCAATCGCA CAATCACACACACACACACACACA	11445	
Occ-117mMCaGt ^f	AGAGGGGCGGGG <u>GATTG</u> CGGAGA GAAGG	Katharina	
Occ-117oM ^f	CCTTCTCCCGCAATCCCCCGCCCC TCT	Haas	
Occ-550mMCaGt ^f	DmMCaGt ^f AGTTACGTTTCGTGCATGATTGGACAAG GACCCTGTGG Kathari		
Occ-550oM ^f	CCACAGGGTCCTTGTCCAATCATGCAC GAAACGTAACT	11443	
Occ-715mMCaGt ^f	ATAACTCTGTTGTTACAGACTTGTGATT GTGTGTGCGATTTTGTTGTATTTC	Katharina Haas	
Occ-7150M ^f	GAAATACAACAAAATCGCACACACAATC ACAAGTCTGTAACAACAGAGTTAT		
158 (o-Imro 158) ^g	CTGAATGAACTGCAGGACGA		
159 (o-Imro 159) ^g	ATACTTTCTCGGCAGGAGCA	Jackson	
443 (o-Imro 443) ^g	GGATTTGACTTAATTCCTTCAGCGG	River	
444 (o-Imro 444) ^g	TCTTGGGCTCGATCTTGTGTCAGGAC AGG		
OL 4064 ^g	CAGTGGGAATAAGGCAAGAGTGA	Walisser et	
OL 4088 ^g	GGTACAAGTGCACATGCCTGC	al. (2005) [239]	
OL 4062 ^g	GTCACTCAGCATTACACTTTCTA		
K5 Cre for ^g	CGGTCGATGCAACGAGTGATGAGG		

interner Name	Sequenz 5`→3`	Referenz/ Quelle
K5 Cre rev ^g	CCAGAGACGGAAATCCATCGCTCG	
Langerin-Cre for ^g	CCGGTCGATGCAACGAGTGA	
Langerin-Cre rev ^g	GGCCCAAATGTTGCTGGATA	

Anmerkung: ^a16S rRNS PCR ^bTest Next Generation Sequencing ^cNext Generation Sequencing (NGS): Die Oligonukleotide für das NGS unterscheiden sich nur in der Barcodesequenz, die zufällig generiert wurde. Somit ist eine Diskriminierung vieler Proben in einem Ansatz möglich. ^dqRT PCR Hautbarriere-relevanten Genen ^eKlonierung: Die fett markierten Bereiche in den Oligonukleotidsequenzen sind die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BgIII (cccGGAagatct) und HindIII (gggCCCaagctt); ^fortsspezifische Mutagenese: Unterstrichen ist die DRE Kernsequenz und die mutierten Basen sind Fett hervorgehobenen ^gGenotypisierung der verwendeten Mausstämme.

11. Enzyme & Größenstandards

Tabelle 9: Enzyme & Größenstandards

Enzym	Applikation	Hersteller
Achromopeptidase [®] ; Purified Lytic Enzyme	Aufschluss der bakteriellen Zellwand	Wako Pure Chemical Industrie; LTD; Neuss
AccuPrime [™] Taq DNS Polymerase; High Fidelity	16S rRNS PCR	Invitrogen; Karlsruhe
DNAse	Isolierung von epidermalen Zellen	Invitrogen; Karlsruhe
FastDigest Bgl II	Klonierung	Fermentas Part of Thermo Fisher Scientific
FastDigest Hind III	Klonierung	Fermentas Part of Thermo Fisher Scientific
Lysozym aus Hühnereiweiß	Aufschluss der bakteriellen Zellwand	Sigma-Aldrich; St. Louis (USA)
M-MLV Reverse Transcriptase	komplementäre DNS (cDNS) Synthese	Promega; USA
my Budget 100Basenpaare (bp) und 1,5kb; DNS Leiter	Agarose-Gele → mit 200µl Ampuwa Wasser und 80µl 6x Ladepuffer mischen	Bio-Budget Technologies GmbH; Krefeld
myTaq HS DNS Polymerase	Genotypisierung der AhR- KO	BioLine GmbH; Luckenwalde
Proteinase K	Genotypisierung	Qiagen; Hilden

Enzym	Applikation	Hersteller
RQ1 RNAse free DNAse	cDNS Synthese	Promega; USA
TakaRA LaTaq	16S rRNS PCR	Takara Bio Europe(SAS); Frankreich
Taq DNS Polymerase	Genotypisierung der konditionalen KO- Stämmen	VWR International GmbH; Darmstadt
Taq DNS Polymerase	Genotypisierung der konditionalen KO- Stämmen	Bio-Budget Technologies GmbH; Krefeld
T4 DNS Ligase	Klonierung	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, Massachusetts (USA)

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Enzyme in den mitgelieferten Puffern und Zusätzen verwendet.

12. Software

Tabelle 10: Software

Software	Hersteller
Axio Vision LE 4.8.2.	ZEISS Deutschland
CK-MPA-Multi-Probe-Adapter	Courage + Khazaka eletronic GmbH; Köln
FACSDiva Version	BD; Heidelberg
GraphPad Prism 6.0	GraphPad; San Diego, CAA, USA
icontrol 1.10	Tecan Trading AG; Schweiz
LAS V4.0	Leica AG; Wetzlar
Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research; Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1998)
QuikChange Primer Design	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG Life Sciences & Chemical Analysis; Waldbronn
Rotor-Gene Q Series	Qiagen; Hilden
Unipro UGENE	UniPro; Russland

13. Mäuse

13.1. Mauslinien

Alle eingesetzten Mauslinien stammten aus institutseigener Zucht. Hierfür stand ein Tierraum in der *specific pathogene free* (SPF) III Anlage des Tierhauses des Leibniz Institutes für Umweltmedizinische Forschung zur Verfügung. Die Tabelle 11 fasst alle verwendeten Mauslinien zusammen.

Stamm- bezeichnung	Interner Name	Kurzbeschreibung des Defektes	Lieferant	Referenz
B6.129-AHR- tm1Bra (stock#002831 von Jackson)	AhR +/- x AhR +/- (= AhR- KO)	Das Exon 2 im AhR Gen wurde deletiert → kein funktionales AhR Protein oder RNS	Charles River	Schmidt et al. 1996; PNAS [199]
B6.129 (FVB)- AHR <tm3.1br> (stock#06203 von Jackson)</tm3.1br>	AhR flox	Das Exon 2 im AhR Gen wurde mit loxP Sequenzen flankiert → keine neo Kassette mehr	Charles River	Walisser et al. 2005; PNAS [239]
AhR ^{∆K5}	AhR K5- KO	Der AhR fehlt nur in den Keratinozyten in der Epidermis der Haut. → konditionaler KO- Stamm	→ generiert aus AhR flox und K5 Cre Maus	Jux et al. (2011); Journal of Investigative Dermatology [88]
AhR ^{∆LC}	AhR LC- KO	Der AhR fehlt nur in den Langerhans Zellen → konditionaler KO- Stamm	→ generiert aus AhR flox und LC Cre Maus	Kadow et al. 2011; Journal of Immunology [91]
C57BL/6			Institut eigene Zucht	

Tabelle 11: Mauslinien

Alle Mauslinien wurden auf dem genetischen Hintergrund der C57BL/6 Maus gezüchtet. Der Inzuchtstamm C57BL/6 ist der am häufigsten verwendete Mausstamm in der Wissenschaft [194]. Die Anfänge der C57BL Maus gehen bis ins Jahr 1921 zurück, als C.C. Little aus der Abby Lathrops Zucht Mäuse herausnahm und miteinander verpaarte. 1937 wurde die Linie 6 von der Linie C57BL separiert [122].

Definitionsgemäß erhält man eine Inzuchtlinie nach mehr als 20 Bruder-Schwester-Verpaarungen basierend auf nur einem Zuchtpaar pro Generation. Nach der 20. Generation werden die Tiere als genetisch identisch betrachtet [227]. Nach dem Gentechnik-Gesetz wurden die verwendeten genetisch veränderten Mauslinien in die Sicherheitsstufe1 (S1) eingestuft. Alle Tierexperimente wurden in Wahrung des deutschen Tierschutzgesetzes nach Genehmigung durch die zuständige Tierschutzbehörde durchgeführt.

Materialien	Verwendungszweck	Hersteller
Alleinfuttermittel für Mäuse - Zucht; 10 mm, sterilisiert 25 KGy, V1124-703	Kontrollfutter für die Fütterungsexperimente	ssniff Spezialdiäten GmbH; Soest
BAYHA sterile Surgical Blade	Entfernung des Fettgewebes	Bayha GmbH; Tuttlingen
BD Microlance 3 26Gx	Injektion des Narkosemittels	BD; Heidelberg
Biopsy Punch (Stiefel), 4 mm	Entnahme von Hautstanzen	Apotheke des Universitätsklinikum Düsseldorf
BD Falcon Cell Strainer 100 μm	Aufreinigung von Zellen	BD Bioscience; USA
EF R/M AIN 76A, 10 mm, sterilisiert 25 KGy, E15710-46	ohne AhR Ligand	ssniff Spezialdiäten GmbH; Soest
EF/PS E15710-04 AIN 76A mit 2 g/ kg I3C, 10 mm, S3641-E722	mit AhR Ligand	ssniff Spezialdiäten GmbH; Soest
Isofluran-Actavis, Delta Select	Narkosemittel	Actavis Dtl. GmbH & Co. KG; München

13.2. Tierexperimentelle Materialien

Tabelle 12: Tierexperimentelle Materialien

Materialien	Verwendungszweck	Hersteller
Isofluran CP 1 ml/ml	Narkosemittel	cp pharma [®] ; Burgdorf
Kurzzeitmesser	Messung der Zeit	Carl Roth; Karlsruhe
Moser ChroMini Trimmer	Entfernung des Rückenfells	Moser
Ohrlocher	Markierung der Versuchstiere	
Omnicon f/air	aktiv Kohlefilter	A.M. Bickford; New York
Präparationsbesteck	Sektion; Entnahme der Organe	
Sauerstoff für medizinische Zwecke	Narkose	GPG Gase-Partner GmbH; Witten
Tegaderm [™] 3 M [™] Film 6,0 x 7,0 cm	Entfernung des Stratum corneum	Sanicare Versandapotheke
Tewameter [®] TM 300; MPA 5	Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL)	Courage + Khazaka electronic GmbH; Köln
TEC 4 UniVet Porta	Narkosegerät	Groppler Medizintechnik; Deggendorf
Wetterstation	Messung der Raumtemperatur (RT) und Luftfeuchtigkeit	Oregon Scientific;

IIb. Methoden

1. TIEREXPERIMENTELLE METHODEN

1.1. Generierung konditionaler KO-Mäuse

Im diesem Abschnitt soll kurz erläutert werden, wie eine konditionale KO-Maus generiert wird, auch wenn es nicht Bestandteil dieser Doktorarbeit war.

Die gezielte Modifikation chromosomaler Maus DNS ermöglicht den Forschern Gene gezielt an- oder auszuschalten. Das am häufigsten verwendete System basiert auf dem Rekombinationssystem Cre/loxP [119] des Bakteriophagen P1, das 1981 von Sternberg und Hamilton entdeckt wurde [219]. Hierbei katalysiert ein 38kDA schweres [195] Phagen kodierendes Protein [67], namens Cre (für "Causes recombination"), die Rekombination zwischen zwei loxP Sequenzen (für "locus of crossing Over (X), P1) [219]. Die loxP Sequenz besteht aus einem zentralen Element mit 8bp und aus zwei flankierenden palindromischen Sequenzen mit 13bp [67]. In Folge der Rekombination werden DNS Abschnitte herausgeschnitten, die sich zwischen den loxP Sequenzen befinden [61].

Die erste erfolgreiche Cre/loxP Rekombination in der Maus wurde 1994 von den Forschern um Klaus Rajewsky beschrieben [61]. Dieses System wird häufig eingesetzt, um eine konditionale (zeit- und gewebespezifische) Gendeletionen herbeizuführen [186]. Die Generierung einer Cre/loxP induzierten gewebespezifischen Gendeletion basiert auf der Nutzung zweier verschiedener Mauslinien. Während in der ersten Mauslinie das Cre-Gen unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promoters steht, wird in der Regel bei der zweiten Linie ein wichtiges Exon im gewünschten Gen durch loxP Sequenzen flankiert.

Hierfür sind zwei Schritte notwendig. Im **ersten Schritt** müssen sowohl das Cre-Gen als auch die loxP Sequenzen in die Keimbahn von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) mittels homologer Rekombination eingeschleust werden. Die Sicherstellung einer erfolgreichen homologen Rekombination erfolgt über Selektionsmarker, die ebenfalls im Konstrukt vorhanden sind. Das Neomycin-Resistenzgen [143] agiert als positiver Selektionsmarker. Währenddessen fungiert die Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase (HSV tk) als negativer Selektionsmarker. Mit dem ersten Selektionsmarker kann nachgewiesen werden, welche ES-Zellen das Konstrukt erfolgreich aufgenommen haben. Eine zweite Selektion ist notwendig, um nachzuweisen bei welchen ES-Zellen das Konstrukt an der richtigen Stelle der Keimbahn eingebaut wurde [134]. Im **zweiten Schritt** werden beide Mauslinien miteinander gekreuzt und in den Nachkommen manifestiert sich der konditionale KO. Rajewsky et al. [61] erwarteten bei einer transienten Expression des Cre-Genes, dass nur eine homologe Rekombination zwischen zwei loxP Sequenzen stattfindet. Ergebnis dieser homologen Rekombination ist entweder ein WT- oder Deletionstyp II, d.h. das flox flankierende Gen ist noch vorhanden oder der konditionale KOoder Deletionstyp I, was bedeutet, dass das flox flankierende Gen entfernt wurde [61]. Eine grafische Zusammenfassung der Generierung eines konditionalen KO`s wird in Abbildung 10 abgebildet.



Abbildung 10: Die Generierung einer konditionalen KO-Mauslinien.

(a) Für die gewebespezifische Gendeletion wird eine gefloxte Maus (schwarze Dreiecke repräsentieren die loxP Sequenzen und das blaue Viereck das Ziel-Exon) mit einer gewebespezifischen Cre-Maus gekreuzt. Nur in dem Gewebe, die einen aktiven Promoter aufweisen, findet die Deletion statt (graue Rechteck). (b) Aufbau des Zielkonstrukts sowie die Darstellung der homologen Rekombination. Das schwarze Rechteck ist das Ziel-Exon, die schwarzen Dreiecke stellen die loxP Sequenzen dar und die Selektionskassette enthält das Gen für die Neomycin-Resistenz und für das Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase (HSV Tk) Gen. Modifiziert nach [61].

1.2. Haltungsbedingungen der Mäuse

Die Mäuse wurden entsprechend der Richtlinien der FELASA (= Federation of European Laboratory Animal Science Associations) in der SPF III (engl. specific pathogen free; spezifisch pathogenfrei) des Tierhauses des Instituts für umweltmedizinische Forschung gehalten und gezüchtet. Die Mäuse wurden heterozygot verpaart, um AhR-KO Mäuse sowie WT-Wurfgeschwister zu erhalten und mit einem Alleinfutter für Mäuse der Firma ssniff (Soest) sowie angesäuertem Leitungswasser ad libitum versorgt. Die Haltung der Tiere erfolgte ausschließlich in Käfigen mit Filterdeckel bei einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60%. Der Lichtrhythmus folgte einem wechselnden Hell-Dunkel Intervall von 12Std. (Licht an: 6-18 Uhr). Der allgemeine Gesundheitszustand der Mäuse wurde täglich durch das Tierpflegepersonal und/ oder die Experimentatoren kontrolliert.

1.3. Nachweis des Genotyps

1.3.1. Kennzeichnung der Versuchstiere

Für eine dauerhafte sowie eindeutige Identifizierung der Mäuse, wurden deren Ohren mittels eines Ohrlochers und nach einem festgelegten Schema gelocht. Das verwendete Schema wird in der Abbildung 11 dargestellt.



Abbildung 11: Schema für die Kennzeichnung der Versuchstiere.

Die einer Zahlen stehen auf der linken Ohrseite, während die rechte Seite für die zehner Zahlen verwendet wird. Ganze Löcher bedeuten die Zahlen 1,2,3 sowie 10,20,30; halbe Löcher werden für die Nummern 4,5,6 und 40,50,60 gestanzt. Währenddessen stehen zwei halbe Löcher für die Zahlen 7,8,9 und 70,80,90.

1.3.2. Genotypisierung der Knock-Out (KO) Mauslinien

Unter dem Begriff Genotyp wird die Gesamtheit aller Gene (= individuelle Satz an Genen) eines Individuum verstanden [157].

Simultan zur Ohrmarkierung wurde eine Schwanzbiopsie bei den Mäusen entnommen. Anschließend wurde die Schwanzbiopsie in 180µl *DirectPCR*[®] *Lysis Reagent Tail* sowie 20µl ProteinaseK über Nacht bei 55°C inkubiert und anschließend die Aktivität der ProteinaseK durch Hitze (45Min., 85°C) inhibiert. Die gewonnene DNS konnte direkt für die Analyse des Genotyps mittels PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

Eine genaue Auflistung der PCR-Protokolle und Thermozykler-Programme sowie der Amplikonlänge befinden sich im Anhang VIIa).

1.3.3. Verifizierung des konditionalen K5 KOs

Unter einem konditionalen KO versteht man eine zeitliche und/oder gewebespezifische Gendeletion [186]. In regelmäßigen Abständen wurden die Mäuse auf die gewebespezifische Gendeletion hin untersucht.

In der Keratinozyten-spezifischen KO-Maus (AhR K5-KO) fehlt der AhR nur in Keratinozyten, alle anderen Zellen exprimieren den AhR. Dies wird dadurch gewährleistet, dass das Cre-Gen unter der Kontrolle des K5 Promoters steht, der nur in Keratinozyten aktiv ist [229, 88].

Neben DNS, die aus den epidermalen Zellen isoliert wurde, wurde auch DNS aus Leber, Milz, Schwanz sowie Lunge isoliert. Denn in diesen Organen wird eine AhR Expression erwartet. Während die DNS aus den Organen direkt isoliert werden konnte, musste die Haut, wie unter Methode 2.1.1. beschrieben, bearbeitet werden, um die epidermalen Zellen zu erhalten. Anschließend wurden die Organe sowie die epidermalen Zellen in Lysispuffer für die DNS Isolierung mit ProteinaseK überführt und die DNS wurde isoliert, wie unter dem Punkt Methoden 3.4.1. beschrieben wurde.

Um das loxP markierte Gen nachzuweisen wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt: OL4062, OL4064 sowie OL4088. Das deletierte AhR^{fx} Allel (OL 4062/4088) generiert eine 180bp große Bande, während die Amplifikation des undeletierten AhR^{fx} Allels (OL4064/4088) zu einer 140bp großen Bande führt [239]. Somit weisen AhR K5-KO eine 180bp Bande auf, während bei WT-Kontrollen eine 140bp erscheinen sollte.

1.4. Allgemeinanästhesie mit Isofluran

Das Wort Narkose (griech. "*narkosis*") bedeutet Betäubung und beschreibt eine künstlich herbeigeführte, reversible Funktionshemmung des Zentralen Nervensystems, die bis zum Tod führen kann. Kennzeichnend für eine Narkose ist der Verlust des Bewusstseins, der Schmerzempfindung und der willkürlichen sowie reflektorischen Muskeltätigkeit [22]. Die Tiefe der Narkose wird nach Guedel in 4 Stadien unterteilt [180] und diese Narkosestadien werden in der Tabelle 13 zusammengefasst:

Stadium	Beschreibung
Stadium der Amnesie und Analgesie	Beginn der Narkose bis zum Verlust des Bewusstseins mit einer Erinnerungslosigkeit (= Amnesie) sowie einer zunehmender Schmerzfreiheit (= Analgesie)
Erregungs- oder Exzitationsstadium	Bewusstseinsverlust bis zum Beginn einer automatischen, regelmäßigen Atmung; entspricht der langsamen Ausschaltung der Großhirnaktivität und ist durch eine überschießende motorische Aktivität gekennzeichnet
Toleranzstadium	Beginn der regelmäßigen Atembewegungen bis zum Einsetzen der Atemlähmung → keine Reflexe, Muskulatur ist erschlafft, Atmung ist ruhig und regelmäßig
Paralyse	Beginn der Zwerchfelllähmung bis zum Tod, durch Atemstillstand und nachfolgendem Kreislaufstillstand

Tabelle 13: Überblick über die Narkosestadien

Isofluran ist ein volatiles Anästhetikum aus der Gruppe der Flurane und ein Strukturisomer des Enflurans. Es wird vor allem bei kleinen Eingriffen eingesetzt, bei denen nur eine kurze Narkose benötigt wird. Aufgrund des niedrigen Blut/Gas Verteilungskoeffizienten wird die Narkose rasch eingeleitet. Ebenso kann durch eine veränderte Isoflurankonzentration die Narkose zügig ausgeleitet werden [96, 31].

Zur Durchführung der Narkose wurde zunächst die Isofluran-Anlage ungefähr 1Min. mit 5% Isofluran vorgeflutet. Die Mäuse wurden fixiert und mit der Schnauze in die Maske gehalten und so lange festgehalten bis die Maus im Stadium der regelmäßigen Atembewegungen war. Um die Narkose aufrechtzuerhalten wurde die Isoflurankonzentration auf 2% reduziert. Dann folgten die TEWL Messungen sowie die Tape-Stripping Prozedur (siehe Methode 1.6.). Die Abbildung 12 zeigt die Mäuse in der Narkose.



Abbildung 12: Die Mäuse in Narkose.

1.5. Opferung und Sektion der Versuchstiere

Die Opferung der Mäuse erfolgte mit CO₂ und anschließender zervikaler Dislokation. Die toten Tiere wurden in Bauchlage fixiert, um die Rückenhaut vom Körper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Isolation diverser Organe. Hierfür wurden die Mäuse wiederum auf dem Rücken fixiert, der Bauch mit 70%igem EtOH desinfiziert und ein Schnitt von caudal (vom Schwanz) nach cranial (zum Schädel hin) durchgeführt. Der Bauchraum wurde eröffnet, die Organe entnommen und bis zur weiteren Verwendung in Medium auf Eis gelagert. Für eine evtl. Nachgenotypisierung wurde eine Schwanzbiopsie entnommen und bei -20°C gelagert.

1.6. Messung des transepidermalen Wasserverlustes

Der genehmigungspflichtige Tierversuch "Störung der Hautbarriere in AhR defizienten Mäusen" wurde von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Recklinghausen), unter dem Amtszeichen 84-02.04.2012.A174, genehmigt.

Die Methode erster Wahl, um die Funktion der Hautbarriere zu bestimmen, ist die Messung des transepidermalen Wasserverlustes (engl. transepidermal water loss, TEWL) [5, 181]. Die ersten Beschreibungen des TEWLs reichen bis in das Jahr 1942 zurück und stammen von Ernest A. Pinson [174]. Der TEWL beschreibt den natürlichen Wasserverlust über die Haut, hervorgerufen durch natürliche Evaporationsprozesse [174, 20], die auf die unterschiedliche Wasserverteilung innerhalb der Dermis und der Epidermis zurückzuführen sind. Der Wassergehalt in den tiefer liegenden Hautschichten ist höher, im Vergleich zu den höher liegenden Schichten. Infolge dessen entsteht ein Konzentrationsunterschied, der durch eine passive Diffusion des gespeicherten Wassers ausgeglichen wird. Dieser natürliche Wasserverlust wird im Allgemeinen in der Literatur als TEWL bezeichnet [112, 75, 188], aber eine präzise Definition des TEWLs existiert bis dato nicht [112, 173, 188]. In der Literatur ist gut dokumentiert, dass ein erhöhter TEWL mit einer Fehlfunktion der Hautbarriere einhergeht, während ein erniedrigter oder normaler TEWL für eine intakte oder wiederhergestellte Hautbarriere spricht. Dafür spricht auch die Tatsache, dass der TEWL durch den Zustand und Funktion des Stratum corneum beeinflusst wird [112, 75, 188]. Des Weiteren wird der TEWL durch viele verschiedenen Faktoren wie der anatomischen Stelle, klimatischen Bedingungen oder die Messung selbst beeinflusst [112, 173, 188]. Aus diesem Grund empfiehlt die Gruppe der "Europäischen Gesellschaft für Kontaktdermatitis" die Messungen unter Standardbedingungen durchzuführen [112, 173, 188]. Die Einheit in dem der TEWL ausgedrückt wird lautet: g/hm², d.h. die Masse an Wasser die pro Stunde (Std.) und m² verloren geht [112, 75, 188]. Die nächste Abbildung 13 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung des Messprinzips der TEWL Messsonde.



Abbildung 13: Das Messprinzip der Tewameter-Sonde.

(a) schematischer Aufbau der Messsonde. (b) Prinzip der TEWL Messung. Abkürzungen: J_L : Flussdichte Luft; J_E : Flussdichte Epidermis; L_{SC} : Dicke des SC; SC: Stratum corneum; TEWL: transepidermaler Wasserverlust. Modifiziert nach [75].

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde auf die *open-chamber* Methode zurückgegriffen (Abbildung 13a). Charakteristisch für diese Methode ist, dass sowohl das untere wie auch das obere Ende des Messkopfes offen ist. Dabei fungiert das untere Ende als Messblende. Hautnah sowie hautfern sind zwei Sensorpaare angebracht, bestehend aus einem Sensor für die Luftfeuchtigkeit und einem für die Temperatur. Die Aufgabe der Wand besteht darin: für ein konstantes Klima innerhalb der Messsonde zu sorgen.

Die TEWL Methode misst die Flussdichte des Wasserdampfs, der über die Hautoberfläche abgegeben wird und entspricht J_E in der Abbildung 13b. Die Haut verliert über passive Diffusion täglich Wasser. Vorausgesetzt der TEWL ist die einigste Wasserquelle und wenn die Hautoberfläche trocken ist, dann entspricht $J_E=J_L$ und die gemessene Flussdichte J_L entspricht dem TEWL (= J_E) [75].

1.6.1. Durchführung der TEWL-Messung

Folgende Empfehlungen wurden bei der Etablierung der TEWL Messung berücksichtigt [112, 188]:

(1) <u>Gruppengröße, Alter und Geschlecht:</u> Es wurden mindestens (mind.) zehn AhR-KO Mäuse sowie deren WT-Wurfschwestern in drei unabhängigen Experimenten gemessen. Das Alter der Mäuse betrug durchschnittlich zehn Wochen (= junge Mäuse), neun Monate (= alte Mäuse) oder achtzehn Monaten (= sehr alte Mäuse). Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse sowie deren WT Wurfschwestern verwendet, die im weiteren Verlauf der Doktorarbeit als WT-Kontrollen bezeichnet werden.

(2) <u>Hautstatus und Messstelle</u>: Laut Menon et al. (2002) [55] benötigt die murine Hautbarriere 24Std. um sich von möglichen Verletzungen zu regenerieren [55]. Aus diesem Grund wurden die Mäuse mind. drei Tage vor dem Experiment auf dem Rücken rasiert. Der mechanische Stress sowie die TEWL Messung erfolgten auf der Mitte des Rückens.

(3) <u>Vorbereitung der Messung</u>: Um sicherzustellen, dass eventuelle TEWL Unterschiede zwischen AhR-KO und WT Mäusen nicht durch die Menge an entferntem Stratum corneum verursacht wurden, wurde die Menge an entfernter Haut bestimmt. Hierfür wurde der Tegaderm[™] 3M[™] Film geviertelt, in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und mit der Feinwaage das Gewicht bestimmt.

Zur Akklimatisierung der Versuchstiere und des Messgeräts wurden diese mind. 30Min. vor Versuchsbeginn in den OP gebracht.

(4) <u>Bedingungen während der Messung</u>: Die Messungen wurden ganzjährig durchgeführt, im Vorraum des OPs der SPFIII Anlage im Tierhaus des Institutes. Allerdings schwankten sowohl die Raumtemperatur als auch die Luftfeuchtigkeit.

(5) <u>Ablauf der Messung</u>: Die Messung des TEWLs sowie die Durchführung des mechanischen Stresses wurden immer von der gleichen Person durchgeführt. Nachdem die letzte Maus in Narkose lag wurden 5Min. gewartet bis der Basal-TEWL (= TEWL vor dem mechanischen Stress) gemessen wurde. Die Wartezeit wurde eingeführt, um konstante TEWL-Messwerte zu erhalten. Für die Messung wurde der Messknopf auf die Mitte des Rückens mit etwas Druck auf gesetzt, die Maus
zusätzlich mit zwei Fingern fixiert und der Startknopf wurde gedrückt. Der mechanische Stress wurde folgendermaßen durchgeführt: der TegadermTM 3 MTM Film wurde auf die Mitte des Rückens aufgebracht, die Haut etwas angehoben und der Film wurde zwischen zwei Fingern auf die Haut einmassiert und schnell abgezogen. Die Prozedur erfolgte 5x hintereinander, jedes Mal mit einem neuen Film. Für die Aufnahme der Kinetik wurden folgende Messzeitpunkte ausgewählt: 0,5,10,15 und 30Min. sowie 24Std. nach dem mechanischen Stress. Während der Messung war die OP Tür geschlossen und die narkotisierten Mäuse lagen auf einem Styroporblock. Nach der letzten Messung wurden die Mäuse aus der Maske genommen und deren Aufwachphase beobachtet.

(6) TEWL Wert: Pro Messung wurden mind. 25 Messwerte aufgenommen. Die erhaltenen Messwerte wurden in eine Exceltabelle exportiert und aus den aufgenommen Messwerten wurde der Mittelwert für die jeweilig Maus errechnet. Dargestellt wird der Mittelwert±SEM von n=10 aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Abbildung 14 zeigt in (a) wie der Messkopf auf den Rücken aufgesetzt worden ist und in (b) wie das adhäsive Klebeband auf die Rückenhaut aufgebracht wurde.



Abbildung 14: Die Durchführung der TEWL Messung nach dem mechanischen Stress. Die Abbildung zeigt in (a), wie der Messkopf auf die rasierte Rückenhaut aufgesetzt wird und in (b) wie der TegadermTM 3 MTM Film auf die Rückenhaut aufgesetzt wurde.

1.7. Fütterungsexperiment

Weibliche C57BL/6 Mäuse bekamen *ad libitum* eine synthetisch, definierte Spezialdiät (EF R/M AIN 76A, E15710-46; ssniff, Soest), die entweder keinen AhR-Liganden enthielt (= *"No AhR Ligand Diet"*, NALD) oder der natürliche AhR Ligand Indol-3-Carbinol (I3C) wurde hinzugefügt (2g/kg; = *"AhR Ligand Diet"*, ALD). Diese Diäten enthalten die gleiche Menge an umsetzbarer Energie, sind vergleichbar in den Hauptnährstoffen (Proteine, Kohlenhydrate und Fette) sowie an der Menge an Mineralstoffen, Vitaminen und Spurenelementen. Als Kontrolle dienten C57BL/6 sowie AhR-KO Mäuse, die mit dem Alleinfuttermittel für die Mäuse-Zucht (V1124-703) (= *"Standard Diet"*, SDT) gefüttert wurden. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Inhaltsstoffe sowie ernährungsphysiologische Zusatzstoffe wird in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Nährstoff	Maus-Zucht Futter	EF R/M AIN 76 A	EF/PS E15710-04 + 2g /kg I3C
umsetzbare Energie	13,60 MJ/kg	16,1 MJ/kg	16,1 MJ/kg
Stärke	34 %	13,9 %	13,9 %
Zucker	5,0 %	51,0 %	51,0 %
Rohprotein	22 %	17,8 %	17,8%
Rohöle und -fette	4,50 %	5,1 %	5,1 %
Rohfaser	3,90 %	5,0 %	5,0 %
Rohasche	6,70 %	2,7 %	2,7 %
ernährungsphysiolog	ische Zusatzstoffe		
Vitamin A	25.000 [IU/IE/kg]	4,800 [IU/IE/kg]	4,000 [IU/IE/kg]
Vitamin D ₃	1.500 [IU/IE/kg]	1,200 [IU/IE/kg]	1,000 [IU/IE/kg]
Vitamin E	125 mg/kg	60 mg/kg	50 mg/kg
Vitamin K ₃	20 mg/kg	6 mg/kg	5 mg/kg
Vitamin C			
Kupfer	17 mg/kg	8 mg/kg	7 mg/kg

Tabelle 14: Zusammensetzung der Mausdiäten

In regelmäßigen Abständen wurde die Menge an verzehrtem Futter sowie das Gewicht der Mäuse bestimmt, um so zu gewährleisten, dass die Mäuse das synthetische Futter annehmen und fressen. Die Daten sind im Anhang VIId) hinterlegt. Um die Wirkung von I3C auf die Hautbarriere messen zu können, wurde in regelmäßigen Abständen der TEWL nach mechanischem Stress gemessen (vgl. tierexperimentelle Methoden 1.6.1.).

2. ZELLKULTURARBEITEN

2.1. Isolierung von murinen Zellen

2.1.1. Isolierung von Keratinozyten

Nachdem die Maus geopfert wurde, wurde die Rückenhaut vom Körper abpräpariert. Hierfür wurde ein Schnitt im Bereich der Schwanzwurzel gesetzt und die Rückenhaut ausgeschnitten. Das Fell wurde mind. drei Tage vorher mit einem Rasierer entfernt. Zunächst wurde das subkutane Fettgewebe mit einem Skalpell abgekratzt, dann die Haut in ca. 1cm² große Stücke geschnitten und mit der dermalen Seite in 2,5% iges Trypsin/PBS gelegt. Nach mind. 1 1/2 Stunden (Std.) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank wurde die Epidermis von der Dermis separiert. Hierfür wurde die Epidermis an einer Stelle etwas zusammengeschoben, mit der Pinzette gegriffen, abgezogen und in eine Petrischale mit 10ml vorgewärmtes Medium (DMEM+10%FCS+1%Pen/Strep) überführt. Das Homogenisieren der Epidermis erfolgte durch Kleinzupfen der Epidermis und mittels eines Stempels einer Spritze. Die daraus erhaltene epidermale Zellsuspension wurde über einen 70µm Filter in ein 50ml Reaktionsgefäß filtriert. Die Petrischale wurde nochmals mit Medium gewaschen und die Waschlösung ebenfalls über den Filter filtriert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1200rpm, 4°C und 8Min. (Heraeus Multifuge 1 S-R). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 10ml vorgewärmten Medium aufgenommen, die Zellen gezählt (siehe Methode 2.3.) und wieder zentrifugiert (1200rpm, 8Min. und 4°C). Nun konnten die epidermalen Zellen für biologischen Untersuchungen verwendet werden (vgl. Methode 3.4.1. und Methode 3.5.2.).

2.1.2. Isolierung von Milzzellen

Die Milz wurde entnommen (siehe Methode 1.5.), in ein 15ml Reaktionsgefäß mit Medium (DMEM+10%FCS+1%Pen/Strep) überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Milz in einer Petrischale mit einem sterilen Stempel homogenisiert, die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und die Petrischale mit Medium gewaschen. Die Waschlösung wurde ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1200rpm für 8Min. und 4°C (Heraeus Multifuge 1 S-R). Um die Erythrozyten aus der Suspension zu entfernen, wurde das Sediment in 1ml ACT Puffer aufgenommen, kurz mit dem Wirbelmixer gemischt und bei 37°C im Wasserbad für 5Min. inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 18ml vorgewärmtes Medium zum Reaktionsgemisch zugefügt, kurz mit dem Wirbelmixer gemischt und dann bei 1200rpm, 4°C und 8Min. zentrifugiert. Danach wurde das Sediment in 20ml Medium resuspendiert und über einen 70µm Nylonfilter in ein 50ml Reaktionsgefäß filtriert. Es folgte wieder ein Zentrifugationsschritt bei 1200rpm und 4°C für 8Min. Nachdem der Überstand abdekantiert war, wurde das Sediment in 10ml Medium resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellen gezählt (vgl. Methode 2.3.).

Anschließend konnten die Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden (vgl. Methode 6.2.).

2.2. Kultivierung und Passagierung der humanen Krebszelllinie HepG2

Die humane Zelllinie wurde in begasten (5% CO₂) Brutschränken bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90% gehalten und alle zwei bis drei Tage mit frischem Medium (DMEM+10%FCS+1%Pen/Strep) versorgt. Die adhärente Zelllinie wurde subkonfluent gehalten, d.h. sobald 70-80% des Flaschenbodens mit den Zellen bedeckt waren, wurden die Zellen passagiert.

Durch das Anheften der adhärenten Zellen an den Flaschenboden, musste der Passagierung dieser Zellen eine Trypsinierung vorangehen.

Das verbrauchte Medium wurde verworfen und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Durch die Behandlung der adhärenten Zellen mit einer kleinen Menge Trypsin/EDTA wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Während EDTA Ca²⁺ und Mg²⁺ Ionen bindet, die die Zellen für die Adhäsion benötigen, so spaltet Trypsin die Peptidbindungen, die eine Adhärenz an die Kulturflasche vermitteln. Die Inkubation dauerte ca. 1 bis 3Min. und durch leichtes schlagen gegen die Flasche konnten die Zellen komplett von dieser gelöst werden. Danach wurden die Zellen in frischem Medium verdünnt (1:10). Nach der Zentrifugation (1200rpm, 4°C und 8Min.; Heraeus Multifuge 1 S-R) wurde das Sediment im frischen Medium kultiviert.

2.2.1. Kyrokonservierung der HepG2 Zelllinie

Das Anlegen einer Kryokultur dient der langfristigen Lagerung einer Zelllinie. Dafür wurden die Zellen bei 1200rpm für 8Min. und bei 4°C zentrifugiert. Das dabei entstandene Sediment wurde in Einfriermedium (90%FCS und 10%DMSO) resuspendiert. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO diente als Einfrierschutzmittel, indem es den Wassergehalt der Zelle reduziert. Es besitzt die Fähigkeit, schnell in die Zelle zu diffundieren und verhindert somit die intrazelluläre Eiskristallbildung. Die resuspendierten Zellen wurden in Kyroröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

2.2.2. Auftauen von Kryokulturen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank herausgeholt und in ein Gefäß mit warmen Wasser gestellt. Dann wurden die aufgetauten Zellen in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt und mit 10ml Medium gewaschen. Durch den Waschprozess wird das DMSO entfernt, welches für die Zellen toxisch ist. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1200rpm für 8Min. und 4°C (Heraeus Multifuge 1 S-R) zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde dekantiert, das entstandene Sediment noch einmal mit Medium gewaschen und in 10ml Medium resuspendiert. Der Anteil an vitalen Zellen wurde mittels Neubauer Zählkammer (siehe Methode 2.3.) bestimmt.

2.3. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

Die Anzahl der vitalen Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen wurde eine Totfärbung durchgeführt. Bei dieser Färbemethode wurde der Farbstoff Trypanblau eingesetzt. Dieser Farbstoff wird durch die Eigenschaft gekennzeichnet, dass dieser die defekte Zellmembran toter Zellen durchdringen kann, nicht aber die intakte Zellmembran von vitalen Zellen. Somit erscheinen tote Zellen unter dem Mikroskop blau, dagegen sind vitale Zellen ungefärbt.

Hierzu wurden 10µl der resuspendierten Zellsuspension mit 90µl 0,4% Trypanblau/PBS-Lösung gemischt und auf die Zählkammer aufgetragen (ca. 10µl). Ermittelt wurde die Zellzahl anhand der vier Großquadrate.

Die Berechnung der Zellzahl pro ml erfolgte nach folgender Formel:

Zellzahl/ml: <u>Anzahl der gezählten Zellen x Verdünnung x K</u> Anzahl der gezählten Großquadrate

K entspricht dem Kammerfaktor, der sich aus der Fläche der Großquadrate (1,0 mm²) und der Höhe der Großquadrate (0,1mm) errechnet.

3. MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN

3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Im Allgemeinen bezeichnet die Gelelektrophorese die Wanderung geladener Teilchen, wie beispielsweise DNS und RNS im elektrischen Feld. Im Zuge dieser Wanderung werden die Teilchen ihrer Größe nach aufgetrennt. Im elektrischen Feld ist die Phosphatgruppe im Rückgrat der DNS ionisiert und die Poly(desoxy) nukleotide liegen als Polyanionen vor. Somit bewegen sie sich im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Dabei hängt die Beweglichkeit der DNS Fragmente von ihrer Größe und der Dichte des verwendeten Gels ab [79].

Es wurden 2%ige (w/v) Agarosegele hergestellt. Hierfür wurde die Agarose in 1x TAE Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend mit dem roten Phenanthridin Farbstoff Ethidiumbromid (EtBr; $0,04\mu$ g/ml) versetzt, der eine spätere Detektion der DNS Banden ermöglicht. Dies ist möglich, da EtBr unspezifisch zwischen den Basen der DNS interkaliert. Eine anschließende Anregung des Farbstoffes durch UV Licht ermöglicht die Detektion des EtBr/DNS Komplexes als rot-orange leuchtende Bande [79]. Die DNS wurde mit 6x Ladepuffer für DNS/RNS gemischt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Basen bei konstanter Spannung von 120V für ca. 60Min. Zusätzlich wurde ein DNS-Größenstandard mit aufgetragen, um die Bandengröße der Fragmente bestimmen zu können. Die DNS/RNS Banden wurden mit einem UV-Transilluminator (λ = 312nm) sichtbar gemacht und mittels CCD-Kamera (Peqlab) dokumentiert.

3.2. Gel-Extraktion zur Isolierung von DNS

Die Aufreinigung von DNS aus Agarosegelen ermöglicht die Isolierung von spezifischer DNS aus komplexen Reaktionsgemischen. Hierzu muss die gewünschte DNS Bande aus dem Agarosegel zügig ausgeschnitten werden, um DNS Schäden durch das UV-Licht zu vermeiden. Die Gewinnung der DNS aus dem Gel erfolgte mit dem *peqGOLD Gel Extraktions-Kit (S-Line)* von PEQLAB und wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Hierfür wurde die interessierende DNS-Bande aus dem Gel ausgeschnitten, in einem Bindepuffer gelöst und während einem Zentrifugationsschritt wurde die DNS reversibel an die *Perfect Bind Silika Membran* gebunden. Es folgten Waschschritte um unerwünschte Kontaminationen zu entfernen. Die gereinigte DNS wurde mit 30µl Ampuwa Wasser von der Silika-Membran eluiert.

3.3. Nachweis der Funktionalität von DRE-Sequenzen in Hautbarriere relevanten Genen

3.3.1. Klonierung der DRE-Sequenz

Molecular Cloning oder kurz Klonierung ist die Kombination von einem vermehrungsfähigen DNS-Stück (= Vektor) und dem interessierendem DNS-Fragment (= *Insert*) zu einem vermehrungsfähigen DNS-Konstrukt. Als Vektor kann ein Plasmid (= autonomes "Bakterien-mini-Chromosom") oder ein Bakteriophage (= ein Bakterienvirus) dienen. Zu den prinzipiellen Schritten gehören: 1) die DNS Präparation von Vektor und interessierendem DNS-Stück; 2) das Schneiden beider DNS-Moleküle mit den entsprechenden Restriktionsenzymen; 3) die Ligation von Vektor und dem interessierendem DNS-Fragment und 4) das Einschleusen der rekombinanten DNS in die Wirtszelle [157].

Die Präparation des interessierenden DNS-Fragmentes wird im Kapitel 3.4.2. erläutert. Als Ausgangsmaterial diente DNS aus der Rückenhaut von einer C57BL/ 6 Maus. Hierfür wurden Oligonukleotide generiert, die im flankierenden Bereich der DRE-Sequenz binden. Für die Amplifikation der DNS wurde folgendes PCR Protokoll verwendet (Tabelle 15).

Komponenten	1x in µl
10x Puffer	2,5
Magnesiumchlorid (MgCl ₂); [25 mM]	1,25
Vorwärtsoligonukleotid; [10µM]	2,5
Rückwärtsoligonukleotid; [10µM]	2,5
dNTPs; [10mM]	0,5
Taq-Polymerase von VWR	0,2
Ampuwa Wasser	14,55
genomische DNS (gDNS) aus der Rückenhaut; [20ng/µl]	1,0

Tabelle 15	Zusammensetzung	Mastermixes
------------	-----------------	-------------

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Wiederholung
Aufbruch der DNS	5Min.	95	1x
Aufbruch der DNS	15Sek.	95	
Anlagerung	20Sek.	60	35x
Verlängerung	30Sek.	72	
finale Verlängerung	10Min.	72	1x
Ende	∞	4	

Tabelle 16: Thermozykler Programm für die putativen DRE-Sequenzen im Occludin Promoter

Tabelle 17: Thermozykler Programm für putativen DRE-Fragmente in dem E-Cadherin, Loricrin und Claudine1 Promoter

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Wiederholung
Aufbruch der DNS	5Min.	95	1x
Aufbruch der DNS	15Sek.	95	
Anlagerung	1Min.	65	35x
Verlängerung	1Min.	72	
finale Verlängerung	10Min.	72	1x
Ende	∞	4	

Anschließend wurde die DNS-Fragmentlänge über eine Agarose-Gelelektrophorese (Methode 3.1.) überprüft und die DNS mittels Gelextraktion (Methode 3.2.) aufgereinigt. Pro Fragment wurden zwei Säulen mit je 30µl Elutionsvolumen eingesetzt.

3.3.2. Restriktionsspaltung von DNS durch Endonukleasen

Als Restriktionsspaltung wird das Schneiden der DNS an bestimmten Erkennungssequenzen durch Restriktionsenzyme verstanden [157].

Sowohl das interessierende DNS-Fragment als auch die Plasmid DNS enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und BglII (Firma Fermentas). Damit Enzyme optimal an ihren spezifischen Sequenzmotiven schneiden können, benötigen diese spezifische Pufferbedingungen sowie eine optimale Arbeitstemperatur. Die optimale Arbeitstemperatur für beide Enzyme lag bei 37 °C und die Inkubationszeit lag bei 1 1/2Std.

Um störende Faktoren wie Restriktionsenzyme oder Pufferbestandteile zu entfernen, wurde die DNS über eine Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Methode 3.1.) mit anschließender Gelextraktion (vgl. Methode 3.2.) aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30µl Ampuwa Wasser. Die anschließende Konzentrationsmessung der DNS wurde mit dem *Tecan Reader infinite M200 Pro* (Tecan Trading AG) und der dazugehörigen Software i control 1.10. durchgeführt.

3.3.3. Ligation des interessierendem DNS-Fragmentes mit der Plasmid DNS

Die Ligation beschreibt das Verknüpfen des Vektors mit dem interessierendem DNS-Fragment. Hierbei wird eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 3`Hydroxy-Ende und dem 5`Phosphatende durch das Enzym Ligase hergestellt [157]. Das Resultat ist das Einbringen von dem interessierendem DNS-Fragment in den Vektor.

Das Verhältnis zwischen dem interessierendem DNS-Fragment und dem Vektor entscheidet über die Effektivität der Verknüpfungsreaktion. Berechnet wurde das Verhältnis mit der folgenden Formel:

$$\mathbf{G}_{\mathrm{I}} [\mathrm{ng}] = \underline{\mathbf{x} \ast \mathbf{G}_{\mathrm{v}} [\mathrm{ng}] \ast \mathbf{L}_{\mathrm{I}} [\mathrm{bp}]}$$

G_{I} :	Gewicht der interessierenden DNS	G_V : Gewicht des Vektors in ng
$L_{I}:$	Länge der interessierenden DNS in bp	L_V : Länge des Vektors in bp
	Vaula "Italia international and DNO many Valatan	

x : Verhältnis interessierenden DNS zum Vektor

1µl T4 DNS Ligase (1000 U/µl) wurden eingesetzt um die kovalente Bindung zwischen dem interessierendem DNS-Fragment und dem Vektor zu katalysieren. Es wurden 1µl pGL3B Plasmid (100ng/µl vom 07.09.2009) sowie 1µl interessierendem DNS-Fragment (5x-10x molare Ratio=20-40ng bei 200bp) eingesetzt. Die Ligation erfolgte entweder bei 22°C für 1Std. oder über Nacht bei 16°C. Anschließend folgte die Inaktivierung der Ligase bei 65°C für 10Min. Für die Transformation in *E.coli* wurden 1µl des Ligationsansatzes eingesetzt. Der Erfolg der Ligation wurde mittels einer Gelelektrophorese überprüft.

3.3.4. Transformation von kompetenten E. coli Zellen

Der Prozess der Einführung rekombinanter DNS in Bakterienzellen wird Transformation genannt [157]. Für die Transformation wurde der kompetente E.coli Stamm $DH5\alpha$ eingesetzt. Hierzu wurden 1µl des Ligationsansatzes zu 50µl der kompetenten E.coli Zellen gegeben und der Reaktionsansatz 30Min. auf Eis inkubiert, um die kompetenten Zellen auf niedrige Temperaturen zu bringen. Dann folgte der Hitzeschock bei 42°C für genau 30Sek. Durch den raschen Temperaturwechsel wird die bakterielle Membran gedehnt, so dass die rekombinante DNS aufgenommen werden kann. Um dem Hitzestress entgegenzuwirken, wurden die Bakterien wieder auf Eis gestellt. Nach 5Min. wurden die transformierten Bakterien in 450µl SOC Medium für 1Std. bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Während dieser Stunde vermehren sich Bakterien, die rekombinante DNS und die Resistenzgene, die für eine spätere Selektion wichtig sind. Um zwischen transformierten und nicht-transformierten Zellen unterscheiden zu können, wurden die Bakterien nach der Inkubation auf LB-Ampicillin-Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Die Bakterien überleben, die die rekombinante DNS aufgenommen haben, da im Plasmid das Ampicillinresistenzgen kodiert wird. Etwa 100 bis 200µl des Transformationsansatzes wurden auf den LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden nur DH5a Bakterien ausgestrichen und als Positivkontrolle dienten mit pGL3B Vektor transformierte Bakterien. Am nächsten Morgen wurden pro Fragment vier Klone gepickt, in 2,5ml LB-Medium mit Ampicillin (50µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert.

Die *E. coli* Kulturen wurden unter ausreichender Belüftung bei 37°C im LB Medium mit 50µg/ml Ampicillin angezogen. Die Inkubation erfolgte jeweils unter Schütteln bei 350-450rpm. Beimpft wurden die Medien durch die Übertragung von Einzelkolonien von Nährbodenplatten oder von Aliquots entsprechender Vorkulturen. Für eine Vorkultur wurden 5ml LB-Ampicillin-Medium mit einer Bakterienkolonie oder einem Abstrich von eingefroren Bakterien angeimpft und bei 37°C über Nacht unter schütteln inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die beimpften Agar-Agar-Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C im gelagert.

3.3.5. Isolation der Plasmid-DNS aus E.coli

Plasmide sind extrachromosomale, ringförmige sowie doppelsträngige DNS-Moleküle, die normalerweise eine Größe von 3kb bis 20kb aufweisen. Sie können sich innerhalb einer Zelle unabhängig vom Chromosom der Wirtszelle vermehren. Ihren Wirten bieten sie Überlebensvorteile wie z.B. Resistenzen gegenüber Antibiotika [79].

Für die Plasmidpräparation wurden je 2ml der Übernachtkultur in einem Reaktionsgefäß pelletiert (5Min., 13000xg) und der Überstand verworfen. Der Rest der jeweiligen Kultur wurde bei 4°C gelagert, um im Falle eines positiven Klons, eine Nachzucht zu ermöglichen. Eine Mini Präparation wird dann eingesetzt, wenn geringe Mengen an DNS (<20µg) ausreichend sind [79]. Die analytische Plasmidpräparation wurde entweder mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit von Roche* oder mit dem *Qiagen Plasmid Mini Kit* von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben der Hersteller. Die Elution erfolgte mit 50µl Ampuwa Wasser. Die isolierten Plasmide wurden mittels Sequenzierung überprüft (GATC Biotech AG; Köln).

3.3.6. Funktionale Analyse der putativen DRE-Sequenzen in HepG2 Zellen

Erfolgreich klonierte DRE-Sequenzen wurden anschließend in einer humanen Zelllinie (HepG2) mittels Luciferase-Assay funktional analysiert.

Aussaat von kultivierten HepG2 Zellen: Am Vortag der Transfektion wurden kultivierte HepG2 Zellen (siehe Methode 2.2.) in einer 96er Lochplatte ausgesät. Hierfür wurde zunächst das Medium (DMEM+10%FCS+1%Pen/Strep) abgenommen und anschließend mit 10ml 1x PBS gewaschen. Um die adhärenten Zellen vom Flaschenboden abzulösen, wurde auf den Zellrasen 1ml Trypsin/ETDA hinzugegeben und die Zellkulturflasche im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für mehrere Minuten (Min.) inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde durch FCS abgestoppt, welches sich im Medium befindet. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die restlichen adhärenten Zellen vom Zellboden abgeschabt. Die Zellsuspension wurde 8Min. bei 4°C und 1200rpm zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1 S-R). Das Sediment wurde in 1ml Medium aufgenommen, die Zellen gezählt (siehe Methode 2.4.) und anschließend bis zu $1x10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 96 Lochplatte ausgesät. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Transfektion der HepG2 Zellen mit den Plasmiden: Die Einführung von freier, löslicher DNS in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Das eingesetzte Transfektionsreagenz Roti[®]-Fect von Carl Roth nutz das Prinzip der Lipofektion. Dabei werden kationische Lipide verwendet, um das Plasmid zu binden, um es dann in die Zelle einzuschleusen zu können [79].

Zunächst musste für die Transfektion der Roti[®]-Fect/Plasmid Mix angesetzt werden. Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine Vertiefung. Der Plasmidmix bestand aus 2µl Plasmid (aus 50ng/µl Stock mit den zu untersuchenden DRE-Sequenzen), 0,4µl Renilla SV40 (aus 50ng/µl Stock) und 7,6µl DMEM (ohne Zusätze). 0,75µl Roti[®]-Fect wurde mit 9,25µl DMEM Medium versetzt. Der Plasmidmix wurde 1:1 mit dem Roti[®]-Fect Reagenz gemischt und für 15 bis 40Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Währenddessen wurde von den am Vortag ausgesäten HepG2 Zellen das Medium abgenommen und 100µl Medium (DMEM+10%FCS) vorgelegt. Anschließend wurden 20µl des Roti[®]-Fect/Plasmid Mixes pro Vertiefung hinzugegeben. Die Dauer der Transfektion lag bei 6Std. und wurde bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank durchgeführt. Nach den 6Std. wurde das Transfektionsmedium abgesaugt, 200µl Medium (DMEM+10 FCS+1%Pen/ Strep) pro Vertiefung hinzugefügt und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Belastung der transfizierten HepG2 Zellen mit TCDD: Die Belastung der Zellen für den Luziferase Assay erfolgte am dritten Tag nach der Aussaat der Zellen. Hierfür wurde das Medium von den Zellen abgenommen und pro Vertiefung 200µl frisches Medium mit DMSO (= Negativkontrolle) bzw. 10nM TCDD in 0,1% DMSO (= Positivkontrolle) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank.

Luziferase Reporter-Gen-Assay: Die funktionale Analyse der DRE-Sequenzen in Hautbarriere-relevanten Genen erfolgte mittels eines Luziferase-Assays. Binden Transkriptionsfaktoren an ihre entsprechende DNS Sequenzen, dann kann diese Bindung zu einer Induktion oder Repression der Genexpression führen. Mit einem Luziferase Reporter-Gen-Assay kann untersucht werden, ob die Bindung eine induzierende oder inhibierende Wirkung auf die Genexpression hat. Das Enzym Luziferase, das vom Luc Gen des Leuchtkäfers Photinus Pyralis kodiert wird, katalysiert eine Reaktion bei der Energie in Form von Licht emittiert wird (= Biolumineszenz). Dabei wird D-Luziferin in Gegenwart von Sauerstoff, ATP und Mg²⁺, als Kofaktoren, oxidativ dekarboxyliert. Das emittierte Licht ist in einem bestimmten Zeitintervall direkt proportional zur Luziferasemenge und wird mit Hilfe eines Luminometers detektiert. Zur internen Normalisierung der Transfektionseffizienz wird ein Kontroll-Reportergen eingesetzt, das unter der Kontrolle eines starken Promoters steht und konstitutiv exprimiert wird. Dieser Kontrollvektor wird zusammen mit dem eigentlichen Reporter-Gen transfiziert. Beim hier eingesetzten *Dual-Luciferase*® *Reporter Assay* von Promega wird als Kontroll-Reportergen das Luziferaseenzym aus der Seefedernart Renilla reniformis (Renilla SV40-Vektor) eingesetzt, das Luziferin Coelenterazin als Substrat umsetzt. Zunächst wird im Reaktionsansatz die Photinus Pyralis Luziferase Aktivität bestimmt, die Reaktion gestoppt und dann die Aktivität der Renilla reniformis Luziferase gemessen [79].

Der Luziferase-Assay fand einen Tag nach der Belastung mit TCDD statt (= vierte Tag des Experiments). Zunächst wurde das Medium (DMEM+10%FCS+1%PenStrep) von den Zellen entfernt und jede Vertiefung der 96er Lochplatte mit 200µl 1x PBS gewaschen. Nun folgte die Zelllyse. Dazu wurden die gewaschen Zellen mit je 20µl 1x PLP Puffer (Lysispuffer aus dem Kit) pro Vertiefung der 96er Lochplatte benetzt und für 15Min. bei RT geschüttelt. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt bei 1200rpm für 2Min. bei 4°C (Eppendorf Zentrifuge 5415D) wurden die lysierten Zellen als weißes Sediment sichtbar. Die Überstände wurden abgenommen und in eine weiße 96er Lochplatte überführt.

Im Anschluss daran folgte der Luziferase-Assay. Hierfür wurden 75µl des Substrates LAR II pro Vertiefung dazugegeben und nach wenigen Sekunden (Sek.) wurde die Luziferaseaktivität der Photinus Pyralis-Luciferase mit dem *Tecan Reader infinite M200 Pro* (Tecan Trading AG) gemessen. Durch die Zugabe von 75µl Stop and Glo wurde die Aktivität der Photinus Pyralis-Luziferase inhibiert, während die Renilla-Luziferase durch das Substrat Coelenterazine aktiviert wurde. Auch hier wurden wenige Sekunden nach der Zugabe des Substrates die Aktivität der Renilla-Luziferase mit dem Tecan Reader gemessen. Die relative Aktivität der Luziferase-Enzyme (Phothius Pyralis-Luciferase zu Renilla-Luziferase) gibt eine Auskunft über die Transfektionseffizienz.

3.3.7. Ortsspezifische Mutagenese

Im Allgemeinen bezeichnet die Mutagenese einen Prozess, bei dem die DNS verändert wird, indem basenspezifische Mutationen in die Gensequenz eingeführt werden. Für die ortsspezifische Mutagenese wird eine einzelsträngige Matrize benötigt, die die Zielsequenz enthält, sowie ein Oligonukleotid, welches komplementär zur Matrize ist und die Mutation an der gewünschten Stelle enthält [157].

Die Kernsequenz 5`-GCGTG-3` [209, 223] der DRE Sequenz wurde an der zweiten und dritten Stelle mutiert. Das C wurde durch ein A ausgetauscht, während das G durch ein T ersetzt wurde. Um die ortsgenaue Mutation einzuführen wurde das Kit QuickChange II Site-Directed Mutagenesis von Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG Life Sciences & Chemical Analysis (Waldbronn) verwendet. Die Generierung der Oligonukleotide erfolgte mit der QuickChange Primer Design Software der Firma Agilent (http://www.genomics.agilent.com/ primerDesignProgram.jsp). Hierfür wurde eine 70bp lange Sequenz aus dem Bereich der DRE Sequenz eingefügt, die Stellen für die Mutation sowie der Basenaustausch angegeben und die Oligonukleotide generiert. Die Sequenzen der Oligonukleotide werden im Materialteil in der Tabelle 8 festgehalten. Das Einführen der Mutation in die DRE Sequenz wurde nach dem Protokoll des Herstellers gemacht. Anschließend konnte die Funktionalität der mutierten DRE-Sequenzen, wie unter 3.3.6. beschrieben, mittels Luziferase-Assay analysiert werden. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch eine Sequenzierung (GATC Biotech AG; Köln) überprüft.

3.4. Isolierung von genomischer DNS

3.4.1. Schnelle DNS-Isolierung

Dieses Protokoll wurde eingesetzt, um die DNS für die Überprüfung des konditionalen KOs (vgl. Methode 1.3.3.) zu gewinnen.

Hierfür wurden die Organe sowie die isolierten epidermale Zellen und Milzzellen mit 500µl Lysis Puffer für die DNS Isolierung und 20µl ProteinaseK (Qiagen; Hilden) versetzt. Die Lyse erfolgt bei 55°C im Wasserbad über Nacht. Der Reaktionsansatz wurde bei 14000rpm für 10Min. zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415D), der Überstand in ein neues 2,0ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500µl Isopropanol versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde geschwenkt, um die DNS zu fällen. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 5Min. bei 14000rpm. Der Überstand wurde abdekantiert, das Sediment in 500µl 70%igem EtOH resuspendiert und wieder zentrifugiert (14000rpm, 5Min.). Der Überstand wurde verworfen und sichtbare EtOH Reste mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurde das Sediment 5Min. in den Schüttler bei 55°C gestellt und dann in 200µl Ampuwa Wasser aufgenommen. Damit sich die DNS wieder lösen kann, wurde das Reaktionsgemisch für mind. 1Std. bei 55°C weitergeschüttelt. Danach kann die gewonnene DNS direkt in der PCR eingesetzt oder bei - 20°C gelagert werden.

3.4.2. High Pure PCR Template Preparation Kit

Das *High Pure PCR Template Preparation Kit* von Roche kam bei folgenden DNS Isolierungen zum Einsatz:

- 1. Isolierung von bakterieller DNS ($DH5 \alpha$) (vgl. Methode 3.7.)
- 2. Isolierung von DNS für die Analyse der DRE-Sequenzen (vgl. Methode 3.3.)

Die Isolation der genomischen DNS (gDNS) erfolgte nach dem Protokoll für die Isolierung der DNS aus Säugetiergewebe, während die Isolation der bakteriellen DNS entsprechend dem Protokoll für Bakterien und Hefe durchgeführt wurde. Im Anschluss daran, wurde die Konzentration am *Tecan Reader infinite M200 Pro* (Tecan Trading AG) gemessen.

3.5. Isolierung von Gesamt RNS aus epidermalen Zellen

3.5.1. my Budget RNAmagic

Die Gesamt-RNS (gRNS) aus epidermalen Zellen (vgl. Methode 2.1.1.) wurde mit dem Reagenz my Budget RNAmagic isoliert. Hierfür wurden die isolierten epidermalen Zellen nach dem Zählen zentrifugiert (1200rpm, 8Min.und 4°C), das Sediment in 1ml *RNAmagic* resuspendiert und bei -80°C gelagert.

RNAmagic nutzt das Prinzip der Guanidin-Isothiocyant-Phenol-Chloroform Extraktion, welches erstmalig von Chomczynski und Sacchi [21] beschrieben wurde. *RNAmagic* enthält das chaotrope Denaturierungsagens Guanidin-Isothiocyant und Phenol. Die Trennung des Reaktionsgemisches in Proteine, DNS und RNS erfolgt durch die Zugabe von Chloroform und einem anschließenden Zentrifugationsschritt. Während des Zentrifugationsschritts trennt sich das Homogenat in folgende 3 Phasen auf:

- einer gefärbten unteren organischen Phase
- einer weißlichen Interphase
- einer farblosen oberen wässrige Phase.

Die gRNS befindet sich in der oberen, farblosen wässrigen Phase, während sich die gDNS in der Interphase und die Proteine in der organischen Phase befinden. Durch Zugabe von Alkohol präzipitiert die RNS [21].

Zur aufgetauten Zelllösung wurden 200µl Chloroform hinzugefügt, 15Sek. kräftig geschüttelt und 3Min. bei RT inkubiert. Im Anschluss daran folgte ein Zentrifugationsschritt bei 12000xg, 10Min. und 4°C (Heraeus Fresco 17). In der oberen, wässrigen Phase befand sich die gRNS. Diese Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurden 500µl Isopropanol hinzugefügt, gut gemischt und 10Min. bei RT inkubiert. Die gefällte gRNS wurde bei 12000xg für 10Min. und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die gefällte gRNS mit 1ml frisch angesetztem 75%igem EtOH gewaschen. Hierfür wurde diese für 5Min. bei 7500xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der restliche EtOH mit einer Pipette abgenommen und das Sediment offen bei RT getrocknet, damit der restliche EtOH verdampfen konnte. Das Sediment wurde in 30µl RNase freiem Wasser resuspendiert und 10Min. bei 55°C gelöst.

Im Anschluss daran wurde die RNS Konzentration am *Tecan Reader infinite M200 Pro* (Tecan Trading AG) gemessen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.5.2. RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit

Um eine sehr saubere gRNS für die Microarray Analyse erhalten zu können, wurde die isolierte gRNS nochmals über eine Säule aufgereinigt. Simultan zur Entfernung von noch vorhandenen Störfaktoren wie beispielsweise Guanidin-Isothiocyant und Phenol, konnte auch ein DNase Verdau direkt auf der Säule durchgeführt werden.

In ein 2ml Reaktionsgefäß wurden 490µl RNase freies Wasser sowie 10µl ProteinaseK vorgelegt und die isolierte gRNS hinzugegeben. Die darin enthaltene ProteinaseK verdaut Proteine und sorgt für die Freisetzung der DNS. Der Reaktionsansatz wurde bei 55°C für 30Min. im Thermomixer inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 10000xg für 10Min. bei RT (Biofuge fresco, Heraeus). Die Fällung der gRNS erfolgte durch die Zugabe von 450µl reinstem EtOH. Hierfür wurde der Überstand im EtOH mehrmals resuspendiert. 700µl des Reaktionsansatzes wurden auf die Säule gegeben und 15Sek. bei 8000xg und RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der restliche Reaktionsansatz wurde auf die Säule gegeben und nochmals zentrifugiert. Es folgte ein Waschschritt mit dem RW1 Puffer (350µl; 15Sek., 8000xg, RT). Der Durchfluss wurde verworfen und es folgte der DNase Verdau auf der Säule. Hierfür wurden 10µl DNaseI mit 70µl

RDD Puffer pro Säule gemischt und 80µl der Lösung direkt auf die Säule gegeben. Die Inkubation erfolgte bei RT für 15Min. Danach folgte wieder ein Waschschritt mit dem RW1 Puffer. Im Anschluss daran folgten zwei Waschschritte mit dem RPE Puffer (500µl; 8000xg, 15Sek., RT). Nun folgte die Elution der gRNS. Hierfür wurde die Säule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, 35µl RNase freies Wasser direkt auf die Säule gegeben und 1Min. bei RT inkubiert. Dann folgte ein Zentrifugationsschritt bei 8000xg für 1Min. und bei RT. Um die Ausbeute an gRNS zu erhöhen, wurde das Eluat nochmals auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die RNS Konzentration am *Tecan Reader infinite M200 Pro* (Tecan Trading AG) gemessen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.5.3. Bestimmung der gRNS Integrität

RNS, im Vergleich zu DNS, ist sehr anfällig gegenüber einer spontanen sowie einer enzymatisch katalysierten Hydrolyse [79].

Deshalb wurde die RNS-Integrität nach der Isolation mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Methode 3.1.) überprüft. Durch das Ethidiumbromid werden zwei diskrete Banden sichtbar: eine weist die 18S rRNS nach, während die zweite Bande die 28S rRNS nachweist. Der Nachweis beider Banden verifiziert eine intakte gRNS Präparation. Dabei soll das Verhältnis der Fluoreszenzintensität der 28S zur 18S rRNS 2:1 betragen. Sind die Banden nur sehr schwach oder werden Schmierbanden nachgewiesen, so wurde die gRNS während dem Isolationsprozess degradiert. Fluoreszenzsignale in den Geltaschen oder im oberen Bereich des Gels stammen von gDNS [79].

Um die Reinheit der gRNS zu bestimmen, wird die Absorption bei 260 und 280nm gemessen und das entsprechende Verhältnis der Absorption bei beiden Wellenlängen zu einander bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260nm werden Proteine oder organische Komponenten gemessen, während die gRNS bei 280nm gemessen wird. Reine gRNS liegt bei einem Wert von 2,0 vor. Kleinere Werte sind Indikatoren dafür, dass die gRNS mit Proteinen oder organischen Komponenten kontaminiert ist.

3.5.4. DNase Behandlung der gRNS

Aufgrund der Tatsache, dass die gDNS ähnliche physikochemische Eigenschaften aufweist wie die gRNS, wird die gDNS bei der gRNS-Isolierung mit aufgereinigt. Daher muss die gDNS entfernt werden. Hierzu gibt es zwei Möglichkeiten. Die erste Möglichkeit besteht darin, die DNS während dem Isolationsprozess zu hydrolysieren. Diese Möglichkeit nutzt das *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (vgl. Methode 3.5.2.). Im Gegensatz dazu besteht diese Möglichkeit des DNase-Verdaus während der gRNS Isolierung bei Verwendung des *RNAmagic-Reagenzes* nicht (vgl. Methode 3.5.1.). Daher wird in dem Fall die gDNS nach der gRNS Isolation hydrolysiert.

Der Verdau der gDNS erfolgte mit der DNaseI. Die DNaseI muss frei von Ribonukleaseaktivitäten sein. Hierfür wurden 1µg gRNS mit 1µl DNAseI (1U/µl) im dazugehörigen Puffer für 30Min. bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde 1µl *Stop Solution* hinzugefügt, um die DNaseI zu inaktiveren. Hierzu musste der Reaktionsansatz 10Min. bei 65°C im Thermomixer inkubiert werden. Im Anschluss daran konnte die gRNS in cDNS umgeschrieben werden.

3.5.5. cDNS Synthese

Die reverse Transkription beschreibt den Prozess der Umschreibung der gRNS in komplementäre cDNS. Dies ist notwendig um die Expression eines Gens mittels PCR analysieren zu können. Hierfür wurde die Reverse Transkriptase M-MLV von Promega eingesetzt.

Standardmäßig wurden 1µg gRNS und PolyDT Oligonukleotide eingesetzt und folgendes Schema (Tabelle 18) benutzt.

Schritt	Mastermix	1x in μl
	gRNS	10
	poly (dT) [0.5 µg/ml]	0,5
	Ampuwa Wasser	3,5
	Summe	14,0
polyDT	Zeit	Temperatur in °C
	5Min.	70
	Pause	4

Tabelle 18: Pipettierschema cDNS Synthese

Hinweis: Um die Ausbildung von sekundär Strukturen zu verhindern, den Reaktionsansatz auf Eis stellen!

Schritt	Mastermix	1x in µl
	Ampuwa Wasser	13,0
	5x RT Puffer	5,0
	dNTP [10 mM]	5,0
cDNS Synthese	RiboLock	1,0
	M-MLV Transkriptase	1,0
	Summe	25,0
	Zeit	Temperatur in °C
	60Min.	37
	10Min.	70
	Pause	4

Der Erfolg der cDNS Synthese wurde mit Hilfe einer PCR und dem Haushaltsgen ribosomales Protein S6 (RPS6) überprüft. Bei einer erfolgreichen cDNS Synthese wird ein Amplikon von 150bp erwartet. Die Zusammensetzung des Mastermixes sowie das Thermozykler Programm werden in den nachfolgenden Tabellen 19 und 20 dokumentiert.

Komponenten	1x in µl
10x Puffer	1
$25 \mathrm{mM} \mathrm{MgCl}_2$	1
dNTPs [10mM]	0,4
IB06RPS6RTf; [10µM]	0,4
IB06RPS6RTr; [10µM]	0,4
Taq Polymerase	0,1
Ampuwa Wasser	5,7
cDNS	1,0

Tabelle 19: Zusammensetzung Mastermix

Die Taq Polymerase, der Puffer sowie das MgCl₂ stammen von der Firma BioBudget. In der nachfolgenden Tabelle 20 wird das Programm für den Thermozykler dargestellt.

Tabelle 20: Thermozykler Programm

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Wiederholung
Denaturierung der DNS	5Min.	95	1x
Denaturierung der DNS	30Sek.	95	
Anlagerung	30Sek.	60	40x
Verlängerung	90Sek.	72	
finale Verlängerung	10Min.	72	1x
Ende	∞	4	

3.5.6. Echt-Zeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beschreibt eine enzymatische Amplifikation eines, durch synthetische Oligonukleotidprimer begrenztes DNS Fragmentes in einer zyklischen Reaktion mit den drei Segmenten: Denaturierung der DNS, Anlagerung der Oligonukleotidprimer und Verlängerung des komplementären Stranges [79]. Eine Weiterentwicklung der PCR ist die quantitative Echt-Zeit Polymerase-Kettenreaktion (gRT-PCR), die eine zuverlässige und exakte Quantifizierung spezifischer mRNS [12] über Fluoreszenzsignale ermöglicht. Dabei ist die Menge an emittierter Fluoreszenz proportional zur Menge an doppelsträngiger DNS [29]. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde auf den DNS-bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zurückgegriffen. Der Farbstoff bindet an alle doppelsträngigen DNS-Moleküle, somit auch an Oligonukleotid-Dimere oder nicht spezifische Amplifikate, die zum Fluoreszenzsignal beitragen und somit zu einer ungenauen Quantifizierung führen können [79]. Um zwischen spezifischen und unspezifischen Fluoreszenzsignale unterscheiden zu können, wird eine Schmelzkurve aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgt über die relative Quantifizierung, d.h. die Expression des Zielgenes wird über ein ubiquitäres und homogen exprimiertes Haushaltsgen quantifiziert [244]. Als Haushaltsgen diente das ribosomale Protein S6 (RPS6). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der vergleichenden C_T (2^{- $\Delta\Delta C_T$}) Methode. Die Methode ist ein mathematisches Modell, das die Veränderung der Genexpression zwischen Zielgen und Haushaltsgen als relativen Unterschied (engl. fold change, x-fache Genexpression) kalkuliert [123]. Als Grundlage dient der CT Wert (engl. Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus). Dieser Wert bezieht sich auf den Zeitpunkt bzw. den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz der Probe erstmalig signifikant größer ist, als die Fluoreszenz des Hintergrundes [244].

Als Reaktionsvolumen wurden 15µl eingesetzt. Mögliche verkontaminierte Reagenzien wurden durch das Mitführen von Negativkontrollen aufgedeckt. Das Thermoprofil bestand aus 2 Segmenten: das erste Segment diente dem primären Aufbruch der cDNS (5Min., 95°C). Das zweite Segment bestand aus folgenden Bestandteilen: Aufbruch der DNS (8Sek., 95°C) und der Anlagerung sowie der Verlängerung des Stranges (15Sek., 60°C). Dieses Segment wurde 45 mal wiederholt. Im letzten Segment wurde eine Schmelzkurve in einem Temperaturbereich von 65-95°C aufgenommen. Die Tabelle 21 zeigt die Zusammensetzung des Mastermixes.

Komponenten	1x in µl
SybrGreen Mastermix	7,5
Gen spezifischer Vorwärtsoligonukleotid; [10µM]	1,5
Gen spezifischer Rückwärtsoligonukleotid; [10µM]	1,5
Ampuwa Wasser	3,0
cDNS	1,5

Tabelle 21: Zusammensetzung Mastermix qRT-PCR

3.6. Microarray

Um ein Expressionsprofil von vielen Genen simultan erstellen zu können, entwickelten Brown et al. (1995) eine neue Technologie, die sogenannte *Microarray* Technologie [198]. Hierbei wird ein bekanntes DNS-Molekül oder Oligonukleotid auf einer festen Phase immobilisiert und anschließend erfolgt die Hybridisierung mit der zu untersuchenden, Fluoreszenzfarbstoff-markierten cDNS [79].

Im Verlauf der Doktorarbeit wurde ein Genexpressionsprofil nach mechanischem Stress erstellt. Hierfür wurde die rasierte Rückenhaut von AhR-KO sowie deren WT-Kontrollen 5x mit TegadermTM 3 MTM Film gestresst und zu den Zeitpunkten Baseline (= vor dem mechanischen Stress), sowie 6Std. und 24Std. (= nach dem mechanischen Stress) gRNS aus der Epidermis isoliert (vgl. Methode 2.1.1.). Die Isolation der gRNS aus den epidermalen Zellen erfolgte zunächst mit *RNAmagic* (vgl. Methode 3.5.1.) und dann mit dem *RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit* (vgl. Methode 3.5.3.).

Die cDNS-Synthese, Amplifikation und Biotin-Markierung der cDNS wurde gemäß des Protokolls des Herstellers durchgeführt (*GeneChip WT PLUS Reagent Kit*; Affymetrix, Inc.): 100ng der jeweiligen Proben-RNS wurden zu cDNS konvertiert. Nach anschließender *in vitro* Transkription und *2nd cycle* cDNS-Synthese wurde die cDNS fragmentiert und durch eine End-Markierungsreaktion mit einem terminalen Biotinmolekül versehen. Nach der Markierung wurde die cDNS auf ein *Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Microarrays* hybridisiert (16Std., 45°C) und mit Streptavidin/ Phycoerythrin gefärbt und gescannt.

Die Daten-Analyse der Affymetrix CEL Dateien wurde mit Hilfe der *GeneSpring GX* Software (Version 12.5; Agilent Technologies) durchgeführt.

Die Roh-Signalintensitäten der einzelnen Oligonukleotiden (=Probe) des Affymetrix Probesets wurden über alle Arrays quantil-normalisiert und anschließend mit dem Robust-Multi-Array-Average (RMA)-Algorithmus zu einem normalisierten Probeset-Signal aufsummiert. Abschließend wurde die Signalintensitäten jedes Probesets eines jeden Arrays durch den Median der betreffenden Signalintensitäten aller Arrays geteilt (Baseline-Transformation) [10].

Nachdem die einzelnen Replikate ihren jeweiligen experimentellen Konditionen zugeordnet worden waren, wurden nicht exprimierte Transkripte gemäß folgender Bedingung von der weiteren Analyse ausgeschlossen: Die Signalintensität eines gegebenen Probesets musste sich in allen drei Replikaten in mindestens einer der beiden (oder beiden) zu vergleichenden Konditionen innerhalb der oberen 80% der Signalverteilung des jeweiligen Arrays befinden, um in den folgenden statistischen Analysen berücksichtigt zu werden.

Signifikant differentiell exprimierte Transkripte wurden mit einem ungepaarten t-Test (moderated) ermittelt, die resultierenden p-Werte wurden anschließend soweit möglich gegen multiples Testen korrigiert (Benjamini-Hochberg FDR). Als Signifikanzschwelle wurde p<0.05 gewählt (FDR korrigiert bzw. unkorrigiert).

Die Transkription der gRNS in cDNS, der Microarray sowie die sich anschließende bioinformatische Analyse wurde von den Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Köhrer sowie Herrn Dr. Deenen vom BMFZ, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, durchgeführt.

3.7. Isolierung von bakterieller DNS aus der Epidermis

3.7.1. Gewinnung von gDNS sowie bakterieller DNS

Für die Gewinnung der gDNS sowie der bakteriellen DNS wurde eine epidermale Zellsuspension hergestellt, wie unter Methode 2.1.1. beschrieben. Allerdings wurden zwei Änderungen am Protokoll vorgenommen. Zum einen wurden die Mäuse nicht rasiert und zum anderen wurde das subkutane Fett nicht abgekratzt. Nach dem die Epidermis von der Dermis getrennt wurde, wurde die epidermale Zellsuspension incl. Haare gut resuspendiert und in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Nachdem die bakterielle Zellwand aufgebrochen war, wurde die gDNS sowie die bakterielle DNS mit dem *Pure Link*[®] *Genomic DNS Mini Kit* von InvitrogenTM by life technologies nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Abweichend vom Herstellerskript wurde anstelle von 10000xg mit 16000xg zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit 30µl Elutionspuffer. Zum Schluss wurde die DNS-Konzentration mit *Tecan Reader infinite M200 Pro* (Tecan Trading AG) gemessen und anschließend bei -20°C gelagert.

3.7.2. Nachweis von bakteriellen Kontaminationen

Die Klassifizierung von Bakterien erfolgt generell über das 16S ribosomale RNS (16S rRNS) Gen. Insgesamt enthält dieses Gen neun hypervariable Regionen, die über eine umfangreiche Sequenzdiversität verfügt und somit charakteristisch für einzelne Bakterienstämme ist. Flankiert werden diese Regionen von konservierten Bereichen, die als Zielsequenz für die Oligonukleotide dienen. Die geeignetste Region, um Bakterien auf Gattungsebene unterscheiden zu können, ist die Region 3 [216].

Während der Isolation können Kontaminationen mit bakterieller DNS auftreten, beispielsweise durch Reagenzien oder unsauberes Arbeiten. Um solche Kontaminationen von der bakteriellen DNS der Maus Epidermis unterscheiden zu können, wurde eine Kontroll-PCR mit allen für die Isolation verwendeten Puffern und Lösungen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die DNS des *E.coli* Bakteriums *DH5* α . Die folgenden Tabellen 22 und 23 fassen die Zusammensetzung des Mastermixes sowie des Thermozykler Programms zusammen.

Komponenten	1x in µl
10 x Puffer	2,5
dNTP	4,0
V3f; [20µM]	0,5
V3r; [20µM]	0,5
TakaRA LaTaq	0,25
Ampuwa Wasser	17,25
DNS	2,0 µl/Tube

Tabelle 22: Zusammensetzung Mastermix

Tabelle 23: Thermozykler Programm

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Wiederholung
Denaturierung der DNS	5Min.	95	1x
Denaturierung der DNS	30Sek.	95	
Anlagerung	30Sek.	58	30x
Verlängerung	90Sek.	72	
finale Verlängerung	10Min.	72	1x
Ende	∞	4	

Die PCR-Produkte wurden auf einem 2,0%igen Agarosegel (siehe Methode 3.1.) elektrophoretisch aufgetrennt und mittels EtBr wurden mögliche V3 Banden (= 203bp) sichtbar gemacht. Wenn in allen Negativkontrollen keine bakterielle DNS gefunden wurde, wurden die Epidermis Proben für das *Next Generation Sequencing* verwendet.

3.7.3. Next Generation Sequencing (NGS)

Die Bestimmung der Abfolge der Basensequenz wird im Begriff Sequenzierung zusammengefasst. Eine Weiterentwicklung der Methode ist das *Next Generation Sequencing* (NGS) [79].

Bevor die DNS Proben für die 16S Sequenzierung verwendet werden konnten, mussten diese mit einem Barcode versehen werden. Dieser Barcode, der zufällig generiert wurde, ermöglicht die Diskriminierung vieler DNS Proben in einem Ansatz. Eine Sequenzinformation der V3_IonXpress_71_FV sowie V3_Ion-Xpress_72_FV Oligonukleotide befindet sich im Materialteil Kapitel 10. Oligonukleotide. Eine tabellarische Zusammenfassung des Mastermixes sowie das Thermozykler Programm werden in den nachfolgenden Tabellen 24 und 25 zusammengefasst.

Komponenten	1x in µl
10x PCR Puffer I	2,5
10x dNTP	0,5
MgSO ₄	1,0
V3_IonXpress_Barcode_FV; [10µM]	1,0
V3_universal_RV; [10µM]	1,0
HIFI Platinum Taq	0,2
Ampuwa Wasser	18,8
DNS	100ng

Tabelle 24: Zusammensetzung Mastermix

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Wiederholung
Aufbruch der DNS	3Min.	94	1x
Aufbruch der DNS	15Sek.	94	
Anlagerung	30Sek.	70	30x
Verlängerung	90Sek.	68	
finale Verlängerung	30Sek.	68	1x
Ende	∞	4	

Tabelle 25: Thermozykler Programm

Nachdem die bakterielle DNS mit den entsprechenden Barcode-Sequenzen markiert worden war, wurde das NGS sowie die bioinformatische Analyse der Daten von den Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Köhrer und Herrn Dr. Deenen (BMFZ; Heinrich Heine Universität Düsseldorf) durchgeführt.

Die anschließende Emulsion-PCR sowie die $IonProton^{TM}$ Sequenzierung der aufgereinigten V3 Amplikons wurden so ausgeführt, wie es in den Herstellerprotokollen beschrieben ist (*Ion PI Template OT2 200 Kit v2, Ion PI Sequencing 200 Kit*; Life Technologies, Darmstadt). Das Demultiplexing sowie das Entfernen der Adaptern wurde mit der *TorrentSuite Software* (Version 4,2,1, LifeTechnologies, Darmstadt) durchgeführt.

Für die Analyse der Sequenzdaten sowie das operational taxonomic unit (OTU) clustering wurde die Software von CLC Genomics Workbench (Version 8.02, Qiagen, Hilden) und CLC Microbial Genomics Module (Version 1.1, Qiagen, Hilden) verwendet. Danach wurden die V3 Oligonukleotide von den raw fastq sequence reads entfernt und die Sequenzlänge auf 150bp reduziert. Nun folgte das OTU clustering, die Annotation und die Kalkulation der bakteriellen Taxonomie mit Hilfe der Software, die eine Referenz Datenbank und die Taxonomie (16S_97_otus_GG) mit einer Ähnlichkeit von 97% bereitstellte.

Die α-Diversität wurde mit Hilfe der Anzahl von OTUs geschätzt und die β-Diversität wurde mit einer UniFrac Analyse berechnet [19] unter Verwendung der phylogenetischen Analysen, die im Datensatz beobachtet wurden.

4. HISTOLOGIE

Um die Schichtdicke der Epidermis bestimmen zu können, wurden Hautstücke in Gefriermedium eingebettet, $10\mu m$ dünne Schnitte hergestellt, auf Objektträger aufgezogen und über eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung die Dermis sowie Epidermis sichtbar gemacht und mit der *Axio Vision LE 4.8.2. Software* die Dicke der Epidermis ausgemessen.

4.1. Einbettung der Haut

Nach der Opferung der Mäuse wurden die Ohren sowie drei Hautstücke von unterschiedlichen Rückenstellen entnommen und in kaltem PBS zwischengelagert. Die Hautstücke wurde aus dem PBS genommen, auf einem saugfähigen Papiertuch glatt gestrichen und in drei Stücke geschnitten. In einem Einbettschälchen wurde Einfriermedium vorgelegt und die Hautstücke bzw. Ohrstücke mit der dermalen Seite eingetaucht. Damit das Einfriermedium gefriert wurde das Schälchen auf Trockeneis gestellt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Von den kryokonservierten Gewebeproben wurden 10µm Schnitte am Kryostaten (Leica LM 3050, Leica, Nussloch) bei einer Blocktemperatur von -21°C angefertigt. Aufgezogen wurden die Schnitte auf Superfrost/Plus Objektträger und bei RT getrocknet. Pro Tier wurden zwei Objektträger à drei Schnitte angefertigt. Die Lagerung erfolgte bei RT.

4.2. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

1876 kombinierte Wissowzky Hämatoxylin und Eosin und legte den Grundstein für eine routinemäßig eingesetzte Übersichtsfärbung in der Histologie.

Ziel der Färbung ist es einen Überblick über das gesamte Gewebe, die Strukturen, die Zellverteilung, die Kern-Plasma Relationen sowie die Anfärbbarkeit zu erhalten. Während Hämatoxylin ein natürlicher Farbstoff ist, der aus Blauholz (Mittelamerika, Westindien) gewonnen wird, gehört Eosin zu den Xanthen-Farbstoffen und ist chemisch gesehen ein Tetrabrom-Fluorescein. Der wirksame Farbstoff ist das Oxidationsprodukt Hämatein, das durch den Zusatz von dreiwertigen Metallionen wie beispielsweise Aluminium, zu einem gut färbenden Hämatoxylinlack wird. Gefärbt wird in saurer Lösung und dann wird der Hämateinlack durch Spülen in Leitungswasser in seine blaue Form überführt (= Bläuen). Bei Eosin handelt es sich um einen saureren Farbstoff. Er färbt das Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot. Auch Kernstrukturen werden mit dem Farbstoff angefärbt, wodurch mit vorangegangener Kernfärbung mit Hämalaun das typisch rötlich-violette Mischbild entsteht [117].

Für die HE-Färbung wurden Gefrierschnitte (vgl. 4.1.) verwendet.

Die Färbung erfolgte nach folgendem Schema

Schritt 1:	1Min.	in Leitungswasser
Schritt 2:	3Min.	in Hämalaun nach Gills No. 3
Schritt 3:	30Sek.	in Leitungswasser
Schritt 4:	1Min.	in 0.5 % HCl in 70%igem EtOH
Schritt 5:	5Min.	in Leitungswasser
Schritt 6:	5Sek.	in Eosin
Schritt 7:	kurz	in 70%igem EtOH
Schritt 8:	2Min.	in 100%igem EtOH
Schritt 9:	2Min.	in 100%igem EtOH
Schritt 10:	10Min.	in Xylol

Die Schnitte wurden in Entellan eingedeckelt und anschließend mikroskopiert (Leica DFC 450). Die Lagerung erfolgte bei RT.

5. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE BILDER

Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops wird durch die Wellenlänge determiniert. Schnelle Elektronen, wie beispielsweise bei der Elektronenmikroskopie generiert werden, besitzen eine Materiewelle mit einer sehr kurzen Wellenlänge im Vergleich zu sichtbaren Licht. Dadurch kann bei der Elektronenmikroskopie eine Auflösung von 0,1nm erreicht werden [57].

Das Hautstück wurde auf einem saugfähigen Papiertuch glatt gestrichen, in kleine Stücke geschnitten und über Nacht bei 4°C in 500µl Fixierungspuffer, bestehend aus 2% Paraformaldehyd und 2% Glutaraldehyd (in Kakodylsäure Puffer, pH 7,4), fixiert. Im Anschluss daran folgten vier Waschschritte à 10Min. in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺.

Die Färbung der Hautstücke erfolgte nach dem Protokoll von Bechtel et al. (2012) [6]. Hierfür wurden die fixierten Hautstücke in 2% Osmiumtetroxid inkubiert, anschließend dreimal in Kakodylsäure Puffer gewaschen und dann mit 1% Uranylacetat in 70%igen Ethanol für 8Std. fixiert. Dadurch sollte der Kontrast verbessert werden. Danach wurden die Hautproben in einer abgestuften Ethanolkonzentrationsreihe dehydriert und zum Schluss in Araldite (Serva, Heidelberg; Deutschland) eingebettet. Im Anschluss daran wurden ultradünne Schnitte (70 nm) mit einem Diamantenmesser am Ultramikrotom hergestellt und auf einem Kupfergitter platziert. Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde an dem Zeiss 902A Elektronen Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen; Deutschland) durchgeführt.

Die Anfertigung der Schnitte sowie die Färbung wurden freundlicherweise von Frau Mojgan Ghilav hergestellt und in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Bloch (Deutsche Sporthochschule; Köln) ausgewertet.

6. DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

6.1. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Cyto=Zelle, Metry=Messen) erlaubt die Identifikation einer Zelle anhand verschiedener Eigenschaften wie Größe, Granularität oder Fluoreszenz [22].

Unter dem Einsatz von Fluoreszenz gekoppelten Antikörpern, die spezifisch an Oberflächenrezeptoren binden, können Zellen analysiert werden. Hierzu passieren die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl. Dieser wiederum regt die gekoppelten Fluorochrome an, die wiederum Licht emittieren, welches über verschiedene Spiegel und Filter weitergeleitet wird. Aufgrund ihrer Streulichteigenschaften können Zellen näher charakterisiert werden. Während die sogenannte Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) eine Aussage über die relative Größe der Zelle macht, so wird die Granularität der Zelle über die sogenannte Seitwärtsstreuung (*side scatter*, SSC) bestimmt. Letztendlich wird das Streulicht sowie die Fluoreszenzen mit Hilfe eines Digital-Analogwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt und in graphischer Form mittels einer Software abgebildet.

Um die Keratinozyten aus den epidermalen Zellen identifizieren zu können, wurde eine bestimmte Identifizierungsstrategie angewandt. Eine beispielhafte Identifizierungsstrategie wird in der nachfolgenden Abbildung 15 präsentiert.



Abbildung 15: Identifizierungsstrategie von MHCII⁺ und CD3⁺ Zellen.

Die Zellen werden nach ihrem Vorwärtsstreulicht (Größe) und ihrem Seitwärtsstreulicht (Granularität) in einem Diagramm (= Dot Plot) dargestellt (a und e). Nachdem die gesuchte Population über ein Fenster eingegrenzt wurde, wurde ein zweites Fenster gesetzt, um Dubletten auszuschließen (b und f). Im Anschluss daran wurde auf der y-Achse der Fluoresenzfarbstoff aufgetragen, während die x-Achse die Größe der Zellen repräsentiert (c und g). Schlussendlich wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe gegeneinander aufgetragen, um so ein genaues Bild von der Zellverteilung in der murinen Epidermis zu erhalten (d und h).

Im ersten Schritt wurden die Keratinozyten sowie die Immunzellen über ihre Größe (FSC) und Granularität (SSC) identifiziert. Hierfür wurde ein Diagramm generiert, indem die Größe gegen die Granularität aufgetragen wurde. Mittels eines Fensters wurde die gesuchte Zellfraktion markiert. Im anschließenden Schritt wurden Dubletten sowie Zellagglomerate von Einzelzellen ausgeschlossen. Hierfür wurde die FSC-W (= Breite des Fluoreszenzsignals) gegen FSC-A (= die Summe unter der Kurve, die gemessen wird, wenn eine fluoreszente Zelle durch den Laser angeregt wird) aufgetragen. Doubletten, also Zellen, die sehr nah aneinander am Laser vorbei rauschen haben eine messbar höhere FSC-A und FSC-W. Am Ende können die Keratinozyten sowie die Immunzellen über die eingesetzten Antikörper identifiziert werden.

Bei der Verwendung mehrerer Fluorochrome kann es zu einer Überlappung der Emissionsspektren (engl. *spectral overlap*) kommen. Dies basiert auf der Tatsache, dass verschiedene Fluorochrome Licht über einen gemeinsamen Wellenlängenbereich emittieren können und somit wird die Emission eines Fluorophors durch einen falschen Detektor detektiert. Daher ist es unmöglich zwei Signale optisch voneinander zu trennen. Mit Hilfe der Kompensation können solche Effekte mathematisch behoben werden.

6.2. Überprüfung der Isolierung muriner epidermaler Keratinozyten

Die Reinheit der epidermalen Keratinozyten wurde mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Da keine Keratinozyten-spezifischen Oberflächenmarker *bis dato* bekannt sind wurden die Keratinozyten, als MHC II und CD 3 negative Population definiert. Als Kontrolle, dass eine spezifische Antikörperbindung stattgefunden hat, wurden Milzzellen zusätzlich mit gefärbt. Die isolierten epidermalen Zellen sowie Milzzellen wurden nach folgendem Schema (vgl. Tabelle 26) gefärbt.

Primär Antikörper	Markierung	Klon	Verdünnung	Hersteller	
CD3	APC	145-2C11	1:200	BioLegend; Fell	
CD16/CD32	ohne	93	1:100	BioLegend; Fell	
MHC II (I-A/I-E)	PE	M5/114.15.2	1:2000	BD; Heidelberg	

Tabelle 26: Antikörper für die Überprüfung der Reinheit von epidermalen Keratinozyten Für die Antikörperfärbung wurden 5x10⁶/ml epidermale Zellen sowie Milzzellen eingesetzt. Eine ungefärbte Probe (= Leerwertprobe) diente zur Validierung der Messung, denn ungefärbte Zellen sollten keine Signale zeigen. Für die Kompensationsreihe wurden neben der Leerwertprobe auch Proben angesetzt, die die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe/AK enthielten. Weiterhin wurde ein Fc Block (CD16/CD32) eingesetzt, um die unspezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen abzusättigen.

Die frisch isolierten Zellen wurden zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1 S-R; 1200rpm, 8Min. und 4°C) und auf eine Zellzahl von 5x10⁶ Zellen/ml eingestellt. Es wurde der Fc Block (1:100) zum Färbeansatz zugegeben, kurz mit dem Wirbelmixer gemischt und 20Min. auf Eis inkubiert. Je 50µl der Fc blockierten Zellen wurden in ein FACS Röhrchen vorgelegt und 50µl der Antikörperlösung dazugegeben, kurz mit dem Wirbelmixer gemischt und 20Min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte mit je 1ml FACS Puffer und bei 1200rpm, 4°C für 8Min. Das gefärbte Sediment wurde in 250µl FACS Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Für die Analyse wurden 100.000 Zellen aufgenommen und mit der FACS DIVA Software analysiert.

7. BIOINFORMATISCHE ANALYSEN

7.1. Statistische Auswertung der Daten

Die Daten werden als Mittelwert±SEM präsentiert. Die statistische Bewertung der Daten erfolgte mit der ungepaarten studentischen T-Verteilung mit GraphPad-Prism[™]. Als signifikant wurde ein p Wert ≤0,05 betrachtet.

7.2. Korrelationsanalyse

Mit Hilfe einer Korrelationsanalyse sollte untersucht werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen Raumtemperatur/Luftfeuchtigkeit und TEWL besteht.

Hierbei wird untersucht, ob zwischen zwei Merkmalen, die durch die Zufallsvariablen X und Y beschrieben werden, ein Zusammenhang (= Korrelation) existiert. Eine Maßzahl für die Stärke des Zusammenhangs ist das Bestimmtheitsmaß r^2 . $r^2=0$ heißt, dass kein Zusammenhang zwischen zwei Zufallsvariablen existiert. Je näher r^2 an 1 kommt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Zusammenhang zwischen den zwei Zufallsvariablen besteht [166]. In meinem Fall untersuchte ich, ob ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Raumtemperatur (= Variable X) und dem OMin.TEWL (= Variable Y) besteht.

7.3. Hauptkomponentenanalyse

Es wurden *Microarrays* von drei AhR-KO sowie drei WT-Kontrollen (1) von ungestresster Haut sowie (2) von gestresster Haut 6Std. und 24Std. später durchgeführt.

Eine Möglichkeit, um die Qualität der Replikate beurteilen zu können, ist die Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal Component Analysis* (PCA)).

Generell können Daten durch eine Vielzahl von Variablen beschrieben werden, was deren Darstellung aber erschwert. Hier kommt die PCA Analyse ins Spiel. Ziel dieser Analyse ist eine Datenreduktion. Dabei werden die Variablen auf ein Minimum reduziert (=Hauptkomponenten), die aber ausreichend sind, um den Datensatz zu beschreiben [100]. Mit der PCA Analyse konnte grafisch sichtbar gemacht werden, inwieweit sich die biologischen Wiederholungen ähneln, sprich wie ähnlich sich die drei Tiere innerhalb einer Kondition verhielten.

III. Ergebnisse

Die Bedeutung des AhR in der dermatologischen Forschung wird immer größer [39, 224, 234, 235, 87, 88, 91], denn der AhR übernimmt die verschiedenartigsten Aufgaben in der Haut wie beispielsweise bei der Hautpigmentierung [88] oder bei der Homöostase von $\gamma\delta$ T-Zellen [87, 91]. Allerdings ist seine Rolle in der Hautbarriere noch wenig erforscht [48, 230, 224]. *Bis dato* ist bekannt, dass der AhR in epidermalen Zellen exprimiert wird [88, 91, 87] und das der AhR zusätzlich spezifische Funktionen dieser Zellen beeinflusst [87, 91]. Unerwartet belegen die Daten aus der Literatur, dass sowohl eine konstitutive Expression [230] wie auch das Fehlen des AhR [48] zu pathologischen Veränderungen in der murinen Haut führen [230, 48]. Interessanterweise führt die Aktivierung des AhR durch TCDD [224] oder medizinischem Teer [234] in humanen Keratinozyten zu einer Steigerung der Expression an Genen, die in die Assemblierung des *cornified envelope* sowie in die Lipidmatrix Biosynthese involviert sind [siehe [221, 53] für eine Übersicht].

Anhand der aktuellen Forschungsdaten ist es sehr wahrscheinlich, dass der AhR eine Funktion in der physikalischen Hautbarriere besitzt [48, 230, 224, 53, 234, 235], aber eine genaue *in vivo* Charakterisierung der AhR-defizienten Hautbarriere fehlt bis heute. An diesem Punkt knüpft die vorliegende Doktorarbeit an, die im **ersten Teil die** *in vivo* Charakterisierung einer AhR-defizienten Hautbarriere beschreibt. Hierfür wurde eine funktionale, morphologische sowie molekularbiologische Charakterisierung der Hautbarriere von verschiedenen konditionalen AhR-defizienten Mäusen durchgeführt. Ebenso sollte die Frage geklärt werden, in welcher Hautzelle, also Keratinozyt oder Langerhanszelle, der AhR wichtig ist bezüglich der Integrität der murinen Hautbarriere?

Da eine beschädigte Hautbarriere zu Veränderungen im Mikrobiom führen kann, beschäftigte sich der **zweite Teil** der Doktorarbeit mit der Frage, **ob der Verlust des AhR die Zusammensetzung des Hautmikrobioms beeinflusst?** Hierfür wurde erstmals das Mikrobiom des Rückens und der Ohren von konditionalen AhRdefizienten Mäusen bestimmt.

Falls die Defizienz des AhR zu einer beeinträchtigten Hautbarriere führt, so stellte sich im Umkehrschluss die Frage, ob die Hautbarriere durch eine Aktivierung des AhR gestärkt werden kann? Deshalb wurde im **dritten Teil** der Doktorarbeit die Frage untersucht, ob der **AhR ein mögliches Zielprotein für eine diätetische Interventionsstudie ist?** Hierfür wurden zwei langfristige Fütterungsstudien mit dem natürlichen AhR-Liganden Indol-3-Carbinol (I3C) durchgeführt. Die Veränderungen der Hautbarriere wurden funktional sowie molekularbiologisch festgestellt.

1. Einsatz von AhR-defizienten Mäusen

Für die *in vivo* Charakterisierung der murinen Hautbarriere sowie der Charakterisierung des Hautmikrobioms, konnte ich auf genmanipulierte Mäuse zurückgreifen. Bei diesen Mäusen wurde das Genom gezielt manipuliert und die Manipulation stabil an die Nachkommen weitergegeben. Bei der eingesetzten AhRdefiziente Mauslinie (=AhR-KO), die 1996 von C. Bradfield generiert wurde [199], fehlt das zweite Exon. Aus diesem Grund kann die Maus kein funktionales AHR Protein herstellen [199].

Um die Frage beantworten zu können, in welcher Hautzelle der AhR wichtig ist bezüglich der Integrität der murinen Hautbarriere, wurden konditionale Ahr-KO Mauslinien eingesetzt, d.h.. der AhR fehlt nur in bestimmten Zellen. Bei der Keratinozyten-spezifischen AhR-KO Mauslinie (= AhR K5-KO) fehlt der AhR nur in den Keratinozyten. Wenn der AhR nur in den Langerhanszellen fehlt, dann handelt es sich um eine Langerhanszell-spezifischen AhR-KO Mauslinie (= AhR LC-KO). Als Kontrollen dienten weibliche Wurfschwestern, die im weiteren Verlauf als AhR-WT, AhR K5-WT oder AhR LC-WT bezeichnet werden.

1.1. Genotypisierung der eingesetzten Mäuse

Alle Mäuse wurden genotypisiert, um sicherzustellen, dass bei den Experimenten die Mäuse mit dem richtigen Genotypen eingesetzt wurden (siehe Methode 1.3.2.). Ein beispielhaftes Agarose Gel einer AhR-KO Genotypisierung wird in der Abbildung 16 präsentiert.

1	2	3	4	М	5	6	7	8	9	10	м	
	WT	HET	ко	Vanillaser	ко	ко	ко	WT	WT	WT	-	
									-	-		700 bp
	-	-						Record.	-	ena		500 bp
												200 bp
					-							100 bp

Abbildung 16: Repräsentatives Agarose-Gel einer AhR-KO Genotypisierung.

Bei jeder Genotypisierung wurden Kontrollen mitgeführt (Spur 1 bis 4). In der Spur 1 wurde die Negativkontrolle aufgetragen. Hierdurch können Kontaminationen, die durch Reagenzien zustande kommen können, ausgeschlossen werden. Die Banden in der Spur 2,8,9 und 10 weisen eine ungefähre Größe von 669bp auf. Hierbei handelt es sich um WT-Mäuse. Das Auftreten von zwei Fragmenten, wie in der Spur 3 zu sehen ist, mit einer ungefähren Größe von 669bp und 172bp, identifiziert heterozygote Mäuse. Wird eine Bande von 172bp im Agarose-Gel sichtbar, wie in den Spuren 4 bis 7, dann handelt es sich um AhR-KO Mäuse. Abkürzung: HET: heterozygot, KO: Knock-Out, WT: Wildtyp
Die Abbildung 16 zeigt, dass die DNS aus den Spuren 5 bis 7 AhR-KO identifiziert, während die DNS in den Spuren 8 bis 10 zu AhR-WT Mäusen gehört.

1.2. Überprüfung des konditionalen KOs in Keratinozyten

Die Hauptzellen in der Epidermis sind die Keratinozyten [214]. Kürzlich konnte eine Studie [235] bestätigen, dass der AhR eine physiologische Funktion in der epidermalen Differenzierung hat. Die Daten zeigten, dass unter einer niedrigen Ca²⁺ Konzentration eine signifikante Reduktion der Genexpression von Keratin *(KRT) KRT1* und *KRT10* sowie den kleinen Prolin-reichen Proteinen *(SPRR) SPRR2A1, SPRR2B, SPRR2G* und SPRR2*H* bei den murinen AhR-KO Keratinozyten beobachtet werden konnte. Eine Erhöhung der Ca²⁺ Konzentration im Kulturmedium führt zu einer verminderten Expression von Involucrin *(IVL)* und Loricrin *(LOR)* bei den murinen AhR-KO Keratinozyten im Vergleich zu den murinen AhR-WT Keratinozyten [235]. Ebenso zeigten die Daten von weiteren *in vitro* Studien mit humanen Keratinozyten, dass eine 24-stündige TCDD (10nM) Stimulation die Genexpression von vielen Hautbarriere-relevanten Genen wie zum Beispiel Filaggrin *(FLG),* Filaggrin 2 *(FLG2)* oder Repetin *(RPTN)* verstärkt [224, 99].

Aus diesen *in vitro* Befunden lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der AhR die Integrität der Hautbarriere über die Keratinozyten beeinflusst. Um diese Hypothese *in vivo* überprüfen zu können, wurde eine Keratinozyten-spezifische AhR-KO Mauslinie eingesetzt. Der gewebespezifische KO wird induziert, indem die Expression der Cre Rekombinase unter der Kontrolle des Keratin 5 (K5) Promoters steht [88, 229]. In regelmäßigen Abständen wurde die AhR K5-KO Mauslinie überprüft, ob der AhR wirklich nur in den Keratinozyten fehlt und in allen anderen Zellen noch vorhanden ist.

Hierfür wurden AhR K5-KO Mäuse sowie deren WT-Kontrollen geopfert und die DNS aus der Epidermis isoliert (vgl. Methode 1.5.). Zusätzlich wurde die DNS aus der Milz, der Lunge, der Leber sowie der Schwanzspitze isoliert. Da in diesen Zellen kein aktiver K5 Promoter vorhanden ist, sollten diese Gewebe den AhR exprimieren. Die DNS wurde, wie unter Methoden 2.1.1. und 3.4.1. beschrieben, isoliert. Um die Reinheit der epidermalen Zellsuspension überprüfen zu können, wurde eine durchflusszytometrische Analyse (vgl. Methode 6.2.) durchgeführt. Hierdurch sollte der prozentuale Anteil an Keratinozyten, Langerhanszellen und T-Zellen in der epidermalen Suspension dokumentiert werden. Keratinozyten wurden über das Fehlen der Oberflächenmarkern CD3 und MHCII diskriminiert, während T-Zellen über die CD3-Expression und Langerhanszellen über die MHCII Expression identifiziert wurden. Als technische Kontrolle wurden AK gefärbte Milzzellen mitgeführt. Eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse wird in der nachfolgenden Abbildung 17 gezeigt.



Abbildung 17: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen und epidermalen Zellen.

(a) und (c) zeigt die Analyse der Milzzellen, während (b) und (d) die durchflusszytometrische Analyse der epidermalen Zellen zeigt. (a) und (b) zeigen eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse einer AhR K5-WT Maus und (c) und (d) für eine AhR K5-KO Maus. Gezeigt wird der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellen im Quadrat an den lebenden Zellen des Gewebes. CD3 färbt T-Zellen an, MHC II färbt Langerhanszellen an. n:1. Wie erwartet konnte bei den Milzzellen deutliche Signale für CD3 sowie MHCII detektiert werden (Abbildung 17a und 17c). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse demonstrieren eindeutig, dass durchschnittlich 96,5% der epidermalen WT-Zellen Keratinozyten (Abbildung 17b) waren. Bei den epidermalen KO-Zellen waren durchschnittlich 96,1% der Zellen Keratinozyten (Abbildung 17d). Diese Daten stimmen mit den Literaturdaten überein [145, 220].

Nachdem die DNS vorlag, wurde eine Flox-Cre-PCR (vgl. Anhang (a) Genotypisierungsprotokolle Flox-Cre-PCR-Protokoll) durchgeführt. Der Nachweis des loxP markierten AhR wird in der Abbildung 18 schematisch gezeigt.



Abbildung 18: Der Nachweis des loxP markierten AhR.

Unter Verwendung der Vorwärts-Oligonukleotide OL4062 und OL4064 sowie des Rückwärts Oligonukleotids OL4088 kann auf genomischer Ebene nachgewiesen werden, ob der AhR ausgeschnitten wurde oder nicht. Wenn der AhR ausgeschnitten wurde, dann erzeugen die Oligonukleotide OL4062 und OL4088 ein 180bp großes Fragment. Eine 140bp große Bande zeigt an, dass der AhR noch im Genom vorhanden ist (OL4064/OL4088). Ist das WT Gen vorhanden, dann wird im Gel eine 106bp große Bande (OL4064/OL4088) sichtbar. Modifiziert nach Walisser et al. (2005) [239].

Wenn der AhR in den Keratinozyten nicht mehr vorhanden ist (= AhR K5 KO-Maus), dann amplifizieren die Oligonukleotide OL4062 und OL4088 ein 180bp großes Fragment. Während bei einem durch loxP Sequenzen markierten AhR die beiden Oligonukleotide OL4064 und OL4088 ein 140bp großes Fragment generieren. Nachdem die DNS aus den epidermalen Zellen und Organen isoliert wurde, wie unter Methode 3.4.1. beschrieben, wurde eine Flox-Cre-PCR (vgl. Anhang VIIa) Genotypisierungsprotokoll Flox-Cre-PCR-Protokoll) durchgeführt. Ein repräsentatives Agarosegel wird in der Abbildung 19 gezeigt.



Abbildung 19: Repräsentatives Agarosegel einer konditionalen AhR K5-KO Überprüfung.

Die Abbildung zeigt exemplarisch ein Agarosegel von einer AhR K5-KO Maus (Spur1 bis Spur5) und einer AhR K5-WT Kontrolle (Spur6 bis Spur10). Neben der DNS aus epidermalen Zellen (Spur 5,10) wurde auch DNS aus der Leber (Spur 1,6), der Lunge (Spur 2,7), der Milz (Spur 3,8) und einer Schwanzbiopsie (Spur 4,9) isoliert. Wenn der AhR ausgeschaltet ist, dann wird eine 180bp große Bande (Spur 5) sichtbar. Wenn der AhR noch vorhanden ist, dann ist die Bande 140bp groß (Spur 2 bis 4). n:1.

Das repräsentative Agarosegel (Abbildung 19) demonstriert eindeutig, dass der AhR nur in den Keratinozyten ausgeschnitten wurde (vgl. Abbildung 19 Spur5) und in den anderen Organen noch vorhanden ist (vgl. Abbildung 19 Spur1 bis Spur4). Allerdings konnte bei der AhR K5-KO schwache Banden bei 180bp (vgl. Abbildung 19 Spur4) und 140bp (vgl. Abbildung 19 Spur5) detektiert werden. Diese Banden kommen durch Kontaminationen durch Keratinozyten (vgl. Abbildung 19 Spur4) bzw. durch Langerhanszellen und $\gamma\delta$ T-Zellen (vgl. Abbildung 19 Spur5) zustande.

Bei der AhR K5-WT Maus konnte nur die 140bp große Bande detektiert werden. Somit ist der AhR in den Organen Leber, Lunge, Milz, Schwanz sowie der Epidermis vorhanden. Es kann festgehalten werden, dass der konditionale KO nur in den Keratinozyten stattgefunden hat.

2. Optimierungen zur Messung des transepidermalen Wasserverlustes

Kennzeichnend für eine geschädigte Hautbarriere ist ein erhöhter transepidermaler Wasserverlust, kurz TEWL (engl. *transepidermal water loss*) [siehe [181] für eine Übersicht]. Daher wird der TEWL als Indikator für die Integrität der Hautbarriere genutzt. Nachteil dieser nicht invasiven Messmethode ist [181], dass der TEWL sehr empfindlich gegenüber den verschiedensten Faktoren wie Alter, Geschlecht, Tageszeit, oder Umweltbedingungen wie Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit ist [112, 173, 188]. Aus diesem Grund wurde ein Standardprotokoll entwickelt, das gleichmäßige und stabile Messungen ermöglicht. Darüber hinaus wurden kritische Parameter wie die Abrissmethode (engl. *tape stripping*) selbst für die Maushaut ausgearbeitet, optimiert und dann für alle Versuch standardisiert (vgl. Methode 1.6.1.). In diesem Kapitel wird näher auf die Entwicklung des TEWL Protokolls eingegangen.

2.1. Anpassung der Abrissmethode an die Maushaut

Um einen messbaren und stabilen TEWL induzieren zu können, muss die Hautbarriere beschädigt werden. Eine der häufigsten Methode ist die Abrissmethode (engl. *tape stripping*). Hierbei werden die obersten Schichten der Epidermis durch einen adhäsiven Klebefilm entfernt. Zusätzlich liefert die Abrissmethode eine Information über die Reparaturfähigkeit der Hautbarriere [43].

Zunächst wurden zwei verschiedene adhäsive Klebebänder ausgetestet, TegadermTM3MTMFilm 6,0x7,0cm und herkömmliches Tesafilm. Ebenso wurde ausgetestet, wie oft der mechanische Stress durchgeführt werden muss, um einen stabilen und messbaren TEWL induzieren zu können. Die Daten dieses Experiments werden in der nächsten Abbildung 20 gezeigt.



Abbildung 20: Vergleich der Induzierbarkeit des TEWLs durch die Abrissmethode mit TegadermTM3MTMFilm und herkömmlichem Tesafilm.

Zwei je 27 Wochen alte C57BL/6 Weibchen wurden auf dem Rücken rasiert und drei Tage später erfolgte der mechanische Stress. Zunächst wurde der Basal-TEWL (= ohne mechanischen Stress) gemessen. Dann wurde die Rückenhaut mehrmals mit den adhäsiven Klebebändern gestresst und der TEWL gemessen. Es wurden mind. 25 Messwerte pro Messung aufgenommen und der Mittelwert errechnet. Die Raumtemperatur betrug 21,65°C und die Luftfeuchtigkeit 46,5%. Die Daten werden als Mittelwert±SEM von n:1 pro adhäsivem Klebeband dargestellt. n:1.

Anhand der Abbildung 20 ist erkennbar, dass der TEWL am Besten durch TegadermTM3MTMFilm induziert wurde. Je öfter der mechanische Stress durchgeführt wurde, desto höher wurde der Wasserverlust. Im Vergleich dazu induzierte das herkömmliche Tesafilm den TEWL kaum. Aus diesem Grund wurde die murine Haut für alle nachfolgenden Experimente 5x mit dem TegadermTM3MTMFilm mechanisch gestresst.

Als Nächstes stellte sich die Frage, wie viel Haut bei der Abrissmethode entfernt wurde? Um diese Frage beantworten zu können, wurde das Gewicht der entfernten Haut bestimmt.

Hierfür wurde der TegadermTM3MTMFilm in Stücke geschnitten, in ein 50ml Reaktionsgefäß überführt und vor sowie nach dem mechanischen Stress gewogen. Anschließend wurde die Menge an entfernter Haut kalkuliert. Die Abbildung 21 fasst die Ergebnisse für den AhR-KO Stamm sowie die WT-Kontrollen zusammen.



Abbildung 21: Die Menge an entfernter Haut korreliert nicht mit dem OMin. TEWL bei den AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.

Gezeigt wird die Menge an entfernter Haut für den Mausstamm AhR-KO und seine WT-Kontrollen (a). In (b) und (c) werden die Diagramme der Korrelationsanalyse gezeigt. (b) zeigt die Ergebnisse für die jungen WT-Kontrollen und (c) für die jungen AhR-KO Mäuse. Wenn das Reaktionsgefäß nach dem mechanischen Stress leichter war als vorher, so wurden die Daten aus der Berechnung herausgenommen. Es werden die Mittelwerte±SEM gezeigt. Die statistische Berechnung für (a) erfolgte über die ungepaarte studentsche T-Verteilung. *p<0,05 und ** p<0,01. Die Anzahl schwankt zwischen n:21 (junge AhR-KO) und n:4 (alte AhR-KO). Kontrolle: adhäsive Klebebänder ohne Haut, um mögliche Einflüsse durch die Luftfeuchtigkeit ausschließen zu können.

Wie aus der Abbildung 21a ersichtlich ist, wurde bei den jungen (= 10 Wochen) AhR-KO Mäusen geringfügig mehr Epidermis entfernt als bei den WT-Kontrollen. Dieser Unterschied zwischen AhR-KO (weiße Balken) und WT-Kontrollen (schwarze Balken) war statistisch signifikant. Bei den alten (= 9 Monaten) und sehr alten (= 18 Monaten) Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den AhR-KO Mäusen (weiße Balken) und deren WT-Kontrollen (schwarze Balken) festgestellt werden (Abbildung 21a). Außerdem zeigt die Abbildung 21a, dass bei den alten und sehr alten Mäusen weniger Epidermis durch die Abrissmethode entfernt werden konnte im Vergleich zu den jungen Mäusen. Aufgrund der Tatsache, dass der Unterschied zwischen den jungen AhR-KO und WT-Kontrollen signifikant war, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Somit sollte abgeklärt werden, ob ein kausaler Zusammenanhang zwischen der entfernten Haut und dem TEWL besteht.

Die Auftragung der entfernten Haut (mg) gegen den OMin. TEWL (g/hm²) (vgl. Abbildung 21 b und c) zeigt auf, dass kein Zusammenhang zwischen der entfernten Haut und dem TEWL bestand. Als Beispiel: ein hoher TEWL bedeutet nicht, dass sehr viel Haut entfernt wurde. Diese Vermutung wurde durch eine Korrelationsanalyse bestätigt. Das Bestimmtheitsmaß für die jungen AhR-KO Mäuse betrug r²: 0,1 und für die WT-Kontrollen r²:0,0. Damit besteht kein kausaler Zusammenhang zwischen der Menge an entfernter Haut und dem TEWL. So dass die beobachteten Effekte auf den Verlust des AhR zurückzuführen sind [166].

Auch für die konditionalen AhR-KO Mauslinien wurde die Menge an entfernter Haut bestimmt. Die Daten werden in der Abbildung 22 präsentiert.



Abbildung 22: Die Menge an entfernter Haut bei der AhR K5-KO und der AhR LC-KO Mauslinie. Gezeigt wird die Menge an entfernter Haut für den Mausstamm AhR K5-KO (a) und in (b) für den AhR LC-KO Stamm. Wenn das Reaktionsgefäß nach dem mechanischen Stress leichter war als vorher, so wurden die Daten aus der Berechnung herausgenommen. Es werden die Mittelwerte ±SEM gezeigt von n:21. Die statistische Berechnung erfolgte über die ungepaarte studentsche T-Verteilung. Es konnten keine Signifikanzen festgestellt werden. Die Anzahl bei den AhR K5-KO betrug n:19 und bei den AhR K5-WT n:20. Bei den AhR LC-KO Mäusen waren es n:20 und bei den WT-Kontrollen n:17. Kontrolle: adhäsive Klebebänder ohne Haut, um mögliche Einflüsse durch die Luftfeuchtigkeit ausschließen zu können.

Weder bei dem AhR K5-KO Stamm noch bei den AhR LC-KO Stamm konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den KO-Mäusen und deren WT-Kontrollen festgestellt werden. Mal wurde etwas mehr Haut bei den WT-Kontrollen entfernt, mal wurde etwas mehr Haut bei den AhR-KO Mäusen entfernt (Abbildung 22a und 22b).

2.2. Der TEWL der AhR K5-KO Mäusen reagiert empfindlicher auf Veränderungen in der Umgebung

Der TEWL wird durch Umweltbedingungen wie Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit beeinflusst [112, 173, 188]. Da aus technischen Gründen die Einflussfaktoren Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit nicht konstant gehalten werden konnten, wurden die Experimente mehrfach wiederholt. Trotzdem ist bei den TEWL Auswertungen der AhR K5-KO Mauslinie und deren WT-Kontrollen aufgefallen, dass die TEWL Werte mit der Raumtemperatur und der Luftfeuchtigkeit schwankten. Diese Beobachtungen konnten weder bei der AhR-KO Mauslinie noch bei der AhR LC-KO Mauslinie gemacht werden.

Um herauszufinden, ob die Raumtemperatur oder die Luftfeuchtigkeit den TEWL bei der AhR K5-KO Mauslinie und deren WT-Kontrollen beeinflusst, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden die OMin., 30 Min. sowie 24Std. TEWL Werte gegen die Raumtemperatur aufgetragen. Diese Auftragungen werden in der nächsten Abbildung 23 gezeigt.



Abbildung 23: Der TEWL der AhR K5-KO Mäuse korreliert mittelmäßig mit der Raumtemperatur.

Die Abbildung 23 zeigt, dass vor allem der OMin. und 30Min. TEWL der AhR K5-KO Mäuse von der Temperatur stark beeinflusst wird. Beispielsweise der OMin. TEWL Wert in der Abbildung 23a: Lag die Raumtemperatur ≤23°C (grüner Bereich), so hatten die AhR K5-KO Mäuse (Abbildung 23 weiße Quadrate) einen OMin. TEWL Wert von unter 20g/hm². Wenn die Raumtemperatur ≥24°C lag, dann stieg der TEWL der AhR K5-KO Mäuse (Abbildung 23 weiße Quadrate) auf ungefähr 35g/hm²

Der OMin. TEWL Wert (a) sowie 30Min. TEWL Wert (b) und der 24Std. TEWL Wert (c) wurden gegen die Raumtemperatur aufgetragen. Dabei wurden die unterschiedlichen Raumtemperaturen zusammengefasst in $\leq 23^{\circ}$ C (grünem Feld) und $\geq 24^{\circ}$ C (rotem Feld). Die schwarzen Rechtecke repräsentieren die TEWL-Werte der WT-Kontrollen, während die weißen Quadrate die TEWL Werte der AhR K5-KO Mäuse darstellen. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung. Die Signifikanz wurde zwischen der $\leq 23^{\circ}$ C und $\geq 24^{\circ}$ C für jeden Genotypen berechnet. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001. n:6 und n:9.

an. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Interessanterweise schien die RT den TEWL der WT-Kontrollen (Abbildung 23, schwarze Quadrate) nicht zu beeinflussen. Die visuellen Beobachtungen wurden mit einer Korrelationsanalyse verifiziert. Die Ergebnisse sind der Tabelle 27 zusammengefasst.

	Genotyp	enotyp TEWL Zeitpunkt		
		0Min.	0 ^b	
	AhR K5-WT	TEWL Zeitpunkt 0Min. 0Min. 24Std. 0Min. K5-KO 30Min. 24Std.	0,1 ^c	
			0,3 ^c	
		0Min.	0,5 ^d	
	AhR K5-KO	30Min.	0,3 ^c	
		24Std.	0,4 ^d	

 Tabelle 27: Bestimmtheitsmaß r²: TEWL und Raumtemperatur

 a Bestimmtheitsmaß, b O=keine Korrelation, c O,1-0,4O=schwache Korrelation und d O,41-0,7= mittlere Korrelation , 0,71-1,0=starke Korrelation

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse bestätigen die visuellen Beobachtungen aus der Abbildung 23. Der OMin. sowie der 24Std. TEWL Wert der AhR K5-KO Mäuse waren anfälliger gegenüber Veränderungen in der Raumtemperatur. Hier ist eine mittlere Korrelation zwischen TEWL und RT erkennbar. Bei den WT-Kontrollen konnte nur bei dem 24Std. TEWL-Wert eine schwache Korrelation festgestellt werden.

Auch für die Luftfeuchtigkeit wurde überprüft, wie der TEWL der AhR K5-KO Mäuse und deren WT-Kontrolle auf Luftfeuchtigkeitsveränderungen reagiert. Die ausgewerteten Daten werden in der nächsten Abbildung 24 gezeigt.



Abbildung 24: Der TEWL der AhR K5-KO Mäuse korreliert schwach mit der Luftfeuchtigkeit. Der OMin. TEWL Wert (a) sowie 30Min. TEWL Wert (b) und der 24Std. TEWL Wert (c) wurden gegen die Luftfeuchtigkeit aufgetragen. Dabei wurden die unterschiedlichen Luftfeuchtigkeitswerten zusammengefasst in $\leq 39\%$ (grünem Feld) und $\geq 50\%$ (rotem Feld) (OMin. und 30Min. TEWL) bzw. 32-33% (grüner Bereich) und $\leq 40\%$ (24Std.). Die schwarzen Rechtecke repräsentieren die TEWL-Werte der WT-Kontrollen, während die weißen Quadrate die TEWL Werte der AhR K5-KO Mäuse darstellen. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung. Die Signifikanz wurde zwischen $\leq 39\%$ und $\geq 50\%$ bzw. 32-33% und $\leq 40\%$ für jeden Genotypen berechnet. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001. n:6 und n:9. In der Abbildung 24 wurden die TEWL Werte gegen die Luftfeuchtigkeit aufgetragen. Wie auch bei der Raumtemperatur beobachtet (vgl. Abbildung 23) stieg der TEWL mit steigender Luftfeuchtigkeit an. Dieser Effekt ist aber nicht so stark ausgeprägt, wie bei der Raumtemperatur (vgl. Abbildung 23). Interessanterweise reagierte der OMin. sowie der 30Min. TEWL der WT-Kontrollen stärker auf Schwankungen in der Luftfeuchtigkeit (vgl. Abbildung 24a und 24b, schwarze Rechtecke). Der Vergleich der 0Min. TEWL Werte der AhR K5-KO Mäuse zeigte auf, dass der TEWL durch die Raumtemperatur mehr beeinflusst wurde (vgl. Abbildung 23a, weiße Quadrate) als durch die Luftfeuchtigkeit (vgl. Abbildung 24a, weiße Quadrate). Auch hier wurde eine Korrelationsanalyse mit GraphPadPrism durchgeführt und die Ergebnisse werden in der nächsten Tabelle 28 gezeigt.

Genotyp	TEWL Zeitpunkt	r2a
	0Min.	0 b
AhR K5-WT	30Min.	0,3 ^c
	24Std.	0,1 ^c
	0Min.	0,5 ^d
AhR K5-KO	30Min.	0,3 ^c
	24Std.	0 b

Tabelle 28: Bestimmtheitsmaß r²: TEWL und Luftfeuchtigkeit

Die Korrelationsanalyse verifiziert die visuellen Beobachtungen aus der Abbildung 24. Bei den AhR K5-KO Mäusen konnte eine mittlere Korrelation zwischen dem 0Min. und 30Min. TEWL Wert und der Luftfeuchtigkeit festgestellt werden. Bei den WT-Kontrollen konnte hingegen eine schwache Korrelation zwischen dem 30Min. und dem 24Std. TEWL Wert beobachtet werden.

Es kann festgehalten werden, dass der AhR K5-KO Stamm empfindlicher auf Veränderungen in der Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit reagiert [112, 173, 188] im Gegensatz zu den AhR-KO und AhR LC-KO Stamm (Daten nicht gezeigt).

 $^{^{}a}$ Bestimmtheitsmaß, b 0=keine Korrelation, c 0,1-0,40=schwache Korrelation und d 0,41-0,7= mittlere Korrelation , 0,71-1,0=starke Korrelation

2.3. Der TEWL von verschiedenen Wildtyp-Kontroll-Mäusen

Während den Auswertungen der TEWL Kinetiken fiel auf, dass die TEWL Werte nach dem mechanischen Stress von den AhR-WT, AhR K5-WT sowie AhR LC-WT unterschiedlich waren. Aufgrund der Tatsache, dass es sich um WT-Tiere handelte, sollten alle WT-Tiere nach dem mechanischen Stress gleiche TEWL Werte aufweisen. Deshalb wurden von den C57BL/6 sowie die AhR K5-WT und AhR LC-WT Mäuse am selben Tag eine TEWL Kinetik aufgenommen. Die Ergebnisse der TEWL Kinetik Messung werden in der Abbildung 25 gezeigt.



Abbildung 25: Die TEWL Kinetik von C57BL/6, AhR K5-WT und AhR LC-WT Mäusen. Je vier 14,75 \pm 2,14 Wochen alte C57BL/6, AhR K5-WT sowie AhR LC-WT Weibchen wurden mechanisch auf dem rasierten Rücken gestresst und eine TEWL Kinetik aufgenommen. Pro Messung wurden mind. 25 Messwerte aufgenommen und daraus der Mittelwert gebildet. Die Raumtemperatur betrug 24,78 \pm 0,11°C (bis 30Min.) und 23,02 \pm 0,24°C (24Std.) und die Luftfeuchtigkeit: 20,43 \pm 0,64% (bis 30Min.) und 36,00 \pm 0% (24Std.). Die Daten werden als Mittelwerte \pm SEM von n:4 dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung. Es konnten keine Signifikanzen festgestellt werden.

Die Abbildung 25 zeigt, dass sich die TEWL Werte nach dem mechanischen Stress zwischen den unterschiedlichen WT-Kontrollen unterscheiden. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass die WT Mäuse nicht 100% identisch sind.

3. FÜHRT DER VERLUST DES AHR ZU EINER BEEINTRÄCHTIGEN INTEGRITÄT DER MURINEN HAUTBARRIERE?

Für die *in vivo* Charakterisierung der murinen AhR-defizienten Hautbarriere wurde die Rückenhaut von AhR defizienten Mäusen mit dem TegadermTM3MTMFilm mechanisch gestresst und anschließend morphologische (siehe Ergebnisse 3.1.), funktionale (siehe Ergebnisse 3.2.) sowie molekulare (siehe Ergebnis 3.3.) Untersuchungen durchgeführt.

3.1. Morphologische Untersuchungen

3.1.1. Der Einfluss des AhR auf die Dicke der Epidermis

Ein typisches Symptom einer TCDD Vergiftung beim Menschen ist die Ausbildung einer Chlorakne, die sich unter anderem in einer verdickten Epidermis äußert [siehe [86] für eine Übersicht]. Ebenso ist bekannt, dass TCDD den AhR aktiviert [176]. Daraufhin stellte ich mir die Frage, wie sich der Verlust des AhR auf die Dicke der Epidermis auswirken würden. Um diese Frage beantworten zu können, bestimmte ich die Dicke der Epidermis bei den AhR-KO und AhR K5-KO Mäusen sowie deren WT-Kontrollen.

Hautbiopsien von der rasierten Rückenhaut sowie den Ohren wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt (vgl. Methode 4.1. und 4.2.) und mit der LAS V4.0 Software wurden mind. zehn Fotos pro Tier aufgenommen. Abbildung 26 zeigt eine beispielhafte HE-Färbung und die Vermessung der Epidermis.



Abbildung 26: Repräsentative Ausmessung der Epidermis vom Rücken und dem Ohr einer WT-Maus.

Gezeigt werden die Schnitte einer AhR-WT-Maus, wobei (a) den Querschnitt durch die Rückenhaut zeigt und (b) einen Querschnitt durch das Ohr. Pro Tier wurden zwei Objektträger à drei Schnitte angefertigt. Es wurden mind. zehn Fotos pro Tier aufgenommen und der gesamte Schnitt wurde vermessen. Vergrößerung: 20 fach. Die Berechnung der Dicke der Epidermis wurde nach folgender Formel berechnet:

Dicke der Epidermis $[\mu m] = 0.1 \text{ mm * x Pixel} * 1000$ 415 Pixel

Länge des Maßstabbalken = 0,1 mm Länge des Maßstabbalken = 415 Pixel

Dicke der Epidermis = x Pixel

Die ermittelten Dicken der Epidermis werden in der Abbildung 27 als Balkendiagramme zusammengefasst.



Abbildung 27: Die Bestimmung der epidermalen Schichtdicke von AhR-KO und AhR K5-KO-Mäusen sowie deren WT-Kontrollen.

Weibliche 1) AhR-KO Mäuse sowie gleichaltrige WT-Kontrollen (Alter: $9,17\pm1,19$ Wochen) und 2) AhR K5-KO Mäuse und deren WT-Kontrollen (Alter: 10 ± 0 Wochen) wurden drei Tage vor dem Experiment auf dem Rücken rasiert. Während in 1a und 2a die Ergebnisse für den Rücken gezeigt werden, zeigen 1b und 2b die Daten für die Ausmessung der Dicke der Epidermis für das Ohr. Die schwarzen Balken repräsentieren die Daten für die WT-Kontrollen. Die weißen Balken fassen die Ergebnisse für die AhR-KO und AhR K5-KO Mäuse zusammen. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standard Error of Mean (SEM) von n: 3 (AhR-KO) bzw. n:4 (AhR K5-KO) präsentiert. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte durch die ungepaarte studentsche T-Verteilung. Abkürzung: ns: nicht signifikant.

Die Abbildung 27 1a und 1b präsentiert die Ergebnisse für die Dicke der Epidermis von den AhR-KO Mäusen sowie deren WT-Kontrollen. Die Dicke der Epidermis am Rücken der WT-Kontrollen betrug 19,59±2,85µm. Für die AhR-KO-Mäuse konnte eine epidermale Schichtdicke von 18,19±1,7µm festgestellt werden. Diese Unterschiede sind minimal und waren statistisch nicht signifikant. Der Vergleich der Schichtdicke am Ohr zwischen den AhR-KO und deren WT-Kontrolle zeigte, dass die WT-Kontrolle eine Dicke von 18,94±1,1µm aufweist, während beim AhR-KO eine Dicke von 20,9±0,6µm gemessen wurde. Wie beim Rücken sind die Unterschiede auch hier minimal und waren statistisch nicht signifikant. Betrachtet man die Ergebnisse für die AhR K5-KO Mäuse und deren WT-Kontrollen, so kann interessanterweise festgestellt werden, dass diese Unterschiede größer sind, als beim AhR-KO Stamm. Abbildung 27 2a fasst die Ergebnisse für den Rücken zusammen und Abbildung 27 2b für das Ohr. Die Epidermis der AhR K5-WT ist am Rücken 21,6±1,7µm dick und beim AhR K5-KO 16,5±2,5µm. Beim Ohr der WT-Kontrolle konnte eine epidermale Schichtdicke von 29,64±5,1µm festgestellt werden und beim AhR K5-KO eine Dicke von 19,37±1,4µm. Hier sind die Unterschiede zwischen AhR K5-KO und deren WT-Kontrollen größer, aber trotzdem nicht signifikant.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich der Verlust des AhR nicht auf die Dicke der Epidermis auswirkt.

3.1.2. Strukturelle und molekulare Veränderungen in der gestressten AhR-KO Epidermis

Eine Zerstörung der äußeren Schicht der Epidermis (= Stratum corneum) induziert eine Reparaturkaskade auf molekularer sowie zellulärer Ebene, deren Höhepunkt 6Std. nach dem mechanischen Stress gefunden wird [207]. Um einen möglichen Einfluss des AhR auf zellulärer Ebene aufzudecken, wurden elektronenmikroskopische (EM)-Bilder von der ungestressten sowie gestressten Haut aufgenommen und in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. W. Bloch (Deutsche Sporthochschule Köln) auf die Keratinozyten Integrität, inflammatorische Infiltrate sowie das Aussehen des Stratum corneums hin untersucht.

Hierfür wurde die rasierte Rückenhaut von zehn Wochen alten AhR-KO Weibchen sowie deren WT-Kontrollen mechanisch gestresst und 6. Std. später wurden Hautbiopsien entnommen (vgl. Methode 5.). Repräsentative elektronenmikroskopische Bilder der Hautbiopsien werden in der nachfolgenden Abbildung 28 gezeigt.



Abbildung 28: Strukturelle Veränderungen in der AhR-KO Epidermis 6Std. nach dem mechanischen Stress.

Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen von der ungestressten und gestressten Rückenhaut von (a,c,e) einer AhR-WT Kontroll-Maus und von (b,d,f) einer AhR-KO Maus. (a,b) von der ungestressten Haut (Vergrößerung x3000) und (c,d) 6Std. nach der Abrissmethode. Vergrößerung (c) x3000 und (d) x4000. (e,f) gleiche Proben wie in (c,d), Vergrößerung x12000. Weißen Pfeile: Desmosomen, rote Pfeile: Verlust der Keratinozyten-Keratinozyten Kontakte, überbrückt durch Adhärenzverbindungen. Abkürzungen: SC: Stratum corneum; C: Zytoplasma; BM: Basalmembran; N: Nukleus; dC: tote Zellen.

Weder in der ungestressten Rückenhaut von AhR-KO Mäusen noch von AhR-WT Mäusen konnten pathologische Veränderungen wie beispielsweise infiltrierte Immunzellen, eine veränderte Keratinozytenstruktur oder ein beeinträchtigtes Stratum corneum festgestellt werden (vgl. Abbildung 28a und 28b).

6Std. nach der Durchführung des mechanischen Stresses sah die "lebende" Epidermis der WT-Kontrollen "aktivierter" aus. Dieser aktivierte Zustand äußerte sich beispielsweise durch einen erhöhten Verlust der Keratinozyten-Keratinozyten Verbindungen (Abbildung 28c und 28e). Zusätzlich wurden in der gestressten, lebenden AhR-KO Epidermis vermehrt tote Zellen/Zellüberreste (Abbildung 28 f; dC) sowie perinukleäre zytoplasmatische Lysen mit möglichen Lipidablagerungen gefunden (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 28e weisen die rote Pfeilen auf Adhärenzverbindungsbrücken hin, die beim AhR-KO nur an den Stellen mit Desmosomen beobachtete wurden (Abbildung 28f). Die Basalmembran im AhR-KO war gelegentlich dicker, was auf ein verändertes Verhältnis zwischen *lamina densa* und *lamina rara* zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Epidermis der jungen AhR-KO Mäuse stärker auf die Auswirkungen des mechanischen Stresses zu reagieren scheint, als die der jungen WT-Kontroll-Mäuse. Im nächsten Schritt wurde die Expression von verschiedenen Hautbarriererelevanten Genen nach dem mechanischen Stress untersucht. Hierfür wurde gRNS von ungestresster und gestresster Haut isoliert und die Expression von folgenden Hautbarriere-relevanten Genen untersucht: CathepsinD (CSTD), Claudine1 (CLDN1), Connexin26 und 43 (CON26 und CON43), Desmoglein3 (DSM3), E-Cadherin (CDH1), Filaggrin (FLG), Involucrin (IVL), Keratin 5,10 und 14 (KRT5,10 und 14), Loricrin (LOR), Occludin (OCLN), Transglutaminase1 (TGM1) [181], Cytochrome P450, Familie 26,Subfamilie b, Polypeptide1 (CYP26B1) [161] und Matrixmetalloproteinase9 (MMP9) [siehe [172] für eine Übersicht]. Die Daten werden in der Abbildung 29 präsentiert.



Abbildung 29: Expression von Hautbarriere-relevanten Genen 6Std. nach der mechanischen Stressung in der Epidermis von AhR-KO Mäusen und WT-Mäusen.

In (a) werden die Gene zusammengefasst, mit einem deutlichen Unterschied in der Genexpression zwischen AhR-KO und den WT-Kontrollen. Gene, bei denen der Unterschied in der Genexpression zwischen AhR-KO und den WT-Kontrollen gering ist, werden in (b) gezeigt. Zehn Wochen alte männliche AhR-KO Mäuse sowie deren WT-Kontrollen wurden 5x mit TegadermTM 3MTMFilm auf dem rasierten Rücken mechanisch gestresst und 6Std. später randomisierte Hautbiopsien für die Isolation von gRNS entnommen. Anschließend wurde die Genexpression von Hautbarriere-relevanten Genen mit qRT-PCR untersucht. Die relative Quantifizierung erfolgte mit dem Haushaltsgen rps6 und die Berechnung der x-fachen Genexpression erfolgte nach [123]. Die Daten werden als Mittelwert±SEM präsentiert. Für die statistische Auswertung wurde die ungepaarte studentsche T-Verteilung auf die $\Delta\Delta$ CT Werte angewandt. n:3. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Technisch nicht korrekte Werte wurden nicht für die Analyse verwendet. Abkürzungen: *IVL:* Involucrin, *OCLN*: Occludin, *CX43*: Connexin 43, *CDH*1: E-Cadherin, *DSG3*: Desmoglein3, *CLDN1*: Claudin1, *CTSD*: CathepsinD, *CX26*: Connexin 26, *KRT5*: Keratin5, *KRT14*: Keratin14, *MMP9*: Matrixmetalloproteinase9, *TGM11*: Transglutaminase1.

Der Vergleich der Abbildung 29a mit 29b zeigt, dass die Expression von verschiedenen Hautbarriere-relevanten Genen 6Std. nach dem mechanischen Stress unterschiedlich stark ausgeprägt war. Dabei fällt auf, dass Gene wie E-Cadherin *(CHD1)*, Connexin 43 *(CX43)*, Desmoglein3 *(DSG3)* sowie Involucrin *(IVL)* im WT (Abbildung 29a, schwarze Balken) 6Std. nach dem Stress besonders stark exprimiert wurden, während diese Gene im AhR-KO (Abbildung 29a, weiße Balken) kaum exprimiert wurden (Abbildung 29a).

3.2. Funktionale Untersuchungen

An die morphologischen Untersuchungen schlossen sich nun funktionale Untersuchungen an. Es wurde getestet, ob der AhR an bestimmte DRE-Sequenzen bindet, die in den Promotern von Hautbarriere-relevanten Genen vorkommen (siehe 3.2.1.). Außerdem wurde die Funktionalität der "inneren-äußeren" Barriere bei den AhR-defizienten Mauslinien überprüft (siehe 3.2.2.)

3.2.1. Putative DRE-Sequenzen im E-Cadherin und Occludin Promoter

Das klassische Bindungsmotiv, das durch den AhR:Ligand:ARNT Komplex erkannt wird, wird als *dioxin response element* (DRE) bezeichnet und enthält die Kernsequenz 5`-GCGTG-3` [209, 223]. Eine Studie von Sun et al. (2004) [223] zeigte, dass viele Hautbarriere-relevante Gen DRE-Sequenzmotive in ihren Promotern besitzen wie z.B. Occludin und E-Cadherin [223]. Der murine Promoter von Occludin enthält 13 putative DREs, ein proximales DRE Cluster konnte an den Stellen -117, -550 und -715 detektiert werden, sowie ein distales DRE bei -2603. Im E-Cadherin Promoter wurden beispielsweise an den Stellen -359 sowie -2113 und -2121 putative Kernsequenzen entdeckt [223]. Der Nachweis der Bindung des AhR an die DRE Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Luziferase Reporter-Gen-Assays (vgl. Methode 3.3.) Die Ergebnisse werden in der nachfolgenden Abbildung 30 gezeigt.



Abbildung 30: Funktionale Untersuchungen der putativen DRE-Sequenzen im E-Cadherin Promoter (-359 sowie -2113/-2121) und im Occludin Promoter (-117/-550/-715 und -2603). Die DRE-Sequenzen wurden über spezifische Oligonukleotide aus der Epidermis amplifiziert und in den pGL3B Vektor kloniert. HepG2 Zellen wurden mit dem pGL3B (Negativkontrolle), pGL3B/ 5DRE (Positivkontrolle) sowie dem pGL3B/Hautspezifischen DREs transfiziert und 24Std. später mit TCDD oder DMSO stimuliert. Der Luziferase Reporter-Gen-Assay erfolgte 24Std. später. Die Luziferase Aktivität ist relativ zur DMSO Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM von n:3 dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung *p<0,05; ns:nicht signifikant. Abkürzung: CDH1: E-Cadherin, OCLN: Occludin. Die Zellen wurden entweder mit DMSO (Negativkontrolle) oder mit dem AhR-Liganden TCDD (Positivkontrolle) stimuliert. Tendenziell wurde eine erhöhte Luziferaseaktivität nach TCDD Behandlung (Abbildung 30, weiße Balken) detektiert. Vor allem bei den Plasmiden für die DRE Sequenz -2113/-2121 im E-Cadherin Promoter und für die DRE Sequenz -117/-550/-715 im Occludin Promoter. Auch wenn die Ergebnisse nicht signifikant sind, so vermutete ich dennoch, dass der AhR:Ligand:ARNT Komplex an die DRE-Sequenzen -2113/-2121 (E-Cadherin) und -117/-550/-715 bindet. Diese Vermutung wurde überprüft, indem die Kernsequenz 5`-GCGTG-3` [209, 223] an der zweiten und dritten Stelle mutiert wurde: 5`-G**AT**TG-3`. Falls der AhR an die DRE Sequenzen bindet, dann würde die Mutation dazu führen, dass der AhR:Ligand:ARNT Komplex nicht binden kann und ein schwaches Luziferase Signal wird erwartet. Die generierten Daten werden in der Abbildung 31 in Form eines Balkendiagramms dargestellt.



Abbildung 31: Ortsspezifische Mutagenese in den putativen DRE-Sequenzen im E-Cadherin Promoter (-2113/-2121) und im Occludin Promoter (-117/-550/-715).

Wie erwartet, zeigten die DRE-Sequenzen ohne Mutation ein erhöhtes Signal und verifiziert so die Daten aus der Abbildung 30. Unerwartet zeigten die TCDD stimulierten HepG2 Zellen, die mit den mutierten Occludin DRE-Sequenzen transfiziert wurden, ein erhöhtes Signal. Dies spricht dafür, dass der AhR an die DRE-Sequenzen bindet. Die Betrachtung der E-Cadherin DRE-Sequenzen zeigen ein minimal schwächeres Luziferase Signal. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der AhR wirklich an die untersuchten DRE-Sequenzen bindet.

Die DRE-Sequenzen wurden über spezifische Oligonukleotide aus der Epidermis amplifiziert und in den pGL3B Vektor kloniert. HepG2 Zellen wurden mit dem pGL3B (Negativkontrolle), pGL3B/ 5DRE (Positivkontrolle) sowie dem pGL3B/Hautspezifischen DREs transfiziert und 24Std. später mit TCDD oder DMSO stimuliert. Der Luziferase Reporter-Gen-Assay erfolgte 24Std. später. Die Luziferase Aktivität ist relativ zur DMSO Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert±SEM von n:1 dargestellt.

3.2.2. Junge AhR-KO sowie AhR K5-KO Mäuse haben eine beeinträchtigte Hautbarriere

Ein Marker für die Funktionalität der "inneren-äußeren" Barriere ist der transepidermale Wasserverlust (TEWL) [siehe [181] eine Übersicht]. Für die Messung des TEWLs wurden zehn Wochen alte (= junge) AhR-KO Weibchen sowie deren WT-Kontrollen auf dem rasierten Rücken mechanisch gestresst und eine TEWL Kinetik aufgenommen. Die Auswertung der TEWL Kinetik wird in Abbildung 32 präsentiert.



Abbildung 32: Die TEWL Kinetik von jungen (=10Wochen) AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen nach dem mechanischen Stress.

Die Abbildung 32 zeigt, dass die AhR-KO (weiße Kreise) nach dem mechanischen Stress einen signifikant erhöhten TEWL aufwiesen im Vergleich zu den WT-Kontrollen (schwarze Rechtecke). Im Basal-TEWL unterschieden sich die AhR-KO Mäuse nicht von den WT-Kontrollen. Direkt nach der mechanischen Stressung stieg der TEWL der AhR-KO Mäuse rasch an und verblieb auf einem höheren Niveau über den gesamten Verlauf der Kinetik im Vergleich zu den WT-Kontrollen.

In drei unabhängigen Experimenten wurden 10,4±0,5 Wochen alte AhR-KO Weibchen und deren WT-Kontrollen mechanisch auf dem Rücken gestresst und eine TEWL Kinetik aufgenommen. Pro Messung wurden mind. 25 Messwerte aufgenommen und der Mittelwert berechnet. Die Raumtemperatur betrug 22,56±0,36°C (bis 30Min.) und 22,34±0,75°C (24Std.) und die Luftfeuchtigkeit 23,98±1,15% (bis 30Min.) und 29,25±5,27% (24Std.). Die Daten werden als Mittelwert±SEM von n:10 dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung. Die Unterschiede im basalen TEWL von AhR-KO und Wurfgeschwistern waren nicht signifikant. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.

24Std. später ist der TEWL der WT-Kontrollen wieder auf dem Ausgangswert zurückgekehrt. Aber der 24Std. TEWL-Wert der AhR-KO Mäusen war noch deutlich erhöht im Vergleich zu dem basalen TEWL-Wert (vgl. Abbildung 32).

Die TEWL Kinetik zeigte auf, dass der AhR-KO nach dem mechanischen Stress einen erhöhten Wasserverlust aufweist und das die AhR-KO eine Verzögerung in ihrer Barriereherstellung aufweisen im Vergleich zu den gestressten WT-Kontrollen.

Im Anschluss daran wurde untersucht, ob der AhR bezüglich der Integrität der murinen Hautbarriere in Keratinozyten oder in den Langerhanszellen wichtig ist. Hierfür wurden die TEWL Kinetiken mit konditionalen AhR-defizienten Mauslinien wiederholt. Zehn Wochen (=junge) alte AhR K5-KO und AhR LC-KO Mäuse sowie deren WT-Wurfgeschwister wurden mechanisch auf dem Rücken gestresst und eine TEWL Kinetik aufgenommen. Die generierten Daten werden in der nachfolgenden Abbildung 33 präsentiert.



Abbildung 33: Die TEWL Kinetik von jungen (=10Wochen) AhR K5-KO sowie AhR LC-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen nach dem mechanischen Stress.

In drei unabhängigen Experimenten wurden 11,91±1,75 Wochen alte AhR K5-KO sowie 10,2±1,02 Wochen alte AhR LC-KO und deren WT-Kontrollen mechanisch auf dem Rücken gestresst und eine TEWL Kinetik aufgenommen. Pro Messung wurden mind. 25 Messwerte aufgenommen und der Mittelwert berechnet. (a) zeigt die Daten für die AhR K5-KO Mäuse und (b) für die AhR LC-KO Mäuse. AhR K5-KO: Raumtemperatur: 23,45±1,81°C (bis 30Min.) und 23,66±1,38°C (24Std.); Luftfeuchtigkeit: 32,44±13,65% (bis 30Min.) und 36,42±2,69% (24Std.). AhR LC-KO: Raumtemperatur: 21,9±0,82°C (bis 30Min.) und 22,0±0,91°C (24Std.); Luftfeuchtigkeit: 37,5±4,62% (bis 30Min.) und 39,4±4,06% (24Std.). Die Daten werden als Mittelwert±SEM von n:16 (a) bzw. n:10 (b) dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung. (a) Die Unterschiede im basalen TEWL von AhR K5-KO und Wurfgeschwistern waren nicht signifikant. *p<0,05; **p<0,01. (b) Zwischen den AhR LC-KO Mäusen und den WT-Kontrollen konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

Wie auch bei der AhR-KO Mauslinie (vgl. Abbildung 32) beobachtet wurde, konnte bei der AhR K5-KO und AhR LC-KO Mauslinie kein signifikanter Unterschied im basalen TEWL zwischen KO und WT festgestellt werden (vgl. Abbildung 33). Der TEWL der AhR K5-KO Weibchen stieg nach dem mechanischen Stress rasch an und verblieb auf einem höheren Niveau im Vergleich zu den WT-Kontrollen (Abbildung 33a). Allerdings war dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt wie bei den AhR-KO Weibchen (vgl. Abbildung 32) und deren WT-Kontrollen beobachtet wurde. Zwischen den AhR LC-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen konnte nach dem mechanischen Stress kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies zeigt der fast identische Verlauf der TEWL Kinetik Kurven (vgl. Abbildung 33b).

Die Beobachtungen, die aus diesem Experiment festgehalten werden können, sind:

- (a) kein Unterschied im Basalen TEWL in allen drei untersuchten Mausstämmen
- (b) AhR-KO Mäuse weisen einen stark erhöhten TEWL nach dem mechanischen Stress auf
- (c) AhR-KO Mäuse benötigen eine längere Zeit, um ihre Barrierefunktion wieder herzustellen
- (d) bei den AhR K5-KO Mäuse wurde der gleiche Effekt beobachtet, war aber weniger stark ausgeprägt war, wie bei den AhR-KO Mäusen
- (e) der Verlust des AhR in den Langerhanszellen wirkt sich nicht negativ auf den TEWL aus

3.2.3. Im Alter steigt der TEWL auch bei den Wildtypen (WT)

Eine alternde, gestresste Hautbarriere wird durch den Verlust der Integrität der Hautbarriere sowie einer verlangsamten Wiederherstellung der Barrierefunktion gekennzeichnet [56]. Somit kann überraschenderweise gesagt werden, dass junge AhR-KO Mäuse einen alternden Phänotypen im Bezug auf ihre Hautbarriere aufweisen (vgl. Abbildung 32). Aus diesem interessanten Befund heraus wurde die Frage gestellt, wenn die Hautbarriere von zehn Wochen alten AhR-KO Mäuse einer alternden Hautbarriere entspricht, wie sieht die Haubarriere von 9Monaten bzw. 18Monaten alten AhR-KO Mäusen aus? Was passiert mit dem Wasserverlust (TEWL) wird dieser noch höher und wie lange braucht die AhR-KO Maus um ihre Barrierefunktion wiederherzustellen? Hierfür wurden alte Mäuse (vgl. Ergebnisse 1.2.2.) mit 9Monate und 18Monate mechanisch auf dem Rücken gestresst und eine TEWL Kinetik aufgenommen. Die gesammelten Daten werden in der Abbildung 34 vorgestellt. Während die Abbildung 34a bis 34c die TEWL Daten der 9Monate (= alten) Mäusen zeigt, so zeigt die Abbildung 34d bis 34f die TEWL Daten für die 18Monate (= sehr alten) Mäusen.



Abbildung 34: Der TEWL von alten (=9Monaten) und sehr alten (=18Monaten) AhR-KO, AhR K5-KO und AhR LC-KO Mäusen sowie deren WT-Kontrollen nach dem mechanischen Stress.

Mit 9 Monaten (= alte Tiere) (a,b,c) sowie mit 18 Monaten (= sehr alte Tiere) (d,e,f) wurden die AhR-KO (a (= 35,6±0,5 Wochen),d (=77,7±2,8 Wochen)), die AhR K5-KO (b (=36±0 Wochen),e (=77,0±2,58 Wochen) sowie die AhR LC-KO (c (= 38,1±2,4 Wochen),f (= 76,4±3,6 Wochen) sowie deren WT Kontrollen mechanisch auf dem dem Rücken gestresst und anschließend eine TEWL Kinetik aufgenommen. Die Werte für die durchschnittlichen Raumtemperaturen sowie der durchschnittlichen Luftfeuchtigkeit betrugen: 1. AhR-KO mit 9 Monaten: Raumtemperatur: $21,80\pm1,48$ °C (bis 30Min.) und $22,72\pm0,87$ °C (24Std.) sowie eine Luftfeuchtigkeit von 32,05±7,42% (bis 30Min.) und 41,13±0,35% (24Std.) und mit 18 Monaten: Raumtemperatur: 23,01±0,33°C (bis 30Min.) und 22,55±0,15°C (24Std.); Luftfeuchtigkeit: 39,98±1,26% (bis 30Min.) und 39,13±2,07% (24Std.). 2. AhR K5-KO mit 9 Monaten: Raumtemperatur: 22,4±0,9°C (bis 30Min.) und $22,10\pm1,03$ °C (24Std.); Luftfeuchtigkeit: $30,91\pm11,85$ % (bis 30Min.) und $33,0\pm10,39$ % (24Std.) und mit 18 Monaten: Raumtemperatur: $22,66\pm0,3$ °C (bis 30Min.) und 22,84±0,25°C (24Std.); Luftfeuchtigkeit: 41,51±4,93% (bis 30Min.) und 43,06±5,34% (24Std.). 3. AhR LC-KO mit 9 Monaten: Raumtemperatur: 22,0±0,57°C (bis 30Min.) und 21,8±0,87°C (24Std.); Luftfeuchtigkeit: $41,7\pm5,72\%$ (bis 30Min.) und $42,6\pm4,59\%$ (24Std.) und mit 18 Monaten: Raumtemperatur: $22,8\pm1,52$ °C (bis 30Min.) und $22,3\pm2,35$ °C (24Std.); Luftfeuchtigkeit: 30,5±5,07% (bis 30Min.) und 35,4±3,82% (24Std.). Pro Messung wurden 25 Messdaten aufgenommen und daraus der Mittelwert gebildet. Die Daten werden als Mittelwert ±SEM von n:7-10 dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit der ungepaarten studentischen T-Verteilung. *p<0,05.

Wie erwartet stieg der TEWL im Alter nach dem mechanischen Stress an (Abbildung 34a bis 34f). Zwei interessante Befunde fallen auf: der erste Befund ist, dass der Basal-TEWL im Alter nicht weiter anstieg. Der zweite Auffälligkeit ist, dass sich der TEWL der AhR-KO Mäuse mit steigendem Alter nicht weiter verschlechterte (Abbildung 34a und 34d). So betrug der OMin. TEWL bei den jungen AhR-KO Mäusen 35,5±5,8 g/hm² (vgl. Abbildung 32) und im Alter von 18 Monaten stieg der OMin. TEWL auf 54,0±4,7 g/hm² (vgl. Abbildung 34d, weißer Kreis) an. Währenddessen ist der Anstieg der OMin. TEWL Werten von jungen WT-Kontrollen (vgl. Abbildung 32, schwarzes Rechteck) zu den sehr alten WT-Kontrollen (vgl. Abbildung 34d, schwarzes Rechteck) drastischer. Hier steigt der OMin. TEWL von 12,5±1,6 g/hm² auf 65,6±5,1 g/hm². Die AhR K5-KO Mäuse und deren WT-Kontrollen verhalten sich im Alter ähnlich wie die AhR-KO Mäuse und deren WT-Kontrollen (vgl. Abbildung 34b und 34e). Wie auch bei den jungen AhR LC-KO Mäusen (vgl. Abbildung 33b) steigt der TEWL nach dem mechanischen Stress sowohl im KO als auch WT gleichmäßig an. Der AhR LC-KO verhält sich so wie die WT-Kontrollen (Abbildung 34c und 34f).

Um auszuschließen, dass der erhöhte Wasserverlust in den WT-Kontrollen durch eine möglicherweise altersbedingte verminderte Expression des AhR begünstigt wurde, wurde die AhR Expression in jungen und sehr alten AhR-WT-Kontrollen quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse werden in der Abbildung 35 gezeigt.



Abbildung 35: Die AhR Expression in jungen (=10Wochen) versus sehr alten (=18Monaten) AhR-WT-Kontrollen.

Das durchschnittliche Alter der jungen AhR-WT-Kontrollen betrug 12,6±5,1 Wochen und das durchschnittliche Alter der alten AhR-WT-Kontrollen betrug 77,5±2,3 Wochen. gRNS wurde aus der Epidermis isoliert. Anschließend wurde die Expression des AHR Genes mittels qRT-PCR untersucht. Die relative Quantifizierung erfolgte mit dem Haushaltsgen RPS6 und die Berechnung der x-fachen Genexpression erfolgte nach [123]. Die Daten werden als Mittelwert ±SEM präsentiert. Für die statistische Auswertung wurde die ungepaarte studentsche T-Verteilung auf die $\Delta\Delta$ CT Werte angewandt. Technisch nicht korrekte Werte wurden nicht für die Analyse verwendet. Mäuse: n:5 bzw. 6.

Überraschenderweise wird der AhR im Alter verstärkt exprimiert (Abbildung 35). Somit kann das beobachtete Phänomen, dass der TEWL im Alter ansteigt nicht durch eine verminderte AhR Expression erklärt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die die TEWL Befunde erklären könnten, könnte auf einem veränderten Expressionsverhalten von Hautbarriere-relevanten Genen liegen. Diese Möglichkeit wurde überprüft, indem die Genexpression von folgenden Genen mit qRT-PCR bestimmt: Filaggrin *(FLG)*, Occludin *(OCLN)*, Periplakin *(PPL)* und das kleine Prolin-reiche Protein 2H *(SPRR2H)*. Filaggrin *(FLG)* ist ein direktes Zielgen des AhR [224] und Occludin *(OCLN)* könnte auch durch den AhR reguliert werden (vgl. Abbildung 29a,30,31). Periplakin *(PPL)* und das kleine Prolin-reiche Protein 2H *(SPPR2H)* haben eine zentrale Stellung in der Assemblierung des *cornified envelope* (CE) [siehe [92] für eine Übersicht]. Die generierten Daten werden in Form von Balkendiagrammen in der nächsten Abbildung 36 präsentiert.



Abbildung 36: Genexpression von Hautbarriere-relevanten Genen in sehr alten (=18 Monaten) AhR-KO und AhR K5-KO Mäusen sowie deren WT-Kontrollen.

Eine Woche nach dem letzten mechanischen Stress wurde die gRNS aus der Epidermis von 77,7±2,8 Wochen alten AhR-KO und 77,0±2,58 Wochen alten AhR K5-KO Mäusen sowie deren WT-Kontrollen isoliert. Anschließend wurde die Genexpression von *FLG* (a), *OCLN* (b), *PPL* (c) und *SPRR2H* (d) mittels qRT-PCR untersucht. Die relative Quantifizierung erfolgte mit dem Haushaltsgen *RPS6* und die Berechnung der x-fachen Genexpression erfolgte nach [123]. Die Daten werden als Mittelwert±SEM präsentiert. Für die statistische Auswertung wurde die ungepaarte studentsche T-Verteilung auf die $\Delta\Delta$ CT Werte angewandt. n:3. *p<0,05. Technisch nicht korrekte Werte wurden nicht für die Analyse verwendet. Abkürzungen: *OCLN*: Occludin, *FLG*: Filaggrin, *PPL*: Periplakin und *SPRR2H*: kleines Prolin-reiches Protein 2H.

Die Abbildung 36 zeigt, dass die ausgewählten Gene unterschiedlich reguliert werden. Nur für die Gene Filaggrin *(FLG)* (Abbildung 36a) und das kleine Prolinreiche Protein 2H *(SPRR2H)* (Abbildung 36d) konnte sowohl im AhR-KO (Abbildung 36, weiße Balken) wie auch im AhR K5-KO (Abbildung 36, grauen Balken) eine moderate, aber signifikante Erniedrigung der Transkription festgestellt werden. Für alle andere Gene konnte kein Unterschied in der Transkription zwischen den beiden KO-Stämme und WT-Kontrollen eine Woche nach dem Stress festgestellt werden. Wie auch im TEWL konnte kein Unterschied zwischen dem KO-Mäuse und dem WT-Kontrollen festgestellt werden.

3.3. Molekularbiologische Untersuchungen

3.3.1. Verifizierung des mechanischen Stresses

Aus der Studie von Sextius et al. (2010)[207] ist bekannt, dass der mechanische Stress eine Reparaturkaskade auslöst, in die 350 Gene involviert sind, wobei nach 6Std. die meisten Gene reguliert werden [207]. In Anlehnung an die Studie von Sextius et al. (2010)[207] wurde ein globales Genexpressionsprofil von ungestresster und mechanisch gestresster AhR-KO Rückenhaut sowie von deren WT-Kontrollen (6Std. und 24Std. später) angefertigt.

Hierfür wurde die rasierte Rückenhaut von jungen AhR-KO Mäuse sowie deren WT-Kontrollen mit dem Tegaderm[™] 3M[™]Film mechanisch gestresst. 6Std. und 24Std. später wurden randomisierte Hautbiopsien entnommen und die gRNS aus der Epidermis isoliert (vgl. Methode 3.5.1 und 3.5.2.). Als Kontrolle diente jeweils ungestresste Rückenhaut von AhR-KO und AhR-WT Mäusen. Die sich anschließende cDNS Synthese sowie die Durchführung des *Affymetrix Mouse Gene* 2.0 ST Microarrays und die bioinformatische Analyse fanden am BMFZ der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Prof. Dr. Köhrer) statt.

Um sicherzugehen, dass für die Microarrays verwendeten Hautbiopsien aus "erfolgreich" gestresster Rückenhaut stammten, wurde vor der Entnahme der Hautbiopsien der TEWL gemessen sowie die Menge an entfernter Epidermis bestimmt. Die Ergebnisse der TEWL Messungen sowie die Menge an entfernter Epidermis werden in der Abbildung 37 gezeigt.



Abbildung 37: Die TEWL Kinetik und die Menge an entfernter Haut von jungen (=10Wochen) AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.

In drei unabhängigen Experimenten wurden 10,55 \pm 1,4 Wochen alte AhR-KO Weibchen und deren WT-Kontrollen mechanisch auf dem Rücken gestresst und eine (a) TEWL Kinetik aufgenommen, sowie wie in (b) gezeigt, die Menge an entfernter Haut bestimmt. Pro Messung wurden mind. 25 Messwerte aufgenommen und daraus der Mittelwert gebildet. Die Raumtemperatur betrug 23,27 \pm 0,50°C (bis 6Std.) und 22,60 \pm 0,14°C (24Std.) und die Luftfeuchtigkeit 38,25 \pm 5,31% (bis 6Std.) und 43,0 \pm 0% (24Std.). Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM von n:6-8 (6Std.) und n: 3-4 (24Std.) dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde die ungepaarte studentsche T-Verteilung angewandt. Die Unterschiede im basalen TEWL von AhR-KO und Wurfgeschwistern waren nicht signifikant. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die TEWL Daten aus der Abbildung 37a zeigten, dass die Hautbiopsien von einer "erfolgreich" gestressten Hautbiopsien stammten.

3.3.2. Strategie zur Auswertung der Microarray Daten

Bevor die Daten der Microarray Daten gezeigt und erklärt werden, soll an dieser Stelle kurz die Strategie der Auswertung der Microarray Daten erklärt werden.

Zunächst wurde eine Skizze erstellt, die aufzeigt, welche Konditionen vorhanden waren und wie diese für die Analyse untereinander kombiniert werden können. Diese Skizze wird in der nachfolgenden Abbildung 38 gezeigt.



Abbildung 38: Überblick über die möglichen Kombinationen zur Auswertung der generierten Microarray Daten.

Während die schwarzen doppelte Pfeile anzeigen, welche Analysen durchgeführt wurden, so zeigen die gestrichelten Linien an, welche weiteren Analysen noch möglich wären.

Folgende Auswertungen wurden gemacht: WT vs. KO 0Std., WT vs. KO 6Std. und WT vs. KO 24Std. Im Verlauf der bioinformatischen Auswertung wurden Kriterien festgelegt, um nicht exprimierte Transkripte ausschließen zu können (vgl. Methode 3.6.) und es wurden Excel-Tabellen generiert, die alle differentiell regulierten Transkripte mit einem p-Wert von <0,05 enthielten (= "Excel Urtabelle"). Dann wurden alle Gene mit einer Genexpression von ≥3,0 auf ihre Funktion in der Haut bzw. Hautbarriere hin überprüft mit http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/, (vgl. Tabelle 29). Zusätzlich wurde eine GeneOntology Analyse durchgeführt. Bei dieser Analyse wurden die Gene in die 4 Funktionsgruppen: zelluläre Komponenten, biologische Prozesse, molekulare Funktion sowie KEGG Pathway eingeteilt. Jede Funktionsgruppe besteht wiederum aus verschiedenen Ereignissen wie z.B. Entwicklung der Epidermis. Die Ereignisse, die mit der Epidermis, einer funktionsfähigen Hautbarriere oder dem Immunsystem assoziiert wurden, wurden wiederum in eine neue Excel Tabelle kopiert. Jedes Gen wurde in http:// www.ncbi.nlm.nih.gov und http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/ auf seine Funktion in der Haut bzw. Hautbarriere hin untersucht. Es wurde auch überprüft, ob die Gene putative DRE-Sequenzen in ihren Promotoren enthielten [223]. Zum Schluss wurde eine neue Liste erstellt, die eine Auswahl an Hautbarriere-relevanten Genen enthält, die eine Genexpression zwischen 1,0 und 2,0 aufwiesen (vgl. Tabelle 44-46).

3.3.3. Auswertung der Hauptkomponentenanalyse

Die Beurteilung der Qualität der biologischen Replikate wurde mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) durchgeführt [100]. Die Abbildung 39 zeigt das Ergebnis der PCA Analyse im 3D Raum.



Abbildung 39: Hauptkomponenten Analyse (PCA) von den 18 Microarray Proben. Jeder Punkt einer Farbe steht für ein biologisches Replikat. n=3/Kondition. Aus der Abbildung 39 (vgl. Methode 7.3.) ist ersichtlich, wie unterschiedlich sich die biologischen Replikate innerhalb einer Kondition verhielten. Der OStd. Wert für die WT-Kontrollen wird durch die rosa Kugeln repräsentiert. Die rosa Kugeln liegen sehr verteilt im 3D Raum. Im Vergleich dazu, die roten Kugeln, die für den 24Std. KO stehen, liegen nahe beieinander.

3.3.4. Auswertung der Wärmekarten

Im nächsten Schritt wurden Wärmekarten (engl. *heatmap*) von den Konditionen OStd., 6Std. und 24Std. erstellt. Vereinfacht sind die Wärmekarten die visuelle Darstellung der "Excel Urtabellen", die alle differentiell regulierten Transkripte mit einem p-Wert von ≤0,05 enthielten. Die Farbe Grün bedeutet eine niedrigere Signalintensität im Vergleich zum Median (schwarze Farbe), während die Farbe Rot für eine höhere Signalintensität im Vergleich zum Median (schwarze Farbe) steht. Die Wärmekarten aller drei Zeitpunkte werden in der Abbildung 40 gezeigt.



Abbildung 40: Visualisierung der "Excel-Urtabellen" in Form von Wärmekarten.

Die Abbildung zeigt zum einen die Wärmekarten sowie die quantitative Betrachtung der differentiell exprimierten Gene zum Zeitpunkt OStd. (a), 6Std. (b) und 24Std. (c) nach mechanischer Stressung. Die Farbe Grün (verminderte Signalintesität/Expression) und die Farbe Rot (erhöhte Signalintesität/Expression) visualisieren das Expressionsverhältnis von den differentiell exprimierten Transkripten im Vergleich zum Median der Signalintesitäten aller Proben (schwarze Farbe). n:3 pro Kondition und Genotyp. Wie erwartet zeigt die Abbildung 40, dass das Signalintensitätsmuster zwischen den AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen variierte.

Im Anschluss daran wurden die differentiell exprimierten Transkripte in der "Excel Urtabelle" nach der Regulation sortiert. Die Transkripte, die eine verstärkte Expression aufwiesen, werden in dem Balkendiagramm in der Abbildung 40 als "herauf" bezeichnet. Als "herab" werden die Transkripte im Balkendiagramm in der Abbildung 40 bezeichnet, bei denen eine verringerte Expression festgestellt wurde.

Vor dem mechanischen Stress (= 0Std.) wurden 2812 Transkripte als differentiell exprimiert gefunden. Dabei waren im AhR-KO mehr Gene "herab" reguliert als "herauf" reguliert im Vergleich zur WT-Kontrolle. 6Std. nach dem mechanischen Stress wurden 3929 Transkripte als differentiell reguliert gefunden. 24Std. nach dem mechanischen Stress waren es nur noch 2493 differentiell exprimierte Transkripte. Auch bei diesen beiden Zeitpunkten waren tendenziell mehr Transkripte beim AhR-KO "herunter" reguliert als "herauf" reguliert im Vergleich zum AhR-WT. Diese Beobachtungen stimmen mit den Beobachtungen von Sextius et al. (2010) überein [207].

3.3.5. Der AhR beeinflusst die Expression von vielen Hautbarriere-relevanten Genen

Auf die Übersichtsanalysen folgten die genauen Analysen. Als Erstes wurden aus der Excel-Urtabelle die Gene mit einer Genexpression von \geq 3,0 in eine neue Exceltabelle kopiert. Anschließend wurde mit Hilfe von http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed/überprüft, welche Funktion diese Gene in der Haut bzw. der Hautbarriere haben. Außerdem wurde nachgeschaut, welche Gene putative DRE-Sequenzen in ihren Promotoren enthalten [223]. Die Anzahl der DRE Sequenzen, sowie die xfache Genexpression und der p-Wert der Gene mit einer Genexpression von \geq 3,0 werden in der Tabelle 29 gezeigt.

genbank/ refseq ^{a,b}	Gen	Symbol	DREs	x- fache GE ^d	p-Wert				
vor dem mechanischen Stress ^e									
BC111819	RIKENcDNSA630038E17 gene	A630038E17Rik	1	-10,89	8,16E-06				
Z48591	T cell receptor gamma, variable 5	tcrg-v5	0	-8,62	7,66E-05				
NM_011198	prostaglandin- endoperoxidesynthase 2	ptgs2	3	-4,10	4,60E-04				
NM_008594	milk fat globule-EGF factor 8 protein	mfge8	8	-4,04	6,93E-06				
NM_008470	keratin 16, type I	krt16	4	-3,64	1,29E-02				
NM_145435	peptide YY	pyy	3	+3,38	1,46E-02				
NM_009854	CD7 antigen	cd7	7	-3,19	4,52E-03				
NM_009265	small proline-richprotein 1B	sprr1b	0	-3,17	1,53E-02				
NM_007648	CD3 antigen, epsilon polypeptide	cd3e	2	-3,04	1,59E-04				
6Std. nach de	em mechanischen Stress	e							
NM_010669	keratin 6B, type II	krt6b	0	+9,27	6,70E-03				
BC111819	RIKENCDNAA630038E17	A630038E17Rik	1	-8,92	1,92E-06				
Z48591	T cell receptor gamma, variable 5	tcrg-v5	0	-6,77	1,61E-05				
NM_010357	glutathione S-transferase, alpha 4	gsta4	5	+6,32	1,71E-03				
NM_008476	keratin 6A, type II	krt6a	0	+6,23	1,16E-02				
NM_001082543	stefin A1	stfa1	0	+6,14	2,77E-04				
NM_001206684	gene	2610528A11Rik	0	+4,80	5,30E-03				
NM_008361	interleukin 1 beta	il1b	0	+3,49	2,26E-05				
NM_133685	RAB31, member RAS	rab31	0	+3,39	1,02E-03				
NM 009854	CD7 antigen	cd7	7	+3.32	1.02E-05				
NM 031378	gasdermin C	qsdmc	0	+3,29	1,04E-04				
	keratin 16, type I	krt16	4	+3,10	, 5,21E-03				
NM_001270426	predicted pseudogene 9782	gm9782	0	+3,06	3,41E-02				
24Std. nach dem mechanischen Stress ^e									
NM_001206684	RIKENcDNS2610528A11 gene	2610528A11Rik	0	+9,68	5,58E-04				
NM_010669	keratin 6B, type II	krt6b	0	+8,67	6,80E-03				
Z48591	T cell receptor gamma, variable 5	tcrg-v5	0	-7,82	2,56E-06				
NM_010357	glutathione S-transferase, alpha4	gsta4	5	+6,48	3,84E-03				

Tabelle 29: Differentiell exprimierte Transkripte mit einer Genexpression \geq 3,0

NM_001082542	predicted gene 5416	gm5416	0	+6,20	8,59E-04
BC111819	RIKENcDNSA630038E17 gene	A630038E17Rik	1	-4,72	1,32E-05
NM_008361	interleukin 1 beta	il1b	0	+4,12	2,87E-03
NM_001082543	stefin A1	stfa1	0	+3,78	1,43E-02
NM_008476	keratin 6A, type II	krt6a	0	+3,72	9,09E-03
	smallproline-				
	richprotein2A2	enrr?a?lenrr?a1			
XR_142038	smallproline-	sprizuz sprizui	0	+3,68	1,47E-03
	richprotein2A1	13911200			
	smallproline-richprotein2A3				
NM 009850	CD3antigen, gamma poly-	cd3a	1	-3.36	2 05E-04
1111_000000	peptide	cacy	-	0,00	2,002 01
NM_009854	CD7 antigen	cd7	7	-3,30	3,22E-04
NM_173869	stefin A2 like 1	stfa2l1	0	+3,28	3,31E-03
	smallproline-				
	richprotein2A1	sprr2a1			
NM_011468	smallproline-	sprr2a2 sprr2a3	0	+3,21	1,33E-03
	richprotein2A2	0p11202 0p11200			
	smallproline-richprotein2A3				
	smallproline-				
ND4 0114604	richprotein2A1	sprr2a1 sprr2a2 sprr2a3	0		1 075 00
NM_011468/	smallproline-			+3,20	1,37E-03
	richprotein2A2				
NIM 009401	smanpronne-richprotein2A3	1000	0	+2 16	7 105 02
NW_008491	Inpocann 2	lCTL2	0	+3,10	1,12E-03
NM_008470	smallproline	KTLIO	4	+3,10	1,32E-03
	richprotein2A1	sprr2a1 sprr2a2 sprr2b sprr2a3	0		
	smallproline-				
NM_011468/	richprotein242			+3,10	8,24E-04
	smallproline-richprotein2B				
	smallnroline-richnrotein2A3				
ND4 011471		2	0		
NM 011471	smallproline-richprotein 2E	sprr'2e	0	+3,04	7,66E-03

Die rasierte Rückenhaut von AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen wurden, wie unter Methode 3.6. beschrieben, mechanisch gestresst und die gRNS aus der Epidermis isoliert (vgl. Methode 3.5.1 und 3.5.2.). Die AhR-abhängige Genexpression wurde mit einem Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Microarray untersucht. Gezeigt werden alle Gene mit einer Genexpression von \geq 3,0, die zwischen AhR-KO und WT differentiell exprimiert wurden. ^a Genbank Sequenz Nummer www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/; ^b RefSequenz Nummer (www.ncbi.nlm.nih.gov/ refseq/); ^c DREs Sequenzen in den Promotern wurden durch Sequenzanalysen identifiziert [223]; ^d x-fache Genexpression (GE); verstärkte oder verminderte Genexpression in AhR-KO versus WT-Kontrollen, + und fett=verstärkt exprimiert und - und nicht fett: verminderte Expression; ^e Genexpression vor dem mechanischen Stress (OStd.) sowie 6Std. und 24Std. nach dem mechanischen Stress. Auf dem Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Microarray sind die Proben für ca. 26 000 Transkripte aufgebracht, an die cDNS hybridisieren kann. In der ungestressten Rückenhaut wurden 2810 differentiell exprimierte Transkripte mit einem p-Wert von ≤0,05 gefunden, aber nur neun Transkripte weisen eine Genexpression von \geq 3.0 auf (vgl. Tabelle 29). Interessanterweise wurden von diesen neun Genen nur ein Gen im AhR-KO als verstärkt exprimiert gefunden im Vergleich zur WT-Kontrolle. Vier (TCR-V γ 5, A630038E17Rik, CD7 und CD3 ε) von den neun Genen sind T-Zell spezifische Gene und weisen eine verminderte Transkription im AhR-KO auf im Unterschied zu den AhR-WT Mäusen. Dies wurde erwartet, denn die Epidermis der AhR-KO Mäuse enthält kaum γδ T-Zellen [91]. Eine Literaturrecherche bei http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ ergab, dass die Gene (Prostaglandinsynthase2 (PTGS2), milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFGE8), Keratin 16 (KRT16), Peptid YY (PYY), CD7 Antigen (CD7) und kleines Prolin-reiches Protein 1b (SPRR1B)), die zwischen AhR-KO und AhR-WT differentiell exprimiert waren, eine Funktion in der Haut haben [41, 116, 233]. PTGS2, MFGE8, KRT16, PYY und CD7 besitzen DRE-Sequenzen in ihren Promotoren [223].

6Std. nach dem mechanischen Stress wurden 3929 differentiell exprimierte Transkripte gefunden. 13 Transkripte wiesen eine Genexpressionsänderung von \geq 3,0 auf. Im Gegensatz zu der ungestressten Haut weisen 10 von den 13 differentiell exprimierten Transkripte eine erhöhte Expression im AhR-KO gegenüber der WT-Kontrolle auf. Insbesondere Keratin 6A (*KRT6A*), Keratin 6B (*KRT6B*), Keratin 16 (*KRT16*) sowie Interleukin1 β (*IL1\beta*) wurden verstärkt in der gestressten AhR-KO Epidermis exprimiert. Die verstärkte Expression von Keratin 6B (*KRT6B*) und Keratin 16 (*KRT16*) spricht für die Reparatur der zerstörten Barrierefunktion [207]. Interleukin1 β (*IL1\beta*) wird als Folge des mechanischen Stresses auch verstärkt exprimiert [245]. Überraschenderweise besitzen nur vier Transkripte (*A630038E17Rik*, Glutathione S-transferase 4 (*GSTA4*), CD7 Antigen (*CD7*) und Keratin 16 (*KRT16*)) putative DRE-Sequenzen in ihren Promotern, was für eine sekundäre Antwort zu diesem Zeitpunkt spricht (vgl. Tabelle 29).

24Std. nach dem mechanischen Stress zeigten 19 von den 2493 gefundenen differentiell exprimierten Transkripten eine Genexpressionsänderung von \geq 3,0 auf. Wie auch beim 6Std. Wert, wurden 24Std. nach dem mechanischen Stress vermehrt Transkripte gefunden, die im AhR-KO verstärkt transkribiert wurden im Vergleich zur WT-Kontrolle. Keratin 6A (*KRT6A*), Keratin 6B (*KRT6B*), Keratin 16 (*KRT16*) sowie Interleukin 1 β (*IL1\beta*), die zwischen AhR-KO und WT differentiell exprimiert waren, wurden auch 24Std. nach dem mechanischen Stress noch verstärkt exprimiert. Die Transkripte Keratin 16 (*KRT16*), CD7 Antigen (*CD7*), *CD3g*

Antigen (CD3 δ), Glutathione S-transferase 4 (GSTA4) sowie A630038E17Rik tragen putative DRE-Sequenzen in ihren Promotern [223]. Im Vergleich zur WT-Kontrolle wurden im AhR-KO zum Zeitpunkt 24Std. vermehrt kleine Prolin-reiche Proteine gefunden, die eine wichtige Funktion im Aufbau des cornified envelope haben [siehe [92] für eine Übersicht]. Unerwartet wiesen keine der bekannten Hautbarriererelevanten Gene wie Filaggrin (FLG), Involucrin (IVL, Occludin (OCLN) oder E-Cadherin (CDH1) [181] eine Genexpression von \geq 3,0 auf (vgl. Tabelle 29).

Bei der ausführlichen Literaturrecherche (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), welche Funktionen die Gene in der Haut bzw. der Hautbarriere haben, fiel auf, dass viele Hautbarriere-relevante Gene wie Involucrin *(IVL)*, Occludin *(OCLN)*, Filaggrin2 *(FLG2)*, alkalische Ceramidase2 *(ACER2)*, Envoplakin *(EVPL)* oder Periplakin *(PPL)* eine Genexpressionsänderung zwischen 1,0 und 2,0 aufwiesen. Diese Gene wurden in Hautbarriere-relevante Ereignisse wie atopische Dermatitis, Keratinfilament Netzwerk, *cornified envelope*, Basalmembran oder Permeabilitätsbarriere einsortiert. Die Anzahl der Gene mit einer verstärkten oder verminderten Expression in den AhR-KO Proben im Vergleich zu den AhR-WT Proben werden in der Abbildung 41 gezeigt.



Anzahl der Gene

Abbildung 41: Genexpressionsprofil von Hautbarriere-relevanten Genen.

Die Balken zeigen eine Zusammenfassung von differentiell exprimierten Hautbarriererelevanten Genen, die im AhR-KO entweder verstärkt oder vermindert exprimiert wurden im Unterschied zu den AhR-WT Mäusen. Die Funktion der Gene in der Haut bzw. Hautbarriere wurde mit Hilfe von PubMed identifiziert. Die Genexpressionsänderung war $\geq 1,0$. Eine vollständige Liste ist im Anhang unter (c) AhR abhängige Regulation von Hautbarriererelevanten Genen: Genexpression zwischen 1,0 und 2,0 (Microarray Tabellen) hinterlegt.

Es kann gesagt werden, dass die Expression von Hautbarriere-relevanten Genen im AhR-KO vermindert war im Vergleich zu dem AhR-WT. Im Anschluss daran folgte die Verifizierung der Microarray-Daten mit Hilfe der qRT-PCR. Folgende Gene wurden ausgesucht: Occludin (OCLN), kleines Prolin-reiches Protein 2H (SPRR2H), Keratin 6A (KRT6A), Keratin 16 (KRT16) und milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFGE8) und in der qRT-PCR verifiziert. Keratin 6A (KRT6A) und Keratin 6B (KRT6B) wurden ausgesucht, weil die Gene die stärkste Genexpression aufwiesen und das Milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFGE8) wegen der geringsten Genexpressionsstärke. Der Occludin Promoter könnte funktionale DRE-Sequenzen enthalten (vgl. Abbildung 30,31) und somit ein direktes Zielgen des AhR sein. Das kleine Prolin-reiche Proteine 2H (SPRR2H) besitzt eine wichtige Position in der Assemblierung des cornified envelope (CE) [siehe [92] für eine Übersicht]. Die qRT-PCR Daten werden in der Abbildung 42 gezeigt.



Abbildung 42: Verifizierung der Gene OCLN, SPRR2H, KRT6A, KRT16 und MFGE8 in der qRT-PCR (AhR-KO und deren WT-Kontrollen).

Für die Verifizierung wurde die restliche gRNS, die nicht für den Microarray benötigt wurde, in cDNS umgeschrieben. Anschließend wurde die Genexpression für OCLN (a), SPRR2H (b), KRT6A (c), KRT16 (d) und MFGE8 (e) mit der qRT-PCR untersucht. Die relative Quantifizierung erfolgte mit dem Haushaltsgen RPS6 und die Berechnung der x-fachen Genexpression erfolgte nach [123]. Die Daten werden als Mittelwert±SEM präsentiert. Für die statistische Auswertung wurde die ungepaarte studentsche T-Verteilung auf die $\Delta\Delta$ CT Werte angewandt. n:5 bzw. 4 (OStd.), n:3 bzw. 4 (6Std.), n:4 (24Std.); *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Technisch nicht korrekte Werte wurden nicht für die Analyse verwendet. Abkürzungen: OCLN: Occludin, SPRR2H: kleines Prolinreiches Protein 2H, MFGE8: milk fat globule-EGF factor 8 protein, KRT16: Keratin 16 und KRT6A: Keratin 6A.

Aus der Abbildung 42 wird beispielsweise deutlich, dass Keratin 16 *(KRT16)* nach dem Stress verstärkt exprimiert wird (Abbildung 42d), während die Expression von dem *milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFGE8)* nach dem mechanischen Stress vermindert ist (Abbildung 42e). Diese Befunde passen mit den Befunden aus der Microarray Analyse überein (vgl. Tabelle 29). Interessanterweise werden die Gene Occludin *(OCLN)* (Abbildung 42a), das kleine Prolin-reiche Proteine 2H *(SPR2H)* (Abbildung 42b) sowie die Keratine 6A *(KRT6A)* und 16 *(KRT16)* (Abbildung 42c und 42d) in der ungestressten AhR-KO Rückenhaut verstärkt exprimiert im Vergleich zum WT. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass nach dem Verlust des AhR andere kompensatorische Wege initiiert werden. Um die Daten aus dem Microarray mit den Daten aus der qRT-PCR besser vergleichen zu können, wurden die Werte für die x-fache Genexpression in der Tabelle 30 gegenübergestellt.

Connomo	AhR-KO Microarray		AhR-KO qRT-PCR			
Genname	OStd.	6Std.	24Std.	OStd.	6Std.	24Std.
OCLN	nd	1,21	nd	3,83±0,78*	0,52±0,92	0,10±0,54*
SPRR2H	nd	1,29	1,67	2,42±0,59	1,18±0,79	20,51±0,74*
KRT6A	nd	6,23	3,72	2,31±0,83*	1,36±0,79	5,46±0,91*
KRT16	3,64	3,10	3,15	3,49±0,80	2,71±0,76*	3,13±0,85*
MFGE8	4,04	nd	1,79	0,24±0,48*	0,63±0,91*	0,87±0,95

Tabelle 30: Vergleich der x-fachen Genexpression vom AhR-KO Microarray und der AhR-KO qRT-PCR

Abkürzungen: nd: nicht detektiert, Fett: verstärkte Expression, das Sternchen (*): Signifikant in der qRT-PCR (vgl. Abbildung 42).

Die Tabelle 30 zeigt, dass die gefundenen Genexpressionen aus dem Microarray mit der qRT-PCR validiert werden konnten. So wurde beispielsweise die Genexpression von Keratin 16 *(KRT16)* sowohl im Microarray als auch in der qRT-PCR im AhR-KO als verstärkt exprimiert gefunden im Vergleich zu AhR-WT Kontrolle. Auffällig ist, dass die Gene Occludin *(OCLN)*, das kleine Prolin-reiche Protein 2H *(SPRR2H)* und
Keratin 6A *(KRT6A)* in der ungestressten AhR-KO Maus verstärkt exprimiert wurden im Unterschied zur WT-Kontrolle. Dieser Befund wurde nur in der qRT-PCR sichtbar und nicht im Microarray. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass diese Gene bei der Auswertung der Microarray Daten auf Grund der aufgestellten Bedingungen (vgl. Methode 3.6.) nicht berücksichtig wurden.

Wie im Ergebniskapitel 3.2.2. (vgl. Abbildung 33a) ausgeführt, zeigten AhR K5-KO Mäuse nach mechanischem Stress einen signifikant erhöhten TEWL. Daraufhin stellte sich die Frage, ob auch in diesen konditionalen-gendefizienten Mäusen die Genexpression der Gene Occludin *(OCLN)*, kleines Prolin-reiches Protein 2H *(SPRR2H)*, Keratin 6A *(KRT6A)*, Keratin 16 *(KRT6)* und *milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFGE8)* nach dem mechanischen Stress betroffen sind.

Um dies mit der qRT-PCR zu zeigen, wurden Hautbiopsien von ungestresster und gestresster Haut entnommen und die gRNS daraus isoliert (vgl. Methode 3.5.1 und 3.5.2.). Um sicherzugehen, dass für die qRT-PCR verwendete Hautbiopsien aus "erfolgreich" gestresster Rückenhaut stammte, wurde vor der Entnahme der Hautbiopsien der TEWL gemessen sowie die Menge an entfernter Epidermis bestimmt. Die Ergebnisse der TEWL Messungen sowie die Menge an entfernter Epidermis Epidermis werden in der Abbildung 43 gezeigt.



Abbildung 43: Die TEWL Kinetik und die Menge an entfernter Haut von jungen (=10Wochen) AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.

In drei unabhängigen Experimenten wurden 11,86 \pm 0,71 Wochen alte AhR K5-KO Weibchen und WT Mäuse mechanisch auf dem Rücken gestresst. Als Kontrolle diente sowohl der TEWL (a) als auch die Menge an entfernter Haut (b). Pro Messung wurden mind. 25 Messwerte aufgenommen und daraus der Mittelwert gebildet. Die Raumtemperatur betrug 24,64 \pm 0,48°C (bis 6Std.) und 24,80 \pm 0,14°C (24Std.) und die Luftfeuchtigkeit 41,23 \pm 2,9% (bis 6Std.) und 40,0 \pm 0% (24Std.). Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM von n:6 bzw. 5 (0Std.), n:6 bzw. 5 (6Std.) und n:3 (24Std.) dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung. Es konnten keine Signifikanzen zwischen AhR K5-KO und AhR K5-WT festgestellt werden.

Die für die qRT-PCR verwendeten Hautbiopsien stammten aus erfolgreich gestresster Rückenhaut (siehe Abbildung 43).

Da der mechanische Stress erfolgreich ausgeführt wurde, wurde die gRNS aus der Epidermis isoliert (vgl. Methode 3.5.1.), die gRNS in cDNS umgeschrieben (vgl. Methode 3.5.3. bis 3.5.5) und eine qRT-PCR (vgl. Methode 3.5.6.) von folgenden Genen durchgeführt: Occludin (OCLN), kleines Prolin-reiches Protein 2h (SPRR2H), Keratin 6A (KRT6A), Keratin 16 (KRT16) und milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFGE8). Die Ergebnisse werden in Form von Balkendiagrammen in der nachfolgenden Abbildung 44 dargestellt.



Abbildung 44: qRT-PCR Überprüfung der AhR-KO Microarray Daten in dem AhR K5-KO Stamm.

Die gRNS wurde in cDNS umgeschrieben. Anschließend wurde die Genexpression für OCLN (a), SPRR2H (b), KRT6A (c), KRT16 (d) und MFGE8 (e) mit der qRT-PCR untersucht. Die relative Quantifizierung erfolgte mit dem Haushaltsgen RPS6 und die Berechnung der x-fachen Genexpression erfolgte nach [123]. Die Daten werden als Mittelwert±SEM präsentiert. Für die statistische Auswertung wurde die ungepaarte studentsche T-Verteilung auf die $\Delta\Delta$ CT Werte angewandt. n:6 bzw. 5 (0Std.), n:3 bzw. 4 (6Std.), n:3 (24Std.); *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Technisch nicht korrekte Werte wurden nicht für die Analyse verwendet. Abkürzungen: OCLN: Occludin, SPRR2H: kleines Prolin-reiches Protein 2H, MFGE8: milk fat globule-EGF factor 8 protein, KRT16: Keratin 16 und KRT6A: Keratin 6A.

Auffällig ist, dass die Expression von Occludin *(OCLN)* (Abbildung 44a), dem kleinen Prolin-reichen Protein 2H *(SPRR2H)* und Keratin 16 *(KRT16)* im AhR K5-KO im Vergleich zur WT-Kontrolle vermindert ist. Interessanterweise 6Std. nach dem mechanischen Stress steigt die Expression von Keratin 16 *(KRT16)* stark an (Abbildung 44d). Um die qRT-PCR Daten der AhR-KO Mäusen mit den qRT-PCR Daten der AhR K5-KO Mäusen besser vergleichen zu können, werden die x-fachen Genexpressionen in der nachfolgenden Tabelle 31 zusammengefasst.

Genname	AhR-KO qRT-PCR			AhR K5-KO qRT-PCR		
	OStd.	6Std.	24Std.	OStd.	6Std.	24Std.
OCLN	3,83±0,78*	0,52±0,92	0,10±0,54*	0,42±0,29	0,06±0,31*	0,59±0,90*
SPRR2H	2,42±0,59	1,18±0,79	20,51±0,74*	0,61±0,67	0,78±0,74	1,07±0,56
KRT6A	2,31±0,83*	1,36±0,79	5,46±0,91*	1,61±0,72	0,45±0,89	0,34±0,66
KRT16	3,49±0,80	2,71±0,76 ³	*3,13±0,85*	0,24±0,68*	4,07±0,84	1,78±0,74
MFGE8	0,24±0,48*	0,63±0,91*	0,87±0,95	0,72±0,83	0,52±0,87*	2,89±0,66

Tabelle 31: Vergleich der x-fachen Genexpression von der AhR-KO sowie der AhR K5-KO qRT-PCR

Abkürzungen: Fett: verstärkte Expression, das Sternchen (*): Signifikant in der qRT-PCR (vgl. Abbildung 42 und 44).

Als Erstes fällt auf, dass die Transkription der untersuchten Gene in der AhR K5-KO Mauslinie sowohl vor als nach dem mechanischen Stress vermindert ist im Vergleich zum AhR-KO Mausstamm. Occludin *(OCLN)*, das kleine Prolin-reiche Protein 2H *(SPRR2H)* und Keratin 16 *(KRT16)* wurden in der ungestressten AhR-KO Maus verstärkt exprimiert. Hingegen wurden in der ungestressten AhR K5-KO Maus die Gene Occludin *(OCLN)*, das kleine Prolin-reiche Protein 2H *(SPRR2H)* und Keratin 16 *(KRT16)* kaum exprimiert (vgl. Tabelle 31). Anhand der generierten qRT-PCR Daten kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die AhR K5-KO Mäuse den Verlust des AhR über einen anderen Weg kompensieren im Vergleich zu den AhR-KO Mäusen. Um diese Vermutung verifizieren zu können wäre es sinnvoll, von den AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen ein globales Genexpressionsprofil vor und nach dem mechanischen Stress (6Std. und 24Std.) anzufertigen. Dies konnte ich im Rahmen meiner Doktorarbeit jedoch nicht mehr durchführen.

4. BEEINFLUSST DER AHR DAS HAUT-MIKROBIOM?

Nachdem die Daten aus dem Ergebniskapitel 3 zeigten, dass AhR defiziente Mäuse eine beeinträchtigte Hautbarriere besitzen, wurde das Hautmikrobiom dieser AhRdefizienten Mäuse bestimmt. Es ist bekannt, dass ein Zusammenhang zwischen Hautbarrierestörungen und einem veränderten Hautmikrobiom existiert [siehe [60] für eine Übersicht].

Die weiblichen Mäuse wurden in der Versuchstieranlage des Leibniz Institutes für Umweltmedizinische Forschung gezüchtet. Die Haltung der Mäuse erfolgte in der SPF Anlage III in Filterdeckel-Käfigen, die im zwei Wochen Rhythmus gewechselt wurden. Die Mäuse wurden mit einem Alleinfutter für Mäuse der Firma ssniff (Soest) sowie mit an gesäuertem Leitungswasser *ad libitum* versorgt. Drei Wochen nach der Geburt wurden die Nachkommen von ihren Elterntiere getrennt und der Genotyp bestimmt. Sobald der Genotyp bekannt war, wurden bis zu acht weiblichen Mäuse in einen großen Käfig nach Genotypen getrennt. Die Isolation der bakteriellen DNS begann frühestens vier Wochen nach der Trennung zwischen WT und KO. Die Isolierung der bakteriellen DNS erfolgte wie unter Methode 3.7. beschrieben wurde. Das anschließende NGS sowie die bioinformatische Auswertung wurde am BMFZ der Universität Düsseldorf (Herrn Prof. K. Köhrer) durchgeführt.

Beim NGS werden sehr viele Sequenzen identifiziert, die wiederum mit einer Datenbank abgeglichen werden müssen, um die identifizierten Sequenzen taxonomisch einzuordnen, bis hin zur Bestimmung der Bakterienart. Hierfür hat die Bioinformatik spezielle Begriffe eingeführt, die für das bessere Verständnis im nächsten Abschnitt erläutert werden.

Am Anfang der bioinformatischen Auswertung der Sequenzen steht das **OTU (engl.** *operational taxonomic unit*), so etwas wie ein "virtueller Topf", indem alle Sequenzen mit einer bestimmten Ähnlichkeit gesammelt werden. Nach Möglichkeit können hieraus die verschiedenen Bakterienarten, die sich in diesem "virtuellen Topf" befinden identifiziert werden. Das zweite große Interesse liegt in der Information, wie ähnlich verhalten sich zwei gleiche "virtuelle Töpfe" unterschiedlicher biologischer Proben. Mit anderen Worten, hier soll eine Aussage über die Populationsdiversität gemacht werden. Hierfür wurden die Begriffe der α - und β -**Diversität** eingeführt. Dabei bezeichnet die α -**Diversität**, den Reichtum sowie die gleichmäßige Verteilung von Sequenzen innerhalb eines OTUs und damit letztlich den Artenreichtum in der untersuchten Probe. Im Gegensatz dazu beschreibt die β-**Diversität**, wie ähnlich die OTUs zwischen zwei oder mehreren biologischen Proben sind [146]. Ein weiterer Begriff, der im Zuge der bioinformatischen Auswertung vorkommt, ist **"Read**". Ein "Read" ist **ein kurzer DNS-Abschnitt**, der während der DNS Sequenzierung identifiziert wird [11].

4.1. Verifizierung der bakteriellen DNS Isolierung

Während der Isolation können Kontaminationen mit bakterieller DNS auftreten, beispielsweise durch Reagenzien oder unsauberes Arbeiten. Um solche Kontaminationen von der bakteriellen DNS der Maus Epidermis unterscheiden zu können, wurde eine Kontroll-PCR mit allen für die Isolation verwendeten Puffern und Lösungen durchgeführt. Als Positivkontrolle die die DNS des E.coli Bakteriums $DH5\alpha$. Die Agarosegele der Kontroll-PCR werden in der Abbildung 45 präsentiert.



Abbildung 45: Nachweis der Abwesenheit von bakteriellen Kontaminationen.

In (a) werden die Ergebnisse für den AhR-KO Stamm gezeigt und in (b) für den AhR K5-KO Stamm. Dieser Test wurde nur einmal durchgeführt, weil auch nur eine Mikrobiomanalyse gemacht wurde.

Negativkontrolle Spur1:Mastermix der V3-PCR (alle Reagenzien ohne DNS), Spur2: Mock-DNS Isolation, Spur3: fertiges Medium (DMEM+FCS+Pen/Strep), Spur4: Ampuwa Wasser (mit dem alle Puffer angesetzt wurden), Spur5: Medium (DMEM+FCS+Pen/Strep) (11 Tage bei 37°C kultiviert wurde), Spur6: DMEM, Spur7:FCS, Spur8: Trypsin, Spur9: Pen/Strep, Spur10: PBS, Spur11: Lysispuffer, Spur12: TE-Puffer (Lösungsmittel für die Enzyme), Spur13: RNase, Spur14: ProteinaseK (beides waren Komponenten des DNS Isolierungskites), Spur15: Achromopeptidase, Spur16: Lysozym, Spur17: EtOH, Komponenten des DNS Isolierungskites: Spur18: Bindungspuffer, Spur19: Waschpuffer1, Spur20: Waschpuffer2, Spur21: Elutionspuffer

Positivkontrolle Spur22: $DH5\alpha$.

Wenn die Reagenzien kontaminiert wären, so müsste im Agarosegel eine Bande bei 204bp sichtbar werden. Erfreulicherweise konnte sowohl bei der Abbildung 45a als auch bei Abbildung 45b nur eine dicke Bande in der Spur22 nachgewiesen werden, also der Positivkontrolle. Die Banden, die eine Größe von ≤100bp aufwiesen, sind Oligonukleotid-Dimere. Somit waren alle benutzten Reagenzien frei von Bakterien.

4.2. Der Einfluss des AhR auf das Ohrmikrobiom

Basierend auf der Sequenzanalyse des 16S rRNA Genes wurden vier große Bakterienklassen: *Actinobakterien, Bacteroidetes, Firmicutes* und *Proteobakterien* auf der humanen Haut nachgewiesen [siehe [193] für eine Übersicht]. Außerdem ist bekannt, dass es signifikante Parallelen zwischen dem Mikrobiom des Mausohres und der humanen Haut gibt [59]. Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Bakterienstämme auf der Ohrhaut von AhR-defizienten Mäusen wird in der Abbildung 46 grafisch gezeigt.



Abbildung 46: Häufigkeitsverteilung von verschiedenen Bakterienstämmen auf der Ohrhaut von AhR-defizienten Mäusen.

Vergleich der relativen Häufigkeit an Bakterienstämme auf der Ohrhaut von (a) AhR-KO sowie (b) AhR K5-KO Mäusen und deren entsprechenden WT-Kontrollen. Wie aus der Abbildung 46 erkennbar, konnten bei beiden KO-Mausstämmen sowie deren WT-Kontrollen die drei Bakterienstämme: *Firmicutes, Proteobakterien* sowie *Bacteroidetes* wiedergefunden werden. *Actinobakterien* wurden nur bei 2 WT-Kontrollen und nur bei einem AhR K5-KO Tier nachgewiesen. Die relativen Häufigkeiten der einzelnen Bakterienstämme variiert zwischen den individuellen Mäusen eines Genotypes sehr, wie beispielsweise bei den *Proteobakterien* (vgl. Abbildung 46, fleischfarbenen Balken). In der Abbildung 46a bei den WT-Kontrollen ist zu sehen, dass bei der WT-Maus 1 mehr *Proteobakterien* gefunden wurden im Vergleich zu den WT-Mäusen 2 und 3. Hier ist der relative Anteil an *Proteobakterien* gleich. Für einen quantitativen Vergleich wurde der Mittelwert aus den prozentualen Anteilen der am häufigsten vorkommenden Bakterienstämme in der Tabelle 32 tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 32: Vergleich der prozentualen Anteilen der vier am häufigsten vorkommenden Bakterienstämme auf den Ohren von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen

	prozentualer Anteil der Bakterienstämme in %				
	Actinobakterien	Bacteroidetes	Firmicutes	Proteobakterien	
AhR-WT	1,0±1,0	14,0±8,02	41,33±7,88	42,67±6,17	
AhR-KO	0,0±0,0	25,67±1,76	23,67±4,67	59,33±4,18	
AhR K5- WT	0,33±0,33	9,33±4,85	68,00±10,69	21,00±6,11	
AhR K5- KO	0,67±0,67	6,67±0,88	68,67±4,37	23,67±4,70	

Die fettgedruckten Zahlen gegeben an, dass diese Bakterienstämme am häufigsten in dem Mausstamm vorkamen. Gezeigt wird der Mittelwert±SEM von n:3.

Wie von Grice und Mitarbeiter für einen anderen Mausstamm beschreiben [59], wurden auf den AhR-KO Mausohren vermehrt *Proteobakterien* gefunden. Aus der Abbildung 46 sowie der Tabelle 32 wird deutlich, dass interindividuelle Schwankungen auftraten, die sich in einem hohen SEM widerspiegelten (vgl. Tabelle 32). Trotzdem lässt sich aus den generierten Daten cum grano salis sagen, dass die prozentualen Unterschiede zwischen KO und WT bei der AhR-KO Mauslinie größer im Vergleich zur AhR K5-KO Mauslinie sind. Diese Beobachtung konnte auch bei den TEWL Daten (vgl. Abbildung 32 und 33a und Tabelle 31) gemacht werden. Anhand der Tabelle 32 wird deutlich, dass auf den AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen überwiegend *Proteobakterien* leben, während auf den AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen *Firmicutes* dominieren. Interessanterweise wurden auf den Ohren der AhR-KO Mäuse viele Bakterien gefunden, die dem Stamm Bacteroidetes angehören.

Um eine Information darüber zugewinnen, wie groß die Diversität der Bakterien auf den Ohren ist, wurde die α -Diversität bestimmt wurde. Die Analyse der α -Diversität wird in der Abbildung 47 gezeigt.



Abbildung 47: Die Bestimmung der α -Diversität im Mikrobiom von Ohr von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.

Während (a) die α -Diversität für den AhR-KO Stamm zeigt, so zeigt (b) die α -Diversität für den AhR K5-KO Stamm. Jede Linie repräsentiert eine individuelle Maus. Für jeden "Read" der Sequenzen (x-Achse) wurde bestimmt, wie viele OTUs darin identifiziert werden konnten (y-Achse). Mit zunehmender Anzahl an "Reads" können immer neue OTUs identifiziert werden, bis ein Plateau erreicht ist. Die Darstellung ermöglicht so die Artenvielfalt in einer Probe zu erkennen. Abkürzungen: WT: AhR-WT, KO: AhR-KO, K5-KO: AhR K5-KO. n:3

Die Abbildung 47a zeigt die Ergebnisse der α-Diversität für den AhR-KO Stamm und 47b für den AhR K5-KO Stamm. Tendenziell fällt auf, dass der Artenreichtum sehr heterogen verteilt ist. Bei dem AhR-KO Stamm (Abbildung 47a) zeigt der WT3 die höchste Artenvielfalt, während der KO3 die niedrigste Artenvielfalt aufweist. Dieses Muster wird beim AhR K5-KO Stamm in umgekehrter Form gefunden. Denn hier weist die K5-KO3 Maus die höchste Artenvielfalt auf und der WT3 die niedrigste. Weiterhin ist auffällig, dass sich sowohl beim AhR-KO als auch beim AhR K5-KO Stamm zwei Gruppen identifizieren lassen. Diese Gruppenausbildung ist beim AhR K5-KO Mausstamm ausgeprägter (vgl. Abbildung 47b). Dabei sind beim AhR-KO Stamm drei Mäuse in der oberen Gruppe, was für eine deutlichere Artenvielfalt spricht und drei Mäuse wiesen eine niedrigere Artenvielfalt auf (Abbildung 47a). Beim AhR K5-KO Stamm weist WT2 und K5-KO3 eine größere Artenvielfalt auf im Gegensatz zu der WT3, WT1, K5-KO2 und K5-KO1 (Abbildung 47b).

Um eine Aussage treffen zu können, wie homogen die biologischen Replikate sind, wurde die β -Diversität bestimmt (Abbildung 48).



Abbildung 48: Die Bestimmung der β -Diversität vom Ohr von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.

Während (a) die β -Diversität für den AhR-KO Stamm zeigt, so zeigt (b) die β -Diversität für AhR K5-KO Stamm. Für die β -Diversität wurde eine UniFrac (d0.5) Distanzmatrix kalkuliert. Auf Basis der phylogenetischen Distanz, die im Datensatz beobachtet wurde. Die Diversität wird in Form eines PCA Diagramms gezeigt. Abkürzungen: WT: AhR-WT, KO: AhR-KO, K5-KO: AhR K5-KO, *PCoA: Principal coordinates analysis.* n:3

Die Abbildung 48a präsentiert die Ergebnisse für AhR-KO Mäuse und deren WT-Kontrollen, während die Abbildung 48b die Ergebnisse für den AhR K5-KO Stamm und dessen WT-Kontrollen zusammenfasst. Dass die drei WT-Kontrollmäuse sehr unterschiedlich in ihrer bakteriellen Zusammensetzung waren, zeigt die Abbildung 48a. Währenddessen liegen die Tiere KO2 und KO3 sehr nahe beieinander, dies spricht für eine ähnliche bakterielle Zusammensetzung. Die β -Diversität der AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen stimmt mit der β -Diversität der AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen überein. Auch hier liegen die Punkte der WT-Mäuse sehr weit auseinander und die Punkte für die K5-KO2 und K5-KO1 liegen nahe beieinander. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass das Mikrobiom der Ohren bei beiden KO-Stämmen stabiler ist, als bei den WT-Kontrollen.

4.3. Der Einfluss des AhR auf das Rückenmikrobiom

Das Ohrmikrobiom der AhR-KO sowie der AhR K5-KO schien eine größere Diversität an Bakterien aufzuweisen im Vergleich zu jeweiligen WT-Kontrollen. Im Anschluss daran wurde untersucht, wie der AhR die mikrobielle Zusammensetzung des Rückens beeinflusst. Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Bakterienstämme auf der Rückenhaut von AhR-defizienten Mäusen wird in der Abbildung 49 grafisch gezeigt.



Abbildung 49: Häufigkeitsverteilung von verschiedenen Bakterienstämmen auf dem Rücken von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.

Vergleich der relativen Häufigkeit an Bakterien auf dem Rücken von (a) AhR-KO sowie (b) AhR K5-KO Mäusen sowie den entsprechenden WT-Kontrollen.

Wie auch bei dem Mikrobiom der Ohren (vgl. Abbildung 46), so konnten die drei Bakterienstämme: *Firmicutes, Proteobakterien* und *Bacteroidetes* als besonders häufig auf der murinen Rückenhaut nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 49). Wie in Abbildung 49 ersichtlich, traten interindividuelle Schwankungen auf, die sich in einem hohen SEM widerspiegeln (vgl. Tabelle 33). Die visuelle Betrachtung der Abbildung 49 lässt vermuten, dass sowohl bei dem AhR-KO sowie dem AhR K5-KO und deren entsprechenden WT-Kontrollen die Firmicutes der dominierende Bakterienstamm ist. Um diese visuelle Beobachtung quantifizieren zu können, wurde für den quantitativen Vergleich der Mittelwert aus den prozentualen Anteilen der am häufigsten vorkommenden Bakterienstämme in der Tabelle 33 tabellarisch zusammengefasst.

Tabelle 33: Vergleich der prozentualen Anteilen der vier am häufigsten vorkommenden Bakterienstämme auf dem Rücken von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen

	prozentualer Anteil der Bakterienstämme in %				
	Actinobakterien	Bacteroidetes	Firmicutes	Proteobakterien	
AhR-WT	1,33±1,33	9,0±2,08	49,33±9,83	40,0±11,14	
AhR-KO	8,0±6,02	13,33±6,56	39,33±14,90	38,0±16,86	
AhR K5- WT	0,33±0,33	3,33±0,33	59,67±13,91	35,00±12,01	
AhR K5- KO	3,33±1,86	8,67±4,49	48,67±14,19	38,67±12,33	

Die fettgedruckten Zahlen gegeben an, dass diese Bakterienstämme am häufigsten in dem Mausstamm vorkamen. Gezeigt wird der Mittelwert±SEM von n:3.

Die Vermutung, dass Firmicutes der dominierende Bakterienstamm auf der Rückenhaut ist, wird durch die Tabelle 33 bestätigt. An dieser Tabelle ist auffällig, dass der Unterschied zwischen den AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen nicht so groß ist wie die Unterschiede im Mikrobiom der Ohren (vgl. Tabelle 32). Sowohl bei den AhR-KO Mäusen wie auch bei den AhR K5-KO Mäusen sind *Firmicutes* der dominierende Bakterienstamm. Auf dem Rücken der beiden KO-Stämme konnte eine geringe Anzahl an *Actinobakterien* nachgewiesen werden. Wie auch bei den Ohren (vgl. Tabelle 32), scheint sich ein kompletter Verlust des AhR stärker auf das Vorhandensein vom *Firmicutes* auszuwirken, als der konditionale Verlust in den Keratinozyten. Wie auch bei den Ohren wurde die α -Diversität sowie die β -Diversität bestimmt. Zunächst wird die der α -Diversität wird in der Abbildung 50 gezeigt.



Abbildung 50: Die Bestimmung der α -Diversität von der Rückenhaut von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.

Als Erstes fällt in der Abbildung 50a auf, dass die Kurve der KO2 Maus sehr steil ansteigt und das Plateau erst bei *Read* 8000 einsetzt. Dies ist für die WT-Kontroll Mäuse sowie die Maus KO1 und KO3 nicht der Fall. Hier setzt das Plateau bereits bei einer Read Anzahl von 4000 ein. Somit scheint das Rückenmikrobiom der KO2 Maus sehr artenvielfältig zu sein. In der Abbildung 50 b ist auffällig, dass die Kurven der Mäuse K5-KO3 und K5-KO2 sowie von den WT-Mäusen 2 und 1 identisch verlaufen. Dies spricht dafür, dass die Artenvielfalt auf den Mäusen identisch ist.

Während (a) die α -Diversität für den AhR-KO Stamm zeigt, so zeigt (b) die α -Diversität für den AhR K5-KO Stamm. Jede Linie repräsentiert eine individuelle Maus. Für jeden "Read" der Sequenzen (x-Achse) wurde bestimmt, wie viele OTUs darin identifiziert werden konnten (y-Achse). Mit zunehmender Anzahl an "Reads" können immer neue OTUs identifiziert werden, bis ein Plateau erreicht ist. Die Darstellung ermöglicht so die Artenvielfalt in einer Probe zu erkennen. Abkürzungen: WT: AhR-WT, KO: AhR-KO, K5-KO: AhR K5-KO. n:3



Als Nächstes werden die Daten der β -Diversität in der Abbildung 51 gezeigt.

Abbildung 51: Die Bestimmung der β -Diversität von der Rückenhaut von AhR-KO, AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen.

Während (a) die β -Diversität für den AhR-KO Stamm zeigt, so zeigt (b) die β -Diversität für den AhR K5-KO Stamm. Für die β -Diversität wurde eine UniFrac (d0.5) Distanzmatrix kalkuliert. Auf Basis der phylogenetischen Distanz, die im Datensatz beobachtet wurde. Die Diversität wird in Form eines PCA Diagramms gezeigt. Abkürzungen: WT: AhR-WT, KO: AhR-KO, K5-KO: AhR K5-KO. n:3

Die β -Diversität der Ohren sah geordneter aus (vgl. Abbildung 48) im Vergleich zur β -Diversität der Rückenhaut (Abbildung 51). Wie auch bei den Ohren (vgl. Abbildung 48) liegen die Punkte der einzelnen WT-Kontrollen im Raum verteilt. Aber die Distanz ist nicht so groß, wie es bei den Ohren beobachtet wurde (vgl. Abbildung 48). Beim Rücken scheinen die inter-individuelle Unterschiede nicht so stark ausgeprägt zu sein, wie auf den Ohren (vgl. Abbildung 48).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden KO-Stämme eine höhere Diversität an Mikroorganismen, sowohl auf den Ohren als auch auf dem Rücken, aufwiesen im Vergleich zu den WT-Kontrollen.

5. IST DER AHR EIN MÖGLICHES ZIELPROTEIN FÜR EINE DIÄTETISCHE INTERVENTIONS-STUDIE?

Die Defizienz des AhR führte zu einer beeinträchtigten Hautbarriere (vgl. 3. Ergebniskapitel). Es stellte sich nun die Frage, ob die Hautbarriere durch eine Aktivierung des AhR gestärkt werden kann? Da wir täglich eine Vielzahl an natürlichen AhR-Liganden wie beispielsweise Quercetin (in Äpfeln und Zwiebeln), Indol-3-Carbinol (in Brassicaceae), Resveratrol (Rotwein) oder Curcumin (Gewürz) [siehe [45] für eine Übersicht] über unsere Nahrung aufnehmen, lag es nahe, den AhR über einen natürlichen AhR Liganden aus der Nahrung zu aktivieren.

Einige Studien [211, 25, 30] fanden heraus, dass der natürliche AhR Ligand Indol-3-Carbinol (I3C) [siehe [45] für eine Übersicht] beispielsweise eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Plattenepithelkarzinomen ausübt [30] oder eine schützende Wirkung auf den UV-B induzierten weißen Hautkrebs (*nonmelanoma skin cancer*) hat [25]. Kreuzblüter wie Kohl, Brokkoli und Rosenkohl enthalten Indol-3-Carbinol (I3C), ein Derivat von Indolyl-Methylglucosinolat. I3C wird im sauren Milieu des Magens metabolisiert. Die wichtigsten Metaboliten sind 3,3[°]-Diindolylmethan (DIM) und Indol[3,2-b]Carbazol (ICZ) [2], wobei ICZ mit einer ähnlichen Affinität an den AhR bindet wie TCDD [36]. Es wurden von mir daher zwei langfristige Fütterungsstudien mit dem natürlichen AhR-Liganden I3C durchgeführt; die Veränderungen der Hautbarriere wurden funktional sowie molekularbiologisch festgestellt.

5.1. Eine frühe Gabe von I3C scheint eine "Erinnerungsfunktion" in der Hautbarriere auszulösen

Direkt nach dem Absetzen (= Wegnahme von der Mutter) wurden insgesamt 24 weibliche C57BL/6 Mäuse in drei Gruppen à acht Tieren eingeteilt. Die erste Gruppe bekam eine **synthetische AhR-Liganden-freie Diät** [104] (EF R/M AIN 76A, E15710-46; **=NALD**). Währenddessen bekam die zweite Gruppe die gleiche synthetische Diät, dir mit 2g/kg I3C supplementiert wurde (**= AhR-Ligandenhaltig, ALD**). Die dritte Gruppe wurde mit dem **Alleinfuttermittel für die Mäuse-Zucht** (V1124-703; **SDT**) gefüttert. Eine weitere Kontrollgruppe bestand aus AhR-KO Mäuse, die ebenfalls das Alleinfuttermittel für die Mäuse-Zucht erhielten. In regelmäßigen Abständen wurde das Gewicht der Mäuse sowie die verzehrte Menge an Futter bestimmt. Die Gewichts- sowie Futterkurven sind im Anhang VIId) hinterlegt. Dieses Experiment wird in der vorliegenden Doktorarbeit als Futter-Tausch Experiment bezeichnet und in der Abbildung 52 wird der zeitliche Ablauf des Experimentes gezeigt.



Abbildung 52: Schema des zeitlichen Ablaufs des Futter-Tausch Experimentes.

21 Tage alte C57BL/6 Weibchen wurden direkt nach dem Absetzen auf die Spezialdiäten gesetzt. Als TEWL-Kontrolle dienten drei gleichaltrige AhR-KO Weibchen, die ebenso wie die Futter-Kontroll-Gruppe das Alleinfutter für die Mäuse-Zucht (=SDT) erhielten. Gruppe1=NALD, Gruppe2=ALD, Gruppe3=SDT. 87 Tage nach dem Start der Fütterung wurde das Futter getauscht: Gruppe1=NALD→ALD und Gruppe2=ALD→NALD. Die Tage bezeichnen die Zeitpunkte nach Beginn der Fütterung, an denen TEWL-Kinetiken bestimmt wurden. Insgesamt wurden 4 TEWL-Kinetiken aufgenommen: die Erste an den Tagen 50/51, die Zweite an den Tagen 86/87, die Dritte an den Tagen 130/131 und die Vierte an den Tagen 169/170. Nach 190 Tagen (+) wurde das Experiment beendet und die Rückenhaut der Mäuse für histologische sowie molekularbiologische Untersuchungen entnommen. n:8 (C57BL/6) bzw. 4 (AhR-KO), Abkürzungen: AhR-Liganden-freie Diät (= NALD), AhR-Liganden-haltige Diät (= ALD), Alleinfutter für die Mäuse-Zucht (= SDT), t= Tage.

Ist es möglich, den TEWL über den natürlichen Liganden I3C zu verändern? Wenn ja, wie lange dauert es, bis dieser Effekt eintritt und wie groß würde dieser Effekt sein? Um diese Fragen beantworten zu können, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (in der Abbildung 52 mit 1, 2, 3 und 4 bezeichnet) TEWL Kinetiken nach dem mechanischen Stress aufgenommen.

Die TEWL Ergebnisse für die erste Kinetik (= Tag50/51) (Abbildung 53 1) und der zweiten Kinetik (= Tag86/87) (Abbildung 53 2) werden in der nächsten Abbildung 53 gezeigt.



Abbildung 53: Der TEWL kann durch I3C moduliert werden.

(1) zeigt die Fläche unter der Kurve für die erste TEWL Kinetik (siehe Abbildung 52) und in (2) wird das Ergebnis der zweite TEWL Kinetik gezeigt. (1) Aus den TEWL Daten wurde mit Hilfe von GraphPad Prism die Fläche unter der Kurve für jede Gruppe berechnet und in Form eines Balkendiagramms zusammengefasst. Das Alter der Tiere betrug 10,0±0 Wochen. Die Raumtemperatur betrug 24,4±0,4°C (bis 30Min.) und 24,0±0,17°C (24Std.). Die Luftfeuchtigkeit betrug 35,3±0,6% (bis 30Min.) und 37,6±0,5% (24Std.). (2) Das Alter der Tiere betrug 15,0±0 Wochen. Die Raumtemperatur betrug 25,1±0,28°C (bis 30Min.) und 24,3±0,31°C (24Std.). Die Luftfeuchtigkeit betrug 34,6±0,38% (bis 30Min.) und 35,2±0,43% (24Std.). In der Abbildung (2) werden nur die Signifikanzberechnungen der Gruppe1 (NALD) gegen Gruppe2 (ALD) gezeigt. Drei Tage vor dem mechanischen Stress wurden die Mäuse auf dem Rücken rasiert. Der mechanische Stress erfolgte 5x mit dem TegadermTM 3MTM Film. Es wurden mind. 25 Messwerte pro Messung aufgenommen. Die Daten werden als Mittelwert±SEM von n:8 (C57BL/6) bzw. 3 (AhR-KO) dargestellt. Die statistische Berechnung erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Der Basalwert zwischen der NALD und ALD Gruppe war nicht signifikant.

Unerwartet war es möglich den TEWL über die Zufuhr (=ALD) bzw. Wegnahme (=NALD) von natürlichen AhR-Liganden zu modulieren. Fehlten natürliche AhR-Liganden in der Diät (=NALD; roter Balken bzw. rote Linie in der Abbildung 53), dann verschlechterte sich der TEWL nach dem mechanischen Stress und der Verlauf der TEWL Kinetik (vgl. Abbildung 53 rote Linie) ähnelte dem Verlauf der AhR-KO Mäuse (vgl. Abbildung 32). Eine Supplementation von I3C (= ALD; grüner Balken bzw. grüne Linie in der Abbildung 53) führte dazu, dass der TEWL nach dem mechanischen Stress nicht anstieg (vgl. Abbildung 53 grüne Linie).

Aus diesen Daten kam die Frage auf, ob es möglich ist, den schlechten TEWL der NALD Gruppe durch die Zufuhr vom natürlichen AhR-Liganden I3C zu verbessern. Hierfür wurde das Futter 87 Tage nach dem Start der Fütterung getauscht, d.h. die NALD Gruppe bekam das ALD Futter und die ALD Gruppe wurde mit NALD gefüttert. Nach dem Tausch wurden an zwei weiteren Tagen der TEWL nach dem mechanischen Stress aufgenommen. Die TEWL Ergebnisse für die dritte Kinetik (= Tag130/131) (Abbildung 54 1) und vierte Kinetik (= Tag169/170) (Abbildung 54 2) werden in der nächsten Abbildung 54 gezeigt.



Abbildung 54: Ein erhöhter TEWL kann durch die Supplementation von I3C gesenkt werden.

(3) zeigt die Fläche unter der Kurve für die dritte TEWL Kinetik (siehe Abbildung 52) und in (4) wird das Ergebnis der vierten TEWL Kinetik gezeigt. (3) Aus den TEWL Daten wurde mit Hilfe von GraphPad Prism die Fläche unter der Kurve für jede Gruppe berechnet und in Form eines Balkendiagramms zusammengefasst. Das Alter der Tiere betrug 21,0±0 Wochen. Die Raumtemperatur betrug 23,2±0,61°C (bis 30Min.) und 22,8±0,39°C (24Std.). Die Luftfeuchtigkeit betrug 39,9±2,65% (bis 30Min.) und 36,4±1,31% (24Std.). (4) Das Alter der Tiere betrug 27,0±0 Wochen. Die Raumtemperatur betrug 23,1±0,52°C (bis 30Min.) und 22,7±0,18°C (24Std.). Die Luftfeuchtigkeit betrug 37,8±1,59% (bis 30Min.) und 39,1±0,36% (24Std.). In der Abbildung (4) werden nur die Signifikanzberechnungen der Gruppe1 (NALD→ALD) gegen Gruppe2 (ALD→NALD) gezeigt. Drei Tage vor dem mechanischen Stress wurden die Mäuse auf dem Rücken rasiert. Der mechanische Stress erfolgte 5x mit dem TegadermTM 3MTM Film. Es wurden mind. 25 Messwerte pro Messung aufgenommen. Die Daten werden als Mittelwert±SEM von n:8 (C57BL/6) bzw. 3 (AhR-KO) dargestellt. Die statistische Berechnung erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung. **p<0,01. Zwischen der ALD und NALD Gruppe konnte bei der 4. TEWL Kinetik keine Signifikanzen festgestellt werden.

Wie erwartet, wenn die Mäuse den natürlichen AhR-Liganden I3C über die Nahrung erhalten (vgl. Abbildung 54 2; rote Linie, NALD→ALD), dann stieg der TEWL nach dem mechanischen Stress kaum an. Überraschenderweise verloren die ALD→NALD Mäuse (vgl. Abbildung 54 3 (grüner Balken) und 4 (grüne Linie)) ihre gute Barriere nach dem mechanischen Stress nicht, obwohl die Mäuse über Wochen keinen natürlichen Liganden mehr über die Ernährung erhalten haben. Über das gesamte Experiment hatte sich der TEWL verändert. Diese Veränderungen der TEWL Werte aller vier TEWL Kinetiken werden in der Tabelle 34 zusammengefasst.

TEWL	Alter der Mäuse in Wochen	Dauer der Diät in Tagen	OMin.TEWL [g/hm²] Gruppe1 (NALD→ALD)	OMin.TEWL [g/hm²] Gruppe2 (ALD→NALD)		
1. Kinetik	10	50/51	18,18±5,1	7,94±0,44		
2. Kinetik	15	86/87	20,77±2,8	8,9±0,58		
Tausch: NALD \rightarrow ALD und ALD \rightarrow NALD						
3. Kinetik	21	43/44	15,82±2,98	11,6±1,19		
4. Kinetik	27	82/83	13,9±2,34	10,92±1,50		

Tabelle 34: Zusammenfassung der OMin. TEWL Werte von den vier TEWL Kinetiken

Die Tabelle 34 verdeutlicht nochmals, dass der TEWL über eine diätetische Intervention modulierbar ist. Zusammenfassend lassen sich zwei wichtige Ergebnisse aus dem Futter-Tausch Experiment nennen: Erstens, eine AhR-Liganden-freie Diät führt zu einem erhöhten Wasserverlust (vgl. Tabelle 34 erste und zweite Kinetik NALD→ALD). Zweitens, wenn die Mäuse direkt nach dem Absetzen I3C bekommen, dann scheint die Barriere eine Art "Erinnerungsfunktion" aufzubauen, da der TEWL trotz fehlender oraler Gabe von I3C nach dem mechanischen Stress nicht ansteigt (vgl. Tabelle 34 dritte und vierte Kinetik Gruppe ALD→NALD).

5.2. Der hohe TEWL einer alternden Hautbarriere kann durch I3C verbessert werden

Eine alternde, gestresste Hautbarriere wird durch den Verlust der Integrität der Hautbarriere sowie einer verlangsamten Wiederherstellung der Barrierefunktion gekennzeichnet [56]. Dass die Hautbarriere durch die Gabe von I3C gestärkt werden kann, zeigten die TEWL Daten aus dem vorherigen Kapitel (vgl. Abbildung 53 und 54). Aus dieser Tatsache heraus stellte sich die Frage, ob eine alternde Hautbarriere durch die Gabe von I3C gestärkt werden kann?

Hierfür wurden 24 zehn Wochen alte, weibliche C57BL/6 Mäuse wieder in die 3 Gruppen (NALD, ALD sowie SDT) eingeteilt und auf die Diäten gesetzt. Eine weitere Kontrollgruppe bestand aus AhR-KO Mäuse, die ebenfalls das Alleinfuttermittel für die Mäuse-Zucht erhielten. In regelmäßigen Abständen wurde das Gewicht der Mäuse sowie die verzehrte Menge an Futter bestimmt. Die Gewichts- sowie Futterkurven sind im Anhang VIId) hinterlegt. Die Abbildung 55 zeigt den zeitlichen Ablauf des Experiments.



TEWL Messungen

Abbildung 55: Schema des zeitlichen Ablaufs des Futter-Pause Experimentes.

Zehn Wochen alte C57BL/6 Weibchen wurden auf die Spezialdiäten gesetzt. Als TEWL Kontrolle dienten vier gleichaltrige AhR-KO Weibchen, die ebenso wie die Futter-Kontroll-Gruppe das Alleinfutter für die Mäuse-Zucht erhielten. Gruppe 1=NALD, Gruppe 2=ALD, Gruppe 3=SDT. Nach 153 Tagen bekamen Gruppe1 und Gruppe2 für 35 Tage die SDT Diät. Danach wurde die Gruppe1 wieder auf NALD Diät und Gruppe2 wieder auf ALD Diät für 48 Tage gesetzt. Die Tage bezeichnen die Zeitpunkte nach Beginn der Fütterung, an denen TEWL-Kinetiken bestimmt wurden. Insgesamt wurden vier TEWL Kinetiken aufgenommen: die Erste am Tag -1/0, die Zweite an Tag 152/153, die Dritte an Tag 188/189 und die Vierte an Tag 216/217. Am Tag 237 wurde das Experiment beendet und die Rückenhaut der Mäuse für histologische sowie molekularbiologische Untersuchungen entnommen. n:8 (C57BL/6) bzw. 4 (AhR-KO); Abkürzungen: AhR-Liganden-freie Diät (= NALD), AhR-Liganden-haltige Diät (= ALD), Alleinfutter für die Mäuse-Zucht (= SDT), t= Tage.

Dieses Experiment wird im Weiteren als Futter-Pausen Experiment bezeichnet. Vor dem Start der diätetischen Interventionsstudie wurde die erste TEWL Kinetik und eine zweite 152 Tage später aufgenommen, um die möglichen I3C Effekte in einer alternden Hautbarriere aufdecken zu können. Die Daten werden in der nächsten Abbildung 56 gezeigt.



Abbildung 56: Der I3C Effekt ist auch in einer alternden Hautbarriere erkennbar.

(1) zeigt die Fläche unter der Kurve für die erste TEWL Kinetik (siehe Abbildung 55) und in (2) wird das Ergebnis der zweiten TEWL Kinetik gezeigt. (1) Aus den TEWL Daten wurde mit Hilfe von GraphPad Prism die Fläche unter der Kurve für jede Gruppe berechnet und in Form eines Balkendiagramms zusammengefasst. Das Alter der Tiere betrug 9,71±0,98 Wochen. Die Raumtemperatur betrug 22,6±0,25°C (bis 30Min.) und 22,2±0,38°C (24Std.). Die Luftfeuchtigkeit betrug 24,8±0,36% (bis 30Min.) und 23,6±0,74% (24Std.). (2) Das Alter der Tiere betrug 31,5±0,31 Wochen. Die Raumtemperatur betrug 25,0±0,31°C (bis 30Min.) und 24,5±0,28°C (24Std.) und die Luftfeuchtigkeit 39,3±0,59% (bis 30Min.) sowie 43,6±0,50% (24Std.). In der Abbildung (2) werden nur die Signifikanzberechnungen der Gruppe1 (NALD) gegen Gruppe2 (ALD) gezeigt. Drei Tage vor dem mechanischen Stress wurden die Mäuse auf dem Rücken rasiert. Der mechanische Stress wurde 5x mit dem TegadermTM 3MTM Film ausgelöst. Es wurden mind. 25 Messwerte pro Messung aufgenommen und daraus der Mittelwert errechnet. Die Daten werden als Mittelwert±SEM von n:8 (C57BL/6) bzw. 4 (AhR-KO) dargestellt. Die statistische Berechnung erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Vor dem Start der Fütterung wurde eine TEWL-Kinetik von allen vier Gruppen aufgenommen (Abbildung 56 1). Wie erwartet ist der TEWL der jungen AhR-KO Mäusen nach dem mechanischen Stress erhöht (vgl. Abbildung 32), während der TEWL der C57BL/6 nach dem mechanischen Stress nicht anstieg. 153 Tage nach dem Start der Fütterung wurde die zweite TEWL-Kinetik aufgenommen (Abbildung 56 2). Die Integrität der Hautbarriere der NALD Mäuse war bei der Messung beeinträchtigt. Dies zeigte der erhöhte TEWL nach dem mechanischen Stress (vgl. Abbildung 56 2, rote Linie). Die altersassoziierte Erhöhung des TEWLs (vgl. Abbildung 34) konnte bei der ALD Gruppe 153 Tage nach dem Start der Fütterung nicht beobachtet werden. Überraschenderweise stieg der TEWL der ALD Gruppe nach der mechanischen Stressung nicht an (vgl. Abbildung 56 2, grüne Linie). Die TEWL Kinetik ähnelt der TEWL Kinetik von den jungen WT-Mäusen (vgl. Abbildung 32).

Die Ergebnisse des Futter-Tausch Experimentes zeigten (vgl. Abbildung 54), dass ein erhöhter TEWL durch eine Supplementation von I3C gesenkt werden konnte. Daraufhin stellte sich die Frage, wie reagiert eine alternde Hautbarriere auf eine Eliminierung von I3C aus der Diät und einer anschließenden Supplementation von I3C? Hierfür bekamen sowohl die ALD als auch die NALD Gruppe für 35 Tage das SDT Futter. Nach dieser Pause bekam die NALD Gruppe wieder das NALD Futter und die ALD Gruppe wieder das ALD Futter bis zum Ende des Experimentes. Nach den 35 Tagen wurde eine TEWL Kinetik aufgenommen (Abbildung 57 3) sowie die letzte TEWL Kinetik 28 Tage nach dem die beiden Gruppen, NALD und ALD, ihre Diäten wieder bekommen haben (Abbildung 57 4).



Abbildung 57: Der TEWL von acht Monate alten Mäusen kann durch die Gabe von I3C verbessert werden.

(3) zeigt die Fläche unter der Kurve für die dritten TEWL Kinetik (siehe Abbildung 55) und in (4) wird das Ergebnis der vierten TEWL Kinetik gezeigt. (3) Aus den TEWL Daten wurde mit Hilfe von GraphPad Prism die Fläche unter der Kurve für jede Gruppe berechnet und in Form eines Balkendiagramms zusammengefasst. Das Alter der Tiere betrug 36,50±1,11 Wochen. Die Raumtemperatur betrug 23,2±0,65°C (bis 30Min.) und 22,3±0,22°C (24Std.). Die Luftfeuchtigkeit betrug 36,7±1,59% (bis 30Min.) und 37,0±2,50% (24Std.). (4) Das Alter der Tiere betrug 40,79±0,92 Wochen. Die Raumtemperatur betrug 24,0±0,42°C (bis 30Min.) und 23,2±0,19°C (24Std.). Die Luftfeuchtigkeit betrug 35,2±1,01% (bis 30Min.) und 39,9±1,42% (24Std.). In der Abbildung (4) werden nur die Signifikanzberechnungen der Gruppe1 (NALD) gegen Gruppe2 (ALD) gezeigt. Drei Tage vor dem mechanischen Stress wurden die Mäuse auf dem Rücken rasiert. Der mechanische Stress erfolgte 5x mit dem TegadermTM 3MTM Film. Es wurden mind. 25 Messwerte pro Messung aufgenommen und daraus der Mittelwert berechnet. Die Daten werden als Mittelwert±SEM von n:8 (C57BL/6) bzw. 4 (AhR-KO) dargestellt. Die statistische Berechnung erfolgte mit der ungepaarten studentschen T-Verteilung. *p<0,05. Die anderen Zeitpunkte der TEWL Kinetik waren zwischen der ALD und NALD Gruppe nicht signifikant. Wie erwartet, wenn die beiden Gruppen ALD und NALD wieder die SDT Diät bekommen, dann steigt der TEWL nach dem mechanischen Stress wieder an (vgl. Abbildung 57 3). Ein erhöhter TEWL einer alternde Hautbarriere, kann durch die Gabe von I3C wieder gesenkt werden (vgl. Abbildung 57 4, grüne Linie). Über das gesamte Experiment hatte sich der TEWL verändert. Diese Veränderungen der TEWL Werte aller vier TEWL Kinetiken werden in der Tabelle 35 zusammengefasst.

TEWL	Alter der Mäuse in Wochen	Futter	Dauer der Diät in Tagen	OMin.TEWL [g/hm ²] Gruppe1 (NALD)	OMin.TEWL [g/hm ²] Gruppe2 (ALD)	
1. Kinetik	10	alle SDT	80	8,7±1,0	12,02±1,92	
2. Kinetik	32	NALD; ALD; SDT	153	24,82±4,4	7,86±0,86	
PAUSE: NALD \rightarrow SDT und ALD \rightarrow SDT						
3. Kinetik	37	alle SDT	35	31,45±3,9	30,94±4,88	
SDT \rightarrow NALD und SDT \rightarrow NALD						
4. Kinetik	41	NALD; ALD; SDT	27	24,75±3,22	14,26±2,33	

Tabelle 35: Zusammenfassung der OMin. TEWL Werte von den vier TEWL Kinetiken

Zusammenfassend lassen sich zwei wichtige Ergebnisse aus dem Futter-Pause Experiment nennen: Erstens, die Gabe von I3C verbessert den TEWL einer alternde Hautbarriere nach dem mechanischen Stress. Der OMin. TEWL der ALD Gruppe stieg nach 35 Tagen SDT Diät auf 30,94±4,88 g/hm². Interessanterweise, wenn die ALD Gruppe nach der Pause wieder die ALD Diät bekamen, dann sank der OMin. TEWL auf 14,26±2,33 g/hm². Zweitens, die Tabelle zeigt, wie schnell und wie deutlich die I3C Effekte auf den TEWL auswirken. Dies wird an den OMin. TEWL Werte der ALD Gruppe deutlich. Bei einer kontinuierlichen Gabe von I3C erhöht sich der TEWL nach dem mechanischen Stress kaum (7,86g/hm²). Bekamen die ALD Mäuse 35 Tage SDT Diät, dann stieg ihr OMin. TEWL auf 30,94g/hm². Bekamen die ALD Mäuse für 28 Tage wieder die ALD Diät, dann sank der OMin. TEWL von 30,94g/hm² auf 14,26g/hm² zurück.

Die TEWL Daten der Langzeit-Fütterungsstudien zeigten, dass die physikalische Hautbarriere durch eine diätetische Intervention gestärkt werden kann.

5.3. Der AhR wird durch die Gabe von I3C aktiviert

Um zu zeigen, dass der AhR in der Haut durch die orale Gabe von I3C aktiviert wurde, wurde die Induktion von dem Cytochrome P450 A1A *(CYP1A1)* gemessen. *CYP1A1* ist das klassische Zielgen des AhR [76]. Die Daten werden in der Abbildung 58 vorgestellt.



Abbildung 58: Der Nachweis eines aktiven AhR in der Epidermis.

Während (a) die CYP1A1 Expression von dem Futter-Tausch zeigt, so zeigt (b) die CYP1A1 Expression von dem Futter-Pausen Experiment. Zwei Wochen (entspricht Tag 190 (vgl. Abbildung 52) bzw. Tag 237 (vgl. Abbildung 55) nach der letzten TEWL Messung (= 4. Kinetik) wurden aus randomisierten Hautbiopsien gRNS aus der Epidermis isoliert, in cDNS umgeschrieben und die Genexpression von CYP1A1 mit Hilfe der qRT-PCR überprüft. Die relative Quantifizierung erfolgte mit dem Haushaltsgen RPS6 und die Berechnung der x-fachen Genexpression erfolgte nach [123]. Die Daten werden als Mittelwert±SEM präsentiert. Für die statistische Auswertung wurde die ungepaarte studentsche T-Verteilung auf die $\Delta\Delta$ CT Werte angewandt. n:8 (C57BL/6)bzw. 3 (AhR-KO). Technisch nicht korrekte Werte wurden aus der Analyse genommen. Abkürzung: Cytochrome P450 1A1: CYP1a1

Die Abbildung 58 zeigt die Expression des Cytochroms P450 1A1 *(CYP1A1)* am Tag 190 (vgl. Abbildung 52) und Tag 237 (vgl. Abbildung 55) nach dem Start der Fütterungsexperimenten. Es ist ein deutlicher Trend deutlich, dass *CYP450 1A1* verstärkt in der Haut exprimiert nach Zugabe von I3C zum Futter. Dies war jedoch nicht statistisch signifikant.

5.4. Eine kontinuierliche Gabe von I3C verstärkt die Genexpression von AD assoziierten Genen

Kennzeichnend für die Pathogenese einer AD ist die mangelhafte Integrität der Hautbarriere, hervorgerufen durch den Funktionsverlust im Filaggrin (FLG) Protein [siehe [46] für eine Übersicht]. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Wirkung von medizinischen Teer, der die Symptome einer AD lindert, auf die Aktivierung des AhR zurückzuführen ist. Denn der AhR leitet die Expression von Genen, die in die epidermale Differenzierung involviert sind ein, wie beispielsweise von Filaggrin (*FLG*) [234]. Eine Studie von Otsuka et al. (2013) [162] zeigte, dass die Filaggrin *(FLG)* Expression über die orale Gabe von JTC801 (=opioide Analgetika[246]) signifikant gesteigert wird und in einer gestärkten physikalischen Hautbarriere resultiert [162]. Weiterhin ist bekannt, dass der Promoter des Filaggrin Genes funktionale DRE-Sequenzen enthält [224].

Die aktuellen Daten zeigen, dass der AhR ein gutes Zielprotein ist, um neue therapeutische Ansätze z.B. für die Behandlung einer AD zu entwickeln. Ein solcher möglicher therapeutische Ansatz wurde in der vorliegenden Doktorarbeit gefunden. Denn die Ergebnisse der beiden langfristigen Fütterungsstudien (vgl. 5.1. und 5.2.) zeigten, dass die Integrität der Hautbarriere über eine diätetische Intervention gestärkt werden kann. Um herauszufinden, ob die Aktivierung des AhR über die orale Gabe von I3C die Genexpression AD assoziierten Genen beeinflusst, wurde zunächst ein Venndiagramm aus den AD assoziierten Genen erstellt, die während der Auswertung der globalen Genexpressionsstudie gefunden wurden (vgl. Tabelle 44 bis 46, Anhang VIIc)). Abbildung 59 zeigt das Venndiagramm.



Abbildung 59: Ein Venndiagramm von Hautbarriere-relevanten Genen, die mit einer atopischen Dermatitis assoziiert sind.

Abkürzungen: NGF: Nerve Growth Factor; OVOL1: OVO Homolog-Like1; TSLP: Thymic Stromal Lymphopoietin; $IL1\beta$: Interleukin1 Beta; FLG2: Filaggrin Family Member 2; TLR9: Toll Like Receptor 9; CLDN8: claudin8

Zusammenfassend zeigt das Venndiagramm (Abbildung 59), dass der Nervenwachstumsfaktor (engl. *nerve growth factor*, *NGF*) und *OVO Homolog-Like1 (OVOL1)* zu allen drei untersuchten Zeitpunkten differentiell exprimiert wurden. *OVOL1* besitzt 16 putative DRE-Sequenzen in seinem Promoter. Das *Thymic Stromal Lymphopoietin* (TSLP), das sowohl zum Zeitpunkt 0Std. und 6Std. differentiell exprimiert wurde, enthält vier putative DRE-Sequenzen in seinem Promoter. Interleukin1 β (*IL1\beta*), Filaggrin2 (*FLG2*), *Toll Like Receptor9 (TLR9*) und Claudine8 (*CLDN8*) werden 6Std. sowie 24Std. nach dem mechanischen Stress differentiell reguliert. Nur *TLR9* enthält drei putative DRE-Sequenzen [223].

Im nächsten Schritt wurde die Genexpression der AD assoziierten Genen: Claudine1 *(CLDN1)*, Filaggrin *(FLG)*, *OVO Homolog-Like1 (OVOL1)* und *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)* untersucht. 190 Tage nach dem Start der Fütterung (vgl. Abbildung 52) wurde die gRNS aus der Epidermis isoliert, in cDNS umgeschrieben und eine qRT-PCR (vgl. Methode 3.5) durchgeführt. Die Ergebnisse werden in der Abbildung 60 präsentiert.



Abbildung 60: Die Genexpression von CLDN1, FLG, OVOL1 und TSLP 190 Tage nach dem Start des Futter-Tausch Experimentes.

190 Tage nach dem Start der Fütterung (vgl. Abbildung 52) wurde die gRNS aus der Epidermis der Mäuse isoliert, in cDNS umgeschrieben und die Genexpression der Gene CLDN1 (a), FLG (b), OVOL1 (c) sowie TSLP (d) mit Hilfe der qRT-PCR überprüft. Die relative Quantifizierung erfolgte mit dem Haushaltsgen RPS6 und die Berechnung der x-fachen Genexpression erfolgte nach [123]. Die Daten werden als Mittelwert±SEM präsentiert. Für die statistische Auswertung wurde die ungepaarte studentsche T-Verteilung auf die $\Delta\Delta$ CT Werte angewandt. n:8 (C57BL/6) bzw. 3 (AhR-KO). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Technisch nicht korrekte Werte wurden nicht für die Analyse verwendet. Abkürzungen: Claudine1: CLDN1, Filaggrin: FLG, Ovo Homolog-Like1: OVOL1, Thymic Stromal Lymphopoietin: TSLP.

Die Abbildung 60 zeigt die Expression von AD-assoziierten Genen: Claudine1 (CLDN1) (Abbildung 60a), Filaggrin (FLG) (Abbildung 60b), OVO Homolog-Like1

(OVOL1) (Abbildung 60c) und *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)* (Abbildung 60d) 190 Tage nach dem Start der Fütterung.

Die Daten der qRT-PCR zeigten, dass durch die orale Gabe von I3C die Expression aller vier untersuchten Genen verstärkt wurde im Vergleich zur SDT Kontrollgruppe.

Bei der **NALD** \rightarrow **ALD Gruppe** (Abbildung 60, rote Balken) war auffällig, dass die Expression von Claudine1 (*CLDN1*) (Abbildung 60a), Filaggrin (*FLG*) (Abbildung 60b) und *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP*) (Abbildung 60d) durch die orale Gabe von I3C signifikant verdoppelt hatte im Unterschied zur SDT Gruppe. Bei *OVOL Homolog-Like1 (OVOL1)* (Abbildung 60c) stieg die Expression signifikant um das Vierfache an gegenüber der SDT Gruppe.

Für die **ALD** \rightarrow **NALD Gruppe** (Abbildung 60, grüne Balken) konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: die Expression der Gene Claudine1 (*CLDN1*) (Abbildung 60a), *OVO Homolog-Like1 (OVOL1*) (Abbildung 60c) und *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)* (Abbildung 60d) verdoppelte sich im Vergleich zur SDT Gruppe. Der Anstieg der Genexpression war aber nicht signifikant. Unerwartet stieg die Expression von Filaggrin (*FLG*) (Abbildung 60b) um das Fünffache an im Vergleich zur SDT Gruppe.

Der Vergleich der Expression zwischen den **Gruppen NALD** \rightarrow **ALD und ALD** \rightarrow **NALD** zeigte, dass eine kontinuierliche, orale Gabe von I3C benötigt wird, um die Expression der untersuchten Gene zu stärken. Denn die Expression der Gene Claudine1 (*CLDN1*) (Abbildung 60a), *OVO Homolog-Like1 (OVOL1*) (Abbildung 60c) und *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP*) (Abbildung 60d) war in der NALD \rightarrow ALD Gruppe stärker als in der ALD \rightarrow NALD Gruppe. Diese Beobachtung galt nicht für die Filaggrin (*FLG*) Expression. Hier war die Expression in der ALD \rightarrow NALD Gruppe doppelt so hoch wie in der NALD \rightarrow ALD und verstärkt so die Vermutung einer "Erinnerungsfunktion".

Für das Futter-Pause Experiment (vgl. Ergebnisteil 5.1.) wurde die qRT-PCR mit den gleichen Genen wiederholt. Die Ergebnisse werden in der nachfolgenden Abbildung 61 gezeigt.



Abbildung 61: Die Genexpression von CLDN1, FLG, OVOL1 und TSLP 237 Tage nach dem Start des Futter-Pausen Experimentes.

Die Daten der qRT-PCR Analysen zeigten, dass sich die Expression der Gene Claudine1 (*CLDN1*) (Abbildung 61a), Filaggrin (*FLG*) (Abbildung 61b), *Ovo Homolog-Like1 (OVOL1*) (Abbildung 61c) und *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP*) (Abbildung 61d) zwischen der ALD (Abbildung 61, grüne Balken) und NALD Gruppe (Abbildung 61, rote Balken) nicht signifikant unterschieden. Dieser Befund verifiziert die beobachteten TEWL Daten (vgl. Abbildung 57 4, rote und grüne Linie). Auch bei der TEWL Kinetik konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der ALD und der NALD Gruppe festgestellt werden.

Auf Genexpressionsebene konnten nur bei dem Futter-Tausch Experiment (vgl. Abbildung 60) eine verstärkte Expressionen der Gene Claudine1 (*CLDN1*), Filaggrin (*FLG*), OVO Homolog-Like1 (OVOL1) und Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) beobachtet werden.

²³⁷ Tage nach dem Start der Fütterung (vgl. Abbildung 55) wurde die gRNS aus der Epidermis der Mäuse isoliert, in cDNS umgeschrieben und die Genexpression der Gene *CLDN1* (a), *OVOL1* (b), *FLG* (c) sowie *TSLP* (d) mit Hilfe der qRT-PCR überprüft. Die relative Quantifizierung erfolgte mit dem Haushaltsgen *RPS6* und die Berechnung der x-fachen Genexpression erfolgte nach [123]. Die Daten werden als Mittelwert±SEM präsentiert. Für die statistische Auswertung wurde die ungepaarte studentsche T-Verteilung auf die $\Delta\Delta$ CT Werte angewandt. n:8 (C57BL/6) bzw. 3 (AhR-KO). *p<0,05 und **p<0,01. Technisch nicht korrekte Werte wurden nicht für die Analyse verwendet. Abkürzungen: Claudine1: *CLDN1*, Filaggrin: *FLG*, Ovo Homolog-Like1: *OVOL1*, Thymic Stromal Lymphopoietin: *TSLP*.

IV. Diskussion

Der evolutionär hochkonservierte Arylhydrokarbonrezeptor (AhR) ist ein Ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor [66], dessen Bedeutung in der dermatologischen Forschung immer größer wird [39, 224, 234, 235, 87, 88, 91]. Seine Rolle in der Hautbarriere ist jedoch noch wenig erforscht [48, 230, 224].

Als Grenzflächenorgan steht die Haut im ständigen Kontakt mit der Umwelt und ist Umweltreizen wie UV-B Strahlung, Bakterien oder Allergenen ausgesetzt, die für den Organismus gefährlich werden können. Aus diesem Grund ist die Ausbildung einer effektiven Schutzbarriere einer der wichtigsten Funktionen der Haut [siehe [181] für eine Übersicht].

Ist die Funktionalität der Barriere nicht mehr gegeben, können entzündliche Hauterkrankungen entstehen [siehe [189, 181] für eine Übersicht] wie beispielsweise eine atopische Dermatitis (AD) [siehe [7, 121] für eine Übersicht]. Kennzeichnend für die Pathogenese einer AD ist die mangelhafte Integrität der Hautbarriere, hervorgerufen durch den Funktionsverlust im Filaggrin (FLG) Protein [siehe [46] für eine Übersicht]. Entscheidend für den Schweregrad der Erkrankung scheint aber das Zusammenspiel zwischen Genetik und Umwelt zu sein, sodass auch die Umwelt immer mehr in den Fokus der Forschung rückt. Dass ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Langzeitexposition mit Luftschadstoffen aus dem Straßenverkehr und atopischen Erkrankungen existiert, konnte in einer epidemiologische Untersuchung [147] aufgezeigt werden.

Ein Sensor in der Haut, der Umweltreize wie UV-B Strahlung erkennt, ist der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR) [87, 91, 175, 165][siehe [221, 62] für eine Übersicht]. So entstehen beispielsweise beim Autofahren Abgase, die beispielsweise 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin (TCDD) enthalten, ein Arylhydrokarbonrezeptor Ligand [47, 33, 70]. Der AhR wird in epidermalen Zellen wie Keratinozyten wie auch in Melanozyten [87, 175] oder in $\gamma\delta$ T-Zellen [91] exprimiert. Die Bedeutung des AhR in der dermatologischen Forschung wird immer größer [39, 224, 234, 235, 87, 88, 91], denn der AhR übernimmt die verschiedenartigsten Aufgaben in der Haut wie beispielsweise bei der Hautpigmentierung [88] oder bei der Homöostase von Immunzellen [87, 91]. Aber seine Rolle in der Hautbarriere ist noch wenig erforscht [48, 230, 224]. *Bis dato* ist zum einen aus murinen Studien bekannt [230, 48], dass sowohl eine konstitutive AhR-Expression [230] als auch die Defizienz des AhR [48] zu pathologischen Hautveränderungen führt [230, 48]. Auf der anderen Seite zeigten *in vitro* Studien, dass der AhR die Genexpression von Hautbarriererelevanten Genen wie Filaggrin *(FLG)* [224], Involucrin *(IVL)* oder Transglutaminase *(TGM)* steuert [124, 167, 224].

Somit könnte der AhR ein mögliches Bindeglied zwischen einer AD [103], Umweltverschmutzungen wie Luftschadstoffen aus dem Straßenverkehr [147] und der Hautbarriere [224] sein. Der AhR wird durch TCDD aktiviert [176], bei AD Patienten konnte eine erhöhte Aktivierung des AhR festgestellt werden [103], und die Filaggrin *(FLG)* Expression wird über den AhR gesteuert [224].

Unerwartet belegen die Studien, die in der Einleitung (Kapitel 3.2. und 3.3.) beschrieben wurden, dass sowohl eine konstitutive Expression [230], wie auch das Fehlen des AhR [48] zu pathologischen Veränderungen in der Haut führten. Dagegen verbesserte eine in vitro Aktivierung des AhR durch TCDD [224] oder medizinischen Teer [234] die Expression von Hautbarriere-relevanten Genen, die beispielsweise in die Assemblierung des cornified envelope oder in die Lipidmatrix Biosynthese involviert sind [siehe [221, 53] für eine Übersicht]. Auf der anderen Seite zeigten die in vitro Daten von van den Bogaard et al. (2013, 2015) [234, 235], dass der AhR ein gutes Zielprotein für therapeutische Ansätze ist [234, 235]. Die tägliche Behandlung einer AD mit medizinischem Teer führt zur einer Linderung der AD assoziierten Symptomen. Die Wissenschaftler um van den Bogaard untersuchten, welchen molekularbiologischen Mechanismus der medizinische Teer induziert. Sie fanden in einer in vitro Studie heraus, dass der medizinische Teer die epidermale Differenzierung über den AhR Signalweg induziert, indem die Expression von Filaggrin (FLG) wiederhergestellt wird. Gleichzeitig wird über den nuclear factor, erythroid 2 like 2 (NRF2) Signalweg eine TH₂ Immunantwort über die Dephosphorylierung von signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) in Keratinozyten unterdrückt [234].

Anhand der beschriebenen Daten aus Literatur liegt es nahe, dass der AhR eine zentrale Funktion in der physikalischen Hautbarriere einnimmt [48, 230, 224, 53, 234, 235]. Allerdings fehlt bis heute eine *in vivo* Charakterisierung einer AhRdefizienten Hautbarriere. An diesem Punkt knüpft die vorliegende Doktorarbeit an, die im **ersten Teil** untersucht, ob **der Verlust des AhR zu einer beeinträchtigten Integrität der murinen Hautbarriere führt?** Hierfür wurde die Rückenhaut von AhR-defizienten sowie AhR konditionalen AhR-defizienten Mäusen und deren WT-Kontrollen mechanisch gestresst, um funktionale (TEWL), morphologische (EM-Bilder) sowie molekularbiologische (Transkriptomanalyse, qRT-PCR) Untersuchungen durchzuführen (vgl. Ergebnisteil 3). Hautbarriere-relevante Gene wie beispielsweise E-Cadherin (CDH1) oder Occludin (OCLN) enthalten putative DRE-Sequenzen in ihren Promotern [223]. Die Genexpressionsdaten von E-Cadherin (CDH1) und Occludin (OCLN) (vgl. Abbildung 29a) 6Std. nach dem mechanischen Stress zeigten, dass die Expression in den AhR-KO vermindert war im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Deshalb wurde überprüft, ob eine Bindung des AhR:Ligand:ARNT Komplex an die putativen DRE-Sequenzen im Occludin sowie E-Cadherin Promoter stattfindet. Die Daten lieferten den Hinweis, dass eine mögliche Bindung des AhR an diese DRE-Sequenzen stattfindet (vgl. Abbildung 30 und 31). Im Rahmen meiner Doktorarbeit war es nicht mehr möglich, diese Daten zu verifizieren und sollte deshalb Gegenstand in zukünftigen Experimenten sein. Die signifikante Erhöhung des Wasserverlustes nach mechanischem Stress in AhR-KO und AhR K5-KO Mäusen spiegelt eine beeinträchtigte Hautbarriere nach mechanischer Stressung wieder im Vergleich zu den WT-Kontrollen (vgl. Abbildung 32 und 33a). Darüber hinaus konnten die Keratinozyten, als die epidermalen Zellen identifiziert werden, in denen der AhR bezüglich der Integrität der murinen Hautbarriere wichtig ist.

Interessanterweise scheint der AhR in Langerhanszellen unter mechanischem Stress keine Rolle zu spielen, weil der TEWL von den AhR KO-LC dem TEWL der WT-Kontrollen gleicht (vgl. Abbildung 33b). Langerhanszellen spielen eine essentielle Rolle in der immunologischen Hautbarriere, aber dafür müssen die Zellen durch fremde Antigene wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pollen aktiviert werden. Dann wandern die Zellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten ein, um dort eine Immunantwort einzuleiten [135, 77][siehe [23] für eine Übersicht]. Auf der einen Seite zeigten Daten aus der Arbeitsgruppe [87], dass die Reifung der Langerhanszellen durch das Fehlen des AhR beeinträchtigt ist [87]. Eine Möglichkeit, die die beobachteten TEWL Daten der AhR LC-KO Mauslinie (vgl. Abbildung 33b) erklären könnten, ist, dass aufgrund der beeinträchtigten Funktion der Langerhanszelle der mögliche Einfluss des AhR in Langerhanszellen auf den TEWL nicht sichtbar wurde. Auf der anderen Seite fanden Proksch et al. (1996) [182] heraus, dass die Dichte an Langerhanszellen nach dem mechanischen Stress ansteigt und dies auch mit einem erhöhten TEWL korreliert [182]. Nach dem Befund von Proksch et al. (1996)[182] beeinflusst die Integrität der Hautbarriere die Langerhanszellen und nicht die Langerhanszellen die Integrität der Hautbarriere. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Langerhanszelle aktiviert sein muss, um ihre Funktion ausüben und den möglichen Effekt eines AhR Verlustes untersuchen zu können. In Anlehnung an die Proksch et al. (1996) [182] Daten könnte ein interessantes Experiment sein, die Dichte an Langerhanszellen in den AhR LC-KO Mäusen nach dem mechanischen Stress zu bestimmen.

Die Beobachtung, dass die Integrität der Hautbarriere bei AhR-KO Mäusen nach dem mechanischen Stress beeinträchtigt ist, konnte auf morphologischer Ebene (vgl. Abbildung 28) sowie molekularbiologischer Ebene (vgl. Tabelle 29 und Abbildung 41 sowie Tabelle 44-46) bestätigt werden. Die interessante Erkenntnis, die aus den Microarray Daten (vgl. Ergebnisse 3.3.) gewonnen wurde, ist, dass der AhR die Expression von vielen entscheidenden Hautbarriere-relevanten Genen wie beispielsweise Envoplakin *(EVPL)*, Periplakin *(PPL)*, kleine Prolin-reiche Proteine *(SPRR)* oder Involucrin *(IVL)* (vgl. Tabelle 44-46) beeinflusst.

Nachdem die Daten aus dem Ergebniskapitel 3 zeigten, dass AhR defiziente Mäuse eine beeinträchtigte Hautbarriere besitzen, beschäftigte sich der zweite Teil der Doktorarbeit mit der Frage, ob der Verlust des AhR die Zusammensetzung des Hautmikrobioms beeinflusst? Denn es ist bekannt, dass ein Zusammenhang zwischen Hautbarrierestörungen und einem veränderten Hautmikrobiom existiert [siehe [60] für eine Übersicht]. Hierfür wurde erstmals das Mikrobiom des Rückens und der Ohren von konditionalen AhR-defizienten Mäusen bestimmt. Ich konnte erfolgreich ein Protokoll etablieren, dass die bakterielle DNS von der gesamten Epidermis (incl. Haare) nachweist. Die bakterielle DNS wurde sowohl von der Rückenhaut als auch von den Ohren von AhR-KO, AhR K5-KO sowie deren WT-Kontrollen isoliert, über das NGS sequenziert und bioinformatisch ausgewertet. Zusammenfassend wurden folgende Erkenntnisse gewonnen: Erstens, dass sowohl auf dem Rücken als auch auf den Ohren drei Bakterienstämme Firmicutes, Proteobakterien und Bacteroidetes leben (vgl. Abbildung 46 und 49). Und Zweitens, dass das Hautmikrobiom von den AhR-KO Mäusen sowie den AhR K5-KO Mäusen komplexer zusammengesetzt war gegenüber den WT-Kontrollen.

Die Defizienz des AhR führte zu einer beeinträchtigten Hautbarriere, so stellte sich im Umkehrschluss die Frage, ob die Hautbarriere durch eine Aktivierung des AhR gestärkt werden kann? Deshalb wurde im **dritten Teil** der Doktorarbeit die Frage untersucht, ob der **AhR ein mögliches Zielprotein für eine diätetische Interventionsstudie ist?** Hierfür wurden zwei langfristige Fütterungsstudien mit dem natürlichen AhR-Liganden Indol-3-Carbinol (I3C) durchgeführt. Der TEWL wurde gemessen, als Indikator für den Zustand der Hautbarriere [siehe [181] für eine Übersicht]. Folgende Beobachtungen konnten bei der diätetischen Interventionsstudie gemacht werden: Erstens, wenn die orale Gabe von I3C direkt nach dem Absetzen beginnt, dann baut die Hautbarriere eine "Erinnerungsfunktion" auf (vgl. Abbildung 54). Zweitens, ein altersassoziierter erhöhter TEWL kann durch die orale Gabe von I3C gesenkt werden (vgl. Abbildung 56). Die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit generierten Daten belegen, dass der AhR

- 1. in Keratinozyten für die Integrität der murinen Hautbarriere notwendig ist
- 2. möglicherweise das Hautmikrobiom beeinflusst und
- 3. ein mögliches Zielprotein für therapeutische Anwendungen ist

Die nachfolgende Diskussion befasst sich zum einen mit der Frage, warum AhR-KO Mäuse trotz gestörter Integrität der Hautbarriere keinen hautspezifischen Phänotypen entwickeln. Zum anderen soll diskutiert werden, ob der AhR ein geeignetes Zielprotein ist, um neue Medikamente für die Behandlung einer AD zu entwickeln.

1. Der AhR ist in Keratinozyten notwendig für die Integrität der murinen Hautbarriere

Die generierten Daten aus dem Ergebnisteil 3 demonstrierten, dass junge AhR-KO sowie AhR K5-KO Mäuse nach dem mechanischen Stress eine beeinträchtige Hautbarriere aufweisen. Aufgrund der Tatsache, dass die Experimente mit AhR defizienten Mäusen durchgeführt wurden, kann eindeutig gesagt werden, dass die beobachteten Effekte auf morphologischer Ebene (EM-Bilder) (vgl. Abbildung 28), funktionaler (TEWL) (vgl. Abbildung 32 und 33) und molekularbiologischer Ebene (Microarray, qRT-PCR) (Abbildung 40, 41, 42 und 44) und auf den Verlust des AhR zurückzuführen sind. Unter physiologischen Bedingungen (= ungestresste Haut) konnte kein bemerkenswerter Unterschied zwischen den AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen nachgewiesen werden, wie die EM-Bilder (vgl. Abbildung 28) und die Basal-TEWL Werte (vgl. Abbildung 32 und 33) zeigten. Interessanterweise zeigt die Betrachtung der qRT-PCR Daten (vgl. Abbildung 42), dass in der ungestressten AhR-KO Haut Gene wie Occludin (OCLN), kleines Prolin-reiches Protein 2H (SPRR2H), Keratin 6A (KRT6A) sowie Keratin 16 (KRT16) im Vergleich zu WT-Kontrollen verstärkt exprimiert wurden. Daraus schließe ich, dass der Verlust des AhR durch eine verstärkte Expression der Gene Occludin (OCLN), kleines Prolin-reiches Protein (SPRR2H), Keratin 6A (KRT6A) sowie Keratin 16 (KRT16) bei den AhR-KO Mäusen kompensiert wird.

Erst bei einer mechanischen Provokation der AhR-KO Rückenhaut konnte ein Unterschied, hervorgerufen durch den Verlust des AhR, experimentell erfasst werden. Dies war bezogen auf den TEWL (vgl. Abbildung 32, 33a,53, 54, 56 und 57) sehr deutlich. Dieser Effekt konnte sogar durch Entfernen der AhR-Liganden aus der Nahrung nachgeahmt werden (vgl. Abbildung 53, 54, 56 und 57) und somit die generierten Daten der AhR-KO Mäuse (vgl. Abbildung 32) bestätigen. Die molekularen und morphologischen Parameter waren jedoch überraschenderweise weit weniger stark ausgeprägt. Dieser Befund zieht sich wie ein roter Faden durch alle Ergebnisse, wie beispielsweise nachgewiesen in den EM-Bildern (vgl. Abbildung 28), den Microarray Daten (vgl. Tabellen 29, 44-46), den qRT-PCR Daten (vgl. Abbildung 42 und 44) und den Hautmikrobiom Daten (vgl. Abbildung 46 und 49).

Die Bedeutung anderer Hautbarriere-relevanten Gene konnte bereits aufgeklärt werden. So wurde beispielsweise die Bedeutsamkeit der Transglutaminase1 (*TGM1*) durch Mutationen im Transglutaminase1 Gen entdeckt. Transglutaminase1 verknüpft die einzelnen Bestandteile des *cornified envelope* (CE) wie beispielsweise Envoplakin (*EVPL*), Periplakin (*PPL*) oder Loricrin (*LOR*) (vgl. Einleitung 2.3.2.). Mutationen in diesem Gen können zu einer lamellären Ichthyose führen [72, 73, 192]. Die fehlerhafte Assemblierung des CE löst bei Patienten mit einer schweren Ichthyose folgende Symptome aus: eine Hyperkeratose (Verdickung des Stratum corneums) und einer Akanthose (Verdickung der Epidermis) [82]. Eine Transglutaminase1-Defizienz führt bei Mäusen zum Tod der neugeborenen Mäuse, hervorgerufen durch schwere Störungen im Stratum corneum [136]. Deshalb wurde erwartet, dass sich auch der Verlust des AhR stärker äußert und es zu einem starken Phänotypen kommt.

Als Erstes stellte sich die Frage nach der **biologischen Relevanz der beobachteten Effekte auf morphologischer (vgl. 3.1.), funktionaler (vgl. 3.2.) sowie molekularbiologischer Ebene (vgl. Ergebnisse 3.3)**. Ist es beispielsweise normal, dass die TEWL Effekte deutlich ausgeprägter sind, als die Effekte auf morphologischer oder molekularbiologischer Ebene? Deshalb wurde in der Literatur nach vergleichbaren Experimenten gesucht, um die biologische Relevanz der generierten Daten erklären und diese in die bestehende Literatur einordnen zu können. In der Literatur ist gut beschrieben, dass der Verlust von bestimmten Genen wie beispielsweise Claudine1 (CLDN1) [54], E-Cadherin (CDH1) [232] oder Transglutaminase1 (TGM1) [136] zu einem übermäßigen Wasserverlust führen und zum Tod kurz nach der Geburt der KO-Mäusen führt [54, 232, 136]. Während Neugeborene E-Cadherin-KO Mäuse einen TEWL von 6g/hm² besitzen [232], so besitzen die jungen AhR-KO Mäuse (=10Wochen) einen TEWL von ~4,0g/hm² (vgl. Abbildung 32). Der TEWL Unterschied zwischen den Neugeborenen E-Cadherin-KO Mäusen und den jungen (=10 Wochen) AhR-KO Mäusen beträgt 2g/hm². Somit stellte ich mir die Frage: warum sterben Neugeborene E-Cadherin-KO an dem erhöhten Wasserverlust [232] und die jungen AhR-KO Mäuse nicht? Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass sich die Bedeutung des AhR auf den TEWL im Laufe eines Mäuselebens ändert und/oder dass andere Kompensationsmechanismen vorhanden sind. Für diese Möglichkeit sprechen zwei Befunde aus der vorliegenden Doktorarbeit. Erstens, die TEWL Messungen der sehr alten AhR-KO Mäuse und deren WT-Kontrollen (vgl. Abbildung 34d). Hier konnte festgestellt werden, dass der Wasserverlust bei den WT-Kontrollen höher war im Vergleich zu den AhR-KO Mäusen. Zweitens, die AhR Genexpression zwischen jungen und sehr alten WT-Mäusen (vgl. Abbildung 35). Denn unerwartet stieg die AhR Genexpression im Alter an. Eine mögliche Ursache könnte in einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit von AhR-abhängigen Signalwegen liegen. So dass eigentlich genügend AHR Protein vorliegt, dies aber von den Zellen nicht erkannt wird. Als Folge dessen wird die AhR Genexpression verstärkt. Diese Vermutung könnte in nachfolgenden in vivo Experimenten untersucht werden, indem junge und sehr alte epidermale WT-Zellen und AhR-KO Kontrollzellen kultiviert werden. Neben der Bestimmung der AhR-Genexpression könnten verschiedene Hautbarriere-relevante Signalwege durchflusszytometrisch analysiert werden. Zusätzlich könnte ein globales Genexpressionsprofil erstellt werden. Schwere Hautverbrennungen sind dann lebensbedrohlich, wenn ein großer Hautbereich verbrannt ist. Die Patienten versterben aufgrund des extensiven Wasserverlustes [siehe [181] für eine Übersicht]. Daraus schließe ich, dass die Kompensation des Wasserverlustes von dem Verhältnis zwischen der Größe der Hautoberfläche und der Menge an verlorenem Wasser abhängt. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass die Neugeborenen E-Cadherin KO-Mäuse kurz nach der Geburt an dem Wasserverlust versterben. Denn die Neugeborenen E-Caderhin KO-Mäuse verlieren über ihre Haut zu viel Wasser und sind nicht in der Lage, diesen Wasserverlust zu kompensieren. An diesem Punkt halte ich fest, dass ein Protein in der Hautbarriere wichtig sein kann, auch wenn die Neugeborenen KO-Mäuse nicht daran versterben.

Vergleichbare TEWL Kinetiken, wie sie in der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführt wurden (vgl. beispielsweise Abbildung 32, 33a, 34, 53, 54, 56 und 57), konnten in der Literatur nicht gefunden werden [64, 95, 251, 71, 149, 212, 207, 20]. Für erwachsene Mäuse, wie sie in der vorliegenden Doktorarbeit verwendet wurden, werden hauptsächlich Studien beschrieben, in denen verschiedene Substanzen wie beispielsweise Ferulasäure [251] oder humanes Sebumextrakt [64] auf die Haut appliziert werden [64, 95, 251, 71], um so deren möglichen Effekt auf die Hautbarriere untersuchen zu können [95, 64]. Um die Wirkung der Substanzen dokumentieren zu können, wurde der TEWL vor und während der Applikationsphase gemessen (meistens alle 24Std.) [64, 95, 251, 71]. In einer murinen Studie von Kang et al. (2010) [95] ist mir aufgefallen, dass der Basal-TEWL (= ohne Stress) von NC/Nga Mäusen, die unter einer atopischen Dermatitis (AD) litten, 50g/hm² betrug [95]. Dieser Basal-TEWL der NC/Nga Mäuse ist vergleichbar mit dem OMin. TEWL (40g/hm²) der den jungen AhR-KO Mäusen (vgl. Abbildung 32). Im Folgenden wird näher auf den Verlauf der TEWL Kinetik nach mechanischem Stress eingegangen.

Die Studien von Honma et al. (2005) [71], Murahata et al. (2008) [149], Sextius et al. (2010) [207] und Chilcott et al. (2002) [20] zeichneten eine TEWL Kinetik nach mechanischem Stress auf [20, 207, 149, 71]. Wobei nur Honma et al. (2005) [71] Mäuse einsetzte [71], während Sextius et al. (2010) [207] wie auch Murahata et al. (2008) [149] ihre TEWL Messungen an der humanen Haut durchführten [149, 207]. Chilcott et al. (2002) [20] untersuchten den Verlauf des Wasserverlustes an der Schweinehaut [20].

In der Studie von Honma et al. (2005) [71] wurde der mechanische Stress durch eine Edelstahl-Drahtbürste ausgeübt [71]. Sowohl in der vorliegenden Doktorarbeit (vgl. Abbildung 20) als auch in der Studie von Honma et al. (2005) [71] wurde zunächst ausgetestet, wie oft der mechanische Stress ausgeführt werden muss, um einen messbaren Wasserverlust induzieren zu können. Mit dem adhäsiven Klebeband Tegaderm[™]3M[™]Film konnte nach fünffachem Ausüben ein TEWL Wert von 25g/hm² induziert werden (vgl. Abbildung 20). Honma et al. (2005) [71] erreichten einen vergleichbaren TEWL erst bei einer 50-fachen Wiederholung [71]. Daraus lässt sich schließen, dass die Höhe der TEWL Werte von der Art des mechanischen Stresses (also Klebeband oder Drahtbrüste) abhängt [71, 247]. Ebenso beobachteten Honma et al. (2005) [71] die Wiederherstellung der Barrierefunktion nach der Applikation von Indomethacin nach dem mechanischen Stress alle 24Std. Die Beobachtungen zeigten, dass die Mäuse, die mit Indomethacin behandelt wurden, eine verzögerte Wiederherstellung der Barrierefunktion aufwiesen [71], so wie bei den jungen AhR-KO Mäuse und die jungen AhR K5-KO Mäuse (vgl. Abbildung 32 und 33a) beobachtet wurde. Wie in den Abbildungen 32 und 33a gezeigt wird, steigt der TEWL in den jungen AhR-KO Mäusen und AhR K5-KO stark an und verbleibt auf einem höheren Niveau. Nach 24Std. ist der TEWL der AhR-KO und den AhR K5-KO Stämme nicht wieder auf dem Basalwert zurückgefallen (Werte waren signifikant) im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Somit ist die Barrierefunktion nicht wieder vollständig hergestellt. So ein TEWL Verlauf konnte auch bei der Studie von Honma et al. (2005) [71] beobachtet werden. Nach dem mechanischen Stress stieg der TEWL an, durch die Applikation von Indomethacin verblieb der TEWL auf einem höheren Niveau und die Haut benötigte länger um die Funktionalität ihrer Barriere wiederherzustellen [71]. Zum einen kann festgehalten werden, dass keine Studie mit identischem Versuchsschema gefunden wurde [64, 95, 251, 71, 149, 212, 207, 20]. Und zum anderen, dass Honma et al. (2005) [71] mit ihrem Versuchsablauf ähnliche TEWL Unterschiede detektieren konnte, wie mit dem Versuchsschema aus der vorliegenden Doktorarbeit (vgl. Abbildung 32, 33a).

Auf morphologischer Ebene (vgl. Abbildung 28 a,b) war kein sichtbarer Unterschied zwischen ungestresster AhR-KO Haut sowie deren WT-Kontrollen zu erkennen. Dieser Befund ähnelt den Ergebnissen von Di Meglio et al. (2014)[39]. Die Forscher stellten Hautschnitte von AhR-KO Mäusen und deren Kontrollen her, führten eine HE-Färbung durch und mikroskopierten die Schnitte. Wie auch bei den EM-Bildern (vgl. Abbildung 28), die sogar durch ihre hohe Vergrößerung wesentlich mehr Details zeigen können, konnte kein klarer visueller Unterschied zwischen AhR-KO Rückenhaut und der Kontrolle entdeckt werden. Erst die Behandlung der Haut mit Imiquimod führte zu einer erkennbaren Verdickung der Epidermis sowie des Stratum corneums bei den AhR-KO Mäusen [39]. HE-Färbungen von etwas sechs Monaten alten AhR-KO Mäusen zeigten auf, dass die Haut der Mäuse Ulzera mit einem unterschiedlichen Schweregrad aufwiesen. Weiterhin wiesen die AhR-KO Mäuse einen kreisrunden Haarausfall sowie eine verstärkte Narbenbildung mit einer Verdickung der oberen Hautschichten auf [48]. Weder bei den alten AhR-KO Mäuse und den beiden konditionalen KO-Mausstämme (vgl. Abbildung 34) aus der vorliegenden Doktorarbeit, noch bei anderen alten AhR-KO Mäuse aus unserer Arbeitsgruppe konnten Hautläsionen beobachtet werden [8]. Bei den Mäusen, die für die Untersuchungen von der Gruppe von Fernandez-Salguero [48] verwendet wurden handelt es sich allerdings um eine andere AhR-KO Linie als diejenige, dich in verwendet habe. Zudem könnte die Tierhaltung, beispielsweise der Hygienestatus, unterschiedlich sein. Li et al. (2011) [120], die die gleiche AhRdefiziente Mauslinie, wie in dieser Dissertation, verwendeten. Weiterhin wurden die Mäuse unter SPF Bedingungen gehalten und machten folgende Beobachtung bei ihren Mäusen: Solange die Mäuse unter SPF Bedingungen gehalten wurden, waren
die Mäuse gesund. Wurden die Mäuse nicht mehr unter SPF Bedingungen gehalten, dann entwickelten alternde Mäuse beispielsweise eine Kolitis. Allerdings erwähnen die Autoren keine pathologischen Veränderungen an der Haut [120]. Es gibt drei verschiedene AhR-defiziente Mauslinien: Die erste Linie wurde von Fernandez-Salguero et al. (1995) [49] generiert, indem das erste Exon im AHR Gen deletiert wurde [49] und bei der AhR-defizienten Mauslinie von Schmidt et al. (1996) [199] wurde das zweite Exon im AHR Gen deletiert [199]. Die dritte Linie wurde von 1997 von Mimura et al. [142] generiert. Bei dieser AhR-defiziente Mauslinie wurde das zweite Intron im AHR Gen deletiert [142]. Bei allen drei AhR-defizienten Mauslinien ist gleich, dass das AHR Gen von der 129/Sv Mauslinie stammt und das die rekombinante embryonale Stammzelle in eine Blastozyste von einer C57BL/6 Maus injizierte wurde [49, 199, 142]. In der vorliegenden Doktorarbeit sowie in der Studie von Li et al. (2011) [120] wurde die AhR-defiziente Mauslinie von Schmidt et al. (1996) [199] eingesetzt, während die Studie von Fernandez-Salguero et al. (1997) [48] seine eigne AhR-defiziente Mauslinie [49] verwendete. Während sich der Verlust des AhR auf morphologischer Ebene nicht äußert, so äußert sich eine konstitutive Expression des AhR in Keratinozyten. Bei fünf Wochen alten transgenen Mäusen traten ekzematöse Veränderungen im Nackenbereich auf. Im weiteren Verlauf verloren die transgene Mäuse ihr Rückenfell und die erosive Dermatitis begann wieder auszuheilen [230]. Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass sich die Defizienz von bestimmten Hautbarriere-relevanten Genen wie Keratin (KRT, Loricrin (LOR) oder Transglutaminase1 (TGM1) in einer Ichthyose äußern mit einem markanten Phänotypen [siehe [185] für eine Übersicht] wie beispielsweise bei kongenitale Ichthyose mit einer glänzenden, durchsichtigen Haut [106]. Im Falle des AhR vermutet ich, dass äußere Einflüsse wie Kratzen, gegenseitige Fellpflege der Mäuse oder Kämpfe, vielleicht aber auch mechanische Reize durch grobe/ hölzerne Einstreu benötigt werden, damit der Verlust des AhR messtechnisch erfasst werden kann.

Die globale Genexpressionsstudie zeigte auf, dass AhR in entscheidenden Hautbarriere-relevanten Ereignissen wie die Assemblierung des *cornified envelope*, der Permeablitätsbarriere, Keratinfilamentnetzwerk (vgl. Tabelle 44-46) involviert ist. Die x-fache Genexpression von entscheidenden Hautbarriere-relevanten Genen wie beispielsweise Envoplakin *(EVPL)*, Periplakin *(PPL)* oder Involucrin *(IVL)* ist $\leq 2,0$. Somit ist die Expressionsänderung der Gene gering (vgl. Tabelle 44-46).

Aus der Literatur sind Studien bekannt, die sich entweder mit dem AhR und seinem möglichen Einfluss auf Genexpression von Hautbarriere-relevante Genen [235, 230] beschäftigen oder die Genexpression nach dem mechanischen Stress untersuchen [207]. In der Studie von Sextius et al. (2010) wurde die Haut von der Innenseite des Unterarmes mechanisch gestresst und die Genexpression zu den Zeitpunkten 2Std., 6Std., 18Std., 30Std. und 72Std. untersucht. Die Daten zeigten, dass das Expressionsprofil von ausgewählten regulierten Genen keine großen Expressionsänderungen aufwiesen. Bei der Betrachtung der x-fachen Genexpressionen (in einer Log-Skala) ist aufgefallen, dass die Werte nicht größer als 7,0 waren. Die stärkste Regulation wies das kleine Prolin-reiche Protein1B (SPRR1B) nach 30Std. mit einem Wert von 6,2 auf [207]. Nach 6Std. fanden Sextius et al. (2010)[207] eine Änderung in der Expression der Gene Envoplakin (EVPL), Keratin 6B (KRT6B) und Keratin 16 (KRT16) vor. Während die Expression von Envoplakin (EVPL) vermindert war, so war die Expression der beiden Keratine verstärkt [207]. Diese Beobachtungen konnten auch in der vorliegenden Doktorarbeit gemacht werden. Bei den AhR-KO Mäusen war die Expression von Envoplakin (EVPL) 6Std. nach dem mechanischen Stress vermindert, während die Expression der beiden Keratine verstärkt war (vgl. Tabelle 45). In der Studie von van den Bogaard et al. (2015) [235] wurden epidermale Zellen von Neugeborenen AhR-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen isoliert und unter Differenzierungskonditionen kultiviert. Im Anschluss daran wurde ein Affymetrix Mouse Gene ST 2.0 Array durchgeführt. Wie auch in der vorliegenden Doktorarbeit und bei Sextius et al. (2010)[207] fanden van den Bogaard et al. (2015)[235] keine großen Veränderungen in der Expression der Gene [235]. Interessanterweise steigt die Stärke der Genexpression an, wenn der AhR konstitutiv exprimiert wird. Tauchi et al. (2005) [230] konnten x-fache Genexpressionen von bis zu 44,2 bei dem Cytochrome P450, 1a1 (CYP1A1) Gen nachweisen. Auch in dieser Studie war die Genexpression von Keratin 6B (KRT6B) verändert in den transgenen AhR Mäusen. Die x-fache Genexpression betrug 35,1 [230]. Die drei vorgestellten Studien [230, 207, 235] stimmen mit den Beobachtungen aus der vorliegenden Doktorarbeit überein. Schlussendlich scheint die schwache Genregulation eine Art Schutzmechanismus darzustellen, um beispielsweise inflammatorische Phänotypen zu verhindern, wie sie von Tauchi et al. (2005) [230] beobachtet wurden [230].

Es bleibt die Frage: Warum entwickeln AhR-KO Mäuse trotz einer gestörten Integrität der Hautbarriere keinen haut-spezifischen Phänotypen?

In Loricrin-KO Mäusen [106, 80] wird der Verlust von Loricrin über einen **Kompensationsmechanismus** behoben wird [106, 80]. Ein weiterer Aspekt, der beachtet werden sollte, ist, dass der **AhR evolutionär hochkonserviert** ist [66].

Phylogenetische Analysen zeigten auf, dass der **AhR evolutionär hochkonserviert** ist [66] und rund 550 Millionen Jahre alt ist [66][siehe [65, 218] für eine Übersicht]. Daher gab es den AhR lange bevor die Haut und deren Barriere entstanden ist [135, 168]. Hieraus leite ich die Vermutung ab, dass sich der AhR während der Entwicklung der Haut und deren Barriere in die verschiedenartigste Hautprozesse integriert hat. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der globalen Genexpressionsanalyse (vgl. Abbildung 41 und Tabelle 44-46 im Anhang) untermauert. Diese Daten zeigten, dass der AhR die Expression von vielen Hautbarriere-relevanten Prozessen wie *cornified envelope*, Permeabilitätsbarriere oder Keratinfilamentnetzwerk involviert ist.

Die Funktion des cornified envelope (CE) besteht darin, die Plasmamembran von terminal differenzierten Keratinozyten zu ersetzen. Der Hauptbestandteil des CE ist das Protein Loricrin (LOR) [106], das zusammen mit den kleinen Prolin-reichen Proteinen das CE-Grundgerüst stärkt [siehe [92] für eine Übersicht]. Während der embryonalen Entwicklung wiesen Loricrin-KO Mäuse eine verspätete Bildung einer intakten Hautbarriere auf. Bei der Geburt waren die Loricrin-KO Mäuse leichter im Vergleich zu den WT-Kontrollen und zeigten eine kongenitale Ichthyose mit einer glänzenden, durchsichtigen Haut. Allerdings verschwand dieser Phänotyp nach vier bis fünf Tagen. Dieser erstaunliche Befund spricht für einen Kompensationsmechanismus. Genauere Analysen der Zusammensetzung des CE zeigten, dass der Verlust von Loricrin (LOR) durch eine gesteigerte Expression von anderen CE Komponenten wie den kleinen Prolin-reichen Proteinen (SPRR) SPRR2H sowie SPRR2D und Repetin (RPTN) ausgeglichen wurde. Die Autoren schlossen aus ihren Daten, dass die verstärkte Expression von anderen CE-Proteine die Entstehung eines ausgeprägten Hautphänotypen bei neugeborenen Loricrin-KO Mäusen verhindert [106]. Anhand dieser Daten vermutete ich, dass die AhR-defizienten Mäuse den Verlust des AHR Proteins durch einen Kompensationsmechanismus ausgleichen. Dass der Verlust des AHR Proteins möglicherweise kompensiert wird, zeigten die Daten der Microarray Tabelle 46 (vgl. Anhang VIIc)): 24Std. nach dem mechanischen Stress war die Genexpression der kleinen Prolin-reichen Proteinen (SPRR) wie SPRR1B, SPRR2B oder SPRR2H verstärkt. Interessanterweise 6Std. nach dem mechanischen Stress war die Genexpression der CE-Proteine Envoplakin (EVPL), Periplakin (PPL) oder Filaggrin2 (FLG2) vermindert, während die Expression von Repetin (RPTN) marginal verstärkt war (vgl. Anhang VIIc) Tabelle 45). Die molekularbiologischen Daten, die im Zuge der Doktorarbeit generiert wurden, zeigten, dass der AhR-KO die Defizienz des AhR durch die verstärkte Genexpression von beispielsweise SPRR Proteine, Keratin 6A und Keratin 16 oder Repetin kompensiert. Die Studie von Sevilla et al. (2007) [206] untersuchte die Auswirkung einer Involucrin, Envoplakin und Periplakin Defizienz auf die murine Haut. Die Analysen der Triple-KO-Mäuse zeigten beispielsweise, dass die neugeborenen Triple-KO Mäuse unter einer Hyperkeratose litten. Außerdem war die Lipidzusammensetzung verändert und die Integrität des CE war betroffen. Sodass der kombinierte Verlust aller drei Gene (Involucrin, Envoplakin und Periplakin) zu einer beeinträchtigen Hautbarriere führte [206]. Eine anderer Erklärungsansatz liegt darin, dass nicht nur der AhR die Genexpression von Hautbarriere-relevanten Genen steuert, sondern auch andere Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise AP1-1 [18] genauer c-Jun/c-Fos, die die Transkription von Genen wie beispielsweise Profilaggrin [78], Loricrin *(LOR)*, Involucrin *(IVL)* und Transglutaminase1 *(TGM1)* steuert [190].

Anhand der Befunde aus der vorliegenden Doktorarbeit sowie den Befunden von Koch et al. (2000) [106] und Sevilla et al. (2007) [206] schlussfolgere ich, dass lebensnotwendige Hautbarriere-relevante Prozesse durch Kompensationsmechanismen abgesichert werden. Wie ausgeprägt sich der Verlust eines Hautbarriere-relevanten Proteins in einem Phänotypen äußert, hängt erstens davon ab, welche andere Proteine und damit verbundene Signalwege mit betroffen sind und zweitens, welche Kompensationsmechanismen vorhanden sind.

2. Der AhR ist ein gutes Zielprotein für die Entwicklung neuer therapeutische Strategie zur Behandlung einer atopischen Dermatitis

Die Haut ist ständig Umweltreizen wie beispielsweise UV-B Strahlung oder Bakterien und Allergenen ausgesetzt, die den Organismus schädigen können. Somit ist die Ausbildung einer effektiven Schutzbarriere für die Haut unerlässlich [siehe [181] für eine Übersicht]. Ist die Funktionalität der Barriere nicht mehr gegeben, können entzündliche Hauterkrankungen entstehen [siehe [189, 181] für eine Übersicht] wie beispielsweise eine atopische Dermatitis (AD) [siehe [7, 121] für eine Übersicht].

Die atopische Dermatitis (AD), auch atopisches Ekzem genannt [siehe [204, 158, 121, 133] für eine Übersicht] ist eine häufige Hautkrankheit, die insbesondere bei Kindern auftritt [siehe[158, 133, 90] für eine Übersicht] . Die Pathogenese ist komplex [siehe [46] für eine Übersicht], aber es wird vermutet, dass die Entstehung der Erkrankung aus einer Kombination von genetischen und umweltbedingten Faktoren sowie Mikroorganismen resultiert [siehe [121, 158] für eine Übersicht]. Anhand einer Zwillingsstudie [231] konnte aufgeklärt werden, dass die Genetik den größeren Risikofaktor (82%) darstellt an einer AD zu erkranken, während

umweltbedingte Faktoren nur ein kleines Risiko (18%) ausmachen [231, 133]. Die Pathogenese einer AD ist multikausal, was eine Kombination von mehreren Therapeutika notwendig macht [siehe [90, 121, 133, 144] für eine Übersicht]. Kennzeichnend für die Pathogenese einer AD ist die mangelhafte Integrität der Hautbarriere, hervorgerufen durch den Funktionsverlust im Filaggrin (FLG) Protein [siehe [46] für eine Übersicht]. In ihrem 2015 veröffentlichen *Review* kommen die Autoren Miyagahi und Sugaya [144] zu dem Schluss, dass *bis dato* keine guten Therapiemöglichkeiten vorhanden sind, um die AD bei Kindern und Erwachsen zu behandeln. Deshalb sollten neue Therapiemöglichkeiten entwickelt werden, deren Schwerpunkt auf der Behandlung der Inflammation sowie der Entgegenwirkung des Juckreizes liegen [siehe [144] für eine Übersicht].

Eine neue Strategie, um eine defekte physikalische Hautbarriere zu stärken, wurde im Zuge der Doktorarbeit entdeckt. Erstmalig konnte gezeigt werden, dass durch die orale Gabe von I3C, ein pflanzlicher AhR-Liganden-Vorläufer, der TEWL nach einer mechanischen Stressung nicht drastisch ansteigt (vgl. Abbildung 53), wie bei den jungen AhR-KO Mäusen beobachtet wurde (vgl. Abbildung 32). Aus den TEWL Daten der beiden langfristigen Fütterungsexperimenten können zwei zentrale Aussagen gemacht werden: Erstens, die frühe orale Gabe von I3C führte dazu, dass die Hautbarriere eine Art "Erinnerungsfunktion" aufbaute (vgl. Abbildung 54). Zweitens, ein erhöhter TEWL einer alternden Hautbarriere kann durch die orale Gabe von I3C verbessert werden (vgl. Abbildung 56 und 57). Diese Daten belegen, dass die physikalische Barriere durch eine diätetische Interventionsstudie mit dem natürlichen AhR-Liganden I3C gestärkt werden kann.

Die Befunde aus der Doktorarbeit eröffnen neue Wege in der Behandlung einer AD, weil i) der AhR für die Integrität der murinen Hautbarriere notwendig ist (vgl. Ergebnisse 3), ii) die Zusammensetzung der Hautflora beeinflusst (vgl. Ergebnisse 4) und iii) die physikalische Hautbarriere über die orale Gabe von I3C gestärkt werden kann (vgl. Ergebnisse 5).

Im Folgenden soll näher erläutert werden, **warum der AhR ein geeignetes** Zielprotein für die Behandlung einer AD darstellt.

Eine bewährte Therapie, um die Symptome einer AD zu lindern, ist die tägliche Applikation von medizinischem Teer. Dennoch konnte erst kürzlich der positive Effekt dieser Therapiemöglichkeit molekularbiologisch aufgeklärt werden. Die im medizinischen Teer enthaltenen AhR-Liganden aktivieren den AhR, der wiederum die Expression von Hautbarriere-relevanten Genen wie Filaggrin *(FLG)* induziert und simultan die inflammatorische TH₂ Antwort unterdrückt, indem der NRF2

Signalweg aktiviert wird [234]. Im gleichen Jahr wurde eine Studie von Otsuka et al. (2013) [162] veröffentlicht, die zeigt, dass die Filaggrin (FLG) Expression über die orale Gabe von JTC801 (=opioide Analgetika [246]) signifikant gesteigert wird und in einer gestärkten physikalischen Hautbarriere resultiert [162]. Eine Stärkung der Hautbarriere, in meinem Fall durch I3C-haltiges Futter, konnte auch in der vorliegenden Doktorarbeit beobachtet werden. Die kontinuierliche orale Gabe von I3C (2g/kg Futter) verhinderte einen drastischen Anstieg des TEWL nach der mechanischen Stressung bei weiblichen C57BL/6 Mäusen (vgl. Abbildungen 53,54,56 und 57). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Filaggrin (FLG) Expression durch eine frühe und kontinuierliche Gabe von I3C gestärkt werden kann (vgl. Abbildung 60b). Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Otsuka et al. (2013) [162] die Substanz JTC801 oral (30 mg/kg) über zwei Wochen verabreicht. Zwei Wochen später wurde der Basal-TEWL (= ohne Belastung) gemessen und eine signifikante Reduktion des TEWLs beobachtet. Eine verstärkte Expression konnte bei Filaggrin (FLG) festgestellt werden, während die Genexpression von Loricrin (LOR), Keratin 10 (KRT10) und Transglutaminase1 (TGM1) durch die orale Gabe von JTC01 nicht verbessert wurde. Aus diesen Daten schlossen die Autoren, dass JTC801 eine selektive Substanz ist, um die Expression von Filaggrin (FLG) zu verbessern [162]. Die generierten Daten aus den beiden Fütterungsexperimenten (vgl. Ergebnisse 5) können in die bestehende Literatur [234, 162] eingeordnet werden. Daraus schließe ich, dass der AhR ein geeignetes Zielprotein ist, um die Hautbarriere zu stärken. Hierbei könnte die präventive Strategie verfolgt werden, die Entstehung einer AD zu verhindern oder zu verzögern, indem die Integrität der physikalischen Hautbarriere gestärkt wird.

Die TEWL Ergebnisse (vgl. Abbildung 53 und 54) sowie die qRT-PCR Daten von Filaggrin (*FLG*) (vgl. Abbildung 60b) zeigten, dass die physikalische Hautbarriere eine "Erinnerungsfunktion" aufbaut, indem der TEWL trotz mechanischer Belastung und keiner oralen Gabe von I3C nicht ansteigt. Das Experiment war so gestaltet, dass die orale Gabe von I3C direkt nach der Trennung von den Elterntieren startet. Die jungen C57BL/6 Mäuse bekamen für drei Monate das I3C über die Nahrung. Nach diesen drei Monaten wurde das I3C aus der Nahrung entfernt. Überraschenderweise, stieg der TEWL bei der dritten und vierten TEWL Kinetik (nach dem Tausch) nach dem mechanischen Stress nicht an (vgl. Abbildung 52 und 54), obwohl die Mäuse seit Wochen kein I3C mehr bekommen haben. Auch bei der Filaggrin (*FLG*) Expression konnte gezeigt werden, dass die Filaggrin (*FLG*) Expression bei der ALD \rightarrow NALD doppelt so hoch war wie bei der NALD \rightarrow ALD Gruppe (vgl. Abbildung 60b). Welches biologische Phänomen steckt hinter diesen Beobachtungen? Eine Möglichkeiten wären epigenetische Modifizierungen in der DNS des Filaggrin Genes. Solche Modifizierungen an der DNS können durch

Faktoren wie beispielsweise der Umwelt oder Ernährung ausgelöst werden [siehe [83] für eine Übersicht]. Eine wichtige epigenetische Modifizierung stellt die (Promoter)-Methylierung dar [siehe [126] für eine Übersicht]. Eine großangelegte epigenomische Studie fand heraus, dass die DNS aus Hautbereichen mit Läsionen ein auffälliges Methylierungsmuster aufwies im Vergleich zur DNS aus Hautbereichen ohne Läsionen [187]. Gene, wie beispielsweise Keratin 6A (*KRT6A*) und Keratin 6B (*KRT6B*) [81, 222] werden durch Methylierungen epigenetisch modifiziert [187]. Die Studie von Luo et al. (2014) [127] zeigte, dass spezifische regulatorische Bereiche im *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)* Gen durch Demethylierungen verändert wurden. Diese Veränderungen führten zur Überexpression von *Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)* in Hautbereichen mit Läsionen bei AD Patienten [127]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) mittels qRT-PCR in den Gruppen ALD \rightarrow NALD und NALD \rightarrow ALD untersucht (vgl. Abbildung 60d). Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (vgl. Abbildung 60d).

Die Daten aus der Literatur [187, 127] legen nahe, dass eine epigenetische Modifizierung von Hautbarriere-relevanten Genen durch I3C möglich wäre. Da epigenetische Modifikationen weitervererbt werden [236], könnte eine orale Gabe von I3C während der Schwangerschaft als präventive Maßnahme verabreicht werden. Dass eine maternale Gabe von I3C präventiv auf die Entstehung von Krankheiten wie beispielsweise Krebs bei den Nachkommen wirkt, konnte in der Vergangenheit schon gezeigt werden [250, 4]. Auf der einen Seite ist bekannt, dass I3C anti-kanzerogene Eigenschaften besitzt [211, 25, 30]. Auf der anderen Seite erhöht die Exposition mit aromatischen Kohlenwasserstoffen während der Trächtigkeit, die beispielsweise beim Rauchen entstehen, das Risiko, dass die Nachkommen an einer Krebserkrankung erkranken. Die Studie von Yu et al. (2006) [250] fand heraus, dass die maternale Gabe von I3C einer durch aromatische Kohlenwasserstoffe induzierten Karzinogenese bei den Nachkommen entgegenwirkt [250]. Anhand dieser Daten kann gesagt werden, dass sich die Effekte von I3C während der Trächtigkeit auf die Nachkommen positiv auswirken. Allerdings muss ein möglicher teratogener Effekt von I3C auf die Embryonen untersucht werden. Während die maternale Gabe von 100mg/kg I3C bei Mausembryonen keine teratogene Effekte auslöste [250, 4], so löste die gleiche Menge bei männlichen Rattenembryonen Anomalien an den Fortpflanzungsorganen aus [243].

Dass die maternale Gabe von I3C positive Effekte bei den Nachkommen auslöst, konnte bereits gezeigt werden [250, 4]. Somit wäre denkbar, dass eine maternale Gabe von I3C präventiv auf die Entstehung einer AD bei den Nachkommen wirkt. Ein möglicher molekularer Mechanismus wäre die epigenetische Modifikation von Hautbarriere-relevanten Genen. Hierfür könnte I3C subkutan [250], in Form einer AhR-Liganden reichen Ernährung [4] oder als Nahrungsergänzungsmittel [siehe [138] für eine Übersicht] verabreicht werden. Der mögliche Erfolg bei den Nachkommen könnte folgendermaßen überprüft werden: Erstens durch die Messung des TEWL. Zweitens können epigenetische Modifikationen auf DNS Ebene nachgewiesen werden. Drittens könnte versucht werden bei den Nachkommen eine AD auszulösen, indem die Rückenhaut mechanisch provoziert wird und einem anschließenden Eintritt eines Allergens [217]. Falls die Strategie der maternalen Gabe von I3C erfolgreich war, so dürften die Nachkommen im Vergleich zur Kontrollgruppe i) keinen erhöhten TEWL aufweisen, ii) ein verändertes epigenetisches Muster haben und iii) keine AD nach der mechanischen Provokation sowie dem Eintritt des Allergens entwickeln.

Allerdings fehlt *bis dato* der Nachweis, dass I3C und seine Metaboliten wie 3,3⁻diindolylmethan (DIM) und Indol[3,2-b]Carbazol (ICZ) die Haut erreichen. Wenige Studien [25, 30, 211] konnten aufzeigen, dass die orale Gabe von I3C einen schützenden Effekt auf die Entstehung bzw. Progression von Hautkrebs ausübt. Aber der direkte Beweis fehlt, dass die Effekte durch I3C und den Metaboliten ausgelöst wurden [25, 30, 211]. In der Literatur wurden zwei Studien [2, 148] gefunden, die I3C und die Metaboliten wie 3,3⁻-diindolylmethan (DIM) im Plasma [2, 148] sowie in der Leber und Niere [148] von Mäusen nachweisen konnten. Daraus ziehe ich den Schluss, dass I3C, aber vor allem die Metaboliten, die Haut über den Blutstrom erreichen und dort den AhR aktivieren können, mit entsprechenden Konsequenzen für die Hautbarriere.

Eine andere therapeutische Strategie, die in dem *Review* von Yesilova et al. (2012) [249] beschrieben wird, ist der Einsatz von Probiotika. Eine schwedische Forschergruppe machte 1997 [132] eine interessante Entdeckung: wurden Kinder, die an einer AD litten, mit einer Lactobacillus GG modifizierten Muttermilchersatznahrung ernährt, so verbesserte sich ihr SCORAD *(Scoring Atopic Dermatitis)* innerhalb eines Monats signifikant. Die Autoren wiesen darauf hin, dass Lactobacillus GG die entzündlichen Reaktionen im Darm verbessert [132]. Seit dieser Studie von Majamaa et al. (1997)[132] wurden zahlreiche weitere Studien [94, 109, 113, 240] zu dieser Thematik veröffentlicht. Allerdings schreiben Meneghin et al. (2012)[138], dass die Ergebnisse kontrovers sind und der Erfolg der Therapie von vielen Faktoren abhängt, wie beispielsweise dem Bakterium, der Dosierung oder der Darreichungsform [94, 109, 113, 240][siehe [249] für eine Übersicht]. Es kann festgehalten werden, dass eine intensive Forschung betrieben wird, die versucht, neue therapeutische Strategien zur Bekämpfung eine AD auf Basis der Ernährung zu entwickeln. Meine Daten eröffnen neue Überlegungen, dass durch AhR-Aktivierung über relevante Nahrungsinhaltsstoffe die Haut erreicht werden kann, um dort die physikalische Hautbarriere zu stärken, vielleicht auch therapeutisch.

Die Idee der probiotischen Supplementation wird auch auf die Haut übertragen. Zur Zeit werden Pflegesalben auf Basis von harmlosen Hautbakterien wie Vitreoscilla filiformis [63] entwickelt [205][siehe [204] für eine Übersicht], um das Gleichgewicht zwischen schützenden und schädlichen Mikroorganismen wiederherzustellen. Es werden immer mehr Befunde gesammelt, die zeigen, dass das Hautmikrobiom von AD Patienten verändert ist [siehe [241, 204, 60] für eine Übersicht]. So fanden beispielsweise Kong und ihre Kollegen [108] heraus, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Verlust der mikrobiellen Diversität und der Pathogenese einer AD existiert. Bei mehr als 90% der AD Patienten werden sowohl die Hautbereiche mit Läsionen als auch die Hautbereiche ohne Läsionen hauptsächlich vom Staphylokokkus aureus (=Firmicutes) besiedelt [108]. Außerdem weist die Haut von AD Patienten eine erhöhte Diversität an Pilzen auf, sowie eine einzigartige Zusammensetzung an anaeroben Bakterien, wie beispielsweise Clostridium und Serratia Spezien [160]. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde das Rückenmikrobiom von den AhR-KO Mäusen und AhR K5-KO Mäusen sowie deren WT-Kontrollen bestimmt. Die Daten zeigten, dass die AhR-KO Mäuse eine komplexere Zusammensetzung an Bakterien aufwiesen (vgl. Abbildung 50). Der prozentuale Anteil der Bakterienstämme (siehe Tabelle 33) zeigte, dass der Bakterienstamm Firmicutes auf den beiden KO-Linien weniger vertreten war im Vergleich zu den WT-Kontrollen. Da der Schweregrad einer AD mit der Überbesiedlung an Staphylokokkus aureus korreliert [108], wäre es weiterhin wichtig zu wissen, wie sich der Verlust bzw. eine Aktivierung des AhR auf das Verhältnis zwischen Staphylokokkus aureus und Staphylokokkus epidermis auswirkt. Denn es wurde herausgefunden, dass sich während eines akuten Schubs bei einer AD auch die Präsenz von Staphylokokkus epidermis erhöht, als Kompensationsmechanismus um der Überbesiedlung an Staphylokokkus aureus entgegenzuwirken [205]. Im Zuge der Doktorarbeit wurde keine Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft vor bzw. nach der Gabe von I3C gemacht. Deshalb sollte dies in nachfolgenden Experimenten nachgeholt werden, weil der Informationsgewinn enorm wäre. Würde sich herausstellen, dass der AhR neben der Verbesserung der physikalischen Integrität der Hautbarriere auch das Gleichgewicht zwischen nützlichen und schädlichen Mikroorganismen wiederherstellt, so könnten zwei wichtige Ursachen mit einem Zielprotein behandelt werden.

V. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass der AhR in Keratinozyten für die Integrität der murinen Hautbarriere notwendig ist. Außerdem weisen die gewonnen Erkenntnisse darauf hin, dass der AhR die Diversität der kutanen mikrobiellen Gemeinschaft moduliert. Interessante Ergebnisse lieferten die Daten der diätetischen Interventionsstudien, die zeigten, dass die physikalische Hautbarriere durch die orale Gabe von dem natürlichen AhR-Liganden I3C gestärkt wird. Während der Durchführung einzelner Experimente sind neue Fragen bzw. Probleme aufgekommen, die im Zuge der Doktorarbeit nicht beantwortet wurden, die aber Gegenstand von weiterführenden Experimenten sein sollten. Neue Fragen, Probleme sowie Lösungsansätze sollen in den nachfolgenden Abschnitten erläutert werden.

Die Kernsequenz, an die der AhR bindet, besitzt die Basenabfolge 5`-GCGTG-3`, die auch in vielen Hautbarriere-relevanten Genen wie Occludin (OCLN) und E-Cadherin (CDH1) gefunden wurden [223]. Der Nachweis, dass der AhR wirklich an diesen putativen DRE-Sequenzen bindet und so die Expression von Occludin (OCLN) und E-Cadherin (CDH1) reguliert, wurde aus zwei Gründen durchgeführt: Erstens, um die generierten Daten der funktionalen (TEWL), der morphologischen (EM-Bilder) sowie der molekularbiologischen (Microarray, qRT-PCR) Untersuchungen verifizieren zu können. Zweitens ist bis heute nur bekannt, dass das Filaggrin Gen (FLG) funktionale DRE-Sequenzen enthält [224]. Die funktionale Analyse der DRE-Sequenzen im Occludin und E-Cadherin Promoter erfolgte mit dem Luziferase-Assay. Bindet der Transkriptionsfaktor an seine entsprechende DNS Sequenz, dann führt die Bindung zu einer Induktion oder Repression der Genexpression [79]. Dies sollte mit einer weiteren Methode wie der Chromatin-Immunpräzipitation (CHIP) oder dem electrophoretic mobility shift assay (EMSA) ergänzt werden, um den endgültigen Beweis zu erbringen, dass der AhR wirklich an die untersuchten DRE-Sequenzen im Occludin sowie E-Cadherin Promoter bindet.

Ein weiteres Phänomen, das in nachfolgenden Experimenten näher untersucht werden sollte, ist, dass die AhR K5-KO Mäuse empfindlicher auf Änderungen in der äußeren Umgebungen reagierten als AhR-KO und AhR LC-KO Mäuse. In der Literatur wird beschrieben, dass jahreszeitliche Veränderungen den Zustand der Haut verändern können [97]. Natürliche Feuchtigkeitsfaktoren wie beispielsweise freie Aminosäuren spielen im Stratum corneum eine kritische Rolle, hinsichtlich der wasserspeichernden Eigenschaften der Haut [183] und sind Metaboliten von Filaggrin [201]. Das Fehlen von freien Aminosäuren resultiert in einer trockenen Haut [228]. So konnte die Studie von Katagiri et al. (2003)[97] eindeutig demonstrieren, dass eine niedrige Luftfeuchtigkeit die Hydration der Haut und die Menge an Aminosäuren reduziert sowie die Lokalisation von Filaggrin verändert [97]. Es ist denkbar, dass die AhR K5-KO Mäuse nicht in der Lage sind die Produktion von freien Aminosäuren an die Luftfeuchtigkeitsveränderungen anzupassen. Grund hierfür könnte ein Fehlen von Filaggrin Abbauprodukte sein, denn Filaggrin (FLG) ist ein Zielgen des AhR [224]. Diese Hypothese sollte in weiterführenden Experimenten überprüft werden. Hierfür könnten die AhR K5-KO Mäuse und deren WT-Kontrollen unter niedrigen und hohen Luftfeuchtigkeiten gehalten werden und anschließend über die Abrisstechnik die Zusammensetzung der freien Aminosäuren bestimmt werden [97].

Im Zuge der Diskussion wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Verlust des AhR durch evolutionäre Kompensationswege überbrückt wird. Die Daten der qRT-PCR (vgl. Abbildung 42) legen nahe, dass in der ungestressten Haut die Expression von Hautbarriere-relevanten Genen wie Occludin *(OCLN)*, kleine Prolin-reiche Proteine *(SPRR)* wie *SPRR2H* oder Keratin 6A *(KRT6A)* und Keratin16 *(KRT16)* verstärkt ist, um den Verlust des AhR zu kompensieren. Diese Vermutung wird durch die Befunde von Loricrin-KO Mäusen [106] sowie den Involucrin, Envoplakin und Periplakin-KO Mäusen [206] bestärkt. Wie aus den EM-Bildern (Abbildung 28) ersichtlich wurde, weist das Stratum corneum der ungestressten AhR-KO Mäuse keine Abnormalitäten auf. Es könnte aber möglich sein, dass sich der Verlust des AhR auf die genaue Zusammensetzung der Lipidmatrix im Stratum corneum auswirkt. Deshalb wäre ein interessanter Ansatz, die genaue Zusammensetzung des *cornified envelops* zu bestimmen, wie unter [80, 106] beschrieben wird. Mit diesen Daten könnte weiterhin geklärt werden, ob nur ein oder mehrere Kompensationswege vorhanden sind. Interessante Einblicke lieferten die Mikrobiomdaten (vgl. Ergebnisteil 5). B*is dato* sind nur murine Hautmikrobiomstudien bekannt, die das Mikrobiom der Ohren untersuchten [200, 151, 59, 197]. Im Laufe der Doktorarbeit ist es mir gelungen, dass Mikrobiom der Rückenhaut von AhR-KO sowie AhR K5-KO Mäusen und deren WT-Kontrollen zu bestimmen. Aus der Literatur ist bekannt, dass es zu interindividuelle Schwankungen in der Zusammensetzung des Mikrobiomes kommt [58, 59][siehe [60] für eine Übersicht]. Dieser Sachverhalt konnte auch bei diesen Mäusen beobachtet werden. Die großen Schwankungen und die geringe Anzahl an Mäusen erschwert die Interpretation der Daten. Deshalb sollten in weiterführenden Experimenten die vorgestellten Daten verifiziert werden, indem die Anzahl an Mäusen erhöht wird.

Im zweiten Teil der Diskussion wurden Befunde vorgestellt, die eindeutig zeigten, dass der AhR ein geeignetes Zielprotein ist, um neue therapeutische Strategien gegen eine AD zu entwickeln. Die vorgezeigten Daten (vgl. Ergebnisteil 5) sind vielversprechend, aber in nachfolgenden Experimenten sollten beide Experimente nochmals wiederholt werden. Während der Wiederholung sollte der I3C Effekt auch auf molekularbiologischer (Transkriptomanalyse, qRT-PCR, Western Blot) und morphologischer Ebene (EM-Bilder, Immunhistochemie) verfolgt werden. Ebenso sollte die interessante Frage aufgeklärt werden, worauf der beobachtete "Erinnerungseffekt" beim Futter-Tausch Experiment zurückzuführen ist (vgl. Abbildung 57). Die vorgestellten Daten aus der Literatur legen nahe, dass epigenetische Modifizierungen wie beispielsweise DNS Methylierungen oder posttranslationale Modifikationen von Histonen [siehe [126] für eine Übersicht] dafür verantwortlich sein können. Derartige Modifikationen lassen sich experimentell nachweisen.

Generell wurde hier zum ersten Mal eine *in vivo* Charakterisierung der murinen AhR-defizienten Haut vorgenommen. Diese Charakterisierung deckte auf, dass der AhR in die Integrität der murinen Hautbarriere involviert ist. Weiterhin ist möglich, dass der AhR die mikrobielle Diversität der Haut moduliert sowie ein geeignetes Zielprotein für neue, innovative Therapien zur Stärkung der Hautbarriere ist. Medizinisch könnte dies für Erkrankungen wie die atopische Dermatitis, die mit Störungen der Hautbarriere einhergeht, hochrelevant sein. Aber der Ausblick zeigt auch, dass mit der Doktorarbeit der Grundstein für weiterführende Projekte gelegt wurde und dass einige der aufgestellten Thesen noch endgültig bewiesen werden müssen.

VI. Literaturverzeichnis

[1] Adachi, J.; Mori, Y.; Matsui, S.; Takigami, H.; Fujino, J.; Kitagawa, H.; Miller, C. A., 3rd; Kato, T.; Saeki, K.; Matsuda, T. (2001). <u>"Indirubin and indigo</u> are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine". J Biol Chem, <u>276</u>, 31475-31478.

[2] Anderton, M. J.; Jukes, R.; Lamb, J. H.; Manson, M. M.; Gescher, A.; Steward, W. P.; Williams, M. L. (2003). "Liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of indole-3-carbinol and its acid condensation products in plasma". J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, <u>787</u>, 281-291.

[3] **Bacsi, S. G.; Reisz-Porszasz, S.; Hankinson, O.** (1995). "Orientation of the heterodimeric aryl hydrocarbon (dioxin) receptor complex on its asymmetric DNA recognition sequence". Mol Pharmacol, <u>47</u>, 432-438.

[4] Bailey, M. M.; Sawyer, R. D.; Behling, J. E.; Boohaker, J. G.; Hicks, J. G.; O'Donnell M, A.; Stringer, K. R.; Rasco, J. F.; Hood, R. D. (2005). <u>"Prior exposure</u> to indole-3-carbinol decreases the incidence of specific cyclophosphamide-induced <u>developmental defects in mice</u>". Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, <u>74</u>, 261-267.

[5] **Baker, H.; Kligman, A. M.** (1967). <u>"Measurement of transepidermal water loss</u> by electrical hygrometry. Instrumentation and responses to physical and chemical <u>insults"</u>. Arch Dermatol, <u>96</u>, 441-452.

[6] Bechtel, M.; Keller, M. V.; Bloch, W.; Sasaki, T.; Boukamp, P.; Zaucke,
F.; Paulsson, M.; Nischt, R. (2012). "Different domains in nidogen-1 and nidogen-2 drive basement membrane formation in skin organotypic cocultures". FASEB J, 26, 3637-3648.

[7] **Bieber, T.** (2008). <u>"Atopic dermatitis"</u>. N Engl J Med, <u>358</u>, 1483-1494.

[8] Biljes, D.; Hammerschmidt-Kamper, C.; Kadow, S.; Diel, P.; Weigt, C.; Burkart, V.; Esser, C. (2015). <u>"Impaired glucose and lipid metabolism in ageing aryl</u> <u>hydrocarbon receptor deficient mice"</u>. EXCLI J, <u>14</u>, 1153-1163.

[9] **Blanpain, C.; Fuchs, E.** (2006). <u>"Epidermal stem cells of the skin"</u>. Annu Rev Cell Dev Biol, <u>22</u>, 339-373.

[10] **Bolstad, B. M.; Irizarry, R. A.; Astrand, M.; Speed, T. P.** (2003).<u>"A</u> comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias". Bioinformatics, <u>19</u>, 185-193.

[11] Bonetta, Laura (2006). "Genome sequencing in the fast lane". Nature Methods,
 <u>3</u>.

[12] **Bustin, S. A.** (2000). <u>"Absolute quantification of mRNA using real-time reverse</u> <u>transcription polymerase chain reaction assays"</u>. J Mol Endocrinol, <u>25</u>, 169-193.

[13] **Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G.** (2005). <u>"The cornified envelope: a model of</u> <u>cell death in the skin"</u>. Nat Rev Mol Cell Biol, <u>6</u>, 328-340.

[14] **Carver, L. A.; Bradfield, C. A.** (1997). "Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo". J Biol Chem, 272, 11452-11456.

[15] **Carver, L. A.; Jackiw, V.; Bradfield, C. A.** (1994).<u>"The 90-kDa heat shock</u> protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system". J Biol Chem, <u>269</u>, 30109-30112.

[16] Carver, L. A.; LaPres, J. J.; Jain, S.; Dunham, E. E.; Bradfield, C. A. (1998). <u>"Characterization of the Ah receptor-associated protein, ARA9"</u>. J Biol Chem, 273, 33580-33587.

[17] **Charlotte, Pooler** (2009).<u>"Porth Pathophysiology: Concepts of Altered Health</u> <u>States"</u>. Lippincott Williams & Wilkins.

[18] Chavanas, S.; Adoue, V.; Mechin, M. C.; Ying, S.; Dong, S.; Duplan, H.; Charveron, M.; Takahara, H.; Serre, G.; Simon, M. (2008). "Long-range enhancer associated with chromatin looping allows AP-1 regulation of the peptidylarginine deiminase 3 gene in differentiated keratinocyte". PLoS one, <u>3</u>, e3408.

[19] Chen, J.; Bittinger, K.; Charlson, E. S.; Hoffmann, C.; Lewis, J.; Wu, G.
 D.; Collman, R. G.; Bushman, F. D.; Li, H. (2012). "Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances". Bioinformatics, <u>28</u>, 2106-2113.

[20] Chilcott, R. P.; Dalton, C. H.; Emmanuel, A. J.; Allen, C. E.; Bradley, S.
T. (2002). <u>"Transepidermal water loss does not correlate with skin barrier function in vitro"</u>. J Invest Dermatol, <u>118</u>, 871-875.

[21] **Chomczynski, P.; Sacchi, N.** (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". Anal Biochem, <u>162</u>, 156-159.

[22] **Christoph, Zink** (1998). <u>"Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch"</u>, Willibald Psychrembel.

[23] **Clausen, B. E.; Stoitzner, P.** (2015). <u>"Functional Specialization of Skin</u> <u>Dendritic Cell Subsets in Regulating T Cell Responses"</u>. Front Immunol, <u>6</u>, 534.

[24] **Colonna, M.** (2014). <u>"AHR: making the keratinocytes thick skinned"</u>. Immunity, <u>40</u>, 863-864.

[25] **Cope, R. B.; Loehr, C.; Dashwood, R.; Kerkvliet, N. I.** (2006). <u>"Ultraviolet</u> radiation-induced non-melanoma skin cancer in the Crl:SKH1:hr-BR hairless mouse: augmentation of tumor multiplicity by chlorophyllin and protection by indole-3carbinol". Photochem Photobiol Sci, <u>5</u>, 499-507.

[26] Costanzo, A.; Fausti, F.; Spallone, G.; Moretti, F.; Narcisi, A.; Botti, E.
(2015). "Programmed cell death in the skin". Int J Dev Biol, <u>59</u>, 73-78.

[27] **Coumailleau, P.; Poellinger, L.; Gustafsson, J. A.M Whitelaw, M. L.** (1995). <u>"Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with</u> <u>Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity"</u>. J Biol Chem, <u>270</u>, 25291-25300.

[28] **Cox, M. B.; Miller, C. A., 3rd** (2004). "Cooperation of heat shock protein 90 and p23 in aryl hydrocarbon receptor signaling". Cell Stress Chaperones, <u>9</u>, 4-20.

[29] **D., Klein** (2002). "Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations". Trends MOl Med., 8, 257-260.

[30] **Dahler, A. L.; Rickwood, D.; Guminski, A.; Teakle, N.; Saunders, N. A.** (2007).<u>"Indole-3-carbinol - induced growth inhibition can be converted to a cytotoxic response in the presence of TPA+Ca(2+) in squamous cell carcinoma cell lines"</u>. FEBS Lett, <u>581</u>, 3839-3847.

[31] **Dale, O.; Brown, B. R., Jr.** (1987). "*Clinical pharmacokinetics of the inhalational anaesthetics*". *Clinical Pharmacokinetics*, <u>12</u>, 145-167.

[32] Das, D. N.; Panda, P. K.; Mukhopadhyay, S.; Sinha, N.; Mallick, B.; Behera, B.; Maiti, T. K.; Bhutia, S. K. (2014). "Prediction and validation of apoptosis through cytochrome P450 activation by benzo[a]pyrene". Chem Biol Interact, 208, 8-17.

[33] **Daston, R.J. Kavlock and G.P.** (1997). <u>"Drug Toxicity in Embryonic</u> <u>Development II - Advances in Understanding Mechanisms of Birth Defects:</u> <u>Mechanistic Understanding of Human Developmental Toxicants"</u>. Springer Berlin Heidelberg New York.

[34] Demehri, S.: Liu, Z.; Lee, J.; Lin, M. H.; Crosby, S. D.; Roberts, C. J.; Grigsby, P. W.; Miner, J. H.; Farr, A. G.; Kopan, R. (2008).<u>"Notch-deficient skin</u> induces a lethal systemic *B*-lymphoproliferative disorder by secreting *TSLP*, a sentinel for epidermal integrity". PLoS Biol, <u>6</u>, e123.

[35] **Denis, M.; Cuthill, S.; Wikstrom, A. C.; Poellinger, L.; Gustafsson, J. A.** (1988). <u>"Association of the dioxin receptor with the Mr 90,000 heat shock protein: a structural kinship with the glucocorticoid receptor"</u>. Biochem Biophys Res Commun, <u>155</u>, 801-807.

[36] **Denison, M. S.; Nagy, S. R.** (2003). <u>"Activation of the aryl hydrocarbon</u> receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals". Annu Rev Pharmacol Toxicol, <u>43</u>, 309-334.

[37] Denison, M. S.; Pandini, A.; Nagy, S. R.; Baldwin, E. P.; Bonati, L.
(2002). "Ligand binding and activation of the Ah receptor". Chem Biol Interact, 141, 3-24.

[38] **Denison, M. S.; Soshilov, A. A.; He, G.; DeGroot, D. E.; Zhao, B.** (2011). <u>"Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular</u> <u>mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor</u>". Toxicol Sci, <u>124</u>, 1-22.

[39] Di Meglio, P.; Duarte, J. H.; Ahlfors, H.; Owens, N. D.; Li, Y.; Villanova,
F.; Tosi, I.; Hirota, K.; Nestle, F. O.; Mrowietz, U.; Gilchrist, M. J.; Stockinger,
B. (2014). "Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions". Immunity, 40, 989-1001.

[40] **Dolwick, K. M.; Swanson, H. I.; Bradfield, C. A.** (1993).<u>"In vitro analysis of</u> <u>Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition"</u>. Proc Natl Acad Sci USA, <u>90</u>, 8566-8570.

[41] **El-Rifaie, A. A.; Rashed, L. A.; Doss, R. W.** (2015).<u>"The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the pathogenesis of cutaneous lichen planus"</u>. Clin Exp Dermatol, <u>40</u>, 903-907.

[42] Elias, P. M. (1983). "*Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*". J Invest Dermatol, <u>80 Suppl</u>, 44s-49s.

[43] Escobar-Chavez, J. J.; Merino-Sanjuan, V.; Lopez-Cervantes, M.; Urban-Morlan, Z.; Pinon-Segundo, E.; Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A.
(2008). "The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin". J Pharm Pharm Sci, <u>11</u>, 104-130.

[44] **Esser, C.; Rannug, A.** (2015). <u>"The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ</u> <u>physiology, immunology, and toxicology"</u>. Pharmacol Rev, <u>67</u>, 259-279.

[45] **Esser, C.; Rannug, A.; Stockinger, B.** (2009). <u>"The aryl hydrocarbon receptor</u> <u>in immunity"</u>. Trends Immunol, <u>30</u>, 447-454.

[46] **Eyerich, K.; Novak, N.** (2013). "*Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm*". Allergy, <u>68</u>, 974-982.

[47] Fernandez-Salguero, P. M.; Hilbert, D. M.; Rudikoff, S.; Ward, J. M.; Gonzalez, F. J. (1996). <u>"Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to</u> <u>2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity"</u>. Toxicol Appl Pharmacol, <u>140</u>, 173-179. [48] **Fernandez-Salguero, P. M.; Ward, J. M.; Sundberg, J. P.; Gonzalez, F. J.** (1997). "Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice". Vet Pathol, <u>34</u>, 605-614.

[49] Fernandez-Salguero, P.; Pineau, T.; Hilbert, D. M.; McPhail, T.; Lee, S. S.; Kimura, S.; Nebert, D. W.; Rudikoff, S.; Ward, J. M.; Gonzalez, F. J. (1995).<u>"Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxinbinding Ah receptor"</u>. Science, <u>268</u>, 722-726.

[50] **Fuchs, E.; Segre, J. A.** (2000). <u>"Stem cells: a new lease on life"</u>. Cell, <u>100</u>, 143-155.

[51] **Fukunaga, B. N.; Probst, M. R.; Reisz-Porszasz, S.; Hankinson, O.** (1995). <u>"Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor"</u>. J Biol Chem, <u>270</u>, 29270-29278.

[52] **Furness, S. G.; Lees, M. J.; Whitelaw, M. L.** (2007). <u>"The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors"</u>. FEBS Lett, <u>581</u>, 3616-3625.

[53] Furue, M.; Tsuji, G.; Mitoma, C.; Nakahara, T.; Chiba, T.; Morino-Koga, S.; Uchi, H. (2015). "Gene regulation of filaggrin and other skin barrier proteins via aryl hydrocarbon receptor". J Dermatol Sci.

[54] **Furuse, M.; Hata, M.; Furuse, K.; Yoshida, Y.; Haratake, A.; Sugitani, Y.; Noda, T.; Kubo, A.; Tsukita, S.** (2002). <u>"Claudin-based tight junctions are crucial for</u> <u>the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice"</u>. J Cell Biol, <u>156,</u> 1099-1111.

[55] **G., Menon** (2002). "*New insights into skin structure: Scratching the surface*". *Advanced Drug Delivery Reviews*, <u>54</u>.

[56] Ghadially, R.; Brown, B. E.; Sequeira-Martin, S. M.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. (1995).<u>"The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional,</u> and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model". J Clin Invest, <u>95</u>, 2281-2290.

[57] **Giancoli, Douglas C.** (2009). <u>"Physik - Lehr und Übungsbuch"</u>. PEARSON STUDIUM, <u>3., erweiterte Auflage</u>.

[58] Grice, E. A.; Kong, H. H.; Conlan, S.; Deming, C. B.; Davis, J.; Young, A.
C.; Bouffard, G. G.; Blakesley, R. W.; Murray, P. R.; Green, E. D.; Turner, M. L.;
Segre, J. A. (2009). "Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome". Science, <u>324</u>, 1190-1192.

[59] Grice, E. A.; Kong, H. H.; Renaud, G.; Young, A. C.; Bouffard, G. G.; Blakesley, R. W.; Wolfsberg, T. G.; Turner, M. L.; Segre, J. A. (2008). <u>"A diversity</u> profile of the human skin microbiota". Genome Res, <u>18</u>, 1043-1050. [60] **Grice, E. A.; Segre, J. A.** (2011). <u>"The skin microbiome"</u>. Nat Rev Microbiol, <u>9</u>, 244-253.

[61] **Gu, H.; Marth, J. D.; Orban, P. C.; Mossmann, H.; Rajewsky, K.** (1994). <u>"Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting</u>". Science, <u>265</u>, 103-106.

[62] **Gu, Y. Z.; Hogenesch, J. B.; Bradfield, C. A.** (2000).<u>"The PAS superfamily:</u> <u>sensors of environmental and developmental signals</u>". Annu Rev Pharmacol Toxicol, <u>40</u>, 519-561.

[63] **Gueniche, A., Knaudt, B., Schuck, E., et al.** (2008). <u>"Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium Vitreoscilla filiformis lysate on atopic dermatitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study". Br J Dermatol, <u>159</u>, 1357-1363.</u>

[64] Guo, J. W.; Lin, T. K.; Wu, C. H.; Wei, K. C.; Lan, C. C.; Peng, A. C.; Tsai, J. C.; Sheu, H. M. (2015).<u>"Human sebum extract induces barrier disruption and cytokine expression in murine epidermis"</u>. J Dermatol Sci, <u>78</u>, 34-43.

[65] **Hahn, M. E.** (2002).<u>"Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution"</u>. Chem Biol Interact, <u>141</u>, 131-160.

[66] Hahn, M. E.; Karchner, S. I.; Shapiro, M. A.; Perera, S. A. (1997). "Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family". Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 13743-13748.

[67] Hoess, R. H.; Ziese, M.; Sternberg, N. (1982). <u>"P1 site-specific recombination:</u> <u>nucleotide sequence of the recombining sites"</u>. Proc Natl Acad Sci U S A, <u>79</u>, 3398-3402.

[68] Hoffman, E. C.; Reyes, H.; Chu, F. F.; Sander, F.; Conley, L. H.; Brooks,
B. A.; Hankinson, O. (1991). "Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor". Science, 252, 954-958.

[69] Hoffmann, A. R.; Proctor, L. M.; Surette, M. G.; Suchodolski, J. S. (2016). "*The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals*". Vet Pathol, 53, 10-21.

[70] **Holladay, Steven D.** (2005). <u>"Developmental Immuntoxicology"</u>. CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C.

[71] Honma, Y.; Arai, I.; Hashimoto, Y.; Futaki, N.; Sugimoto, M.; Tanaka, M.; Nakaike, S. (2005). "Prostaglandin D2 and prostaglandin E2 accelerate the recovery of cutaneous barrier disruption induced by mechanical scratching in mice". Eur J Pharmacol, <u>518</u>, 56-62. [72] Huber, M.; Rettler, I.; Bernasconi, K.; Frenk, E.; Lavrijsen, S. P.; Ponec, M.; Bon, A; Lautenschlager, S.; Schorderet, D. F.; Hohl, D. (1995). <u>"Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis"</u>. Science, <u>267</u>, 525-528.

[73] Huber, M.; Yee, V. C.; Burri, N.; Vikerfors, E.; Lavrijsen, A. P.; Paller, A.
S.; Hohl, D. (1997). "Consequences of seven novel mutations on the expression and structure of keratinocyte transglutaminase". J Biol Chem, <u>272</u>, 21018-21026.

[74] **Ikuta, T.; Eguchi, H.; Tachibana, T.; Yoneda, Y.; Kawajiri, K.** (1998). "Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor". J Biol Chem, <u>273</u>, 2895-2904.

[75] Imhof, R. E.; De Jesus, M. E.; Xiao, P.; Ciortea, L. I.; Berg, E. P. (2009). <u>"Closed-chamber transepidermal water loss measurement: microclimate, calibration and performance"</u>. Int J Cosmet Sci, <u>31</u>, 97-118.

[76] Ito, S.; Chen, C.; Satoh, J.; Yim, S.; Gonzalez, F. J. (2007). <u>"Dietary</u> phytochemicals regulate whole-body CYP1A1 expression through an arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-dependent system in gut". J Clin Invest, <u>117</u>, 1940-1950.

[77] Janeway Charles A., Travers Paul, Wolport Mark and Shlomchik Mark
 (2002). <u>"Immunologie"</u>, SPEKTRUM - Akademischer Verlag Gustav Fischer.

[78] Jang, S. I.; Steinert, P. M.; Markova, N. G. (1996). "Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene". J Biol Chem, 271, 24105-24114.

[79] **Jansohn M., Rothhämel S.** (2012). <u>"Gentechnische Methoden - Eine</u> <u>Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor"</u>, SPEKTRUM -Akademischer Verlag Gustav Fischer 5. Auflage.

[80] Jarnik, M.; de Viragh, P. A.; Scharer, E.; Bundman, D.; Simon, M. N.; Roop, D. R.; Steven, A. C. (2002). "Quasi-normal cornified cell envelopes in loricrin knockout mice imply the existence of a loricrin backup system". J Invest Dermatol, 118, 102-109.

[81] Jarzab, J.; Filipowska, B.; Zebracka, J.; Kowalska, M.; Bozek, A.; Rachowska, R.; Gubala, E.; Grzanka, A.; Hadas, E.; Jarzab, B. (2010). <u>"Locus</u> 1q21 Gene expression changes in atopic dermatitis skin lesions: deregulation of small proline-rich region 1A". Int Arch Allergy Immunol, <u>151</u>, 28-37.

[82] **Jeon, S.; Djian, P.; Green, H.** (1998). "Inability of keratinocytes lacking their specific transglutaminase to form cross-linked envelopes: absence of envelopes as a simple diagnostic test for lamellar ichthyosis". Proc Natl Acad Sci U S A, <u>95</u>, 687-690.

[83] **Jirtle, R. L.; Skinner, M. K.** (2007). <u>"Environmental epigenomics and disease</u> <u>susceptibility"</u>. Nat Rev Genet, <u>8</u>, 253-262.

[84] **Jones, E. L.; Krizek, H.** (1962). <u>"A technic for testing acegenic potency in</u> rabbits, applied to the potent acnegen, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin". J Invest Dermatol, <u>39</u>, 511-517.

[85] **Jones, S.** (2004). <u>"An overview of the basic helix-loop-helix proteins"</u>. Genome Biol, <u>5</u>, 226.

[86] Ju, Q.; Zouboulis, C. C.; Xia, L. (2009). <u>"Environmental pollution and acne:</u> <u>Chloracne"</u>. Dermatoendocrinol, <u>1</u>, 125-128.

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

[88] Jux, B.; Kadow, S.; Luecke, S.; Rannug, A.; Krutmann, J.; Esser, C. (2011). <u>"The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning"</u>. *J Invest Dermatol*, <u>131</u>, 203-210.

[89] **K.H., Kimmig J.; Schulz** (1957). "Berufliche Akne (sog. Chlorakne) durch chlorierte aromatische zyklische Äther". Dermatology, <u>115</u>.

[90] **Kabashima, K.** (2013).<u>"New concept of the pathogenesis of atopic dermatitis:</u> interplay among the barrier, allergy, and pruritus as a trinity". J Dermatol Sci, <u>70</u>, 3-11.

[91] Kadow, S.; Jux, B.; Zahner, S. P.; Wingerath, B.; Chmill, S.; Clausen, B. E.; Hengstler, J.; Esser, C. (2011).<u>"Aryl hydrocarbon receptor is critical for</u> homeostasis of invariant gammadelta T cells in the murine epidermis". J Immunol, 187, 3104-3110.

[92] Kalinin, A. E.; Kajava, A. V.; Steinert, P. M. (2002). "Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope". Bioessays, 24, 789-800.

[93] Kalinin, A.; Marekov, L. N.; Steinert, P. M. (2001). "Assembly of the epidermal cornified cell envelope". J Cell Sci, 114, 3069-3070.

[94] Kalliomaki, M.; Salminen, S.; Arvilommi, H.; Kero, P.; Koskinen, P.; Isolauri, E. (2001). <u>"Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial"</u>. Lancet, <u>357</u>, 1076-1079.

[95] Kang, M. J.; Eum, J. Y.; Park, S. H.; Kang, M. H.; Park, K. H.; Choi, S. E.; Lee, M. W.; Kang, K. H.; Oh, C. H.; Choi, Y. W. (2010). <u>"Pep-1 peptide-conjugated</u> elastic liposomal formulation of taxifolin glycoside for the treatment of atopic <u>dermatitis in NC/Nga mice"</u>. Int J Pharm, <u>402</u>, 198-204. [96] **Karas, Richard E. Fish; Marilyn J. Brown; Peggy J. Anneman; Alicia Z.** (1997).<u>"Anesthesia and Analgesia in Laboratory animals"</u>. American College of Laboratory Animal Medicine Series, <u>2ND Edition</u>.

[97] **Katagiri, C.; Sato, J.; Nomura, J.; Denda, M.** (2003). <u>"Changes in</u> <u>environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and</u> <u>its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless</u> <u>mice"</u>. J Dermatol Sci, <u>31</u>, 29-35.

[98] **Kazlauskas, A.; Sundstrom, S.; Poellinger, L.; Pongratz, I.** (2001).<u>"The</u> <u>hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor"</u>. *Mol Cell Biol*, <u>21</u>, 2594-2607.

[99] Kennedy, L. H.; Sutter, C. H.; Leon Carrion, S.; Tran, Q. T.; Bodreddigari, S.; Kensicki, E.; Mohney, R. P.; Sutter, T. R. (2013).<u>"2,3,7,8-</u> Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated production of reactive oxygen species is an essential step in the mechanism of action to accelerate human keratinocyte differentiation". Toxicol Sci, 132, 235-249.

[100] **Kessler, Waltraud** (2007). <u>"Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio-und Prozessanalytik "</u>. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

[101] Kewley, R. J.; Whitelaw, M. L.; Chapman-Smith, A. (2004).<u>"The</u> mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators". Int J Biochem Cell Biol, <u>36</u>, 189-204.

[102] **Khavari, P. A.** (2006). "Modelling cancer in human skin tissue". Nat Rev Cancer, <u>6</u>, 270-280.

[103] Kim, H. O.; Kim, J. H.; Chung, B. Y.; Choi, M. G.; Park, C. W. (2014). "Increased expression of the aryl hydrocarbon receptor in patients with chronic inflammatory skin diseases". Exp Dermatol, 23, 278-281.

[104] Kiss, E. A., Vonarbourg, C., Kopfmann, S., Hobeika, E., Finke, D., Esser, C., Diefenbach, A. (2011). "*Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles*". Science, <u>334</u>, 1561-1565.

[105] **Knutson, J. C.; Poland, A.** (1982). <u>"Response of murine epidermis to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: interaction of the ah and hr loci</u>". *Cell*, <u>30</u>, 225-234.

[106] Koch, P. J.; de Viragh, P. A.; Scharer, E.; Bundman, D.; Longley, M. A.; Bickenbach, J.; Kawachi, Y.; Suga, Y.; Zhou, Z.; Huber, M.; Hohl, D.; Kartasova, T.; Jarnik, M.; Steven, A. C.; Roop, D. R. (2000). "Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein". J Cell Biol, 151, 389-400. [107] Kolarsick, P.A.J.; Kolarsick, M.A.; Goodwin, C. (2005). <u>"Anatomy an</u> <u>Physiology of the Skin"</u>. Dermatology nursing/ Dermatology Nurses Association, <u>17</u>, 62.

[108] Kong, H. H.; Oh, J.; Deming, C.; Conlan, S.; Grice, E. A.; Beatson, M. A.;
Nomicos, E.; Polley, E. C.; Komarow, H. D.; Murray, P. R.; Turner, M. L.; Segre,
J. A. (2012). "Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis". Genome Res, 22, 850-859.

[109] **Kopp, M. V.; Hennemuth, I.; Heinzmann, A.; Urbanek, R.** (2008). <u>"Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary</u> <u>prevention: no clinical effects of Lactobacillus GG supplementation</u>". Pediatrics, <u>121</u>, e850-856.

 [110] Koster, M. I.; Dai, D.; Marinari, B.; Sano, Y.; Costanzo, A.; Karin, M.;
 Roop, D. R. (2007). <u>"p63 induces key target genes required for epidermal</u> <u>morphogenesis"</u>. Proc Natl Acad Sci U S A, <u>104</u>, 3255-3260.

[111] Koster, M. I.; Roop, D. R. (2007). <u>"Mechanisms regulating epithelial</u> <u>stratification"</u>. Annu Rev Cell Dev Biol, <u>23</u>, 93-113.

[112] Kottner, J.; Lichterfeld, A.; Blume-Peytavi, U. (2013). "Transepidermal water loss in young and aged healthy humans: a systematic review and metaanalysis". Arch Dermatol Res, 305, 315-323.

[113] Kukkonen, K.; Savilahti, E.; Haahtela, T.; Juntunen-Backman, K.; Korpela, R.; Poussa, T.; Tuure, T.; Kuitunen, M. (2007). <u>"Probiotics and prebiotic</u> galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, doubleblind, placebo-controlled trial". J Allergy Clin Immunol, <u>119</u>, 192-198.

[114] Kumar, M. B.; Ramadoss, P.; Reen, R. K.; Vanden Heuvel, J. P.; Perdew,
G. H. (2001). "The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity". J Biol Chem, <u>276</u>, 42302-42310.

[115] **Kundu, P.; Pettersson, S.** (2014). "*Immunology: Mammalian watchdog targets* bacteria". Nature, <u>512</u>, 377-378.

[116] Lambert, R. W.; Campton, K.; Ding, W.; Ozawa, H.; Granstein, R. D. (2002). "Langerhans cell expression of neuropeptide Y and peptide YY". Neuropeptides, <u>36</u>, 246-251.

[117] **Lang, Gudrun** (2013). <u>"Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische</u> <u>Analytik"</u>, SpringerWienNewYork.

[118] Lederberg, J.; McCray, A. (2001).<u>"Ome sweet `omics: -- A genealogical</u> treasury of words". The Scientist, <u>15:8</u>. [119] **Lewandoski, M.** (2001). <u>"Conditional control of gene expression in the mouse"</u>. Nat Rev Genet, <u>2</u>, 743-755.

[120] Li, Y., Innocentin, S., Withers, D. R., et al. (2011). "Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation". Cell, 147, 629-640.

[121] Liang, Y.; Chang, C.; Lu, Q. (2015).<u>"The Genetics and Epigenetics of Atopic</u> <u>Dermatitis-Filaggrin and Other Polymorphisms"</u>. Clin Rev Allergy Immunol.

[122] Little, C. C.; Cloudman, A. M. (1937). "The Occurrence of a Dominant Spotting Mutation in the House Mouse". Proc Natl Acad Sci U S A, 23, 535-537.

[123] **Livak, K. J.; Schmittgen, T. D.** (2001).<u>"Analysis of relative gene expression</u> <u>data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method"</u>. Methods, <u>25</u>, 402-408.

[124] Loertscher, J. A.; Lin, T. M.; Peterson, R. E.; Allen-Hoffmann, B. L. (2002). <u>"In utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes accelerated terminal differentiation in fetal mouse skin"</u>. Toxicol Sci, <u>68</u>, 465-472.

[125] Loertscher, J. A.; Sattler, C. A.; Allen-Hoffmann, B. L. (2001). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters the differentiation pattern of human keratinocytes in organotypic culture". Toxicol Appl Pharmacol, <u>175</u>, 121-129.

[126] Lowdon, R. F.; Jang, H. S.; Wang, T. (2016). "Evolution of Epigenetic Regulation in Vertebrate Genomes". Trends Genet.

[127] **Luo, Y.; Zhou, B.; Zhao, M.; Tang, J.; Lu, Q.** (2014). <u>"Promoter demethylation</u> contributes to TSLP overexpression in skin lesions of patients with atopic dermatitis". *Clin Exp Dermatol,* <u>39</u>, 48-53.

[128] Lusska, A.; Shen, E.; Whitlock, J. P., Jr. (1993). <u>"Protein-DNA interactions at</u> a dioxin-responsive enhancer. Analysis of six bona fide DNA-binding sites for the liganded Ah receptor". J Biol Chem, <u>268</u>, 6575-6580.

[129] **Ma, Q.; Whitlock, J. P., Jr.** (1997). <u>"A novel cytoplasmic protein that interacts</u> with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin". J Biol Chem, <u>272</u>, 8878-8884.

[130] **Madison, K. C.** (2003). "Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the <u>epidermis</u>". J Invest Dermatol, <u>121</u>, 231-241.

[131] Magiatis, P.; Pappas, P.; Gaitanis, G.; Mexia, N.; Melliou, E.; Galanou, M.;
Vlachos, C.; Stathopoulou, K.; Skaltsounis, A. L.; Marselos, M.; Velegraki, A.;
Denison, M. S.; Bassukas, I. D. (2013). "Malassezia yeasts produce a collection of

exceptionally potent activators of the Ah (dioxin) receptor detected in diseased human skin". J Invest Dermatol, 133, 2023-2030.

[132] **Majamaa, H.; Isolauri, E.** (1997). <u>"Probiotics: a novel approach in the</u> management of food allergy". J Allergy Clin Immunol, <u>99</u>, 179-185.

[133] **Malajian, D.; Guttman-Yassky, E.** (2015). "*New pathogenic and therapeutic paradigms in atopic dermatitis*". Cytokine, 73, 311-318.

[134] **Mansour, S. L.; Thomas, K. R.; Capecchi, M. R.** (1988). <u>"Disruption of the</u> proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes". Nature, <u>336</u>, 348-352.

[135] **Matsui, T.; Amagai, M.** (2015). "*Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum*". Int Immunol, 27, 269-280.

[136] Matsuki, M.; Yamashita, F.; Ishida-Yamamoto, A.; Yamada, K.; Kinoshita, C.; Fushiki, S.; Ueda, E.; Morishima, Y.; Tabata, K.; Yasuno, H.; Hashida, M.; Iizuka, H.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Kondoh, G.; Kinoshita, T.; Takeda, J.; Yamanishi, K. (1998). "Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase)". Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 1044-1049.

[137] **May, G.** (1973). <u>"Chloracne from the accidental production of</u> <u>tetrachlorodibenzodioxin"</u>. Br J Ind Med, <u>30</u>, 276-283.

[138] **Meneghin, F.; Fabiano, V.; Mameli, C.; Zuccotti, G. V.** (2012). <u>"Probiotics</u> and atopic dermatitis in children". Pharmaceuticals (Basel), <u>5</u>, 727-744.

[139] **Meves, Alexander** (2006). <u>"Intensivkurs Dermatologie"</u>. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München.

[140] **Meyer, B. K.; Pray-Grant, M. G.; Vanden Heuvel, J. P.; Perdew, G. H.** (1998). <u>"Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl</u> *hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity"*. *Mol Cell Biol,* <u>18</u>, 978-988.

[141] **Milnes, M. H.** (1971). *"Formation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin by thermal decomposition of sodium 2,4,5,-trichlorophenate"*. Nature, <u>232</u>, 395-396.

[142] Mimura, J.; Yamashita, K.; Nakamura, K.; Morita, M.; Takagi, T. N.; Nakao, K.; Ema, M.; Sogawa, K.; Yasuda, M.; Katsuki, M.; Fujii-Kuriyama, Y. (1997). "Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor". Genes Cells, 2, 645-654.

[143] Mingeot-Leclercq, M. P.; Glupczynski, Y.; Tulkens, P. M. (1999). <u>"Aminoglycosides: activity and resistance"</u>. Antimicrob Agents Chemother, <u>43</u>, 727-737. [144] **Miyagaki, T.; Sugaya, M.** (2015).<u>"Recent advances in atopic dermatitis and</u> *psoriasis: genetic background, barrier function, and therapeutic targets*". J Dermatol Sci, <u>78</u>, 89-94.

[145] Moll, Ingrid (2010). "Duale Reihe - Dermatologie". Thieme Verlag, 7. Auflage.

[146] Morgan, X. C.; Huttenhower, C. (2012). "Chapter 12: Human microbiome analysis". PLoS Comput Biol, <u>8</u>, e1002808.

[147] Morgenstern, V.; Zutavern, A.; Cyrys, J.; Brockow, I.; Koletzko, S.;
Kramer, U.; Behrendt, H.; Herbarth, O.; von Berg, A.; Bauer, C. P.; Wichmann,
H. E.; Heinrich, J. (2008). "Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children". Am J Respir Crit Care Med, <u>177</u>, 1331-1337.

[148] **Moussata, J.; Wang, Z.; Wang, J.** (2014). "Development and validation of an HPLC method for the simultaneous quantification of indole-3-carbinol acetate, indole-3-carbinol, and 3,3'-diindolylmethane in mouse plasma, liver, and kidney tissues". J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, <u>958</u>, 1-9.

[149] **Murahata, R. I.; Taylor, M. G.; Damia, J.; Grove, G. L.** (2008). <u>"Preliminary</u> studies on the relationship among peel force, quantitative measures of skin damage and subjective discomfort". Skin Res Technol, <u>14</u>, 478-483.

[150] Muszer, M.; Noszczynska, M.; Kasperkiewicz, K.; Skurnik, M. (2015).<u>"Human Microbiome: When a Friend Becomes an Enemy"</u>. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), <u>63</u>, 287-298.

[151] **Natsuga, K.; Cipolat, S.; Watt, F. M.** (2016). <u>"Increased Bacterial Load and</u> <u>Expression of Antimicrobial Peptides in Skin of Barrier-Deficient Mice with Reduced</u> <u>Cancer Susceptibility"</u>. J Invest Dermatol, <u>136</u>, 99-106.

[152] **Nebert, D. W.** (1969). "Changes in aryl hydrocarbon hydroxylase activity and microsomal P450 during polycyclic hydrocarbon treatment of mammalian cells in <u>culture</u>". Biochem Biophys Res Commun, <u>36</u>, 885-890.

[153] **Nebert, D. W.; Gelboin, H. V.** (1968). <u>"Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of induced enzyme"</u>. J Biol Chem, <u>243</u>, 6242-6249.

[154] **Nebert, D. W.; Gelboin, H. V.** (1968). <u>"Substrate-inducible microsomal aryl</u> hydroxylase in mammalian cell culture. II. Cellular responses during enzyme <u>induction</u>". J Biol Chem, <u>243</u>, 6250-6261.

[155] **Nebert, D. W.; Gielen, J. E.** (1972). "Genetic regulation of aryl hydrocarbon hydroxylase induction in the mouse". Fed Proc, <u>31</u>, 1315-1325.

[156] **Nemes, Z.; Steinert, P. M.** (1999). <u>"Bricks and mortar of the epidermal</u> <u>barrier"</u>. Exp Mol Med, <u>31</u>, 5-19.

[157] **Nicholl, Desmond S.T.** (2002). "Labor im Fokus - Genetische Methoden". Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg . Berlin, <u>2. Auflage</u>.

[158] **Nutten, S.** (2015). <u>"Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors"</u>. Ann Nutr Metab, <u>66 Suppl 1</u>, 8-16.

[159] **Oh, J.; Byrd, A. L.; Deming, C.; Conlan, S.; Kong, H. H.; Segre, J. A.** (2014). "*Biogeography and individuality shape function in the human skin* <u>metagenome"</u>. Nature, <u>514</u>, 59-64.

[160] Oh, J.; Freeman, A. F.; Park, M.; Sokolic, R.; Candotti, F.; Holland, S. M.; Segre, J. A.; Kong, H. H. (2013).<u>"The altered landscape of the human skin</u> <u>microbiome in patients with primary immunodeficiencies"</u>. Genome Res, <u>23</u>, 2103-2114.

[161] Okano, J.; Lichti, U.; Mamiya, S.; Aronova, M.; Zhang, G.; Yuspa, S. H.; Hamada, H.; Sakai, Y.; Morasso, M. I. (2012). <u>"Increased retinoic acid levels through</u> <u>ablation of Cyp26b1 determine the processes of embryonic skin barrier formation and</u> <u>peridermal development"</u>. J Cell Sci, <u>125</u>, 1827-1836.

[162] Otsuka, A.; Doi, H.; Egawa, G.; Maekawa, A.; Fujita, T.; Nakamizo, S.;
Nakashima, C.; Nakajima, S.; Watanabe, T.; Miyachi, Y.; Narumiya, S.;
Kabashima, K. (2014). "Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression". J Allergy Clin Immunol, 133, 139-146 e131-110.

[163] **P., Fritsch** (2004). <u>"Dermatologie, Venerologie"</u>. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, <u>2. Auflage</u>.

[164] **P., Sundberg J.; Nanney L.; Fleckman** (2012).<u>"Skin and Adexa"</u>. Comparative Anatomy and Histology, <u>1. Auflage</u>, 433-455.

[165] **Panteleyev, A. A.; Bickers, D. R.** (2006). "*Dioxin-induced chloracne-*reconstructing the cellular and molecular mechanisms of a classic environmental disease". Exp Dermatol, <u>15</u>, 705-730.

[166] **Papula, Lothar** (1997). <u>"Mathematik für Ingenieure und und</u> <u>Naturwissenschaftler "</u>. Vierwegs Fachbücher der Technik, <u>Band 3</u>.

[167] Pastor, M. A.; Carrasco, L.; Izquierdo, M. J.; Farina, M. C.; Martin, L.; Renedo, G.; Requena, L. (2002). "Chloracne: histopathologic findings in one case". J Cutan Pathol, <u>29</u>, 193-199.

[168] **Paus, Ralf** (2002).<u>"What is the "true" function of skin?"</u>. Experimental Dermatology, <u>11</u>, 159-187.

[169] **Perdew, G. H.** (1988). <u>"Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat</u> shock protein". J Biol Chem, <u>263</u>, 13802-13805.

[170] **Petrulis, J. R.; Hord, N. G.; Perdew, G. H.** (2000). "Subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor is modulated by the immunophilin homolog hepatitis B virus X-associated protein 2". J Biol Chem, 275, 37448-37453.

[171] Petrulis, J. R.; Kusnadi, A.; Ramadoss, P.; Hollingshead, B.; Perdew, G.
H. (2003). "The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity". J Biol Chem, 278, 2677-2685.

[172] **Philips, N.; Auler, S.; Hugo, R.; Gonzalez, S.** (2011). *"Beneficial regulation of matrix metalloproteinases for skin health"*. Enzyme Res, 2011, 427285.

[173] **Pinnagoda, J.; Tupker, R. A.; Agner, T.; Serup, J.** (1990).<u>"Guidelines for</u> <u>transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization</u> <u>Group of the European Society of Contact Dermatitis</u>". Contact Dermatitis, <u>22</u>, 164-178.

[174] **Pinson, Ernest A.** (1942). "Evaporation from human skin with sweat glands inactivated". Am. J. Physiol.

 [175] Platzer, B.; Richter, S.; Kneidinger, D.; Waltenberger, D.; Woisetschlager,
 M.; Strobl, H. (2009). "Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits in vitro differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells". J Immunol, <u>183</u>, 66-74.

[176] **Poland, A.; Glover, E.; Kende, A. S.** (1976). "Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase". J Biol Chem, <u>251</u>, 4936-4946.

[177] **Pollenz, R. S.; Barbour, E. R.** (2000). <u>"Analysis of the complex relationship</u> between nuclear export and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene regulation". Mol Cell Biol, <u>20</u>, 6095-6104.

[178] **Pongratz, I.; Mason, G. G.; Poellinger, L.** (1992). "Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity". J Biol Chem, 267, 13728-13734.

[179] Probst, M. R.; Reisz-Porszasz, S.; Agbunag, R. V.; Ong, M. S.; Hankinson,
O. (1993). "Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action". Mol Pharmacol, <u>44</u>, 511-518.

[180] **Prof. Dr. med. Hans Walter Striebel, D.E.A.A.** (2005).<u>"Anästhesie</u> <u>Intensivmedizing Notfallmedizin - Für Studium und Ausbildung"</u>. Schatttauer GmBH, <u>6. Auflage</u>. [181] **Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J. M.** (2008).<u>"The skin: an</u> indispensable barrier". Exp Dermatol, <u>17</u>, 1063-1072.

[182] **Proksch, E.; Brasch, J.; Sterry, W.** (1996). <u>"Integrity of the permeability</u> barrier regulates epidermal Langerhans cell density". Br J Dermatol, <u>134</u>, 630-638.

[183] **Rawlings, A. V.; Scott, I. R.; Harding, C. R.; Bowser, P. A.** (1994).<u>"Stratum</u> corneum moisturization at the molecular level". J Invest Dermatol, <u>103</u>, 731-741.

[184] **Reyes, H.; Reisz-Porszasz, S.; Hankinson, O.** (1992). <u>"Identification of the Ah</u> receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor". Science, <u>256</u>, 1193-1195.

[185] **Richard, G.** (2004).<u>"Molecular genetics of the ichthyoses"</u>. Am J Med Genet C Semin Med Genet, <u>131C</u>, 32-44.

[186] Robert Lukowski, Silke Weber, Pascal Weinmeister, Susanne Feil und Robert Feil (2005). <u>"Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus"</u>. BIOspektrum, <u>3</u>.

[187] Rodriguez, E.; Baurecht, H.; Wahn, A. F.; Kretschmer, A.; Hotze, M.;
Zeilinger, S.; Klopp, N.; Illig, T.; Schramm, K.; Prokisch, H.; Kuhnel, B.; Gieger,
C.; Harder, J.; Cifuentes, L.; Novak, N.; Weidinger, S. (2014). <u>"An integrated epigenetic and transcriptomic analysis reveals distinct tissue-specific patterns of DNA methylation associated with atopic dermatitis"</u>. J Invest Dermatol, <u>134</u>, 1873-1883.

[188] **Rogiers, V.** (2001). "EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences". Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, <u>14</u>, 117-128.

[189] **Roop, D.** (1995). <u>"Defects in the barrier"</u>. Science, <u>267</u>, 474-475.

[190] **Rossi, A.; Jang, S. I.; Ceci, R.; Steinert, P. M.; Markova, N. G.** (1998). "Effect of AP1 transcription factors on the regulation of transcription in normal <u>human epidermal keratinocytes</u>". J Invest Dermatol, <u>110</u>, 34-40.

[191] Roth, R. R.; James, W. D. (1988). "*Microbial ecology of the skin*". Annu Rev Microbiol, <u>42</u>, 441-464.

[192] Russell, L. J.; DiGiovanna, J. J.; Rogers, G. R.; Steinert, P. M.; Hashem, N.; Compton, J. G.; Bale, S. J. (1995). <u>"Mutations in the gene for transglutaminase 1</u> in autosomal recessive lamellar ichthyosis". Nat Genet, <u>9</u>, 279-283.

[193] **Sanford, J. A.; Gallo, R. L.** (2013). *"Functions of the skin microbiota in health and disease"*. Semin Immunol, <u>25</u>, 370-377.

[194] Sarna, J. R., Dyck, R. H. & Whishaw, I. Q. (2000). <u>"The Dalila effect: C57BL6</u> mice barber whiskers by plucking". Behav Brain Res, <u>108</u>, 39-45. [195] **Sauer, B.; Henderson, N.** (1988). <u>"Site-specific DNA recombination in</u> <u>mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1"</u>. Proc Natl Acad Sci U S A, <u>85</u>, 5166-5170.

[196] Schafer, M.; Farwanah, H.; Willrodt, A. H.; Huebner, A. J.; Sandhoff, K.; Roop, D.; Hohl, D.; Bloch, W.; Werner, S. (2012). <u>"Nrf2 links epidermal barrier</u> function with antioxidant defense". EMBO Mol Med, <u>4</u>, 364-379.

[197] Scharschmidt, T. C.; List, K.; Grice, E. A.; Szabo, R.; Renaud, G.; Lee, C. C.; Wolfsberg, T. G; Bugge, T. H.; Segre, J. A. (2009). "Matriptase-deficient mice exhibit ichthyotic skin with a selective shift in skin microbiota". J Invest Dermatol, 129, 2435-2442.

[198] Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. (1995). <u>"Quantitative</u> monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray". Science, <u>270</u>, 467-470.

[199] Schmidt, J. V.; Su, G. H.; Reddy, J. K.; Simon, M. C.; Bradfield, C. A. (1996). <u>"Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development"</u>. Proc Natl Acad Sci U S A, <u>93</u>, 6731-6736.

[200] Scholz, F.; Badgley, B. D.; Sadowsky, M. J.; Kaplan, D. H. (2014). <u>"Immune</u> <u>mediated shaping of microflora community composition depends on barrier site"</u>. PLoS one, <u>9</u>, e84019.

[201] Scott, I. R.; Harding, C. R.; Barrett, J. G. (1982).<u>"Histidine-rich protein of</u> the keratohyalin granules. Source of the free amino acids, urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum". Biochim Biophys Acta, <u>719</u>, 110-117.

[202] **Segre, J.** (2003). <u>"Complex redundancy to build a simple epidermal</u> <u>permeability barrier"</u>. Curr Opin Cell Biol, <u>15</u>, 776-782.

[203] **Segre, J. A.** (2006). "*Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders*". J Clin Invest, 116, 1150-1158.

[204] **Seite, S.; Bieber, T.** (2015). "*Barrier function and microbiotic dysbiosis in atopic dermatitis*". Clin Cosmet Investig Dermatol, **8**, 479-483.

[205] Seite, S.; Flores, G. E.; Henley, J. B.; Martin, R.; Zelenkova, H.; Aguilar, L.; Fierer, N. (2014). "Microbiome of affected and unaffected skin of patients with atopic dermatitis before and after emollient treatment". J Drugs Dermatol, 13, 1365-1372.

[206] Sevilla, L. M.; Nachat, R.; Groot, K. R.; Klement, J. F.; Uitto, J.; Djian,
P.; Maatta, A.; Watt, F. M. (2007). "Mice deficient in involucrin, envoplakin, and periplakin have a defective epidermal barrier". J Cell Biol, 179, 1599-1612. [207] Sextius, P.; Marionnet, C.; Bon, F. X.; de La Chapelle, A. L.; Tacheau, C.;
Lahfa, M.; Mauviel, A.; Bernard, B. A.; Leclaire, J.; Bernerd, F.; Dubertret, L.
(2010). "Large scale study of epidermal recovery after stratum corneum removal: dynamics of genomic response". Exp Dermatol, <u>19</u>, 259-268.

[208] Shaw, T. E.; Currie, G. P.; Koudelka, C. W.; Simpson, E. L. (2011). "Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 National Survey of Children's <u>Health</u>". J Invest Dermatol, <u>131</u>, 67-73.

[209] Shen, E. S.; Whitlock, J. P., Jr. (1992). "Protein-DNA interactions at a dioxinresponsive enhancer. Mutational analysis of the DNA-binding site for the liganded Ah receptor". J Biol Chem, 267, 6815-6819.

[210] Shetty, P. V.; Bhagwat, B. Y.; Chan, W. K. (2003). <u>"P23 enhances the</u> formation of the aryl hydrocarbon receptor-DNA complex". Biochem Pharmacol, <u>65</u>, 941-948.

[211] Shukla, Y.; Singh, A.; Srivastava, B. (1999). <u>"Inhibition of carcinogen-induced</u> activity of gamma-glutamyl transpeptidase by certain dietary constituents in mouse <u>skin</u>". Biomed Environ Sci, <u>12</u>, 110-115.

[212] Sierra, A. F., Ramirez, M. L., Campmany, A. C., et al. (2013). <u>"In vivo and</u> in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation". J Dermatol Sci, <u>69</u>, 202-214.

[213] **Sinal, C. J.; Bend, J. R.** (1997). "Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells". Mol Pharmacol, <u>52</u>, 590-599.

[214] **Slack, J.M.W.** (2006). <u>"Essential developmental Biology"</u>. Blackwell Publishing, <u>Second Edition</u>.

[215] **Soshilov, A. A.; Denison, M. S.** (2014). "Ligand promiscuity of aryl hydrocarbon receptor agonists and antagonists revealed by site-directed mutagenesis". Mol Cell Biol, <u>34</u>, 1707-1719.

[216] Soumitesh Chakravorty, Danica Helb, Michele Burday, Nancy Connel, David Alland (2007).<u>"A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for</u> the diagnosis of pathogenic bacteria". Journal of Microbiological Methods, <u>69</u>, 330-339.

[217] Spergel, J. M.; Mizoguchi, E.; Brewer, J. P.; Martin, T. R.; Bhan, A. K.; Geha, R. S. (1998). "Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice". J Clin Invest, 101, 1614-1622.

[218] **Stange, J.; Veldhoen, M.** (2013). <u>"The aryl hydrocarbon receptor in innate T</u> <u>cell immunity</u>". Semin Immunopathol, <u>35</u>, 645-655.

[219] **Sternberg, N.; Hamilton, D.** (1981). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites". J Mol Biol, <u>150</u>, 467-486.

[220] **Sterry, Wolfram** (2011). "Kurzlehrbuch Dermatologie". Thieme Verlag.

[221] **Stockinger, B.; Di Meglio, P.; Gialitakis, M.; Duarte, J. H.** (2014).<u>"The aryl</u> <u>hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system"</u>. Annu Rev Immunol, <u>32</u>, 403-432.

[222] Sugiura, H.; Ebise, H.; Tazawa, T.; Tanaka, K.; Sugiura, Y.; Uehara, M.; Kikuchi, K.; Kimura, T. (2005). <u>"Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin</u> lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope". Br J Dermatol, <u>152</u>, 146-149.

[223] Sun, Y. V.; Boverhof, D. R.; Burgoon, L. D.; Fielden, M. R.; Zacharewski,
T. R. (2004). "Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences". Nucleic Acids Res, <u>32</u>, 4512-4523.

[224] Sutter, C. H.; Bodreddigari, S.; Campion, C.; Wible, R. S.; Sutter, T. R. (2011). <u>"2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the expression of genes in the human epidermal differentiation complex and accelerates epidermal barrier formation</u>". Toxicol Sci, <u>124</u>, 128-137.

[225] Sutter, C. H.; Yin, H.; Li, Y.; Mammen, J. S.; Bodreddigari, S.; Stevens, G.; Cole, J. A.; Sutter, T. R. (2009). <u>"EGF receptor signaling blocks aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription and cell differentiation in human epidermal keratinocytes"</u>. Proc Natl Acad Sci U S A, <u>106</u>, 4266-4271.

[226] Swanson, H. I.; Chan, W. K.; Bradfield, C. A. (1995). "DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins". J Biol Chem, <u>270</u>, 26292-26302.

[227] T.S.o.t.J., Laboratory; (1966). "Biology of the Laboratory Mouse".

[228] Tanaka, M.; Okada, M.; Zhen, Y. X.; Inamura, N.; Kitano, T.; Shirai, S.; Sakamoto, K.; Inamura, T.; Tagami, H. (1998). "Decreased hydration state of the stratum corneum and reduced amino acid content of the skin surface in patients with seasonal allergic rhinitis". Br J Dermatol, <u>139</u>, 618-621.

[229] Tarutani, M.; Itami, S.; Okabe, M.; Ikawa, M.; Tezuka, T.; Yoshikawa, K.; Kinoshita, T.; Takeda, J. (1997). <u>"Tissue-specific knockout of the mouse Pig-a gene</u> reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development". Proc Natl Acad Sci U S A, <u>94</u>, 7400-7405. [230] Tauchi, M.; Hida, A.; Negishi, T.; Katsuoka, F.; Noda, S.; Mimura, J.; Hosoya, T.; Yanaka, A.; Aburatani, H.; Fujii-Kuriyama, Y.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. (2005). "Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions". Mol Cell Biol, 25, 9360-9368.

[231] Thomsen, S. F.; Ulrik, C. S.; Kyvik, K. O.; Hjelmborg, Jv; Skadhauge, L.
 R.; Steffensen, I.; Backer, V. (2007). "Importance of genetic factors in the etiology of atopic dermatitis: a twin study". Allergy Asthma Proc, 28, 535-539.

[232] Tunggal, J. A.; Helfrich, I.; Schmitz, A.; Schwarz, H.; Gunzel, D.; Fromm,
M.; Kemler, R.; Krieg, T.; Niessen, C. M. (2005). "E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions". EMBO J, 24, 1146-1156.

[233] Uchiyama, A.; Yamada, K.; Ogino, S.; Yokoyama, Y.; Takeuchi, Y.; Udey,
M. C.; Ishikawa, O.; Motegi, S. (2014). "MFG-E8 regulates angiogenesis in cutaneous wound healing". Am J Pathol, 184, 1981-1990.

[234] van den Bogaard, E. H.; Bergboer, J. G.; Vonk-Bergers, M.; van Vlijmen-Willems, I. M.; Hato, S. V.; van der Valk, P. G.; Schroder, J. M.; Joosten, I.;
Zeeuwen, P. L.; Schalkwijk, J. (2013). "Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis". J Clin Invest, 123, 917-927.

[235] van den Bogaard, E. H.; Podolsky, M. A.; Smits, J. P.; Cui, X.; John, C.; Gowda, K.; Desai, D.; Amin, S. G.; Schalkwijk, J.; Perdew, G. H.; Glick, A. B. (2015). <u>"Genetic and pharmacological analysis identifies a physiological role for the</u> <u>AHR in epidermal differentiation</u>". J Invest Dermatol, <u>135</u>, 1320-1328.

[236] **van Otterdijk, S. D.; Michels, K. B.** (2016). <u>"Transgenerational epigenetic</u> inheritance in mammals: how good is the evidence?". FASEB J.

[237] Venus, M.; Waterman, J.; McNab, I. (2010). "Basic physiology of the skin". Surgery, <u>28</u>, 469-472.

[238] **W., Sandermann** (1984). <u>"Die Entdeckungsgeschichte des 2,3,7,8-</u> <u>Tetrachlordibenzo-p-dioxins (TCDD, Dioxin,Sevesogift)"</u>. Naturwissenschaftliche Rundschau, <u>5</u>.

[239] Walisser, J. A.; Glover, E.; Pande, K.; Liss, A. L.; Bradfield, C. A. (2005). "Aryl hydrocarbon receptor-dependent liver development and hepatotoxicity are mediated by different cell types". Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 17858-17863.

[240] Weston, S.; Halbert, A.; Richmond, P.; Prescott, S. L. (2005). "Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial". Arch Dis Child, 90, 892-897.

[241] Weyrich, L. S.; Dixit, S.; Farrer, A. G.; Cooper, A. J. (2015).<u>"The skin</u> microbiome: Associations between altered microbial communities and disease". Australas J Dermatol, <u>56</u>, 268-274.

[242] Whitelaw, M.; Pongratz, I.; Wilhelmsson, A.; Gustafsson, J. A.; Poellinger, L. (1993). "Ligand-dependent recruitment of the Arnt coregulator determines DNA recognition by the dioxin receptor". Mol Cell Biol, 13, 2504-2514.

[243] Wilker, C.; Johnson, L.; Safe, S. (1996). <u>"Effects of developmental exposure</u> to indole-3-carbinol or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on reproductive potential of <u>male rat offspring</u>". Toxicol Appl Pharmacol, <u>141</u>, 68-75.

[244] Wong, M. L.; Medrano, J. F. (2005). "*Real-time PCR for mRNA quantitation*". Biotechniques, <u>39</u>, 75-85.

[245] Wood, L. C.; Jackson, S. M.; Elias, P. M.; Grunfeld, C.; Feingold, K. R. (1992). "Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice". J Clin Invest, 90, 482-487.

[246] Yamada, H.; Nakamoto, H.; Suzuki, Y.; Ito, T.; Aisaka, K. (2002). "Pharmacological profiles of a novel opioid receptor-like1 (ORL(1)) receptor antagonist, JTC-801". Br J Pharmacol, 135, 323-332.

[247] Yang, L.; Mao-Qiang, M.; Taljebini, M.; Elias, P. M.; Feingold, K. R. (1995). "Topical stratum corneum lipids accelerate barrier repair after tape stripping, solvent treatment and some but not all types of detergent treatment". Br J Dermatol, 133, 679-685.

[248] **Yao, E. F.; Denison, M. S.** (1992). <u>"DNA sequence determinants for binding of</u> <u>transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer"</u>. Biochemistry, <u>31</u>, 5060-5067.

[249] Yesilova, Y.; Calka, O.; Akdeniz, N.; Berktas, M. (2012). "Effect of probiotics on the treatment of children with atopic dermatitis". Ann Dermatol, 24, 189-193.

[250] Yu, Z.; Mahadevan, B.; Lohr, C. V.; Fischer, K. A.; Louderback, M. A.; Krueger, S. K.; Pereira, C. B.; Albershardt, D. J.; Baird, W. M.; Bailey, G. S.; Williams, D. E. (2006). "Indole-3-carbinol in the maternal diet provides chemoprotection for the fetus against transplacental carcinogenesis by the polycyclic aromatic hydrocarbon dibenzo[a,]pyrene". Carcinogenesis, 27, 2116-2123.

[251] Zhang, L. W.; Al-Suwayeh, S. A.; Hsieh, P. W.; Fang, J. Y. (2010).<u>"A</u> comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: evaluation of their efficacy and safety". Int J Pharm, <u>399</u>, 44-51.

VII. Anhang

VIIa) Genotypisierungsprotokolle

Bei allen Genotypisierungs-PCR wurde sowohl eine Negativkontrolle als auch eine entsprechende Positivkontrolle mitgeführt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sowie deren Referenzen sind in der Tabelle 8 im Materialteil hinterlegt.

AhR-KO Mausstamm

Tabelle 36: Zusammensetzung des Mastermixes		
Komponenten	1x in µl	
5x Puffer mit dNTP`s und MgCl ₂	3	
Primer 444; [10µM]	14	
Primer 443; [10µM]	14	
Primer 158; [10µM]	8	
Primer 159; [10µM]	8	
Hot Start Taq	1	
Ampuwa Wasser	35	
DNS; [10 ng/µl]	10	

Tabelle 37: Thermozykler Programm

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Wiederholung
Denaturierung der DNS	3Min.	94	1x
Denaturierung der DNS	30Sek.	94	
Anlagerung	1Min.	62	36x
Verlängerung	1Min.	72	
finale Verlängerung	1Min.	72	1
Ende	∞	4	

Beim WT Allel wird eine Bande bei 669bp sichtbar, das KO Allel weist eine Bande von 172bp auf. Dementsprechend besitzen heterozygote Mäuse beide Banden (669bp und 172bp).

Flox-PCR-Protokoll

Tabelle 38: Zusammensetzung des Mastermixes		
Komponenten	1x in µl	
10x Puffer	1,25	
MgCl ₂ ; [25mM]	0,63	
dNTP; [10mM]	0,25	
OL 4064; [10µM]	1,25	
OL 4088; [10µM]	1,25	
Ampuwa Wasser	5,245	
Taq Polymerase	0,125	
DNS; [10 ng/µl]	2,0	

Tabelle 39: Thermozykler Programm

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Wiederholung
Denaturierung der DNS	3Min.	94	1x
Denaturierung der DNS	30Sek.	94	
Anlagerung	1Min.	68	
Verlängerung	1Min.	72	36x
finale Verlängerung	2Min.	72	1x
Ende	œ	4	

Bei dieser PCR wird überprüft, ob der AhR markiert ist oder nicht. Beim WT amplifizieren die Oligonukleotide OL4064 und OL4088 ein 106bp großes Fragment. Wird der AhR auf beiden Chromosomen durch loxP Sequenzen markiert, dann entsteht ein 140bp großes Fragment. Tritt der Fall auf, dass der AhR nur auf einem Chromosom flankiert wurde, dann werden zwei Banden (106bp und 140bp) im Gel sichtbar [239].

Flox-Cre-PCR-Protokoll

Tabelle 40: Zusammensetzung	des	Mastermixes
-----------------------------	-----	-------------

Komponenten	1x in µl
10x Puffer	1,25
MgCl ₂ ; [25mM]	0,63
dNTP`s; [10mM]	0,25
Primer 1 (OL4064); [10mM]	1,25
Primer 2 (OL4088); [10mM]	1,25
Primer 3 (OL4062); [10mM]	1,25
H ₂ O	3,995
Tag Polymerase	0,125
+10ng DNS pro µl	2

Tabelle 41: Thermozykler Programm

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Wiederholung
Denaturierung der DNS	3Min.	94	1x
Denaturierung der DNS	30Sek.	94	36x
Anlagerung	1Min.	60	
Verlängerung	1Min.	72	
finale Verlängerung	2Min.	72	1x
Ende	∞	4	

Handelt es sich um eine KO-Maus, so amplifizieren die Oligonukleotide OL4062 und OL4088 ein 180bp großes Fragment. Ist der AhR noch vorhanden, dann entsteht ein 140bp großes Fragment.
konditionale Cre-PCR-Protokoll

Tabelle 42: Zusammensetzung des Mastermixes

Komponenten	1x in µl
Puffer mit MgCl ₂	1,0
MgCl ₂ ; [25mM]	0,25
dNTP; [2,5mM]	0,25
BSA	0,40
Vorwärtsoligonukleotid 1; [10µM]	0,40
Rückwärtsoligonukleotid 2; [10µM]	0,40
Ampuwa Wasser/ DNS unverdünnt	7,1/8,6
Taq Polymerase	0,125
+20ng DNS/DNS unverdünnt	2,0/0,5

Tabelle 43: Thermozykler Programm

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Wiederholung
Denaturierung der DNS	3Min.	94	1x
Denaturierung der DNS	30Sek.	94	
Anlagerung	40Sek.	60	
Verlängerung	1Min.	72	36x
finale Verlängerung	5Min.	72	1x
Ende	∞	4	

Bei der Keratinozyten spezifischen KO-Maus ist die Bande 643bp groß, während bei einer Langerhanszell spezifischen KO-Maus eine Bande von 235 bp erwartet wird.

VIIb) Vektorkarte

Auf der Basis des pGL3B-Vektors wurde ein Reporterplasmid generiert, bei dem die Transkription der Luziferase unter der Kontrolle des *CYP1A1* Promoterelements 5DRE steht. Die *multiple cloning site* (MCS) enthält Schnittstellen für die Restriktionsenzyme HindIII und BgIII. Über diese Schnittstellen wurden sowohl die 5DRE Sequenz aus dem *cyp1a1* Promoterelement als auch die DRE-Sequenzen aus *cdh1* und *ocln* in die MCS eingebaut. Bei der Bindung von TCDD an den AhR, transloziert dieser in den Zellkern und aktiviert die Expression der Luziferase. Die Aktivität der Luziferase kann mittels eines Luziferase-Assays (vgl. Methode 3.3.6.) ermittelt werden. Die Vektorkarte vom pGL3B/5DRE Vektor wird in der Abbildung 62 gezeigt.



Abbildung 62: Die Vektorkarte des pGL3B/5DRE Vektors (5.235bp).

Der pGL3B Vektor mit Einbau von 5DRE als Promoter für das Luziferase Gen. 5 DRE; fünf DREs umfassender Sequenzabschnitt aus dem murinen cyp1a1-Promoter. Die Restriktionsschnittstellen BgIII und HindIII flankieren die 5DRE innerhalb der MCS.

VIIc) AhR abhängige Regulation von Hautbarriere-relevanten Genen: Genexpression zwischen 1,0 und 2,0 (Microarray Tabellen)

Tabelle 44: vor dem mechanischen Stress

refseq ^a	Gen	Symbol	DREs ^b	x-fache GE°	p-Wert
atopische I	Dermatitis				
NM_009661	arachidonate 8 lipoxygenase	alox8	0	-1,21	4,80E-02
NM_024264	cytochrome P450, family 27, subfamily a,polypeptide 1	cyp27a1	2	+1,43	2,35E-02
NM_010511	interferon gamma receptor 1	ifngr1	0	+1,45	1,86E-03
NM_008367	interleukin 2 receptor, alpha chain	il2ra	0	-1,16	1,07E-02
NM_013609	nerve growth factor	ngf	0	-1,73	6,50E-03
NM_019935	OVO homolog-like 1	ovol1	16	-1,47	4,48E-02
NM_138657	suppresor of cytokine signaling 7	socs7	1	-1,14	3,54E-02
NM_021367	thymic stromal lymphopoietin	tslp	4	-1,31	4,16E-02
Basalmemb	oran				
NM_053185	collagen, type IV, alpha 6	col4a6	2	-1,22	3,44E-02
NM_008480	laminin alpha 1	lama1	8	+1,57	3,43E-03
NM_008484	laminin beta 3	lamb3	4	-1,29	1,62E-03
NM_008485	laminin, gamma 2	lamc2	4	-1,36	1,56E-04
NM_009825	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47) member 1	serpinh1	6	-1,14	2,34E-02
cornified e	nvelope				
NM_009983	cathepsin D	ctsd	4	-1,18	1,84E-02
NM_025276	envoplakin	evpl	0	-1,15	8,84E-03
NM_009265	small proline rich protein 1B	sprr1b	0	-3,17	1,53E-02
NR_003548	small proline rich protein 2G	sprr2g	0	-1,32	2,35E-03
Keratinfila	ment Netzwerk				
NM_008473	keratin 1, type II	krt1	4	-1,59	2,73E-04
NM_016958	keratin 14, type I	krt14	6	-1,37	9,10E-03
NM_008470	keratin 16, type I	krt16	4	-3,64	1,29E-02
NM_010663	keratin 17, type I	krt17	11	-1,19	4,09E-02
NM_212485	keratin 73, type II	krt73	0	-1,47	2,43E-02
NM_130873	keratin associated protein 16-4	krtap6-4	2	+1,38	1,22E-03
Permeabilit	tätsbarriere				
NM_175731	alkaline ceramidase 1	acer1	0	+1,16	3,62E-02
NM_139306	alkaline ceramidase 2	acer2	0	-1,37	6,22E-03
NM_007440	arachidonate 12 lipoxygenase	alox12	0	+1,15	1,82E-02

NM_145684	arachidonate 12 lipoxygenase, epidermal	alox12e	6	+1,45	2,85E-03
NM_001081136	acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 1	awat1	0	-1,55	4,52E-03
NM_177746	acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 2	awat2	0	-1,57	3,15E-02
NM_009851	CD44 molecule	cd44	0	-1,31	1,06E-02
NM_030596	desmoglein 3	dsg3	0	-1,20	3,13E-03
NM_007703	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast) like 3	elovl3	0	-1,38	2,45E-02

Die rasierte Rückenhaut von AhR-KO Mäusen und deren WT Schwestern wurden, wie unter Methode 3.6. beschrieben, mechanisch gestresst und die gRNS aus der Epidermis isoliert (vgl. Methode 3.5.1. und 3.5.2.) Die AhR-abhängige Genexpression wurde mit einem Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Microarrays untersucht. Gezeigt werden alle Gene mit einer Genexpression von \geq 1,0, die zwischen AhR-KO und WT differentiell exprimiert wurden zu dem Zeitpunkt OStd. ^a RefSequenz Nummer (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/); ^b DREs Sequenzen in den Promotern wurden durch eine Sequenzanalyse identifiziert (Sun et al., 2004); ^c x-fachen Genexpression (GE); verstärkte oder verminderte Genexpression in AhR-KO versus WT Schwestern, + und fett=verstärkt exprimiert und - und nicht fett: verminderte Expression.

refseq ^a	Gen	Symbol	DREs ^b	x-fache GE°	p-Wert
atopische De	ermatitis				
NM_027998	claudin 23	cldn23	6	-1,38	1,69E-04
Mm.25836	claudin 8	cldn8	0	-1,67	1,14E-03
NM_007843	defensin beta 1	defb1	0	+1,48	2,06E-02
NM_001013804	filaggrin family member 2	flg2	0	-1,81	7,23E-03
NM_008361	interleukin 1 beta	$il1\beta$	0	+3,49	2,26E-05
NM_008362	interleukin 1 receptor, type I	il1r1	5	-1,26	5,09E-03
NM_010558	interleukin 5	il5	2	+1,48	1,50E-02
NM_139299	interleukin 31 receptor A	il31ra	0	-1,62	4,19E-03
NM_008391	interferon regulatory factor 2	irf2	8	-1,18	3,22E-02
NM_013609	nerve growth factor	ngf	0	+2,44	5,62E-03
	nucleotide-binding				
NM_172729	oligomerization domain	nod1	0	-1,55	2,53E-03
	containing 1				
Mm.280225	OVO homolog-like 1	ovol1	16	-1,91	3,07E-03
NM_011489	signal transducer and activator of transcription 5B	stat5b	7	-1,41	1,31E-03
NM_009284	signal transducer and activator of transcription 6	stat6	12	-1,36	4,50E-03
NM 031178	toll-like receptor 9	tlr9	3	+1.15	3 98E-02
NM 024246	transmembrane protein 79	tmem79	0	-1,22	4,89E-02
_ NM 021367	thymic stromal	tslp	4	+1.32	3.88E-02
	lymphopoietin			-,	
Basalmembra	an				
NM_001163155	collagen, type IV, alpha 5	col4a5	0	-1,31	4,13E-03
NM_053185	collagen, type IV, alpha 6	col4aб	2	-1,27	7,69E-04
NM_007738	collagen, type VII, alpha 1	col7a1	0	-1,47	6,85E-04
NM_172862	matrix protoin 2	frem2	0	-1,67	1,45E-03
NM 152803	henaranase	hnse	З	-1 76	6 53E-04
NM_008484	laminin heta 3	lamh3	4	-1 61	1.22E-03
1111_000101	serpin peptidase inhibitor.	unibo	I	1,01	1,220 00
NM 009825	clade H (heat shock protein	serpinh1	6	-1,34	3,46E-02
—	47) member 1	1		,	,
cornified en	velope				
NM_009983	cathepsin D	ctsd	4	-1,36	2,15E-02
NM_025276	envoplakin	evpl	0	-1,42	3,89E-03
NM_001013804	filaggrin family member 2	flg2	0	-1,81	7,23E-03
NM_008909	periplakin	ppl	4	-1,38	2,97E-03
NM_011474	small proline-rich protein 2H	sprr2h	1	+1,29	5,22E-03
NR_003185	small proline-rich protein 2J, pseudogene	sprr2j-ps	0	+1,16	9,05E-03
Keratinfilam	ent Netzwerk				

Tabelle 45: 6Std. nach dem mechanischen Stress

NM_008473	keratin 1, type II	krt1	4	-1,21	4,07E-03
NM_008469	keratin 15, type I	krt15	0	-1,53	3,73E-04
NM_029393	keratin 24, type I	krt24	5	-1,44	5,64E-03
NM_001159374	keratin 32, type I	krt32	0	-1,22	5,20E-03
NM_001003667	keratin 77, type II	krt77	0	-1,34	8,79E-03
NM_212487	keratin 78, type II	krt78	0	-1,44	3,67E-04
Permeabilitä	tsbarriere				
NM_175731	alkaline ceramidase 1	acer1	0	-1,42	1,48E-03
NM_139306	alkaline ceramidase 2	acer2	0	-1,29	9,51E-03
NM_007440	arachidonate 12 lipoxygenase	alox12	0	-1,46	4,25E-03
NM_145684	arachidonate 12 lipoxygenase, epidermal	alox12e	6	-1,67	7,84E-03
NM_177746	acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 2	awat2	0	-1,43	1,14E-02
NM_008756	occludin	ocln	13	-1,21	7,22E-04
NM 013769	tight junction protein 3	tjp3	11	-1,49	1,72E-03

Die rasierte Rückenhaut von AhR-KO Mäusen und deren WT Schwestern wurden, wie unter Methode 3.6. beschrieben, mechanisch gestresst und die gRNS aus der Epidermis isoliert (vgl. Methode 3.5.1. und 3.5.2.) Die AhR-abhängige Genexpression wurde mit einem Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Microarrays untersucht. Gezeigt werden alle Gene mit einer Genexpression von ≥1,0, die zwischen AhR-KO und WT differentiell exprimiert wurden 6Std. nach dem mechanischen Stress. ^a RefSequenz Nummer (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/); ^b DREs Sequenzen in den Promotern wurden durch eine Sequenzanalyse identifiziert (Sun et al., 2004); ^c x-fachen Genexpression (GE); verstärkte oder verminderte Genexpression in AhR-KO versus WT Schwestern, + und fett=verstärkt exprimiert und - und nicht fett: verminderte Expression.

refseqª	Gen	Symbol	DREs ^b	x-fache GE°	p-Wert
atopische De	rmatitis				
Mm.25836	claudin8	cldn8	0	-1,24	2,27E-02
NM_001013804	filaggrin family member 2	flg2	0	-1,39	4,37E-02
NM_008361	interleukin 1 beta	$il1\beta$	0	+4,12	2,87E-03
NM_013609	nerve growth factor	ngf	0	+1,89	2,69E-02
Mm.280225	OVO homolog-like 1	ovol1	16	-1,29	4,54E-02
NM_031178	toll-like receptor 9	tlr9	3	+1,29	4,37E-02
Basalmembra	n				
NM_007743	collagen, typeI, alpha 2	col1a2	3	-1,16	8,17E-03
NM_023420	collagen, type IV, alpha 3	col4a3bp	5	-1,24	1,24E-02
NM_009933	collagen, typeVI, alpha 1	col6a1	4	-1,16	9,71E-03
NM_001243008	collagen, type VI, alpha 3	col6a3	0	+1,11	3,37E-02
NM_001024720	hemicentin	hmcn1	0	-1,19	1,13E-02
NM_152803	heparanase	hpse	3	-1,28	1,16E-02
NM_010722	lamin B2	lmnb2	6	-1,15	2,34E-02
cornified env	elope				
NM_025276	envoplakin	evpl	0	-1,16	2,37E-02
NM_001013804	filaggrin family member 2	flg2	0	-1,39	4,37E-02
NM_008412	involucrin	ivl	0	-1,54	3,42E-03
NM_009265	small proline-rich protein 1B	sprr1b	0	+1,77	3,62E-02
NM_011469	small proline-rich protein 2B	sprr2b	0	+2,69	2,39E-03
NM_011474	small proline-rich protein 2H	sprr2h	1	+1,67	1,08E-03
<u>NM_173070</u>	small proline-rich protein 4	sprr4	0	+1,24	3,58E-02
Keratinfilame	ent Netzwerk				
NM_016958	keratin 14, type I	krt14	6	+1,17	1,20E-02
NM_029393	keratin 24, type I	krt24	5	-1,58	2,15E-03
NM_001039666	keratin 40, type I	krt40	0	+1,12	2,94E-02
NM_001099774	keratinassociatedprotein 17-1	krtap17-1	0	-1,24	7,72E-03
NM_023511	keratinassociatedprotein 3-1	krtap 3-1	0	-1,13	4,83E-02
Permeabilität	sbarriere				
NM_139306	alkaline ceramidase 2	acer2	0	-1,15	4,80E-02
NM_009902	claudin 3	cldn3	6	+1,30	3,51E-02
NM_007883	desmoglein 2	dsg2	5	-1,10	2,21E-02

Tabelle 46: 24Std. nach dem mechanischen Stress

Die rasierte Rückenhaut von AhR-KO Mäusen und deren WT Schwestern wurden, wie unter Methode 3.6. beschrieben, mechanisch gestresst und die gRNS aus der Epidermis isoliert (vgl. Methode 3.5.1. und 3.5.2.) Die AhR-abhängige Genexpression wurde mit einem Affymetrix Mouse Gene 2.0 ST Microarrays untersucht. Gezeigt werden alle Gene mit einer Genexpression von $\geq 1,0$, die zwischen AhR-KO und WT differentiell exprimiert wurden 24Std. nach dem mechanischen Stress. ^a RefSequenz Nummer (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/); ^b DREs Sequenzen in den Promotern wurden durch eine Sequenzanalyse identifiziert (Sun et al., 2004); ^c x-fachen Genexpression (GE); verstärkte oder verminderte Genexpression in AhR-KO versus WT Schwestern, + und fett=verstärkt exprimiert und - und nicht fett: verminderte Expression.

VIId) Der Verbrauch des Futters sowie das Gewicht der Mäuse aus den beiden Fütterungsexperimenten

In regelmäßigen Abständen wurde das Gewicht der Mäuse bestimmt sowie die Menge an verbrauchten Futter gewogen. Hierdurch wurde sichergestellt, dass die Mäuse das synthetische Futter verzehren und zusätzlich wurde der Gesundheitszustand der Mäuse überprüft.



Abbildung 63: Der Verbrauch des Futters sowie das Gewicht der Mäuse aus den beiden Fütterungsexperimenten.

(a) und (b) zeigt die Daten vom Futter-Tausch Experiment (vgl. Ergebnisteil 3 1.1.). (c) und (d) zeigt die Daten vom Futter-Pausen Experiment (vgl. Ergebnisteil 3 1.2.). Während (a) und (c) den Verlauf der Gewichtszunahme dokumentiert, so zeigen (b) und (d) die verbrauchte Menge an Futter.

VIII. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

VIIIa) Wissenschaftliche Veröffentlichungen

* Haas et al. (2016) "Aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes is essential for murine skin barrier integrity", Journal of Investigative Dermatology; 136(11): 2260-2269

VIIIb) Poster

* Gordon Research Conference "Barrier Function of Mammalian Skin"; Waterville Valley, USA (18. bis 23.08.2013)

Postertitel: "Changes in transepidermal water loss (TEWL) of aryl hydrocarbon receptor deficient mice"

*Society of Investigative Dermatology; Atlanta, USA (08. bis 11.05.2015)

Postertitel: "Involvement of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in the murine skin barrier function"

* 2. ADF Round Table 2015 (30. und 31.10.2015)

Postertitel: "The Aryl Hydrocarbon Receptor is involved in murine skin barrier integrity"

* Society of Investigative Dermatology; Scottsdale, Arizona, USA (11. bis 14.05.2016)

Postertitel: "The Aryl hydrocarbon receptor (AHR) is critical for skin barrier function and a target for dietary intervention"

VIIIc) Vorträge

* Gordon Research Conference "Barrier Function of Mammalian Skin"; Waterville Valley, USA (18. bis 23.08.2013)

Vortragstitel: "The Role of AhR in skin barrier"

* 2. ADF Round Table (30. und 31.10.2015)

Vortragstitel: "The Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) is involved in murine skin barrier integrity"

IX. Lebenslauf

PROFIL

Name:	Katharina Haas
Geburtsdatum:	19.Juni 1984
Geburtsort:	Bad Kreuznach
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

BERUFSERFAHRUNG

04.2012-05.2016	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Doktorandin
	IUF Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung gGmbH; Düsseldorf
	Titel der Arbeit: "Der Arylhydrokarbonrezeptor ist in Keratinozyten notwendig für die Integrität der murinen Hautbarriere"
11.2011 - 03.2012	Wissenschaftliche Hilfskraft
	Kinder und Jugendpsychiatrie LVR Klinikum; Essen

AKADEMISCHE AUSBILDUNG

10.2009 - 10.2011	Studentin
	Westfälische Hochschule, Recklinghausen
	Studium: Molekulare Biologie
	Schwerpunkt: Medizinische Biologie
26.10.2011	Master of Science
	Titel der Arbeit "Effects of Terbutaline-Induced
	β_2 -Adrenergic Receptor Stimulation on IL-2 Production of T Cell Receptor activated CD4+ T-cells - A Comparsion between Human, Rat and Mouse"
09.2006 - 09.2009	Studentin
	Westfälische Hochschule, Recklinghausen
	Studium: Molekulare Biologie

04.09.2009	Bachelor of Science
	Titel der Arbeit: "Analysis of different signal pathways in mature T cell leukemia/ lymphoma"
BERUFSAUSBILDUNG	
09.2001 - 07.2004	Ausbildung zur Diätassistentin
	Diakonie Neuendettelsau; Neuendettelsau

Staatlich geprüfte Diätassistentin

PUBLIKATIONEN

08.07.2004

Haas K, Weighardt, H, Deenen R, Köhrer K, Clausen B, Zahner S, Boukamp P, Bloch W, Krutmann J, Esser C. "Aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes is essential for murine skin barrier integrity", J. Investig. Dermatol.; 136(11): 2260-2269

Ali N, Baumann C, de Castro Kroner J, Do NN, Friedrich HC, **Haas K**, Klaeschen AS, Pfaff C, Plesser K, Pollet M, Schmidt J, Schneeweiss M, Siewert MM, Stock M, Sucker N, Üstün Y, Vollmer V, Wachsmuth E, Wang J, Schilling B, Fabri M, Loser K, Eming SA "Round Table - new concept of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung to foster regional exchange between young clinican scientists in dermatology", Exp. Dermatol. 2016 Jun; doi: 10.1111/exd. 13052

Volckmar AL, Han CT, Pütter C, Haas S, Vogel CI, Knoll N, Struve C, Göbel M, **Haas K**, Herrfurth N, Jarick I, Grallert H, Schürmann A, Al-Hasani H, Hebebrand J, Sauer S, Hinney A. "Analysis of Genes Involved in Body Weight Regulation by Targeted Re-Sequencing", PLoS One. 2016 Feb 1;11(2):e0147904.

Pilz C, Feyerabend T, Sonner J, Redaelli C, Peter K, Kunze A, **Haas K**, Esser C,Schäkel K, Wick W, Rodewald HR, Lanz TV, Platten M. "Normal mast cell numbers in the tissues of AhR-deficient mice", Exp Dermatol. 2016 Jan;25(1):62-3.

Volckmar AL, Song JY, Jarick I, Pütter C, Göbel M, Horn L, Struve C, **Haas K**, Knoll N, Grallert H, Illig T, Reinehr T, Wang HJ, Hebebrand J, Hinney A. "Fine Mapping of a GWAS-Derived Obesity Candidate Region on Chromosome 16p11.2.", PLoS One. 2015 May 8;10(5):e0125660.

X. Danksagung

Auf den letzten Seiten möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich nicht nur in den letzten Jahren begleitet haben, sondern mich in vieler Hinsicht unterstützt haben und somit die Doktorarbeit ermöglicht haben.

Vielen Dank an **Frau Prof. Charlotte Esser** für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Vielen Dank an **Herrn Prof. Johannes Hegemann** für die Bereitschaft der Begutachtung der Doktorarbeit sowie sein Interesse an meiner Arbeit.

Vielen Dank an die Kooperationspartner **Herrn Prof. Wilhelm Bloch** und **Mojgan Ghilav** (EM-Bilder) und **Herrn Prof. Karl Köhrer** und **Dr. Rene Deenen** (Microarray, Mikrobiomanalyse).

Bei **Petra:** Für die hervorragende Pflege und Betreuung meiner Mäuse und dass Du all meine Sonderwünsche ohne ein Murren erfüllt hast.

Bei **Andrea:** Für ihre Unterstützung bei der Etablierung der histologischen Experimenten.

Bei **Babette:** Ein großes Dankeschön für Deine Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente. Für all die hunderten von Stunden, die Du neben mir im OP verbracht hast. Für Deinen kühlen Kopf in so manchen heiklen Situationen.

Bei **Swantje:** Ein großes Dankeschön für die Hilfe bei den Klonierungsexperimenten sowie den ganzen qRT-PCR.

Und zu guter Letzt bei Imke, Christiane, Daniel, Andrea A., Eva, Sonja und Kati Z: Es war eine wunderschöne Zeit, die ich sehr vermissen werde. Danke für die unendlich vielen Gesprächen, für die Ablenkungen, wenn`s mal wieder nicht so toll lief und vor allem für das Leben nach dem Labor.

Bei **Christiane, Katharina, Sonja, Andrea, Erik, Felix und Nora:** Für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit. Tausend Dank !

Bei **Katharina und Sonja:** Ich wüsste echt nicht, was ich in den letzten Monaten ohne Euch gemacht hätte. Danke dafür, dass ihr einfach da wart, zu gehört habt oder mich mit unseren unzähligen Kinobesuchen, Sport, Essen gehen, Fotografieren oder sonstigen Unternehmungen auf andere Gedanken gebracht habt.

Bei **Carolinchen:** Für all die unzähligen Gesprächen, für Deine aufmunternden Worte und deinen Optimismus, dass alles seinen Sinn hat.

Bei **meinen Eltern und meinem Bruder Felix:** Die mich in jedem Schritt meines Lebens unterstützt haben und mich immer wieder aufgefangen haben, wenn`s mir schlecht ging. Die es mir erlaubt haben, meine eigene Entscheidungen zu treffen, dafür, dass ich Fehler machen durfte, führ ihre Geduld und ihr Vertrauen. Aber besonders dafür, dass sie immer das Beste für mich getan haben und alles Erdenkliche bereit sind, dafür zu geben.



"Wio horrlich ist os, dass nomand oine Minule zu worlen braucht, um damit zu boginnon, do Welt langsam zu ündern!" 4m 7ad, 261031944