Die Bedeutung des Arylhydrocarbon Rezeptors für die Reifung und Funktion epidermaler Langerhans-Zellen in der Maus

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Bettina Jux
aus Lübeck

Düsseldorf

2008

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

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charlotte Esser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Januar 2008

Inhalt

I. Einleitung 7

1. Der Arylhydrocarbon Rezeptor 8

1.1 Allgemeines 8

1.2 Der AHR-Signalweg und seine Zielgene 9

1.3 Die Liganden des AHR 10
1.3.1 Natürliche AHR-Liganden 11
1.3.2 Endogene AHR-Liganden 12
1.3.3 AHR-Agonisten und –Antagonisten 12

2. Die Rolle des AHR in der Haut 13

2.1 Dermatologische Symptome der Überaktivierung des AHR beim Menschen 13

2.2 AHR-Modelle 14
2.2.1 Dermatologische Symptome der Überaktivierung des AHR beim Tier 14
2.2.2 Dermatologische Symptome des Fehlens des AHR bei der Maus 14

2.3 Aufbau der Haut 15
2.3.1 AHR Expression und Funktion in Keratinozyten 16
2.3.2 AHR Expression und Funktion in Langerhans-Zellen 17

3. Fragestellung 20

II. Material und Methoden 21

1. Material 21

1.1 Feinchemikalien und Verbrauchsmaterial 21

1.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme für molekularbiologische Methoden 21

1.3 Puffer und Medien 22

1.4 Monoklonale Antikörper und Fluorochromkonjugate 23

1.5 Materialien für die magnetische Zellseparation 24

1.6 Oligonukleotide (Primer) 24

1.7 Software 26

1.8 Versuchstiere 26

2. Methoden 27

2.1 Injektion von TCDD 27

2.2 Zellbiologische Methoden 27
2.2.1 Isolierung von epidermalen Zellen 27
2.2.2 Anreicherung von Langerhans-Zellen 28
2.2.3 Präparation einer Einzelzellsuspension aus Organen 29
2.2.4 Durchflusszytometrie 29
2.2.4.1 Extrazelluläre Färbung 29
2.2.4.2 Intrazelluläre Färbung 29
2.2.4.3 Phagozytose-Assay 30
2.2.5 ELISA 30
2.2.6 Kultivierung epidermaler Zellen mit GM-CSF 30
2.2.7 Proliferationsassay 30
2.2.8 Inkubation mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Natriumbutyrat 31
2.2.9 Apoptose-Assay 31

2.3 Molekularbiologische Methoden 31
2.3.1 RNA-Präparation für 1 – 10 x 10^6 Zellen 31
2.3.2 RNA-Präparation für < 1 x 10^6 Zellen 32
2.3.3 Konzentrationsbestimmung der RNA 32
2.3.4 RNA-Amplifikation 32
2.3.5 Mikroarray-Analyse – Probenvorbereitung und Auswertung 33
2.3.6 Reverse Transkription 34
2.3.7 Polymerase Kettenreaktion 34
2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese 35
2.3.9 Echt-Zeit-PCR (engl. Real-time-PCR) 35
2.3.9.1 Erstellung einer Standardkurve 36
2.3.9.2 Semiquantitative PCR 36

2.4 Immunhistochemischer Nachweis von LZ in Epidermishäutchen 37

2.5 Statistik 37

III. Ergebnisse 39

1. Isolation und Anreicherung epidermaler Zellpopulationen 39

2. Langerhans-Zellen exprimieren den AHR 42

3. Die Haut reagiert auf die Aktivierung des AHR mit TCDD 43

4. Durch TCDD lassen sich keine transkriptionellen Veränderungen in LZ induzieren 44

4.1 CYP1A1 und CYP1B1 lassen sich in LZ nicht induzieren 44

4.2 TCDD verändert nicht das globale Genexpressionsprofil von LZ 47
4.2.1 Qualitätskontrolle der Microarrays 47
4.2.2 Vergleich des Genexpressionsprofils von LZ aus TCDD-behandelten und DMSO-behandelten Mäusen 49
4.2.3 Die Gene des Fremdstoffmetabolismus waren auf den Microarrays nicht detektierbar . 53

4.3 Der AHR Repressor wir in LZ konstitutiv exprimiert 54
4.3.1 Der AHRR wird in epidermalen Zellen aber nicht in LZ durch TCDD aufreguliert 54

4.3.2 LZ exprimieren den AHRR konstitutiv in großer Menge 56
4.3.3 Mit einem HDAC-Inhibitor kann die Wirkung des AHRR nicht umgangen werden 56

4.4 TCDD hat einen geringen Effekt auf die Ausprägung von Oberflächenmolekülen auf LZ 57
4.4.1 Trypsinempfindlichkeit anderer Oberflächenmoleküle neben CD11c 58
4.4.2 TCDD führt zu einer stärkeren Expression von CD86 auf reifen LZ 59

4.5 TCDD beeinflusst die Phagozytosekapazität der LZ 61

5. Vergleich von LZ aus C57BL/6 Wildtyp und AHR$^{-/-}$ Mäusen 62

5.1 Phänotypische Unterschiede zwischen WT und AHR-defizienten LZ 62
5.1.1 Die dendritische Morphologie der LZ in der Epidermis ist unabhängig vom AHR 62
5.1.2 Größe und Granularität sind abhängig vom AHR 63
5.1.3 Die Ausprägung einiger ko-stimulatorischer Proteine ist abhängig vom AHR 65

5.2 Vergleich der Transkriptome von LZ aus Wildtyp- und AHR$^{-/-}$- Mäusen 66

5.3 Funktionelle Unterschiede zwischen AHR-defizienten und Wildtyp-LZ 68
5.3.1 AHR-defiziente LZ sind bessere Phagozyten 68
5.3.2 Die ko-stimulatorischen Fähigkeiten waren nicht beeinflusst 69

6. Keratinozyten beeinflussen LZ über die AHR-abhängige Expression von Zytokinen 70

6.1 AHR-abhängige Zytokinexpression in Keratinozyten 70

6.2 Die Sekretion von GM-CSF hat Einfluss auf die umgebenden LZ 72

IV. Diskussion 75

V. Zusammenfassung 91

VI. Literaturverzeichnis 93

Anhang 104

Verwendete Abkürzungen 104

Danksagung 110

I. Einleitung

Die Haut ist bei einem durchschnittlichen Erwachsenen mit rund 2m² und 15% des Körpergewichts das größte Organ des Menschen. Nur wenige Millimeter dick, bildet sie eine schützende Grenze zwischen der Innenwelt eines Menschen und seiner Umgebung. Durch den direkten Kontakt zur Außenwelt nimmt die Haut vielfältige und komplexe Aufgaben wahr. So verfügt die Haut über Sensoren für Schmerz, Temperatur und Tastsinn. Schutzfunktionen bietet die Haut, in dem sie eine Barriere vor dem Verlust von Wärme und Wasser und dem Eindringen von körperfremden Substanzen bildet. Weiterhin schützt sie vor mechanischen Verletzungen und DNA-Schäden durch ultraviolette Strahlung und ist in der Lage eingedrungene pathogene Erreger zu eliminieren. In Abhängigkeit von der Hautanatomie (Alter, Hautdicke, Durchblutung, Anzahl der Drüsen) (Marzulli und Maibach, 1996) kann es zur Resorption verschiedener, vor allem fettlöslicher Substanzen kommen (Timbrell, 1993). Salben und Pflegeprodukte werden so zusammengestellt, dass es zu einer Resorption kommt, beim Kontakt mit Umweltschadstoffen ist dies allerdings unerwünscht. Es wird angenommen, dass die Haut als weitere Schutzfunktion eine sogenannte biochemische Barriere bildet. Kommt es zur Absorption potentiell giftiger Fremdstoffe, kann die biochemische Barriere deren Abbau vermitteln, und so deren toxische Effekte verhindern (Williams et al., 1995; Marzulli und Maibach, 1996). Andererseits kann es durch die Mechanismen des Fremdstoffmetabolismus zur Generierung hochreaktiver toxischer Zwischenprodukte kommen, die zur Entwicklung von Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut oder zur Entstehung von Krebs beitragen können (Goerz et al., 1992).

Im Juni 2006 legte die Weltgesundheitsorganisation einen ausführlichen Bericht zum Einfluss der Umwelt (im weitesten Sinne) auf die Entstehung von Krankheiten vor[*], dazu gehörten auch Hauterkrankungen, Allergien und Krebs.

Wie die Haut auf äußere Reize anspricht und diese vermittelt, ist nach wie vor nicht vollständig verstanden und bedarf weiterer Aufklärung zur Vermeidung und Behandlung umweltinduzierter Erkrankungen.

[*] "Preventing disease through healthy environments: Towards an estimate of the environmental burden of disease"; http://www.who.int/en/

1. Der Arylhydrocarbon Rezeptor

1.1 Allgemeines

Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AHR) ist ein Mitglied der evolutionär konservierten PAS-bHLH Familie (Per-Arnt-Sim; homologe Proteine in Drosophila), mit dem Motiv einer „basic Helix-Loop-Helix" Region. Die PAS-Domäne ist charakteristisch für Proteine, die als „biologische Sensoren" eine Rolle in der Detektion und Anpassung an Veränderungen der Umwelt spielen. Der AHR steuert die Reaktion auf die zelluläre Umgebung als Sensor für endogene und xenobiotische niedermolekulare Substanzen (Gu et al., 2000; Carlson et al., 2002).

Als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor ist der AHR potentiell ein Teil der oben angesprochenen biochemischen Barriere, da er Fremdstoff-metabolisierende Enzyme induziert, die für den Abbau körperfremder Substanzen (Xenobiotika) sorgen. Viele Xenobiotika sind lipophil und können in Geweben gespeichert werden, wo sie ihre mögliche toxische Wirkung freisetzen. Durch die Biotransformation mit einem dafür spezialisierten Enzymsystem werden niedermolekulare Substanzen zu wasserlöslichen, ausscheidungsfähigen Produkten metabolisiert. Durch dieselben Mechanismen kann eine vorher ungiftige Substanz eventuell durch sogenannte Bioaktivierung auch in giftige Metabolite umgewandelt werden. So wird zum Beispiel das als Frostschutzmittel eingesetzte Ethylenglykol zur toxischen Oxalsäure metabolisiert (Timbrell, 1993).

Die Metabolisierung von niedermolekularen Fremdstoffen wird in drei Phasen unterteilt, wobei unterschiedliche Enzym-Gruppen benötigt werden. Die Cytochrom P450-Familie vermittelt die 1. Phase der Transformation durch Oxidation oder Reduktion des Fremdstoffes (Vrzal et al., 2004). Das dadurch polarisierte Produkt wird in Phase 2 mittels Transferasen (z.B. Glutathion-S-Transferase und Sulphotransferase) mit weiteren reaktiven Molekülen konjugiert (Vrzal et al., 2004). In der 3. Phase wird der Transport des Metabolits aus der Zelle reguliert (Greim und Deml, 1996). Viele an der Metabolisierung beteiligte Enzyme stehen unter der Kontrolle des AHR, weshalb dieser Rezeptor bisher vor allem im Rahmen der Toxikologie untersucht wurde.

Das Hauptorgan des Fremdstoffabbaus ist die Leber, und der AHR ist in diesem Organ gut untersucht. Etwa ein Drittel aller Publikationen über den AHR beinhalten Untersuchungen an der Leber (Quelle: http://www.ncbi.nlm.nih.gov)*. Der AHR ist allerdings in vielen anderen

* PubMed-Suche im November 2007: Stichwort Ah receptor gibt 2799 Einträge (328 Reviews); Stichworte liver AND Ah receptor gibt 989 Einträge (51 Reviews)

Organen und Zellen ebenfalls ausgeprägt (Li et al., 1994), was vermuten ließ, dass er neben der Regulation des Fremdstoffmetabolismus auch physiologische Aufgaben wahr-nimmt (Puga et al., 2005). Um dies noch genauer zu untersuchen, haben vor ca. 10 Jahren drei verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander Mäuse generiert, denen der AHR vollständig fehlt (Fernandez-Salguero et al., 1995; Schmidt et al., 1996; Mimura et al., 1997). In all diesen Mäusen konnte ein Defekt in der Leberentwicklung beobachtet werden. Die Lebern waren bis zu 50% kleiner im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Gruppe um Fernandez-Salguero *et al.* fand außerdem geringere Lymphozytenzahlen in Milz und Lymphknoten (Fernandez-Salguero et al., 1995), während Bradfield *et al.* zusätzlich Wachstumsstörungen innerhalb der ersten drei Lebenswochen beobachten konnten (Schmidt et al., 1996). Die Entwicklung von AHR-defizienten Mäusen liefert demnach Hinweise, dass der AHR neben seiner Vermittlerrolle im Fremdstoffmetabolismus weitere Funktionen einnimmt.

1.2 Der AHR-Signalweg und seine Zielgene

Im Zytosol liegt der AHR als Multiproteinkomplex in Verbindung mit zwei Molekülen Heatschock Protein 90 (HSP90) als Chaperon und weiteren stabilisierenden Proteinen vor (Abb. 1). Nach Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des AHR und als Folge zu einer Translokation in den Kern. Hier bindet der AHR an den so genannten AHR-nuclear translocator (ARNT), ebenfalls ein Mitglied der PAS-Familie. Dieses Heterodimer bildet den funktionellen Transkriptionsfaktor, welcher an einen bestimmten Sequenzbereich im Promoter, das Xenobiotika-responsive Element (XRE) bindet und damit die Induktion des entsprechenden Gens einleitet (Abb. 1) (Carlson et al., 2002; Vrzal et al., 2004).

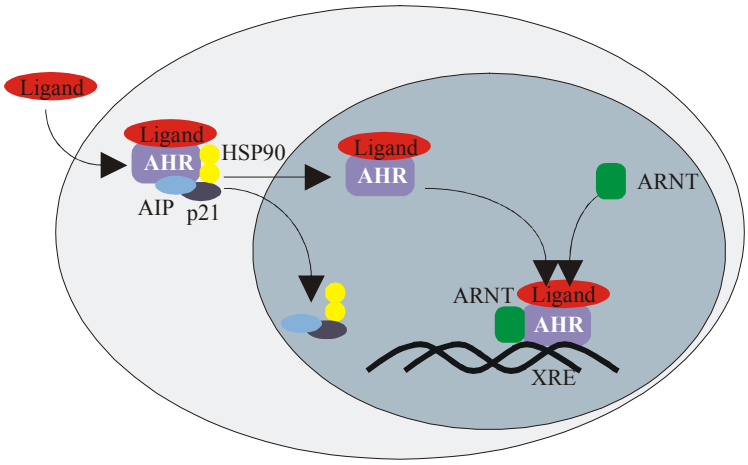

Abb. 1: Schema des AHR-Signalwegs (modifiziert nach www.biocarta.com)

Ein XRE besteht aus einer Kernsequenz mit der Basenfolge 5´-GCGTG-3´ und flankierenden Regionen aus jeweils 7 Basen (Yao et al., 1992; Sun et al., 2004). Die bekanntesten Zielgene des AHR-Signalwegs kodieren, wie oben beschrieben, für verschiedene Fremdstoff-metabolisierende Enzyme, darunter Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) und P450 1B1 (CYP1B1). Beide Gene besitzen mehrere XRE. Mit Hilfe bioinformatischer Methoden konnten in den vergangenen Jahren ca. 3000 Gene identifiziert werden, die ein oder mehrere XRE in ihrer Promotorregion enthalten. Hierzu gehören auch Gene, welche für Proteine des Zellzyklus, der Apoptose oder der Zelldifferenzierung kodieren (Sun et al., 2004).
Ob die XRE tatsächlich für die Regulation dieser Gene verwendet werden ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. So werden die Gene in starker Abhängigkeit vom AHR-Liganden und dem entsprechenden Zelltyp reguliert (Zhang et al., 2003; Frericks et al., 2006).
Der AHR-Repressor (AHRR) ist ebenfalls ein Zielgen des AHR und reguliert den Signalweg in einem negativen „feedback loop“, in dem er im Nukleus mit dem AHR um die Bindestelle an ARNT konkurriert. Da der AHRR keine DNA-Bindedomäne besitzt, ist das Heterodimer aus AHRR und ARNT jedoch transkriptionell inaktiv (Mimura et al., 1999).

1.3 Die Liganden des AHR

Die Bindestelle des AHR ist relativ unspezifisch, weshalb eine Vielzahl von Substanzen an den AHR binden kann. Minimale, strukturelle Voraussetzungen sind, dass der Ligand planar, hydrophob und unpolar ist. Eine Reihe anthropogener Substanzen wie halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAK) binden an den AHR. Als prominenteste Vertreter dieser Klasse sind Biphenyle und Dioxine zu nennen. Zu den AHR-Liganden gehören aber auch viele in der Nahrung vorkommende, bakterielle und pflanzliche Verbindungen aus der Gruppe der Flavonoide und Indole (Abb. 2) (Denison et al., 2003).

2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), der bekannteste Ligand des AHR, ist mit einer Bindungsaffinität zwischen 0,06 und 18,6 nM hochaffin. Die Affinität schwankt in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies (Connor et al., 2006). Giftige Dioxine wie TCDD entstehen als Nebenprodukt bei unvollständigen Verbrennungsprozessen von Müll, verbleitem Benzin, Stroh und Holz, aber auch bei industriellen Prozessen, wie bei der Herstellung von Pflanzenschutzmitteln und in der Metallurgie (Eisen- und Stahlherstellung)[*].

[*] Quelle: “Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risk Assessment of Dioxins and Dioxin-like PCBs in Food” der europäischen Kommission vom 23. November 2000

Der AHR wird umgangssprachlich auch „Dioxinrezeptor“ genannt, da er die toxischen Wirkungen dieser Gifte vermittelt. Um den AHR-Signalweg und seine Funktionen auf experimenteller Ebene aufzuklären, wird hauptsächlich TCDD eingesetzt.

1.3.1 Natürliche AHR-Liganden

Die evolutionäre Entstehung des AHR liegt geschätzte 450 Millionen Jahre zurück, lange bevor HAK in der Umwelt zu finden waren (Hahn, 2002). Es ist daher anzunehmen, dass ein endogener Ligand existiert. Jeuken und Mitarbeiter untersuchten verschiedene Extrakte aus Obst und Gemüse und fanden, dass die Nahrung die größte Quelle von AHR-Liganden darstellt (Jeuken et al., 2003). Natürliche Liganden, unter anderem Flavonoide und Indolderivate werden, im Gegensatz zu TCDD, über das durch den AHR induzierte Enzymsystem metabolisiert. Als Beispiele hierfür sind die Flavonoide Quercetin und Curcumin, die in Zwiebeln und Äpfeln beziehungsweise in Curry vorkommen, in Abbildung 2 aufgeführt.

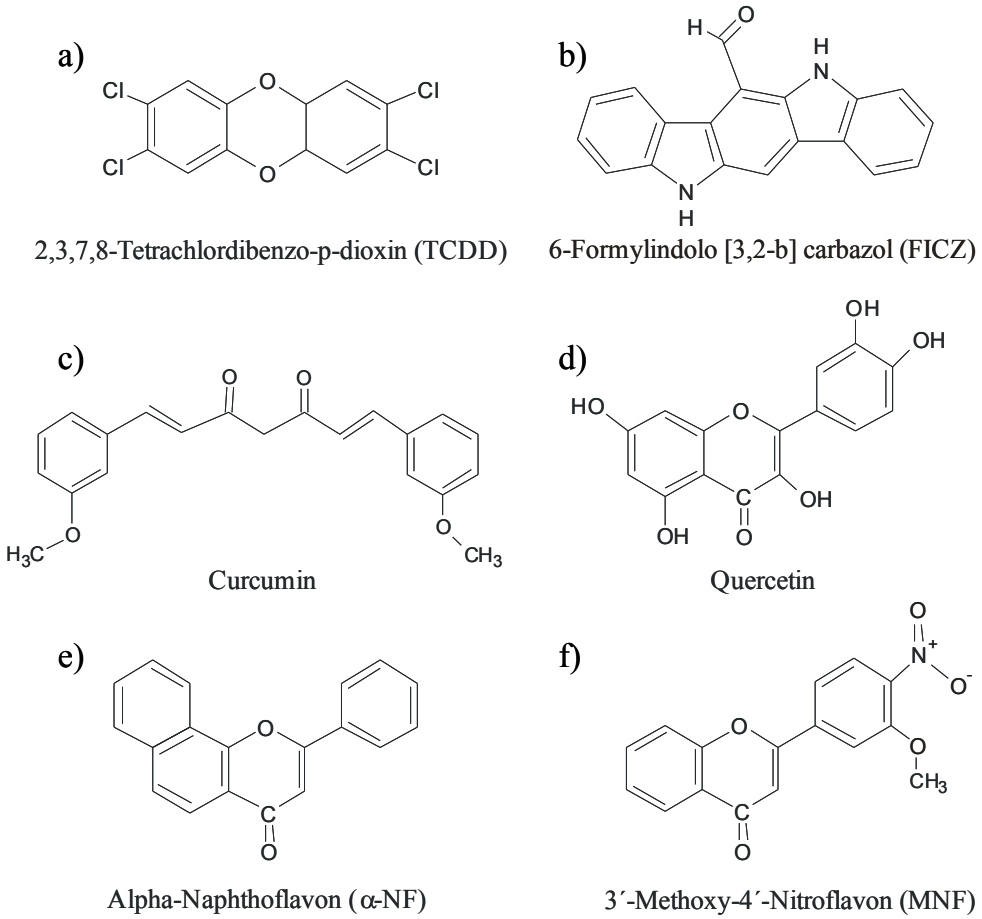

Abb. 2: Strukturformeln verschiedener AHR-Agonisten a) TCDD, b) FICZ, c) Curcumin, d) Quercetin (Ketoform) und AHR-Antagonisten e) α-Naphthoflavon, f) MNF.

1.3.2 Endogene AHR-Liganden

Bisher sind mehrere endogene Liganden identifiziert worden. Als AHR-Liganden isolierten Adachi und Mitarbeiter Indirubin und Indigo aus menschlichem Urin und Song *et al.* ein Indolderivat aus der Lunge von Schweinen (Adachi et al., 2001; Song et al., 2002). Erst vor kurzem ist ein sehr affiner Ligand des AHR (affiner als TCDD) entdeckt worden, der besonders für die Haut eine wichtige Rolle spielen könnte. Durch Ultraviolett B (UVB)-Strahlen entsteht aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan ein Dimer, 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), welches schon nach 3 Stunden den AHR aktiviert und damit zur Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme führt (Wei et al., 1998). Diese Wirkung ist, im Gegensatz zu TCDD nur transient, denn FICZ wird innerhalb weniger Stunden durch das induzierte Enzymsystem abgebaut. Da die Haut einer ständigen UVB-Strahlung ausgesetzt ist wird vermutet, dass FICZ als endogener Ligand eine physiologische Rolle wahrnehmen könnte, die über den AHR-Signalweg vermittelt wird, z.B. zur Steuerung des zirkardianen Rhythmus (Mukai et al., 2007). Hier muss noch einmal betont werden, dass die durch den AHR induzierten Zielgene durchaus variieren können, in Abhängigkeit vom Zelltyp, dem Liganden, dessen Affinität und Biotransformation.

1.3.3 AHR-Agonisten und –Antagonisten

TCDD und FICZ gehören zu den Liganden, welche zur Modulation von Zielgenen führen; sie wirken als so genannte Agonisten. Es existieren umgekehrt auch Antagonisten wie MNF und α-Naphthoflavon (Abb. 2). Die Mechanismen, über die eine Substanz als Antagonist wirkt, sind bisher nicht gut verstanden, und es gibt diesbezüglich verschiedene Möglichkeiten (Henry et al., 1999). So könnte der Antagonist nach seiner Bindung an den AHR dessen Translokation in den Kern verhindern, oder die Dissoziation der Chaperone z.B. HSP90 vom AHR blockieren. Für die Wirkung von MNF wird der zweite Fall vermutet. Weitere Mechanismen könnten die Verhinderung der Dimerisierung vom AHR mit ARNT oder eine Verhinderung der Bindung an das XRE sein. Ob ein AHR-Ligand als Agonist oder Antagonist wirkt, ist oft abhängig von der eingesetzten Konzentration, ein Beispiel hierfür ist α-Naphthoflavon (Nazarenko et al., 2001). Ferner kann die Wirkung eines AHR-Liganden vom untersuchten Zelltyp abhängen (Zhang et al., 2003). Die Verwendung von Antagonisten liefert neben dem „knock-out“ des AHR eine weitere experimentelle Möglichkeit, die Rolle des AHR in Zellen zu untersuchen.

2. Die Rolle des AHR in der Haut

Bereits zu Anfang wurde erwähnt, dass die Haut über Mechanismen des Fremdstoffmetabolismus verfügt. Als erste Barriere zur Umwelt und als Ausscheidungsorgan (über Schweiß- und Talgdrüsen) ist sie exponiert gegenüber einer Vielzahl potentieller AHR-Liganden. Dennoch ist die Expression und Funktion des AHR in der Haut mit einigen Ausnahmen bisher nur wenig erforscht (Swanson, 2004). Erste Erkenntnisse ergaben sich aus der Beobachtung dermatologischer Symptome nach humaner Exposition mit TCDD durch Industrieunfälle und kontaminierte Nahrungsmittel, wodurch deutlich wurde, dass die Haut des Menschen sehr empfindlich auf TCDD reagiert.
Die systemisch toxischen Auswirkungen einer TCDD-Exposition sind allerdings vielfältig. So verursacht TCDD Immunsuppression, Thymusatrophie, Kachexie und Leberschäden. Außerdem fördert die Exposition mit TCDD die Tumorbildung und embryonale Fehlbildungen (Holsapple et al., 1991).
Im Folgenden werden die Auswirkungen einer AHR-Überaktivierung auf die Haut beim Menschen und die AHR-Aktivierung sowie das Fehlen des AHR im Tiermodell geschildert.

2.1 Dermatologische Symptome der Überaktivierung des AHR beim Menschen

1957 untersuchten die Dermatologen Kimmig und Schulz die Ursache von Hautveränderungen bei Arbeitern einer Chemiefabrik. Sie identifizierten TCDD als die Substanz, welche die sogenannte Chlorakne auslöst (Kimmig et al., 1957), eine systemische Intoxikation der Haut, begleitet von Comedonen (Mitessern), Pusteln und Talgzysten. Bei Chemieunfällen (BASF, Ludwigshafen 1953; Seveso, Italien 1976) oder auch durch Aufnahme über kontaminierte Lebensmittel (Yusho, Japan 1968) kam es zur Exposition von Menschen mit TCDD und verwandten Chemikalien wie polychlorierten Biphenylen (PCB). Auch hier konnte in vielen Fällen die Entstehung von Chlorakne beobachtet werden, wobei es keine klare Korrelation zwischen der Höhe der TCDD-Belastung und Chlorakne gibt. Trotzdem wird dieses Symptom als klinischer Marker für eine TCDD-Vergiftung verwendet. Da TCDD hydrophob und schwer abbaubar ist, lagert es sich im Fettgewebe ein. TCDD hat im Menschen eine Halbwertzeit von ca. 7 Jahren (Geyer et al., 2002) und die Chlorakne dauert im Mittel 26 Jahren (Moses et al., 1984). Chlorakne ist das auffälligste, aber nicht das einzige auf der Haut erkennbare Symptom einer TCDD-Exposition. In Yusho brachten Frauen, die während der Belastung mit PCB-kontaminiertem Öl schwanger waren, Kinder mit Hyperpigmentierung, die sogenannten „Cola-Babys“, zur Welt (Yamashita et al., 1985).

Hyperpigmentierung wurde auch bei anderen betroffenen Personen beobachtet. Weiterhin traten Hornschichtverdickungen (Hyperkeratose), Lichtüberempfindlichkeit (Porphyria cutanea tarda) (Dunagin, 1984) und vermehrter Haarwuchs (Hypertrichose) auf. In Einzelfällen kam es zu verstärkten Alterungserscheinungen (Suskind et al., 1984).

2.2 AHR-Modelle

2.2.1 Dermatologische Symptome der Überaktivierung des AHR beim Tier

Die Verwendung von TCDD als Modellsubstanz zur Erforschung des AHR bringt zwei Herausforderungen mit sich. Zum Einen ist TCDD stark toxisch, zum Anderen ist die Reaktion auf die Aktivierung stark abhängig von der zu untersuchenden Spezies - die sensitivste Spezies sind Meerschweinchen mit einer LD_{50} von 0.6-2 µg/kg, die unsensitivste Spezies sind Hamster mit einer LD_{50} von 5 mg/kg (Holsapple et al., 1991). Zur Untersuchung der Effekte einer Aktivierung des AHR in der Haut durch TCDD gibt es nur wenige Tiermodelle, die ähnliche Reaktionen zeigen wie die menschliche Haut. Dazu gehört die innere Oberfläche von Kaninchenohren, die Gesichtshaut von Affen und die Haut eines bestimmten hairless-Mausstammes (HRS/J) (Puhvel et al., 1988). Die hairless-Mäuse, welche eine rezessive Mutation im Hairless-Gen (*hr/hr*) tragen, wurden bisher hauptsächlich verwendet, um die Toxizität von TCDD in der Haut zu untersuchen (Knutson et al., 1982; Puhvel et al., 1982). Beobachtungen in diesen Studien beziehen sich vor allem auf die Entstehung von Hauttumoren (Plattenepithelkarzinom) (Poland et al., 1982) und Hyperkeratose (Puhvel et al., 1988). Ob bei diesen Mäusen auch die anderen, beim Menschen auftretenden Symptome, beobachtet wurden, ist bislang nicht beschrieben.

2.2.2 Dermatologische Symptome des Fehlens des AHR bei der Maus

Unter 1.1 wurde schon die Verwendung von AHR-defizienten Mäusen zur AHR-Forschung erwähnt. Die Arbeitsgruppe von Fernandez-Salguero beschrieb eine starke Veränderung der Haut mit zunehmendem Alter (Fernandez-Salguero et al., 1997). Es wurde ein kreisrunder Haarausfall im Zusammenhang mit dem Auftreten von Geschwüren auf dem Rücken beobachtet, sowie eine verstärkte Narbenbildung mit einer Verdickung der oberen Hautschichten und in einigen Fällen auch eine schlechtere Wundheilung. Diese Hautveränderungen sind in einem Alter von 6 bis 13 Monaten aufgetreten (was erklären könnte,

warum bei den anderen beiden Studien hierzu keine Ergebnisse vorliegen). Mimura *et al.* untersuchten die Rolle des AHR in der Embryonalentwicklung (Mimura et al., 1997). Sie ersetzten den AHR durch β-Galactosidase. Dieses Enzym kann X-Gal (5-Brom-chlor-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid) in einen blauen Farbstoff umwandeln. Die Embryos zeigten eine Schach-Färbung der Epidermis. Zusammengenommen lassen die geschilderten Beobachtungen die Vermutung zu, dass der AHR in der Haut eine physiologische Rolle wahrnimmt.

2.3 Aufbau der Haut

Die Haut kann grob in drei Schichten unterteilt werden (Abb. 3A), die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Bindegewebe) und die Subkutis (Fettgewebe). Diese Kompartimente bestehen wiederum aus einem Netzwerk an unterschiedlichen, teilweise stark spezialisierten Zelltypen, die sich gegenseitig beeinflussen können.

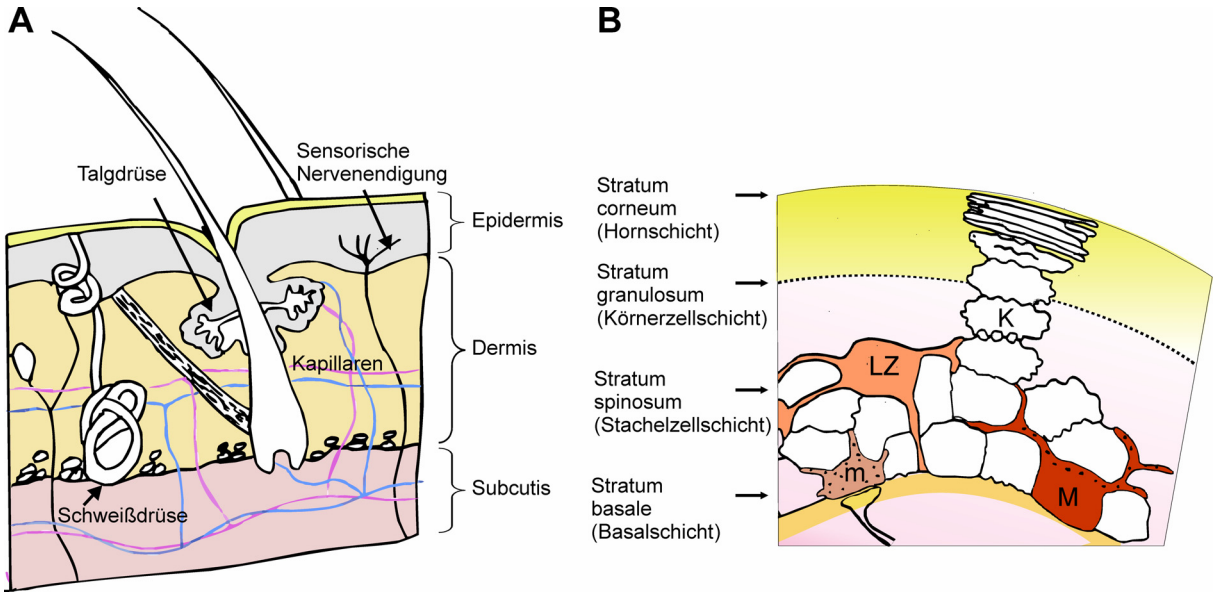

Abb. 3: A) Aufbau der Haut; B) Aufbau der Epidermis.
(K, Keratinozyt; LZ, Langerhans-Zelle; m, Merkel-Zelle; M, Melanozyt).

Die Epidermis enthält Langerhans-Zellen (LZ) (1-3%), die neben dermalen Dendritischen Zellen und Makrophagen in der Dermis das Immunsystem in der Haut repräsentieren. Weiterhin befinden sich in den oberen Hautschichten die Melanozyten (ca. 5%), welche durch die Produktion des Farbstoffs Melanin die Pigmentierung der Haut regulieren. Den größten Anteil machen die Keratinozyten mit ca. 90% aus (Abb. 3B). Sie dienen als Träger der Hautstruktur und nehmen darüber hinaus auch immunologische Funktionen durch die Sekretion verschiedener Zytokine wahr.

Die beschriebenen Effekte einer Überaktivierung des AHR und des Fehlens des AHR betreffen vor allem die oberen Hautschichten (Puhvel et al., 1988). Dies lässt sich vermutlich dadurch begründen, dass die Epidermis im direkten Kontakt mit der Außenwelt steht. Im Fokus dieser Dissertation stand die Untersuchung des AHR in den beiden Populationen der Epidermis mit immunologischer Bedeutung, den Keratinozyten und den Langerhans-Zellen.

2.3.1 AHR Expression und Funktion in Keratinozyten

Die Keratinozyten bilden in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungsstatus vier Schichten in der Epidermis (Abb. 3B). Die Menge an AHR steigt proportional zum Differenzierungsgrad (Swanson, 2004). Jones und Reiners demonstrierten eine proportionale Korrelation des AHR-Expressionsniveaus und der Aktivierung des AHR, indem sie undifferenzierte murine Keratinozyten aus der Basalschicht und differenzierte Keratinozyten aus den oberen Epidermisschichten in Kultur mit 1 nM TCDD belasteten. Sie konnten zeigen, dass die typischen Zielgene des AHR in differenzierten Keratinozyten stärker induziert werden, als in den undifferenzierten Zellen (Jones et al., 1997). Durch die Aktivierung des AHR mit TCDD wird auch die Differenzierung selbst beeinflusst. TCDD vermindert die „epidermal growth factor“-stimulierte DNA-Synthese, was zu einer gesteigerten Differenzierung und verminderten Proliferation der Keratinozyten der Basalschicht führt (Greenlee et al., 1985).
Tauchi *et al.* generierten eine Maus mit einem in Keratinozyten konstitutiv aktiven AHR (Tauchi et al., 2005). Zu beobachten war die Entstehung von Ekzemen auf dem Rücken, sowie Acanthose (Hautverdickung durch vermehrtes Keratinozytenwachstum) und Hyperkeratose ab der dritten bzw. vierten Woche nach der Geburt. In einer Microarrayanalyse wurden über 300 Genen identifiziert, die in Abhängigkeit des aktiven AHR differenziell reguliert waren. Darunter waren nicht nur die typischen Gene der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme, etwa 17% der regulierten Gene waren von immunologischer Bedeutung.

Keratinozyten nehmen eine wesentliche Rolle im Immunsystem der Haut ein. Sie sezernieren eine Reihe von Zytokinen. Das sind kleine Proteine (~ 25 kDa), die von verschiedenen Zellen ausgeschüttet werden können und autokrin oder parakrin wirken (Janeway et al., 2001). Verschiedene, von Keratinozyten sezernierte Zytokine beeinflussen die Aktivität und Funktion der umliegenden Zellen, wie LZ und Melanozyten (McKenzie et al., 1990; Kondo, 1999). Die Interleukine IL-1β, IL-6, IL-15, GM-CSF und TNF-α stimulieren die Funktion und Migration der LZ, während IL-10 die Funktion von LZ inhibiert. Mit Ausnahme von IL-

1β ist die direkte Abhängigkeit der Expression vom AHR in Keratinozyten bisher nicht eindeutig geklärt. TCDD stimuliert die IL-1β Expression zeit- und dosisabhängig, wobei Henley *et. al.* eine posttranskriptionale Regulation durch den AHR zeigen konnten (Henley et al., 2004).

2.3.2 AHR Expression und Funktion in Langerhans-Zellen

Langerhans-Zellen (LZ) machen nur etwa 1-3% der epidermalen Zellen aus. Sie wurden 1868 von Paul Langerhans entdeckt, der die Zellen auf Grund ihrer dendritischen Morphologie zunächst als Nervenzellen betrachtete (Langerhans, 1868; Becker, 2003). Erst 1985, also mehr als 100 Jahre nach ihrer Entdeckung, wurden die LZ durch Schuler und Steinman der Familie der dendritischen Zellen (DZ) und damit dem Immunsystem zugeordnet (Schuler et al., 1985b; Romani et al., 2003). DZ, also auch LZ, exprimieren ein charakteristisches Profil an Oberflächenproteinen wie MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex, major histocompatibility complex) Klasse II Moleküle und CD11c (Banchereau et al., 1998). CD11c unterstützt die Adhäsion von Lymphozyten und DZ, während über MHC-II Antigene an T-Zellen präsentiert werden (Banchereau et al., 1998). Die Expression von E-Cadherin, welches die Adhäsion von LZ zu Keratinozyten vermittelt (Tang et al., 1993), sowie eine ATPase-Aktivität (Mackenzie et al., 1975), die Expression des Oberflächenproteins Langerin (CD207) (Valladeau et al., 2002) und die Birbeck Granula (Birbeck et al., 1961) sind Besonderheiten der LZ und können zur Identifizierung der Zellen genutzt werden. LZ stammen aus dem Knochenmark (Katz et al., 1979) und sitzen in der Epidermis, wo sie eine Wächterfunktion („Sentinels“) übernehmen. Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen nehmen sie über Pinozytose (kontinuierlicher Prozess zum Filtern der umgebenden Gewebsflüssigkeit) und Phagozytose (durch spezielle Rezeptoren vermittelt) Antigene auf (Reis e Sousa et al., 1993). Die Antigenaufnahme bewirkt eine morphologische und funktionelle Veränderung der LZ, die auch als Reifung bezeichnet wird. Sie verlieren ihre Phagozytosefähigkeit und verändern die Expression verschiedener Oberflächenproteine. Diese ermöglichen die Migration der LZ zu den Haut-drainierenden Lymphknoten wo die Stimulation naiver T-Zellen stattfindet (Romani et al., 2003). Das aufgenommene Antigen wird prozessiert und über MHC-II Moleküle an naive T-Zellen präsentiert. Dieses sogenannte Signal 1 wird durch die Expression ko-stimulatorischer Moleküle, die das Signal 2 liefern, ergänzt. Antigen-spezifische T-Zellen, die beide Signale empfangen, werden stimuliert, was eine Proliferation und Differenzierung zu T-Effektorzellen und damit eine Immunantwort auslöst. Die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD24a und CD80 begünstigt dabei eine Induktion einer T_H1-Immunantwort, die

zur Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen führt (Harris et al., 1999), während über die Expression von CD86 eher eine T_H2-vermittelte Immunantwort zur Aktivierung von B-Zellen ausgelöst wird (Harris et al., 1999).

Die Reifung von LZ kann auch durch Kultivierung induziert werden. LZ, die für drei Tage *ex vivo* kultiviert wurden, weisen morphologisch und funktionell die gleichen Merkmale auf wie reife LZ (Schuler et al., 1985b). Hemmi *et al.* zeigten, dass LZ auch unter nicht-inflammatorischen Bedingungen in geringer Zahl zum Lymphknoten migrieren, nachdem sie in der Haut Selbst-Antigen aufgenommen haben (Hemmi et al., 2001). Diese LZ befinden sich allerdings in einem nicht vollständig reifen Status, hierdurch wird eher eine Toleranz als eine Immunantwort induziert (Lutz et al., 2002).

Seit Kurzem wird die Rolle der LZ in der Immunantwort neu diskutiert, nachdem unter anderem Allan *et al.* und Zhao *et al.* zeigten, dass nach einer viralen Hautinfektion die T-Zell-Antwort nicht durch LZ ausgelöst wird (Allan et al., 2003; Zhao et al., 2003). Zu dieser Diskussion trug auch ein neuer Versuchsansatz mit LZ-defizienten Mäusen bei. Eine induzierbare Depletion von LZ wurde durch Gabe von Diphtherietoxin bei „knock-in" Mäusen erreicht, die den Diphtherietoxin-Rezeptor unter der Kontrolle des CD207-Promotors exprimieren. Dieser Ansatz führte jedoch zu kontroversen Ergebnissen. In einer experimentellen Anwendung waren die LZ nicht notwendig, um eine Immunantwort (Kontakthypersensibilisierung gegen DNFB) zu induzieren, in dem anderen Fall war die Immunantwort nach LZ-Depletion signifikant vermindert (Bennett et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005). Im Gegensatz dazu führte eine beständige Depletion der LZ durch eine transgene, stabile Diphtherietoxin-Expression in $CD207^+$ Zellen zu einer gesteigerten Kontakthypersensibilisierungsreaktion (Kaplan et al., 2005). Diese Experimente zeigen, dass LZ sowohl ein immunogenes als auch ein tolerogenes Potential besitzen, was allerdings noch weitgehend unbekannten Regulationsmechanismen unterworfen ist.

Ob LZ den AHR exprimieren, ist bisher nicht beschrieben. Bislang befasste sich nur eine Studie mit dem Effekt von TCDD auf LZ (Puhvel et al., 1989). Puhvel *et al.* verglichen dabei LZ aus Wildtyp und den oben schon erwähnten hairless Mäusen (HRS/J), die eine sensitivere Form des AHR ausprägen. Die LZ aus hairless-Mäusen waren nach TCDD Behandlung kleiner und bildeten weniger Dendriten aus, allerdings nahm die Zahl der LZ/mm² Epidermis zu. In Wildtyp-Mäusen war dieser Effekt nicht erkennbar.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie die Haut auf einen AHR-Liganden reagieren könnte. Einerseits könnte der Fremdstoff durch die Aktivierung des AHR und die damit verbundene

Induktion der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme abgebaut und ausgeschieden werden, ohne eine allergische oder Haut-irritierende Reaktion (Kontaktdermatitis) auszulösen. Andererseits ist es denkbar, dass ein AHR-Ligand eine Kontaktdermatitis auslöst. Sollte es sich bei der niedermolekularen Chemikalie um ein Irritanz handeln, kann diese (auch ohne Metabolisierung) eine irritative (akute toxische) Kontaktdermatitis auslösen. Die metabolische Umsetzung eines Liganden zu einem proteinreaktiven Hapten könnte außerdem durch Bindung an körpereigene Proteine und Bildung eines Neoantigens zur T-Zell-abhängigen Allergie, der sogenannten allergischen Kontaktdermatitis führen. Diese dritte Reaktion wird durch eine Studie von Anderson *et al*. bestätigt, in der gezeigt wurde, dass die Metabolisierung von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen zu reaktiven Metaboliten notwendig ist, um eine Kontakthypersensibilisierung auszulösen (Anderson et al., 1995). Hieraus ergibt sich die Frage, welche Rolle die LZ in der Vermittlung von Immunantworten gegen niedermolekulare Substanzen einnehmen, d.h. ob sie eine Kontaktdermatitis induzieren, indem sie Neoantigene an T-Zellen präsentieren, oder ob sie durch ihr tolerogenes oder immunsuppressives Potential eine Immunreaktion gegen niedermolekulare Substanzen verhindern.

3. Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Expression und Funktion des AHR in epidermalen Langerhans-Zellen.

Vor dem Hintergrund, dass Liganden des AHR durch die Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme (XME) zu proteinreaktiven Substanzen umgesetzt werden und eine Kontakthypersensibilisierung auslösen können (Anderson et al., 1995) sollte geklärt werden, ob die Haut über Mechanismen verfügt, die Immunantworten gegen harmlose niedermolekulare Substanzen verhindern oder verstärken.

Hierfür wurde untersucht, ob

1. der AHR in den Zellpopulationen der Epidermis exprimiert wird, und
2. seine Aktivierung mit TCDD zur Induktion von XME führt, (was Liganden entweder zu Haptenen metabolisieren könnte, oder Fremdstoffe zum Schutz des Körpers abbauen kann)
3. das interagierende Netzwerk der epidermalen Zellen (LZ und Keratinozyten) durch die Aktivierung des AHR mit TCDD betroffen ist.

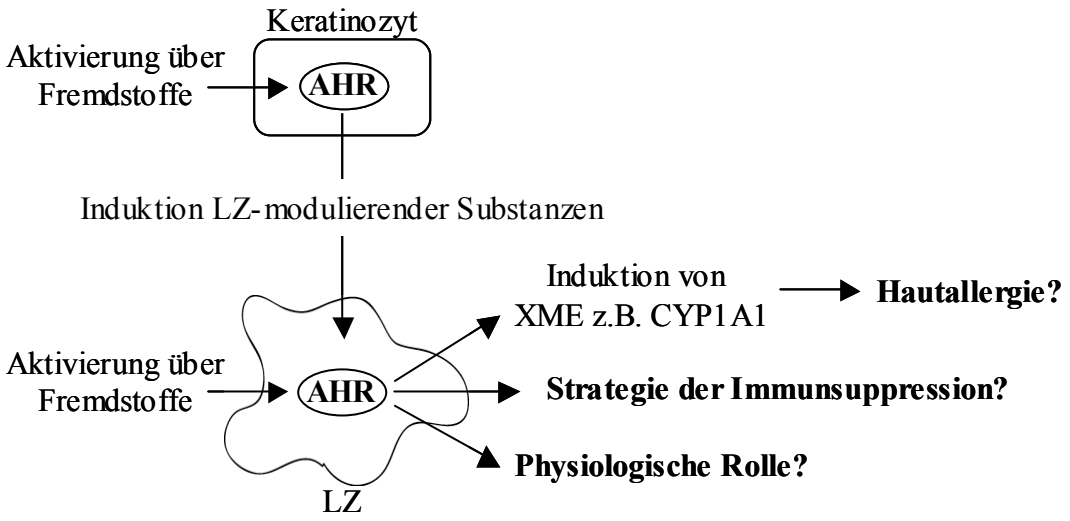

Abb. 4: Schema zur Fragestellung.

Mittlerweile ist mehrfach beschrieben, dass der AHR auch physiologische Abläufe neben dem Fremdstoffmetabolismus reguliert, weshalb ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit darauf lag, einen Vergleich von Zellen mit und ohne AHR durchzuführen. Es wurde untersucht, ob

4. der AHR eine physiologische Rolle in LZ wahrnimmt
5. das interagierende Netzwerk der epidermalen Zellen (LZ und Keratinozyten) durch das Fehlen des AHR betroffen ist

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Feinchemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Sigma, Deisenhofen bezogen.

Aqua dest.	Hauseigene Reinstwasseranlage, TKA-LAB
Dinatriumhydrogenphosphat [Na_2HPO_4]	Merck, Darmstadt
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt und unvergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat [KH_2PO_4]	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid [NaCl]	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid [KCl]	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid [NaOH]	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid [NH_4Cl]	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
Trypsin ohne EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
BSA, Fraktion 5	Serva, Heidelberg
Tris	Carl Roth, Karlsruhe

Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von Greiner (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

1.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme für molekularbiologische Methoden

Agarose	Peqlab, Erlangen
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Längenstandard, 100 bp-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I (RNase frei)	Invitrogen, Karlsruhe
25 mM EDTA	Fermentas, St. Leon-Roth
dNTP, 10 mM	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
MMLV Reverse Transkriptase (200 U/µl),	
5x Reaktionspuffer	Promega, Mannheim
100 mM DTT	Promega, Mannheim
RNase Inhibitor (RNase out, 40 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe

Taq Polymerase (5 U/µl), 10x PCR-Puffer	Natutec, Frankfurt
Oligo (dT-Primer)	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Sybr Green	Quantace, Berlin
TRIzol™	Invitrogen, Karlsruhe

1.3 Puffer und Medien

Alle Puffer wurden sterilfiltriert oder autoklaviert und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) pH 7,4

140 mM NaCl

2 mM KCl

1,5 mM KH_2PO_4

8 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$

MACS-Laufpuffer

PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA

FACS-Puffer

140 mM NaCl

4 mM KCl

2 mM KH_2PO_4

20 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$

0,7 mM EDTA

ACT-Puffer für die Erythrozytenlyse, pH 7,2

17 mM Tris

160 mM NH_4Cl

Zellkulturmedium (Komplettmedium) zur Kultivierung von epidermalen Zellen und LZ

500 ml RPMI (PAA Laboratories, Cölbe)

50 ml Fötales Kälberserum (PAA Laboratories)

Antibiotika: 100 U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA Laboratories)

Zur Kultivierung von epidermalen Zellen und LZ wurde dem Medium 10 ml 7,5% $NaHCO_3$ als Puffersubstanz zugefügt.

BSA-Dichtegradient

186 ml PBS

29 ml 1M NaOH

65 ml Aqua bidest

Die Lösung wurde sterilfiltriert, mit 106 g BSA überschichtet und über Nacht bei 4°C (ohne schütteln) gelöst.

Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser

4 ml DEPC wurden auf 2 l Wasser gegeben und über Nacht gerührt. Danach wurde die Lösung autoklaviert und aliquotiert.

Tris-Acetat-EDTA-Pufferlösung (TAE), pH 8,0

2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

40 mM Tris

20 mM Eisessig

Agarosegel 1%

0,4g Agarose in 40 ml TAE-Puffer

Die Agarose wurde durch Kochen gelöst, der Lösung wurde 1 µl einer Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) zugefügt.

Gel-Probenpuffer

50 % (v/v) Glycerin

0,01 % (w/v) Bromphenolblau in TAE

1.4 Monoklonale Antikörper und Fluorochromkonjugate

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die folgenden Maus-spezifischen Antikörper verwendet:

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein	APC	Allophycocyanin

Tabelle 1: Liste der verwendeten Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
B220	PE	RA3-6B2	BD Bioscience, Heidelberg
CD3ε	APC	145-2C11	eBioscience, San Diego, CA, USA
CD4	APC	RM4-5	BD Bioscience, Heidelberg
CD11b	PE	M1/70	BD Bioscience, Heidelberg
CD11c	PE	HL3	BD Bioscience, Heidelberg
CD16/32	Purified	2.4G2	BD Bioscience, Heidelberg
CD16/32	PE	2.4G2	BD Bioscience, Heidelberg
CD24a	FITC	M1/69	BD Bioscience, Heidelberg
CD40	Biotin	3/23	BD Bioscience, Heidelberg
CD44	FITC	IM7	BD Bioscience, Heidelberg
CD80	Biotin	16-10A1	BD Bioscience, Heidelberg
CD86	Biotin	GL1	BD Bioscience, Heidelberg
CD207	Biotin	926G4	AbCys (Paris, Frankreich)
MHC-II	APC	M5/114.15.2	eBioscience, San Diego, CA, USA
MHC-II	PE	M5/114.15.2	BD Bioscience, Heidelberg
Streptavidin	FITC		BD Bioscience, Heidelberg
Streptavidin	PerCP		BD Bioscience, Heidelberg

1.5 Materialien für die magnetische Zellseparation

Folgende microBeads und Magnetsäulen wurden von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach bezogen:

Anti-PE microBeads

Magnetsäulen der Größe MS und LS

1.6 Oligonukleotide (Primer)

Intronüberspannende Oligonukleotide wurden mit dem Programm *Primer 3* entworfen und von Operon Biotechnologies GmbH, Köln synthetisiert.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Primer

Primer Bezeichnung	Sequenz (5´→ 3´)	Annealing-temperatur	Fragment-größe
AHR vorwärts AHR rückwärts	AGG ACC AAA CAC AAG CTA GA TGG AGA TCT CGT ACA ACA CA	56°C	391
AHRR vorwärts AHRR rückwärts	GCC AAT GCT GTC TAA TGA AG AAC AGA GCA CCA AGA AAA CA	54°C	336
Cdkn 1a vorwärts Cdkn 1a rückwärts	AAG AAG CCC AGT ACT TCC T CAC TTC AGG GTT TTC TCT TG	56°C	214
Für die Echt-Zeit-PCR CYP1A1 vorwärts CYP1A1 rückwärts	 TCC TTG CAT GTC CAT GTT TC TGC ATA AGC AAA ATA CAG TCC A	55°C	344
Für die konventionelle PCR CYP1A1 vorwärts CYP1A1 rückwärts	 CCC ACA GCA CCA CAA GAG A AAG TAG GAG GCA GGC ACA A	60°C	499
CYP1B1 vorwärts CYP1B1 rückwärts	GAC CCG GAT GTT TTG TGA AT CAT GGT GAG CAG CAA AAG AA	55°C	232
GM-CSF vorwärts GM-CSF rückwärts (Overbergh et al., 2003)	GCC ATC AAA GAA GCC CTG AA GCG GGT CTG CAC ACA TGT TA	60°C	114
IL-1β vorwärts IL-1β rückwärts	TGA AGG AGC TCC CTT GTC AT TGC AGG CTA TGA CCA ATT CA	55°C	286
IL-6 vorwärts IL-6 rückwärts	ATG AAG TTC CTC TCT GCA AGA GAC T CAC TAG GTT TGC CGA GTA GAT CTC	51°C	638
IL-10 vorwärts IL-10 rückwärts (Giulietti et al., 2001)	GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA AC TGC TCC ACT GCC TTG CT	60°C	191
IL-15 vorwärts IL-15 rückwärts	CAG TGA CTT TCA TCC CAG TT CAT TTG GAC AAT GCG TAT AA	55°C	244
Mef 2A vorwärts Mef 2A rückwärts	TAA GCA GTT CTC AAG CCA CT TGA TGT TCT GGT TGG TGT TA	56°C	300
Nap1l1 vorwärts Nap1l1 rückwärts	GCC TAT TTT CGT GAA CAT TGA A GAA TAG AAC CAT TTG GGG ACT G	56°C	214
RPS6 vorwärts RPS6 rückwärts	ATT CCT GGA CTGACA GAC AC GTT CTT CTT AGT GCG TTG CT	51-60°C	246
TNF-α vorwärts TNF-α rückwärts	ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC CGC CCA AAG TAG ACC TGC CCG GAC TC	60°C	692

Alle Oligonukleotide wurden mit Aqua bidest. auf 100 µM verdünnt und bei –20°C gelagert.

1.7 Software

GraphPad Prism 4.0	GraphPad, San Diego, CA, USA
Office 2000	Microsoft, Redmond, WA, USA
Win MDI	The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA
Cell Quest Pro und 3.3	BDBioscience, Heidelberg
Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research; Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1998)

1.8 Versuchstiere

Folgende Mausstämme wurden verwendet:
C57BL/6 wurden von Janvier (Le Genest-St-Isle, Frankreich) bezogen.
B6;129-AHR^{tm1Bra}/J (AHR-defizient) sowie SKH1-Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany) bezogen.

In den Experimenten wurden weibliche Mäuse im Alter von 6 – 12 Wochen verwendet. Die Tiere wurden im institutsinternen Tierhaus unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten und gezüchtet. Standardfutter (SNIFF Spezialdiäten, Soest) und Wasser standen zur freien Verfügung.

Alle Experimente wurden in Wahrung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt.

2. Methoden

2.1 Injektion von TCDD

Um die Auswirkungen von TCDD auf die Zellen der Haut zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse und AHR-defiziente Mäuse mit 10 µg/kg in DMSO gelöstem TCDD in Olivenöl intraperitoneal (i.p.) injiziert. Das TCDD (LGC Promochem, Wesel) wurde zuvor auf 2 µg/ml verdünnt, so dass, je nach Gewicht des Versuchstieres, 90-100 µl appliziert wurden. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO in Öl i.p. appliziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Mäuse durch Ersticken mit CO_2 getötet. Haut und verschiedene Organe wurden für Experimente unter aseptischen Bedingungen entnommen.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von epidermalen Zellen

Die Isolierung primärer epidermaler Zellen wurde von zwei Hautregionen vorgenommen. Zum einen wurden die Zellen aus der Haut der Ohren gewonnen, und zum anderen aus der Rückenhaut. Die Ohren wurden am Knorpel abgeschnitten und in kaltem PBS bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Ohren kurz in 70% Ethanol desinfiziert, nochmals in sterilem PBS gewaschen, für ca. 5 min getrocknet und anschließend entlang der zentralen Knorpelschicht geteilt. Die Ohrhälften wurden mit der dermalen Seite in einer Petrischale auf 0,25% Trypsin/PBS für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Rückenhaut wurde vor der Verarbeitung mit Pinzetten von den Haaren befreit, anschließend für ca. 5 Sekunden in 70% Ethanol zur Desinfektion geschwenkt und danach in sterilem PBS gelagert. Vor der Inkubation auf Trypsin musste das subkutane Fett der Rückenhaut mit einem Skalpell entfernt, und die Haut in ca. 1 cm² große Stücke geschnitten werden. Nach der Inkubation ließ sich die Epidermis beider Hautregionen mit Hilfe einer Pinzette von der Dermis trennen.

Für die Gewinnung von Keratinozyten wurde die Epidermis in Komplettmedium gelegt und mechanisch durch Zerzupfen und vorsichtiges Zerdrücken mit Pinzetten und Stempeln eine Einzelzellsuspension hergestellt.

Sollte die Epidermis zur Analyse oder Aufreinigung von Langerhans-Zellen verwendet werden, wurde die Epidermis in Komplettmedium mit 130 U/ml DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) für weitere 15 min. inkubiert, um dann mit Pinzetten und Stempeln eine

Einzelzellsuspension herzustellen. Die Zellsuspensionen wurden zweimal durch Zentrifugation bei 300 x g für 8 min bei 4°C in PBS gewaschen. Die Zellzahl und der Anteil der lebenden Zellen wurden mittels Trypanblauexklusion in der Neubauerkammer bestimmt.

2.2.2 Anreicherung von Langerhans-Zellen

LZ wurden aus Suspensionen epidermaler Zellen angereichert. Dafür wurden die epidermalen Zellen zunächst für 16 Stunden in Komplettmedium kultiviert. Hier fand eine Anreicherung dadurch statt, dass Keratinozyten und Melanozyten adhärent wachsen, LZ aber im Überstand verbleiben (Schuler et al., 1985b). Der Überstand wurde entnommen und die LZ über einen BSA-Dichte-Gradienten bis auf ca. 30% aufgereinigt. Dafür wurden die Zellen in 4 – 5 ml BSA-Lösung (Zusammensetzung siehe Abschnitt II.1.3) aufgenommen, mit 1,5 ml Komplett-medium überschichtet, und für 15 min. bei 4°C und bei 9500xg ohne Bremse zentrifugiert. LZ befanden sich auf Grund der geringeren Dichte in der Interphase. Die angereicherte Zellsuspension wurde zur Absättigung der Fc-Rezeptoren mit einem CD16/32 Antikörper (Fc-Block) für 15 min. bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit anti-MHC-II-PE durch Inkubation für 15 min. bei 4°C gefärbt. Die Zellen wurden nach dem Waschen auf eine Zelldichte von $1x10^7$ Zellen/ml PBS eingestellt, so dass sich bei der anschließenden FACS-Sortierung eine Durchflussrate 500 – 1000 Zellen pro Sekunde ergab.
Die Sortierung der lebenden MHC-II positiven Zellen erfolgte im „Single cell“ Modus der Steuerungssoftware. Die Zielzellen wurden in 50 ml Polypropylenröhrchen gesammelt, in welche jeweils 5 ml 10% FKS in PBS (v/v) vorgelegt wurde. Um unspezifische Adhäsion der Zellen an die Plastikoberfläche zu vermeiden, wurden diese Röhrchen zuvor für mindestens 24 Stunden mit 50 ml 10% FKS in PBS bei 4°C gelagert, das vor der Sortierung bis auf 5ml abgegossen wurde. Die sortierte Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde mittels Neubauerkammer bestimmt und die Reinheit im FACS kontrolliert. Durch die Sortierung ergab sich eine Reinheit von mindestens 95% (siehe Abb. 5).

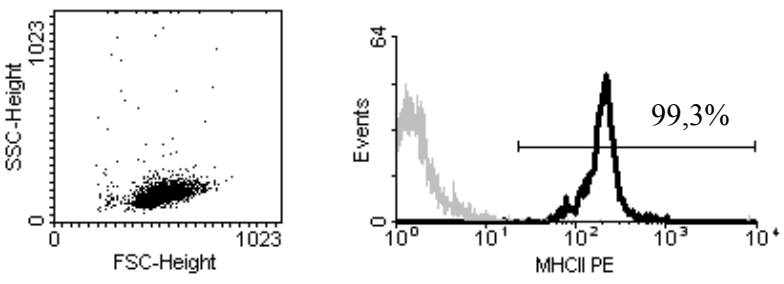

Abb. 5: Reine LZ wurden durch Sortierung am FACS aus epidermalen Zellen gewonnen. Es wurden Anreicherungen von über 95% erreicht. Das Punktwolken-diagramm zeigt eine definierte Population in Größe (FSC-Height) und Granularität (SSC-Height), das Histogramm zeigt das Ergebnis einer Reinheitsüberprüfung nach der Sortierung (schwarze Kurve = angereicherte LZ; graue Kurve = Isotypkontrolle).

2.2.3 Präparation einer Einzelzellsuspension aus Organen

Leber, Thymus und Milz wurden entnommen und in kaltem PBS bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Organe wurden in einer Petrischale in PBS zerkleinert und mit Hilfe eines Stempels homogenisiert. Zur RNA-Isolation wurden Leber und Thymus in 1 ml TRIzol^{TM} aufgenommen. Die RNA wurde, wie unter Abschnitt II.2.3.1 beschrieben, isoliert.
Um die T-Zellen aus der Milz zu isolieren, wurden zunächst die Gewebereste durch Filtration über eine Nylongaze (BD Bioscience, Heidelberg) mit einer Maschenweite von 100 µm entfernt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 300xg, 4°C, 8 min. pelletiert. Zur Lyse der Erythrozyten in der Milzsuspension wurde das Pellet in 5 ml hypotoner ACT-Lösung aufgenommen und 5 min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 ml kaltem PBS gestoppt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert und nach Bestimmung der Zellzahl wurden die T-Zellen über magnetische Zellseparation nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (siehe auch II.2.2.7).

2.2.4 Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Extrazelluläre Färbung

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit bis zu 1,5 x 10^6 Zellen in einem Volumen von 100 µl PBS durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst mit 0,5 µg Fc-Block für 10 min. bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindung über den Fc-Rezeptor zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen mit den jeweils angegebenen spezifischen Fluorochrom- bzw. Biotin-konjugierten Antikörpern für 15 min. bei 4°C gefärbt. Die Antikörper wurden in einer Menge von 0,02 µg – 0,5 µg eingesetzt. Die Zellen wurden gewaschen, und biotinylierte Antikörper wurden in einem zweiten Schritt mit Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin erneut für 10 min. bei 4°C inkubiert. Um antigenunspezifische Bindungen von spezifischen Bindungen zu unterscheiden, wurden Färbungen mit Antikörpern gleichen Isotyps aber irrelevanter Spezifität durchgeführt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen zur Messung in 100 - 200 µl PBS aufgenommen.

2.2.4.2 Intrazelluläre Färbung

Die intrazelluläre Färbung mit CD207 erfolgte nach Fixierung mit Paraformaldehyd und Permeabilisierung mit Saponin. Die Zellen wurden in 2% Paraformaldehyd in PBS für 20 min. im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 0,5% Saponin in PBS/1% BSA 10 min. bei 4°C inkubiert. Die folgenden Färbe- und Waschschritte erfolgten ebenfalls in der Saponinlösung. Die Inkubation mit dem anti-CD207 Antikörper erfolgte für

45 min. bei 4°C. Da es sich um einen biotinylierten Antikörper handelte, wurde eine Inkubation für 10 min. bei 4°C mit PerCP-gekoppeltem Streptavidin angeschlossen. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen in 100 - 200 µl PBS aufgenommen.

2.2.4.3 Phagozytose-Assay

1,5 x 10^6 epidermale Zellen (siehe II.2.2.1) wurden in einer Konzentration von 0,5 mg FITC-Dextran/ml PBS /10% FKS für 45 min. bei 37°C inkubiert. Ein Aliquot der Zellen wurde mit identischer FITC-Dextran-Konzentration auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindung von außen an der Zellen abschätzen zu können. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS/FKS gewaschen. Um die LZ detektieren zu können, wurden die Zellen zur Absättigung der Fc-Rezeptoren mit Fc-Block für 15 min. bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden die LZ mit anti-MHC-II-PE für 15 min. bei 4°C gefärbt und die Aufnahme grün-fluoreszierender Dextranpartikel durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.5 ELISA

Epidermale Zellen wurden wie unter II.2.2.1 beschrieben isoliert und in einer Zelldichte von 10^6/ml in 12-well Platten kultiviert. Der Kulturüberstand wurde nach zwei Tagen abgenommen und bis zur Testung bei –20°C eingefroren. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben mit 50 µl unverdünntem Überstand durchgeführt. Verwendet wurden der GM-CSF-ELISA und der IFN-γ-ELISA von eBioscience (San Diego, CA, USA)

2.2.6 Kultivierung epidermaler Zellen mit GM-CSF

Epidermale Zellen wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml mit 10 ng/ml GM-CSF (Überstand von mGM-CSF exprimierenden Ag8/653 Zellen, freundlicherweise überlassen von M. Winter, IUF) kultiviert. 48 Stunden später wurden die Zellen geerntet und im FACS analysiert.

2.2.7 Proliferationsassay

Die Effektivität von LZ aus Wildtyp- und AHR-defizienten Mäusen bezüglich ihrer Stimulation von T-Zellen, wurde mit Hilfe der allogenen T-Zell-Stimulation festgestellt. Hierfür wurden epidermale Zellen aus Wildtyp- und AHR-defizienten Mäusen isoliert und für 24 Stunden kultiviert. Die LZ wurden vor der Ko-Kultivierung mit den T-Zellen über einen BSA-Gradienten auf 10-15% angereichert. Der Haplotyp der C57BL/6 Mäuse ist H-2^b. Für die allogene T-Zell-Stimulation wurden die T-Zellen aus der Milz von SKH1 hairless Mäusen mit einem undefinierten Haplotyp verwendet. Die T-Zellen wurden durch Depletion von

$CD11c^+$ $B220^+$ und $CD11b^+$ Zellen über MACS auf 85-90% angereichert. Dafür wurde die Milzzellsuspension (siehe II.2.2.3) für 10 min. bei 4°C mit entsprechenden PE-gekoppelten Antikörpern inkubiert. 3 x 10^7 Zellen wurden gewaschen und in 270 µl MACS-Laufpuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 30 µl anti-PE Beads wurde für 10 min. bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden mit der 10-fachen Menge an Laufpuffer gewaschen und in 500 µl Laufpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden über eine Magnetsäule aufgetrennt, und der Durchfluss mit den angereicherten T-Zellen im FACS analysiert.
Je 2 x 10^5 T-Zellen wurden mit 100-10000 LZ für drei Tage in einer Rundboden 96-well Platte kultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde durch Zugabe von 0.5 µCi ^{3}H-Thymidin pro well für 18 Stunden bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Zellerntegerät (Inotech, Dottikon, Schweiz) und einem Szintillationszähler (Perkin Elmer Life Science, Zaventem, Belgien).

2.2.8 Inkubation mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Natriumbutyrat

Zur Steigerung der AHR-Aktivität wurden epidermale Zellen für 24 Stunden mit 5-25 mM Natriumbutyrat kultiviert. Die Substanz lag in einer Stammlösung von 1 M in PBS vor.

2.2.9 Apoptose-Assay

Zum Nachweis der Apoptose wurde der Annexin-V Assay verwendet. Annexin-V bindet spezifisch und Ca^{2+}-abhängig an Phosphatidylserin, das in frühen Apoptosestadien durch Umklappen der Zellmembran auf der Außenseite der Zelle auftritt. Zur Bestimmung apoptotischer Zellen, wurde das Apo Target-Kit von Biosource (Camarillo, CA, USA) verwendet. Der Ansatz wurde mit Annexin-V Binding Puffer gewaschen und mit 5 µl Annexin-V-FITC für 15 min. bei RT im Dunkeln inkubiert und im FACS, nach Gegenfärbung mit anti-MHC-II Antikörper, analysiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Präparation für 1 – 10 x 10^6 Zellen

Die RNA wurde mit Hilfe von TRIzol™ nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll für die Isolation der Gesamt-RNA aus Zellen und Organen präpariert.
Die Zellen wurden in 500 µl TRIzol™ aufgenommen und nach Zugabe von 100 µl Chloroform 15 sec gemischt. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 14000xg hatten sich drei Phasen gebildet, die untere organische Phase, ein Interphasering und die obere

wasserlösliche Phase. Proteine und hochmolekulare genomische DNA befinden sich vor allem in der Interphase, die RNA ist in der oberen wasserlöslichen Phase. Letztere wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Mit 250 µl Isopropanol konnte die RNA während einer Lagerung für 15 min. bei RT ausgefällt werden. Die RNA wurde durch Zentrifugation pelletiert und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde für 5 – 10 Minuten an der Luft getrocknet, bevor es in 20 – 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen wurde.

Bei der Gewinnung der RNA aus Organen wurde das Gewebe mit Schere, Pinzette und Stempel zerkleinert und abzentrifugiert. Aus dem Zellpellet wurde dann, ebenfalls mit Hilfe von TRIzol™, die Gesamt-RNA gewonnen. Die präparierte RNA wurde bei –20°C gelagert.

2.3.2 RNA-Präparation für < 1 x 10^6 Zellen

Für die RNA-Isolation aus LZ wurde ein modifiziertes Protokoll nach Baugh (Baugh et al., 2001) angewendet. Das Zellpellet wurde in 300 µl TRIzol™ aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µg linearem Polyacrylamid, das die Fällung der RNA erleichtert, wurden die Proben 10 sec gevortext. Es wurden je 60 µl Chloroform zugefügt und nochmals 30 sec gevortext. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 14000xg wurde die RNA, die sich in der oberen wasserlöslichen Phase befand, in ein frisches Gefäß überführt und mit 180 µl Isopropanol gemischt. Die RNA wurde zur Fällung über Nacht bei –20°C gelagert. Danach wurde die RNA durch Zentrifugation für 20 min. bei 14000xg pelletiert und zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde für 5 – 10 Minuten an der Luft getrocknet, bevor es in 15 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen wurde.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der RNA-Lösung wurde über die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm in 1 µl mit Hilfe des Nanodrops (Spectrophotometer ND-1000; Peqlab) bestimmt. Der Quotient aus OD 260/OD 280 gibt die Reinheit der RNA an, der für reine RNA bei 1,7 – 2 liegt.

2.3.4 RNA-Amplifikation

Das Genexpressionsprofil von LZ aus unbehandelten Wildtyp-Mäusen sollte mit LZ aus TCDD-behandelten Mäusen verglichen werden, ebenso wie das Profil von LZ aus Wildtyp-Mäusen mit LZ aus AHR-defizienten Mäusen. Für ein Microarray-Experiment wird eine Ausgangsmenge von mindestens 5 µg Total-RNA benötigt, was eine Amplifikation der isolierten RNA (200-500 ng) erforderte. Für die Amplifikation von 100 ng Total-RNA wurde das

MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit (Ambion, Austin, USA), welches nach dem Prinzip von Eberwine arbeitet (Eberwine et al., 2002), nach Angaben des Herstellers verwendet (siehe Abb. 6). In zwei unabhängigen Studien wurde beschrieben, dass durch die Verwendung der mRNA-Amplifikation keine signifikanten Verschiebungen bezüglich der relativen Häufigkeit der mRNAs auftreten, und daraus die ursprüngliche relative mRNA-Verteilung in den zu untersuchenden Zellen erhalten bleibt (Baugh et al., 2001; Pabon et al., 2001)

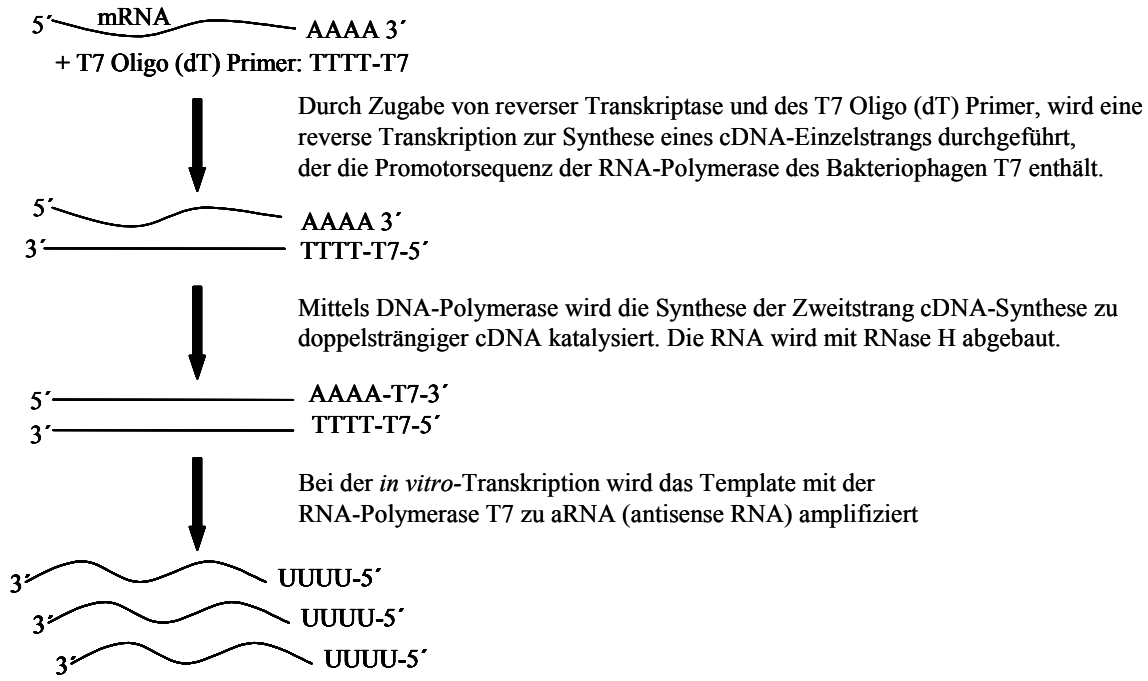

Abb. 6: Schema zur Amplifikation von RNA nach Eberwine (1992).

2.3.5 Mikroarray-Analyse – Probenvorbereitung und Auswertung

Die amplifizierte RNA wurde in einer weiteren *in vitro*-Transkription durch Zugabe biotinylierter Nukleotide markiert (Enzo Bio Array™HighYield™ RNA transcript labeling kit; Affymetrix, High Wycombe, UK). Die Aufreinigung und Fragmentierung der Proben erfolgte mit Hilfe des „Affymetrix GeneChip Sample Cleanup Moduls“ nach Herstellerangaben. Die Reinheit und Integrität der Proben wurde zu mehreren Zeitpunkten während des Experiments mittels Gelelektrophorese überprüft. Alle weiteren Schritte, wie die Hybridisierung der Proben auf die Chips, die Färbung mit Phycoerythrin und das Scannen der Chips wurden von der Affymetrix Core Lab Facility an der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Die RNA wurde auf einen „Mouse 430A Gene Chip“ von Affymetrix hybridisiert, der 22690 gespottete Transkripte („probe sets“) enthält, die durch eine Proben-ID eindeutig gekennzeichnet sind. Jedes Transkript beinhaltet 22 unterschiedliche

Oligonukleotid-Fragmente aus 25 Nukleotiden („probe cells“). 11 dieser Fragmente haben eine perfekte Hybridisierungssequenz („perfect match“), während 11 Fragmente durch einen Nukleotid-Austausch an Position 13 von der genauen Sequenz abweichen („mismatch“). Die Perfect Match und Mismatch-Informationen des Chips wurden genutzt, um nach Vergleich mit einem Schwellenwert zu entscheiden, ob das einzelne Transkript in dieser Probe exprimiert wird, und somit als „present“, „marginal“ oder „absent“ gewertet wird.
Für die Evaluation der Daten enthält der Genchip außerdem Hybridisierungskontrollen, Poly-A-Kontrollen, Normalisierungskontrollen und Haushaltsgen-Kontrollen.
Die Normalisierung und Umwandlung der beim Scannen der Chips erhaltenen Intensitätsdaten in Signalstärken (Log2 Expression) wurde freundlicherweise von Markus Frericks mit dem „Bioconductor affy package“ und dem RMA (robust microarray analysis) Algorithmus vorgenommen. Die Microarraydaten der LZ aus TCDD-behandelten und DMSO-behandelten Mäusen sind im „Gene Expression Omnibus“ unter der Serie GSE 9506 hinterlegt (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/).

2.3.6 Reverse Transkription

Die RNA-Menge wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Je 0,2 – 1 µg der nach II.2.3.1 und II.2.3.2. präparierten RNA wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Um die Vervielfältigung genomischer DNA auszuschließen, wurde die RNA vor der RT-PCR mit DNase I inkubiert, um die genomische DNA abzubauen. Hierzu wurden in einem 10 µl Ansatz der RNA 1 µl 10x Puffer mit Magnesium und 1 µl DNase I (1 U/µl) gegeben und 15 Minuten bei RT inkubiert. Mit 1 µl 25 mM EDTA wurde die DNase I in 10 min. bei 65°C inaktiviert. Die DNase-behandelte RNA wurde mit 2 µl Oligo-(dT)-Primer (1 µg/µl) für 5 min. bei 60°C zur Hybridisierung inkubiert. Nach Zugabe von 7 µl DEPC-Wasser, 8 µl Reaktionspuffer, 4 µl DTT (100 mM), 4 µl dNTP, 2 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 2 µl Reverser Transkriptase (200 U/µl) wurde der Ansatz für 60 min. bei 37°C zur Elongation und für 10 min. bei 70°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase inkubiert. Die entstandene cDNA wurde bei –20°C gelagert.

2.3.7 Polymerase Kettenreaktion

Die PCR-Reaktion wurde in dünnwandigen 0,5 ml Reaktionsgefäßen auf Eis angesetzt. Ein Gemisch von 25 µl, bestehend aus 1x PCR-Puffer, 200 µM dNTP, 1 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 1,5 mM $MgCl_2$ und 1 U Taq-Polymerase wurde vorgelegt. Die Konzentrationen wurden mit Aqua bidest. eingestellt. Zu dem Reaktionsgemisch wurde je 1 – 2 µl cDNA gegeben. Für eine Negativkontrolle wurde eine Reaktion ohne cDNA mitgeführt. Die

mRNA des konstitutiv exprimierten Haushaltsgens ribosomales Protein S6 (RPS6) wurde als Referenz für die Gesamtmenge an cDNA in der Präparation amplifiziert. Über eine PCR mit spezifischen RPS6-Primern lassen sich auf Grund der Bandenstärke die DNA-Mengen vergleichen. Die Banden auf einem Gel lassen sich dadurch miteinander vergleichen, um Aussagen über die Expression und deren Änderung in Abhängigkeit unterschiedlicher Bedingungen machen zu können. Die PCR wurde in einem Thermocycler (Trio, Biometra, Göttingen) mit folgendem Ablauf (Tab. 3) durchgeführt:

Tabelle 3: Allgemeine Schritte der konventionellen PCR

	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Ereignis
1x	5 min	95°C	Denaturierung der DNA-Matrize
25-35x	60 sec	95°C	Denaturierung der DNA-Matrize
	60 sec	Primer-spezifisch	Anlagerung der Primer
	90 sec	72°C	Verlängerung der Primer
1x	10 min	72°C	Verlängerung der Primer

2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der amplifizierten Produkte erfolgte als Horizontalgel-Elektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel mit 10 µg Ethidiumbromid. Je 10 µl Probe wurden mit 2 µl Gel-Probenpuffer vermischt. 10 µl dieser Mischung wurden auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurden 0,5 µg/Spur des Molekulargewichtsmarkers, der eine 100 bp-Leiter liefert, aufgetragen. Die DNA wurde bei 90 V für 30 min. aufgetrennt, als Laufpuffer diente 1 x TAE. Die Auswertung erfolgte als Videodokumentation (UV Solo, Biometra, Göttingen) unter UV-Licht bei 302 nm.

2.3.9 Echt-Zeit-PCR (engl. Real-time-PCR)

Bei der Echt-Zeit-PCR lässt sich die Akkumulation der PCR-Produkte über eine Fluoreszenzmessung während der Reaktion verfolgen. Dafür wird ein Fluorophor eingesetzt (in diesem Fall Sybr-Green), welches spezifisch an Doppelstrang-DNA bindet. Die Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zur doppelsträngigen DNA-Menge im Reaktionsansatz und lässt sich am Computer verfolgen. Die PCR wurde in einem Rotor-Gene RG-3000 (Corbett, LTF Labortechnik, Wasserburg) durchgeführt. Der PCR-Ansatz bestand aus 7,5 µl SYBR Green PCR Master Mix (Quantace, Berlin), 1 µM Vorwärts- und 1 µM Rückwärtsprimer, 2 µl cDNA und RNase freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 15 µl. Die Echt-Zeit-PCR wurde mit folgendem Ablauf durchgeführt:

Tabelle 4: Allgemeine Schritte der Echt-Zeit-PCR

	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur	Ereignis
1x	15 min	95°C	Denaturierung der DNA-Matrize
40-50x	15 sec	95°C	Denaturierung der DNA-Matrize
	20 sec	Primer-spezifisch	Anlagerung der Primer
	30 sec	72°C	Verlängerung der Primer
	2 sec	72°C	Aufnahme des Fluoreszenzsignals
1x	0,1°C/sec	65°C-95°C	Schmelzkurve

2.3.9.1 Erstellung einer Standardkurve

Die Dauer, welche benötigt wird, um eine bestimmte PCR-Produktmenge, die man als Schwellenwert festlegt, zu erreichen, ist linear abhängig vom Logarithmus der ursprünglich eingesetzten Konzentration der Zielsequenz. Der Zyklus, zu welchem der Signalverlauf einer Probe den gegebenen Schwellenwert überschreitet, wird als Crossing Point bezeichnet. Werden die Crossing Points gegen den Logarithmus der eingesetzten Kopienzahl aufgetragen, entsteht eine Standardkurve, mit deren Hilfe die Probenkonzentration unbekannter Proben anhand der Crossing Poinst bestimmt werden kann.

Um definierte Konzentrationen einer Zielsequenz einzusetzen, wurde eine PCR durchgeführt und das PCR-Produkt mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Konzentration wurde über die optische Dichte bei 260 nm nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Konzentration [mol/µl]} = \frac{OD260nm * V * F}{M_W * L * 10^9}$$

OD_{260nm} = optische Dichte bei 260 nm
V = Verdünnungsfaktor
F = Multiplikationsfaktor (50 bei doppelsträngiger DNA)
M_w = Molekulargewicht je Base (660 g/mol)
L = Länge des PCR-Produkts in Basenpaare

Kopien/µl = Konzentration [mol/µl] * Avogadrosche Konstante

2.3.9.2 Semiquantitative PCR

Um die Menge eines PCR-Produkts abschätzen zu können, wurden die Ansätze gegen das Haushaltsgen RPS6 abgeglichen. Dafür wurden in der PCR die Proben im gleichen PCR-Lauf mit den zu testenden Primern und den RPS6 Primern amplifiziert. Nach dem Lauf wurde der sogenannte delta-CP aus der Differenz der Crossing Points des zu testenden Transkripts und RPS6 gebildet. Die Differenz der delta-CP der unbehandelten und der behandelten Probe

wurden zum delta-delta CP verrechnet. Zur Berechnung der x-fachen Induktion wurde der delta-delta CP als Potenz zur Basis 2 verwendet (Pfaffl, 2001).

2.4 Immunhistochemischer Nachweis von LZ in Epidermishäutchen

Epidermishäutchen wurden von Ohren hergestellt. Dafür wurden die Ohren nach Desinfektion in 70%igem Ethanol und Waschen in PBS mit der dermalen Seite auf 20mM EDTA/PBS Lösung pH 7,3 für 3,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nachdem die Ohrhälften weitere 30 Minuten bei RT auf PBS gelegen haben, ließ sich die Epidermis leicht von der Dermis trennen. Die Epidermis wurde für 20 Minuten in –20°C kaltem Aceton fixiert, danach in PBS kurz gewaschen und durch einstündige Inkubation in PBS/10% FKS bei RT die unspezifischen Bindungen geblockt.
Zur Detektion der LZ wurden die Epidermishäutchen über Nacht bei 4°C mit einem aufgereinigten unkonjugierten anti-I-A/I-E (Klone M5/114) von Pharmingen (Heidelberg) inkubiert. Die Färbung erfolgte mit dem Texas Red-X gekoppelten sekundären Antikörper Ziege anti-Ratte IgG (H+L) (Molecular probes, Leiden, Niederlande) für 3,5 Stunden bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschritt für 10 min in PBS wurde die Epidermis glatt auf einen Objektträger gelegt und mit Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck) eingedeckelt. Die LZ sind als rot fluoreszierende Zellen am Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

2.5 Statistik

Zur Bewertung der Unterschiede bei den Ergebnissen zwischen den verschiedenen Gruppen, wurde ein Students t-Test zur Berechnung der Signifikanz durchgeführt. Der Students t-Test setzt eine Gauß´sche Normalverteilung der Werte voraus. War diese Voraussetzung nicht gegeben, wurde die Signifikanzberechnung mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind als „Mittelwert ± SEM“ oder bei der Darstellung von Histogrammen oder Bildern als repräsentatives Ergebnis gezeigt. Die Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen wurde als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) oder $p < 0,001$ (***) war.

III. Ergebnisse

1. Isolation und Anreicherung epidermaler Zellpopulationen

Die Epidermis setzt sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Die beiden Populationen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, umfassen Keratinozyten und LZ. Die Untersuchung von LZ setzte ihre eindeutige Identifizierung voraus. Um Veränderungen des Transkriptoms zu analysieren war das Vorhandensein reiner Populationen unerlässlich. Da die Epidermis zu etwa 90% aus Keratinozyten besteht, wurde auf eine weitere Anreicherung dieser Zellpopulation verzichtet. LZ gehören zur Familie der dendritischen Zellen (DZ), welche in der Durchflusszytometrie üblicherweise über das Integrin CD11c und die Ausprägung von MHC-II identifiziert werden (Banchereau et al., 1998). Bei der durchflusszytometrischen Analyse epidermaler Zellen zeigten sich zwei Populationen (Abb. 7A). Die eine exprimierte weder CD11c noch MHC-II, die andere Population (2,6%) war MHC-II positiv aber negativ für CD11c. Die Herstellung einer epidermalen Zellsuspension erfordert die vorherige Trennung der Epidermis von der darunter liegenden Dermis, was durch eine zweistündige Behandlung mit der Protease Trypsin erreicht wurde. Es wurde daher untersucht, ob das Oberflächenprotein CD11c durch Trypsin verdaut und deshalb nicht auf den MHC-II positiven Zellen detektierbar war.

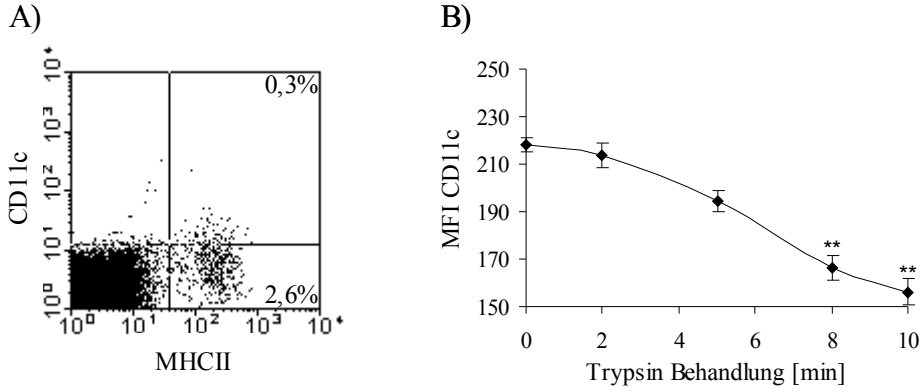

Abb. 7: CD11c wird durch Trypsin abgebaut. A) Frisch isolierte epidermale Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD11c und MHC-II gefärbt und im FACS analysiert. B) Milzzellen wurden isoliert und mit Trypsin (0,25% in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD11c und MHC-II gefärbt und im FACS analysiert. Es wurden nur lebende MHC-II$^+$/CD11c$^+$ Zellen berücksichtigt.

Hierfür wurde eine Einzelzellsuspension der Milz hergestellt, in der sich etwa 5% MHC-II$^+$/CD11c$^+$ DZ befinden. Die Zellen wurden für zwei bis zehn Minuten mit derselben Konzentration an Trypsin behandelt, die auch zur Trennung von Epidermis und Dermis eingesetzt wurde, anschließend wurde die Ausprägung von CD11c vitaler MHC-II positiver

Zellen über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) im FACS bestimmt. Abbildung 7B zeigt, dass bereits nach einer fünfminütigen Inkubation mit Trypsin schon eine erkennbare Reduktion der CD11c Expression vorlag. Nach acht und zehn Minuten war der Unterschied zu unbehandelten Zellen signifikant. CD11c erwies sich demnach als ungeeigneter Marker zur Identifizierung von epidermalen LZ.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass es sich bei der MHC-II positiven Population um kontaminierende B-Zellen und Makrophagen handelte wurden epidermale Zellen anhand eines LZ-spezifischen Oberflächenproteins analysiert. Langerin (CD207) wurde 2000 von Valladeau *et al.* als exklusiver LZ-Marker beschrieben. (Valladeau et al., 2000). Allerdings ist ein entsprechender Antikörper erst seit kurzem kommerziell erhältlich, und die notwendige intrazelluläre Färbung mit diesem Antikörper technisch aufwändig. In einer Färbung von epidermalen Zellen mit MHC-II und Langerin konnte gezeigt werden, dass alle MHC-II positiven Zellen der Epidermis CD207 exprimieren, und damit eindeutig als LZ klassifiziert werden können (Abb. 8).

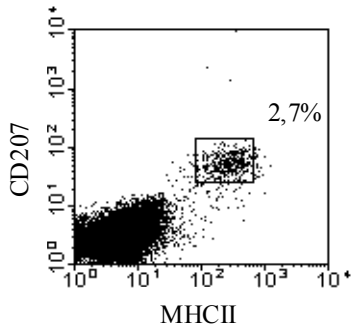

Abb. 8: Alle MHC-II$^+$ Zellen der Epidermis exprimieren CD207. Epidermale Zellen wurden isoliert, mit spezifischen Antikörpern gegen CD207 und MHC-II gefärbt und im FACS analysiert.

Eine generelle Herausforderung beim Arbeiten mit LZ besteht darin, dass diese Zellen in verschiedenen Reifestadien vorkommen, wobei sich Phänotyp und Funktion während der Reifung verändern (Romani et al., 2003; Steinman, 2003). Dies hat wiederum Einfluss auf die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse. In der unbehandelten Haut liegen LZ in einem unreifen Status vor, welcher durch die fehlende Ausprägung ko-stimulatorischer Moleküle (Abschnitt III.4.4) und eine hohe Phagozytosekapazität (Abschnitt III.4.5) charakterisiert ist. Sobald die Zellen aus der Haut isoliert werden, beginnt der Reifungsprozess, welcher mit der Aufregulation ko-stimulatorischer Moleküle einhergeht. Die Zellen verlieren ihre Phagozytosekapazität und werden zu effektiven Stimulatoren der T-Zell-Proliferation. In der vorliegenden Arbeit wurden die LZ in verschiedenen Reifestadien untersucht. Für eine bessere Nachvollziehbarkeit sind in Abbildung 9 die in den folgenden Experimenten verwendeten Zelltypen und ihr Reifestatus schematisch dargestellt.

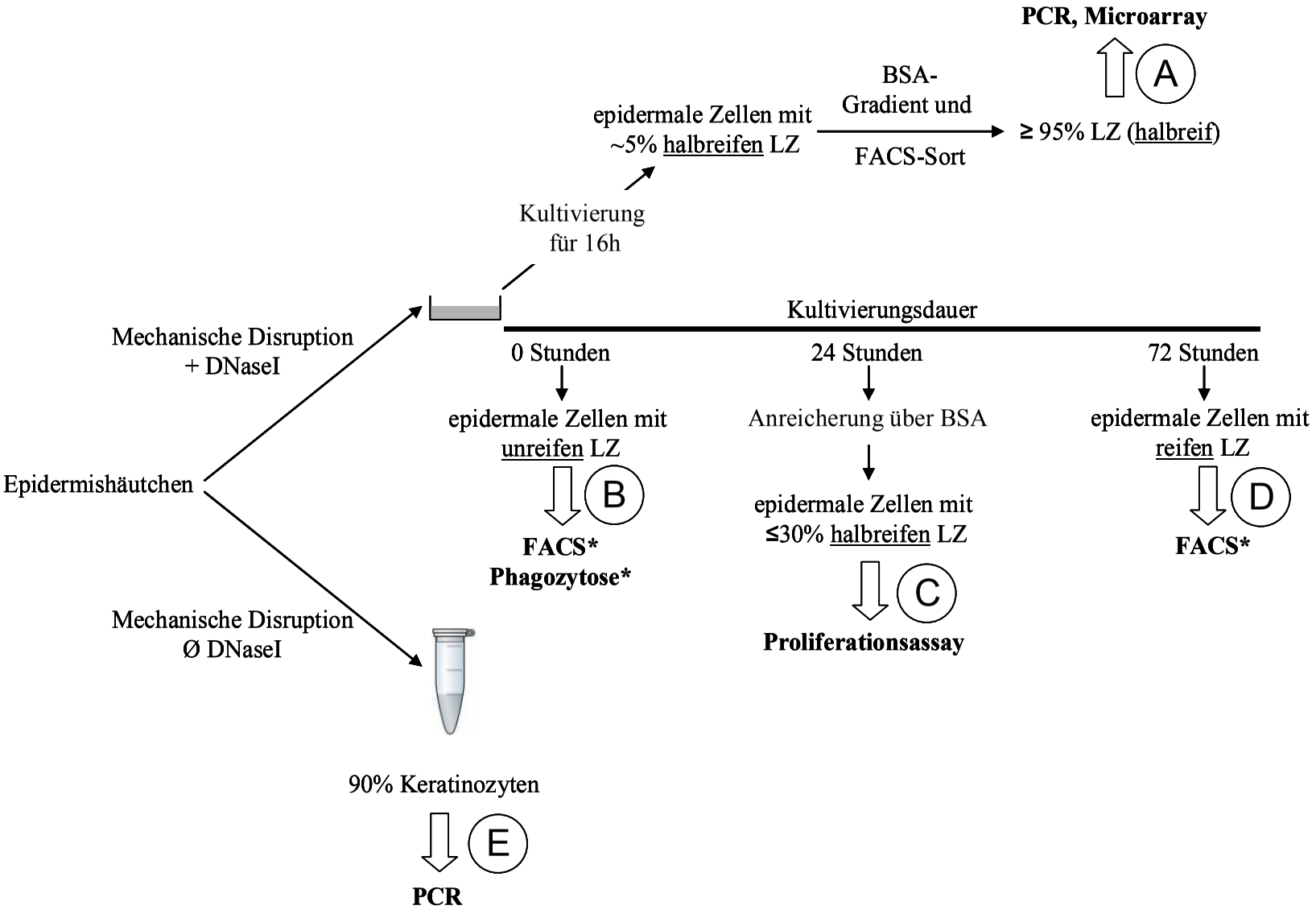

Abb. 9: Schema zur Art und Verwendung von epidermalen Zellen und LZ. Für die Untersuchung der Expression und Funktion des AHR in den Zellen der Epidermis wurden LZ in unterschiedlichen Reifestadien (unterstrichen) verwendet. Die jeweiligen Experimente sind in fetter Schreibweise angegeben. Der Stern (*) bezeichnet die Experimente, bei denen LZ (lebende MHC-II+ Zellen) in einer epidermalen Zellsuspension analysiert wurden.

2. Langerhans-Zellen exprimieren den AHR

Zur Untersuchung der Rolle des AHR in der Epidermis war es zunächst erforderlich, dessen Ausprägung in den unterschiedlichen Zellpopulationen mittels PCR zu quantifizieren (Abb. 10). Die RNA wurde aus der gesamten Epidermis (siehe Abb. 9, Population E) und reinen LZ (≥ 95%) (Abb. 9, Population A) isoliert, in cDNA umgeschrieben und die AHR-Expression in einer Echt-Zeit-PCR analysiert. Um einschätzen zu können, wie hoch die Expression des AHR in den Zellpopulationen der Epidermis ist, wurde die RNA bzw. cDNA aus Leber und Thymus ebenfalls in der PCR mitgeführt. Die Leber enthält nach der Lunge die größte Menge an AHR, während im Vergleich hierzu im Thymus wesentlich weniger AHR ausgeprägt wird (Li et al., 1994). Dennoch ist der Thymus ein stark betroffenes Organ der toxischen Wirkung von TCDD (Clark et al., 1981; Temchura et al., 2005), weshalb die RNA in dieser PCR mitgeführt wurde.

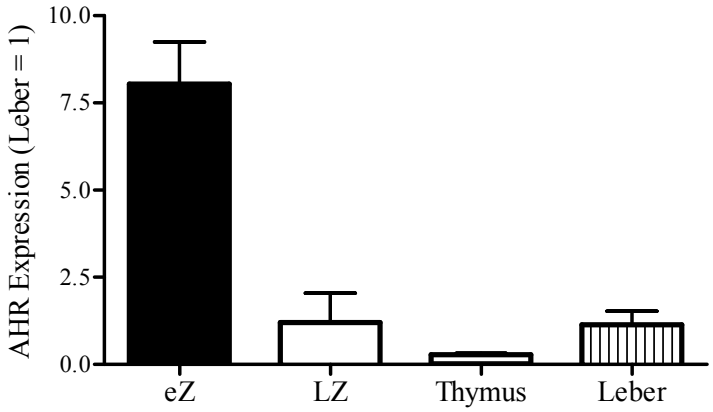

Abb. 10: Semiquantitative Analyse der AHR-Expression. Die RNA aus epidermalen Zellen (eZ), LZ, Thymus und Leber wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer semiquantitativen Echt-Zeit-PCR wurden die Crossing Points gegen das Haushaltsgen RPS6 abgeglichen und mit der Expression in der Leber verglichen (relative Expression = 1). Das Ergebnis zeigt die Mittelwerte und deren Standardabweichung aus 3 unabhängigen Zellpräparationen.

Die Expression des AHR wurde über das Haushaltsgen RPS6 abgeglichen und in Bezug zur Expression in der Leber gesetzt (Leber = „1“). Wie in Abbildung 10 dargestellt, wurde der AHR in der Haut zwar sehr stark ausgeprägt, zwischen den beiden Zelltypen der oberen Hautschicht konnten allerdings große Unterschiede festgestellt werden. Im Vergleich zur Leber konnte in der unseparierten Epidermis eine 8-fach höhere AHR-Expression detektiert werden. Da die Epidermis zu ca. 90% aus Keratinozyten besteht, war die Expression des AHR in der Epidermis hauptsächlich auf die Keratinozyten zurück zu führen. Die AHR-Expression in reinen LZ entsprach ungefähr der Menge der Leber. Die Expression im Thymus betrug nur ein Drittel im Vergleich zur Leber, so dass bei den untersuchten Populationen der

Epidermis die AHR-Expression weit über der des Thymus lag. Mit diesem Experiment wurde das erste Mal die Expression des AHR in murinen LZ nachgewiesen. Die in der Epidermis im Vergleich zu Leber und Thymus vorliegende hohe Ausprägung des AHR ließ erwarten, dass die Zellen auf die Aktivierung des AHR mit TCDD reagieren.

3. Die Haut reagiert auf die Aktivierung des AHR mit TCDD

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl Keratinozyten als auch LZ den AHR ausprägen (Abb. 10) wurde untersucht, ob der vorliegende AHR funktionell aktiv ist. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse systemisch mit TCDD belastet. Für die Exposition der Tiere mit TCDD wurde statt der topischen Applikation auf die Haut eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 10 µg/kg Körpergewicht gewählt. Es handelt sich dabei um eine subtoxische Dosis (LD_{50} bei Mäusen = 126 µg/kg; (Jones et al., 1975)), die aber im Immunsystem starke Effekte hervorruft (Holsapple et al., 1991). Bisher wurden verschiedene pharmakodynamische Studien zur zeitlichen und Dosis-abhängigen Verteilung von TCDD nach oraler Gabe oder i.p. Injektion bei Mäusen durchgeführt (Gasiewicz et al., 1983; Diliberto et al., 1995;). In den genannten Studien wurde gezeigt, dass TCDD die Haut erreicht und den AHR aktiviert.

Zunächst wurde mittels einer Kinetik ermittelt, wie lange die Haut nach i.p. Injektion von TCDD benötigt, um AHR-Zielgene zu induzieren. Dazu wurde nach verschiedenen Zeitpunkten der TCDD- bzw. DMSO-Applikation die RNA von epidermalen Zellen entnommen (Abb. 9, Population E), in cDNA umgeschrieben und in einer Echt-Zeit-PCR auf die Expression der AHR-Zielgene CYP1A1 und CYP1B1 untersucht (Abb. 11).

Aufgrund starker interindividueller Unterschiede sind in Abbildung 11 die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten aufgeführt. Die Tendenz beider Experimente war allerdings vergleichbar. Sowohl CYP1A1 als auch CYP1B1 wurden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle 12 Stunden nach Gabe von TCDD induziert. Die Expression steigerte sich nach 24 Stunden weiter, aber nur in Experiment 1 war auch 6 Tage nach TCDD-Exposition noch ein Anstieg der CYP1A1-Expression erkennbar, während CYP1B1 in diesem Experiment bereits ein Plateau erreichte. In beiden Experimenten konnte für CYP1A1, welches sechs XRE in seiner Promotorregion enthält, eine stärkere Induktion beobachtet werden, verglichen mit CYP1B1, welches nur vier XRE in der Promotorregion aufweist (Sun et al., 2004).

Obwohl sich die Experimente im späten Verlauf der Kinetik, sowie in der maximalen Induktion der beiden Gene im Vergleich zur Kontrolle unterschieden, war deutlich, dass

TCDD in beiden Experimenten innerhalb von 12 Stunden die Haut erreichte und den AHR in epidermalen Zellen aktivierte.

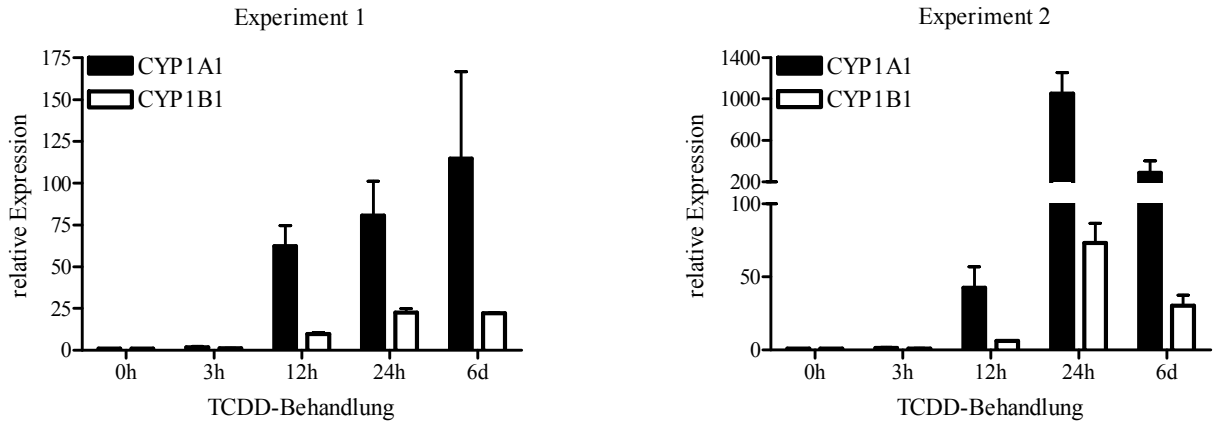

Abb. 11: Induktion typischer AHR Zielgene in der Epidermis nach TCDD Behandlung.
Mäusen wurde 10 µg/kg TCDD oder als Kontrolle das Lösungsmittel DMSO in Olivenöl i.p. injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die epidermalen Zellen aus der Ohrhaut je einer Maus isoliert und die Expression von CYP1A1 (schwarze Balken) und CYP1B1 (weiße Balken) mittels semi-quantitativer Echt-Zeit-PCR analysiert. Dargestellt ist die relative Induktion in Zellen von TCDD-behandelten Mäusen im Vergleich zur Expression in Zellen von DMSO-behandelten Mäusen („1“) von zwei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung resultiert aus einem technischen Replikat.

4. Durch TCDD lassen sich keine transkriptionellen Veränderungen in LZ induzieren

Es wurde bereits beschrieben, dass Keratinozyten nach TCDD-Exposition Gene des Fremdstoffmetabolismus verstärkt ausprägen (Jones et al., 1997). Der in Abbildung 11 gezeigte Effekt der Geninduktion durch TCDD in der Epidermis kann dadurch vermutlich den Keratinozyten zugeschrieben werden. Um zu überprüfen, ob unabhängig davon auch in LZ die Aktivierung des AHR mit dem Liganden TCDD zur Induktion von Genen führt, wurden aufgereinigte LZ herangezogen. Hierzu erhielten Mäuse i.p. Injektionen von TCDD, und LZ wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Belastung in hoher Reinheit gewonnen (Reinheit ≥ 95%; Abb. 9, Population A). Die RNA wurde isoliert, mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und in der PCR untersucht.

4.1 CYP1A1 und CYP1B1 lassen sich in LZ nicht induzieren

Das Ergebnis in Abbildung 11 zeigte deutlich, dass TCDD nach 12 Stunden sowohl die Expression von CYP1A1 als auch von CYP1B1 in den Zellen der Epidermis induziert. Als

Positivkontrolle wurden deshalb epidermale Zellen (eZ) einer Maus verwendet, die für 24 Stunden mit TCDD exponiert war. In der PCR wurde bei der Positivkontrolle eine starke Bande von 499 bp detektiert, die dem PCR-Produkt von CYP1A1 entspricht (Abb. 12 (+)). Im Gegensatz zu unseparierten epidermalen Zellen konnte in reinen LZ keine CYP1A1-Expression festgestellt werden (Abb. 12 (2-4)).

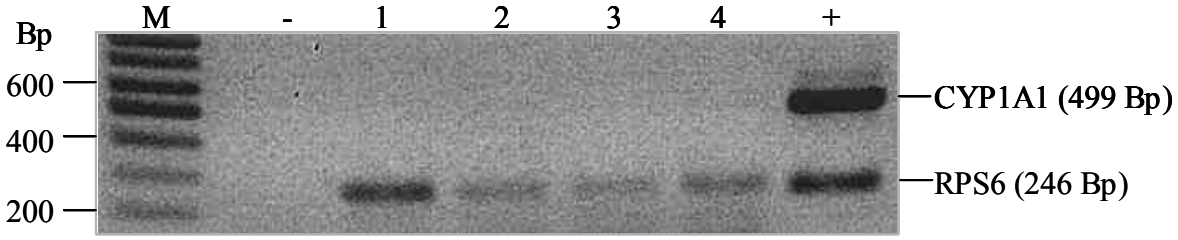

Abb. 12: CYP1A1-Expression aufgereinigter LZ nach systemischer TCDD-Exposition.
C57BL/6 Mäuse erhielten eine i.p. Injektion von TCDD (10 µg/kg). 3, 12 und 24 Stunden nach Injektion wurden die LZ aufgereinigt, RNA isoliert und auf CYP1A1-Expression in der PCR untersucht. M = DNA-Längenstandard (100 bp-Standard), - = Negativkontrolle ohne cDNA, 1 = LZ aus unbehandelten Mäusen, 2-4 = LZ aus TCDD behandelten Mäusen (2 = 3h, 3 = 12h, 4 = 24h), + = eZ aus TCDD-behandelten Mäusen (24h)

Die Expression von CYP1A1 in LZ wurde zusätzlich in einer Echt-Zeit-PCR untersucht. Mit der Echt-Zeit-PCR lassen sich auch geringe Mengen an Ausgangsmaterial nachweisen, da aufgrund der kürzen Amplifikations-, Denaturierungs- und Elongationszeiten mehr Zyklen durchlaufen werden können. Dadurch lässt sich die Nachweisgrenze im Vergleich zu einer konventionellen PCR im Thermocycler stark heruntersetzen. Um die Nachweisgrenze für CYP1A1 festzulegen, wurde eine Standardkurve mit definierter Kopienzahl angefertigt. Hierfür wurde das PCR-Produkt einer CYP1A1-PCR aufgereinigt und die Anzahl der Kopien über die optische Dichte bei 260 nm bestimmt (siehe II.2.3.9.1). 10^1 bis 10^6 Kopien von CYP1A1 wurden zur Amplifikation in der Echt-Zeit-PCR eingesetzt.

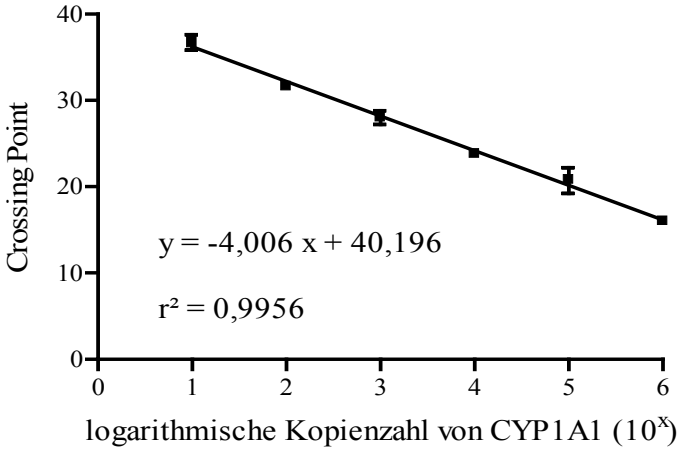

Abb. 13: Standardkurve von CYP1A1. 10^1 bis 10^6 Kopien von CYP1A1 wurden zur Amplifikation in der Echt-Zeit-PCR eingesetzt. Der Logarithmus der eingesetzten Kopienzahl wurde gegen den jeweiligen Crossing Point aufgetragen, der den Punkt bezeichnet, an dem eine bestimmte Produktmenge erreicht wurde. Die Standardabweichung resultiert aus einem technischen Replikat.

Zur Erstellung der Standardkurve wurden die Zyklen, an denen die Proben einen definierten Schwellenwert überschritten haben (Crossing Point) gegen den Logarithmus der eingesetzten Kopienzahl eingesetzt (Abb. 13). An der Standardkurve ist zu erkennen, dass die Ausgangsmenge der Zielsequenz proportional zum Crossing Point ist. Je höher die eingesetzte Menge an Kopien war, desto früher erreichte die PCR eine bestimmte Produktmenge (Schwellenwert). Anhand der Geradengleichung ließ sich berechnen, dass ab 40 Zyklen bei dieser PCR die Nachweisgrenze erreicht war, da weniger als eine Kopie in der Probe nicht gemessen werden kann.

Tab. 5: Crossing Point einer CYP1A1-PCR von LZ

Behandlung der Mäuse[1)]	Crossing point[2)]
unbehandelt	45,44
3h TCDD	44,62
6h TCDD	43,71
12h TCDD	43,90
24h TCDD	44,88
3d TCDD	48,80
7d TCDD	47,83

[1)] Mäuse wurden mit 10µg/kg TCDD für die angegebenen Zeitpunkte behandelt

[2)] Der angegebene Crossing Point ist repräsentativ für zwei unabhängige Experimente

In Tabelle 5 wurden die Crossing Points der CYP1A1-PCR der LZ aufgelistet. Diese lagen ausnahmslos über 43. Die Ausgangsmenge an CYP1A1 in den Proben unterschritt damit die Nachweisgrenze dieser PCR. Dadurch wurde das zuvor erhobene Ergebnis der fehlenden CYP1A1-Expression in LZ bestätigt. Auch die Erweiterung auf spätere Zeitpunkte nach einer TCDD-Behandlung zeigte keine CYP1A1-Expression in LZ.

Es konnte in Abbildung 11 gezeigt werden, dass neben CYP1A1 auch CYP1B1 durch die Behandlung mit TCDD nach 12 Stunden in den Zellen der Epidermis induziert wurde. Deshalb wurde die Fragestellung dahingehend erweitert, ob CYP1B1 in LZ durch TCDD induziert wird.

In der Echt-Zeit-PCR wurde im Gegensatz zu CYP1A1 zwar eine konstitutive CYP1B1-Expression in LZ festgestellt, diese wurde durch TCDD aber nicht weiter induziert (Abb. 14). Entgegen den Erwartungen konnte nach 24 Stunden und drei Tagen sogar eine schwächere CYP1B1-Expression im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle gemessen werden.

Trotz einer zur Leber vergleichbar hohen AHR-Expression in LZ, konnten die beiden bestuntersuchten Zielgene des AHR, CYP1A1 und CYP1B1, nur in unseparierten epidermalen Zellen nicht aber in LZ detektiert bzw. induziert werden. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass sich der AHR in LZ durch TCDD nicht aktivieren ließ.

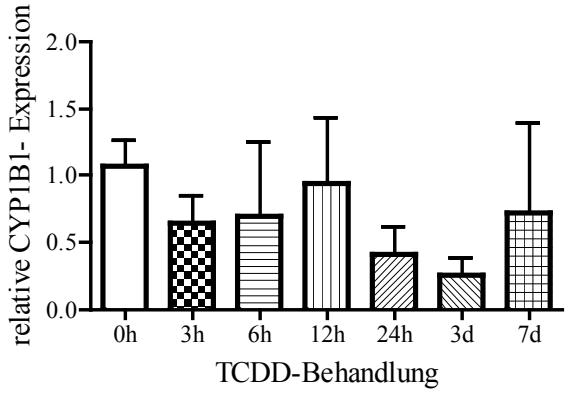

Abb. 14: CYP1B1 wird in LZ konstitutiv exprimiert, aber durch TCDD nicht induziert.
C57BL/6 Mäuse erhielten eine i.p. Injektion von TCDD (10 µg/kg). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die LZ aufgereinigt, RNA isoliert und auf CYP1B1-Expression in Echt-Zeit-PCR untersucht. Angegeben ist die relative Expression, normalisiert auf das Haushaltsgen RPS6 und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle, die auf „1" gesetzt wurde. ($n \geq 2$)

4.2 TCDD verändert nicht das globale Genexpressionsprofil von LZ

Mehr als 3000 Gene besitzen ein putatives XRE in ihrer Promotorregion (Sun et al., 2004), was diese Gene zu potentiellen Zielgenen des AHR macht. Eine Induktion der bekanntesten AHR-Zielgene CYP1A1 und CYP1B1 konnte durch Aktivierung des AHR mit TCDD in LZ nicht festgestellt werden. In einer globalen Genexpressionsanalyse wurde daher untersucht, ob und welche anderen Gene in LZ über die Aktivierung des AHR induziert werden. Hierfür wurde ein MOE 430A Genchip von Affymetrix™ verwendet, der die Analyse von ca. 22.500 Genen erlaubt. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. In jedem Experiment wurden Mäuse mit 10 µg/kg TCDD bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Epidermale Zellen wurden nach 24 Stunden isoliert und die LZ auf ≥ 95% aufgereinigt (siehe Abb. 9, Population A). Diese Behandlungsdauer wurde gewählt, da in epidermalen Zellen zu diesem Zeitpunkt eine starke Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 beobachtet werden konnte (Abb. 11).

4.2.1 Qualitätskontrolle der Microarrays

Wie oben gezeigt, reagieren Keratinozyten mit der Regulation von Genen auf die Aktivierung des AHR. Die Anreicherung von LZ von ca. 3% auf 100% ist technisch nahezu unmöglich. Die Reinheit der Zellen wurde bei jedem Experiment durchflusszytometrisch bestimmt, wobei eine Anreicherung auf 95 - 99% erreicht wurde. Dies schloss für die Analyse der Microarray-Daten die Möglichkeit eine Fehlinterpretation durch kontaminierende Keratinozyten oder Melanozyten ein. Um mögliche Veränderungen auf dem Microarray eindeutig den LZ

zuordnen zu können, wurde die Reinheit der Zellpräparationen anhand Zell-spezifischer Gene abgeschätzt, die in der jeweiligen Zellpopulation üblicherweise stark ausgeprägt werden. Dazu wurden die sogenannten „Detection-calls“ verwendet, welche eine Aussage über die Nachweisbarkeit eines Transkripts erlauben (siehe Abschnitt II.2.3.5), und in Tabelle 6 zusammengefasst. Da keines der überprüften Gene differenziell reguliert war, wurde auf allen Arrays eine vergleichbare Expression detektiert. Aus diesem Grund waren für die in Tabelle 6 aufgelisteten Gene die „Detection-calls“ sowohl auf den Chips der DMSO-Kontrolle als auch der TCDD-behandelten LZ gleich.

Tabelle 6: Auflistung zellspezifischer Gene von LZ, Keratinozyten und Melanozyten.

			log2 Expression		Detection
	Proben-ID[1)]	**Gen**	**DMSO**[2)]	**TCDD**[2)]	**calls**[3)]
LZ-spezifische Gene	1420404_at	CD 86	10,84	10,77	P
	1425243_at	Langerin	11,23	10,98	P
	1427717_at	CD 80	7,02	7,40	P
	1449473_s_at	CD 40	12,27	12,36	P
	1450648_s_at	MHC II H2-Ab1	9,62	9,75	P
Keratinozyten-spezifische Gene	1418742_at	Keratin 1	5,71	5,72	A
	1422222_at	Involucrin	5,51	5,48	A
	1426284_at	Keratin 20	5,26	5,13	A
	1427268_at	Filaggrin	4,13	4,21	A
	1448745_s_at	Loricrin	6,26	6,83	A
Melanozyten-spezifische Gene	1415861_at	Tyrosinase-related Protein 1	4,78	4,67	A
	1417717_a_at	Tyrosinase	6,18	6,20	A
	1418028_at	Tyrosinase-related Protein 2	6,42	6,29	A

1) Jedes Gen ist durch eine eindeutige Nummer (Proben-ID) gekennzeichnet
2) Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten
3) P = present; M = marginal; A = absent, entspricht dem Signal auf allen vier Chips

LZ prägen als Antigen-präsentierende Zellen verschiedene Oberflächenmoleküle aus, welche auf Keratinozyten und Melanozyten nicht zu finden sind (Enk et al., 2002; Valladeau et al., 2005). Dazu gehören CD40, CD80, CD86 und MHC-II, die auf allen Chips eindeutig nachweisbar waren. Das spezifische LZ-Protein CD207 war ebenfalls auf allen vier Chips detektierbar. In Abhängigkeit ihres Differenzierungsstatus prägen Keratinozyten verschiedene Proteine aus. Keratin 1 wird im frühen Entwicklungsstadium exprimiert, Filaggrin und Loricrin werden in späten Differenzierungsstadien ausgeprägt (Schoop et al., 1999). Die fünf beispielhaft aufgelisteten Keratinozyten-spezifischen Gene konnten auf keinem der Chips detektiert werden.

Tyrosinase, Tyrosinase-related Protein 1 und 2 sind essentielle Enzyme für die Generierung des Pigmentfarbstoffs Melanin in Melanozyten (Halaban et al., 2003). Diese waren ebenfalls nicht detektierbar.

4.2.2 Vergleich des Genexpressionsprofils von LZ aus TCDD-behandelten und DMSO-behandelten Mäusen

Das Genexpressionsprofil von LZ aus TCDD-behandelten und Lösungsmittel-behandelten Mäusen ist in Abbildung 15 als Punktwolkendiagramm dargestellt. Aus den zwei unabhängigen Experimenten, in denen Mäusen jeweils TCDD und DMSO appliziert wurde, wurde ein Mittelwert aus den log2 Expressionen gebildet. Diese Mittelwerte von LZ aus TCDD-behandelten (y-Achse) und DMSO-behandelten (x-Achse) Mäusen wurden gegeneinander aufgetragen.

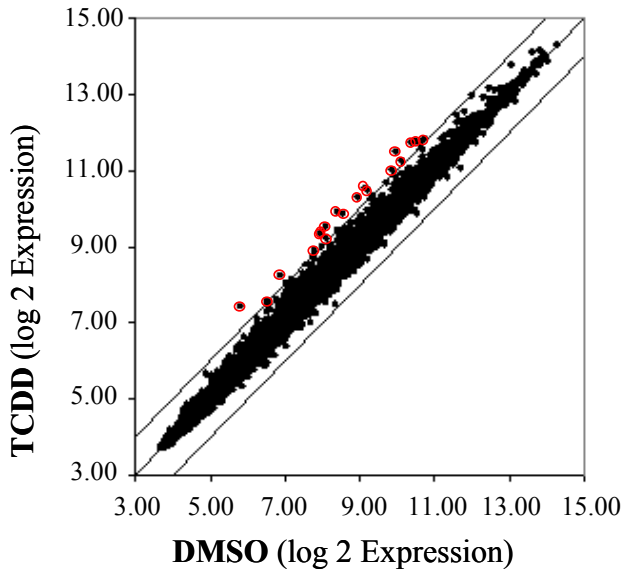

Abb. 15: Gegenüberstellung der globalen Genexpressionsanalyse von LZ aus TCDD-behandelten und DMSO-behandelten Mäusen im Punktwolkendiagramm.
C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit TCDD bzw. DMSO (als Lösungsmittelkontrolle) behandelt. Nach 24 Stunden wurden die LZ isoliert und deren RNA nach *in vitro*-Amplifikation für eine Microarray-Analyse verwendet. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt repräsentiert ein Gen. Liegt der Punkt auf der Mittellinie, ist das entsprechende Gen nicht reguliert. Die beiden anderen Linien bilden eine Zweifach-Grenze, liegt ein Punkt außerhalb der Grenze, ist eine mindestens zweifache Regulation zu vermuten (siehe rot umrandete Punkte).

Jeder Punkt in dem Diagramm entspricht einem der Gene, die sich auf dem Affymetrix-Chip befinden. Liegt dieser Punkt auf der mittleren Gerade, ist die Expression in LZ aus TCDD-behandelten und Lösungsmittel-behandelten Mäusen gleich und es hat keine Regulation stattgefunden. Liegt ein Punkt nicht auf dieser Gerade, ist das entsprechende Gen im Vergleich zwischen TCDD-behandelten und DMSO-behandelten Zellen unterschiedlich exprimiert. Ein Gen wurde als differenziell reguliert bewertet, wenn ein mindestens zweifacher Unterschied zwischen den Kontrollen und den TCDD-Chips vorlag. Dieser Grenzwert wurde durch die beiden äußeren Diagonalen sichtbar gemacht, was bedeutet, dass

jedes Gen, welches außerhalb der beiden äußeren Linien lag, mindestens zweifach reguliert war. Die Zweifach-Grenze wurde gewählt, um auch schwach regulierte Gene zu berücksichtigen.

Vergleicht man die Genexpressionsprofile von LZ aus TCDD-behandelten Mäusen mit LZ aus Kontrollmäusen (DMSO-behandelt) ist zu erkennen, dass nur 19 der getesteten 22.500 Gene außerhalb der zweifachen Grenze lagen. Alle außerhalb der Zweifach-Schwelle liegenden Gene schienen dabei durch Aktivierung des AHR mit TCDD aufreguliert zu werden. In Tabelle 7 sind diese 19 Gene mit der entsprechenden log2 Expression von den vier Chips aufgelistet. Gene der „AHR-Batterie“ (Tijet et al., 2006), also bekannte Gene, die über den AHR reguliert werden, befanden sich nicht darunter.

Tabelle 7: Gene, die im Microarray außerhalb der Zweifach-Grenze liegen (vergl. Abb. 15)

		log2 Expression			
		DMSO[2]		TCDD[3]	
Proben-ID[1]	**Gen**	**Chip 1**	**Chip 2**	**Chip 3**	**Chip 4**
1415918_a_at	triosephosphate isomerase 1	11,68	9,31	11,78	11,79
1416335_at	*macrophage migration inhibitory factor* [4]	*10,23*	*8,14*	*10,40*	*10,67*
1416365_at	*heat shock protein 1, beta*	*10,57*	*9,16*	*11,29*	*10,69*
1417052_at	proteasome subunit, beta type 3	9,56	7,27	9,52	9,34
1417380_at	IQ motif containing GTPase activating protein 1	11,51	9,76	11,81	11,52
1420479_a_at	**nucleosome assembly protein 1-like 1** [5]	**6,64**	**6,47**	**7,71**	**7,42**
1421679_a_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	11,84	8,91	11,96	11,50
1422884_at	*small nuclear ribonucleoprotein D3*	*9,02*	*7,16*	*9,44*	*9,01*
1423747_a_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1	6,66	5,00	7,18	7,71
1427186_a_at	*myocyte enhancer factor 2A*	*8,79*	*6,84*	*9,15*	*8,70*
1427262_at	inactive X specific transcripts	9,86	6,97	10,59	9,23
1427932_s_at	unbekannt	10,00	7,10	10,35	9,40
1435129_at	protein tyrosine phosphatase 4a2	9,89	6,32	9,49	9,55
1435137_s_at	unbekannt	10,05	7,86	10,83	9,78
1435659_a_at	triosephosphate isomerase 1	10,30	8,20	10,37	10,60
1437497_a_at	heat shock protein 1, alpha	10,99	9,33	11,28	11,19
1438403_s_at	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	8,75	7,22	9,68	9,01
1449645_s_at	chaperonin subunit 3 (gamma)	8,06	5,75	8,44	7,99
1452927_x_at	triosephosphate isomerase 1	11,55	9,62	11,63	11,76

1) Jedes Gen ist durch eine eindeutige Nummer (Proben-ID) gekennzeichnet, hier in aufsteigender Reihenfolge aufgelistet

2) C57BL/6 Mäuse wurden für 24h mit DMSO behandelt, Chip 1 und 2 repräsentieren zwei unabhängige Experimente

3) C57BL/6 Mäuse wurden für 24h mit 10 µg/kg TCDD behandelt, Chip 3 und 4 repräsentieren zwei unabhängige Experimente

4) kursive Schreibweise bezeichnet Gene mit mind. einem validen XRE

5) fette Schreibweise bezeichnet das einzige Gene, das auf beiden Chips reproduzierbar reguliert war

Nur für vier der regulierten Gene ist mindestens ein valides XRE beschrieben (Sun et al., 2004). *Macrophage migration inhibitory factor* und *small nuclear ribonucleoprotein D3* weisen in ihrer Promotorregion ein valides XRE auf, *heat shock protein 1, beta* und *myocyte enhancer factor 2A* weisen jeweils zwei valide XRE in ihrer Promotorregion auf (Tabelle 7, kursiv).

18 der 19 Gene, die außerhalb der zweifachen Begrenzung lagen, zeigten keinen auf beiden Chips reproduzierbaren Unterschied. Die Expression war in den zwei unabhängigen Experimenten nicht vergleichbar. In der Tabelle ist deutlich zu erkennen, dass dies vor allem auf die Expression der DMSO-Kontrolle auf Chip 2 zurückzuführen war. Mit Ausnahme des Gens für das *Nucleosome assembly protein 1-like 1* lagen die Werte von Chip 2 in allen 18 Proben weit unter den auf Chip 1 ermittelten Werten. Weiter fiel auf, dass die Werte auf Chip 1 der DMSO-Kontrolle sehr gut mit den Werten der beiden TCDD-Chips übereinstimmten. In der internen Qualitätskontrolle auf dem Chip 2 konnte keine fehlerhafte Hybridisierung festgestellt werden. Dennoch konnte die zunächst angenommene Regulierung der 18 Gene nur durch eine niedrige Expression auf Chip 2 erklärt werden.

Auffällig war, dass *Triosephosphat isomerase 1* dreimal unter den scheinbar regulierten Genen vorkam. Bei der Suche nach geeigneten Primern zur Validierung des Ergebnisses musste allerdings festgestellt werden, dass 7 der 19 Gene zu starke Homologien zu anderen Genen aufwiesen. Dadurch war es nicht möglich, geeignete Primer zu finden, um ein spezifisches Produkt zu amplifizieren. Diese Beobachtung liefert eine mögliche Erklärung für eine Fehlhybridisierung.

Um zu prüfen, ob bei den 19 Genen eine Regulation durch die Aktivierung des AHR mit TCDD vorlag, oder der Effekt durch eine fehlerhafte Hybridisierung entstand, wurden drei der 19 Gene exemplarisch in der Echt-Zeit-PCR überprüft und LZ aus TCDD-behandelten Mäusen mit Zellen aus Kontrollmäusen verglichen. Hierfür wurde das Gen *Nucleosome assembly protein 1-like 1* ausgewählt, welches reproduzierbar, in beiden unabhängigen Experimenten durch Aktivierung des AHR stärker exprimiert wurde. Obwohl es über kein XRE in der Promotorregion verfügt, war eine zweifache Aufregulation in TCDD-behandelten Zellen auf den Chips erkennbar (Tab. 7). Dieses relativ unbekannte Gen kodiert für ein Protein mit Funktionen bei der DNA-Replikation (Nagata et al., 2003b) und Zellteilung (Nagata et al., 2003a). Die Validierung dieses Ergebnisses in der Echt-Zeit-PCR brachte allerdings keine Bestätigung des Microarray-Ergebnisses (Abb. 16). Zu keinem der getesteten Zeitpunkte nach TCDD-Behandlung konnte eine signifikante Induktion festgestellt werden.

Weiterhin wurde das Gen *Myocyte enhancer factor 2A* ausgewählt, welches zwei XRE in der Promotorregion besitzt, sowie das Gen *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)*, für das bereits eine Induktion durch TCDD und andere AHR-Liganden beschrieben wurde (Koliopanos et al., 2002) (Abb. 17). Für diese beiden Gene konnte ebenfalls keine signifikante Regulation durch TCDD nach 24 Stunden in der Echt-Zeit-PCR nachgewiesen werden.

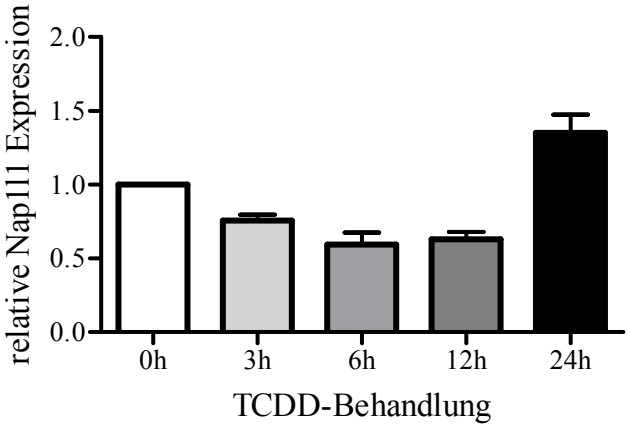

Abb. 16: Das Gen "Nucleosome assembly protein 1-like 1" (Nap1l1) wird nicht durch TCDD reguliert.
C57BL/6 Mäuse erhielten eine i.p. Injektion von TCDD (10 µg/kg). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die LZ aufgereinigt, RNA isoliert und auf Nap1l1 Expression in Echt-Zeit-PCR untersucht. Angegeben ist die relative Expression, normalisiert auf das Haushaltsgen RPS6 und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle, die auf „1" gesetzt wurde. (n = 2)

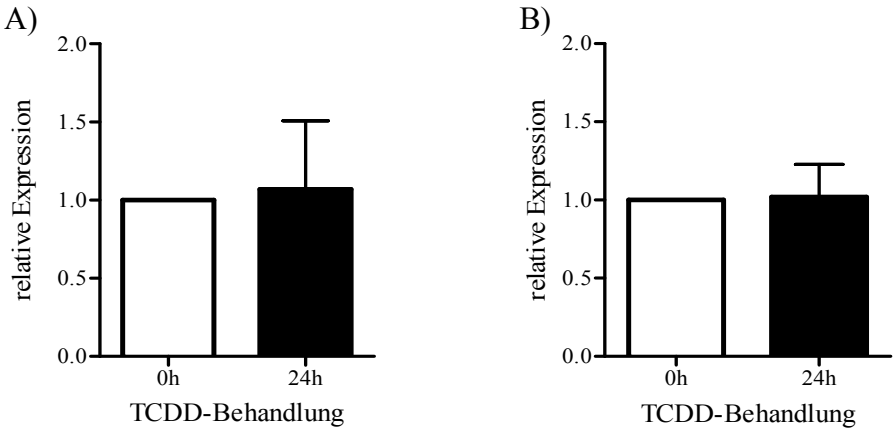

Abb. 17: Die Expression der Gene myocyte enhancer factor 2A (A) und cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (B) wurde in der Echt-Zeit-PCR validiert
C57BL/6 Mäuse erhielten eine i.p. Injektion von TCDD (10 µg/kg) bzw. DMSO. Nach 24 Stunden wurden die LZ aufgereinigt, RNA isoliert und die Expression in Echt-Zeit-PCR untersucht. Angegeben ist die relative Expression, normalisiert auf das Haushaltsgen RPS6 und bezogen auf die DMSO-Kontrolle, die auf „1" gesetzt wurde. (n = 3)

Die Ergebnisse des Microarrays konnten somit nicht bestätigt werden, und die scheinbare zweifache Induktion durch TCDD in den 19 Genen ergab sich mit großer Wahrscheinlichkeit aus einer Fehlhybridisierung auf dem Chip 2 der DMSO-Kontrolle.

4.2.3 Die Gene des Fremdstoffmetabolismus waren auf den Microarrays nicht detektierbar

In der PCR konnte bereits gezeigt werden, dass LZ zwar den AHR ausprägen (Abb. 10), aber die Expression der beiden bekanntesten AHR-Zielgene CYP1A1 und CYP1B1 durch Aktivierung des AHR mit TCDD nicht induziert wurden (Abb. 12 und 14). Im Folgenden sollten die Microarray-Daten dahingehend analysiert werden, ob der AHR und auch dessen Dimerisierungspartner ARNT, welcher zur Bildung des aktiven Transkriptionsfaktors notwendig ist, in den Proben detektiert werden konnten. Weiterhin wurde auf den Chips überprüft, ob LZ Gene der „AHR-Batterie“ (Tijet et al., 2006) ausprägen. Tabelle 8 zeigt die Expressionswerte auf den Affymetrix Chips. Die Gene wurden aufgrund der Analyse mit dem „Bioconductor affy package“ als present, marginal oder absent eingestuft.

Tabelle 8: Aufgelistet sind Gene des AHR-Signalwegs und einige Gene der „AHR-Batterie“

		log 2 Expression		Detection
Proben-ID[1)]	**Gen**	**DMSO**[2)]	**TCDD**[2)]	**calls**[3)]
1422631_at	Arylhydrocarbon Rezeptor	8,63	8,41	P
1421721_a_at	AHR nuclear translocator	6,01	5,99	M
1420796_at	AHR Repressor	8,93	8,88	P
1422217_a_at	CYP450 A1	5,84	5,76	A
1450715_at	CYP450 A2	5,49	5,36	A
1416613_at	CYP450 B1	4,37	4,15	A
1421041_s_at	Glutathion-S-Transferase α2	4,95	4,93	M
1423436_at	Glutathion-S-Transferase α3	4,23	4,29	A
1416368_at	Glutathion-S-Transferase α4	6,39	6,40	A
1418752_at	Aldehyddehydrogenase 3 α1	4,11	4,05	A
1423627_at	NAD(P)H dehydrogenase, Quinon 1	6,31	6,20	A

1) Jedes Gen ist durch eine eindeutige Nummer (Proben-ID) gekennzeichnet
2) Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten
3) P = present; M = marginal; A = absent, entspricht dem Signal auf allen vier Chips

Der AHR und auch der Heterodimerisierungspartner ARNT waren auf dem Chip nachweisbar. Die log2 Expression von ARNT war 2,5-fach geringer als die von AHR. Dies deutet an, dass ARNT in LZ schwächer ausgeprägt wird als der AHR. Aufgrund der Methode lässt sich dies allerdings nicht eindeutig quantifizieren, da für alle Oligonukleotidsonden die

gleichen Hybridisierungsbedingungen galten, wobei die Hybridisierungseffizienz nicht bei allen (22.500 Gene mit jeweils 22 Sonden = 495000 „gespottete“ Sonden) Sonden gleich sein kann. Der AHR Repressor (AHRR) bildet mit ARNT ein Heterodimer zur negativen Regulation des AHR-Signalwegs. Das Gen des AHRR war im Vergleich zum AHR und ARNT mit einer hohen log2 Expression detektierbar („present“). Mit Ausnahme der *Glutathion-S-Transferase α2*, welches eine sehr geringe log2 Expression aufwies aber marginal nachweisbar war, konnten die untersuchten Gene der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme der „AHR-Batterie“ nicht detektiert werden. CYP1A1 konnte, wie schon in der PCR gezeigt (Abschnitt III.4.1), auch nicht auf dem Microarray nachgewiesen werden. CYP1B1 war auf den Chips nicht detektierbar, obwohl in der PCR eine basale Expression nachgewiesen werden konnte. Auf dem Chip sind noch 2 weitere „Proben Sets“ für CYP1B1, aber auch diese lieferten kein detektierbares Signal. Dieser Befund kann durch eine höhere Sensitivität der PCR im Gegensatz zum Microarray begründet werden.
Die Ergebnisse der PCR von CYP1A1 und CYP1B1 deuteten an, dass der AHR in LZ nicht aktiviert wird. Die Auswertung der Microarrays bestätigte diese Vermutung. Obwohl mehr als 3000 Gene ein XRE besitzen, konnte durch Behandlung mit TCDD keine Regulation von Genen in LZ induziert werden.

4.3 Der AHR Repressor wir in LZ konstitutiv exprimiert

Der AHRR ist ein Zielgen des AHR und reguliert den AHR-Signalweg durch einen sogenannten negativen „feedback-loop“. Er konkurriert mit dem AHR um die Bindestelle an ARNT, wobei das Heterodimer aus AHRR und ARNT einen transkriptionell inaktiven Komplex bildet. Auf dem Microarray konnte eine hohe Expression des AHRR in LZ gezeigt werden (Tab. 8). Die Expression war unabhängig von einer TCDD-Exposition auf allen Chips vergleichbar. In den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob eine hohe AHRR-Expression die Ursache für die Unempfänglichkeit der LZ für eine AHR-Aktivierung durch TCDD ist.

4.3.1 Der AHRR wird in epidermalen Zellen aber nicht in LZ durch TCDD aufreguliert

In Abbildung 11 konnte bereits gezeigt werden, dass die Epidermis auf TCDD-Exposition mit der Induktion der AHR-Zielgene CYP1A1 und CYP1B1 innerhalb von 12 Stunden reagiert. Zur Untersuchung der AHRR-Expression in epidermalen Zellen und reinen LZ (Abb. 9 Population A und E) in Abhängigkeit der Aktivierung des AHR wurden C57BL/6 Mäuse für 3 Stunden bis 6 Tage mit TCDD belastet. Von epidermalen Zellen und reinen LZ wurde die

RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Ausprägung des AHRR in der Echt-Zeit-PCR analysiert.

Eine Induktion des AHRR in epidermalen Zellen nach *in vivo* Belastung mit TCDD konnte in zwei unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden (Abb. 18A). Aufgrund starker interindividueller Unterschiede, wurden die Ergebnisse von beiden Experimenten aufgeführt. Während in Experiment 1 eine Induktion des AHRR erst nach 6 Tagen beobachtet werden konnte, zeigte sich eine Induktion in Experiment 2 schon nach 24 Stunden. Deutlich war, dass die Induktion des AHRR mit einer anderen Kinetik verläuft, als die Induktion von CYP1A1 und CYP1B1. Sowohl CYP1A1 als auch CYP1B1 waren nach 12 Stunden TCDD-Behandlung in der Haut aufreguliert (Abb. 11), während die Induktion des AHRR frühestens nach 24 Stunden gezeigt werden konnte.

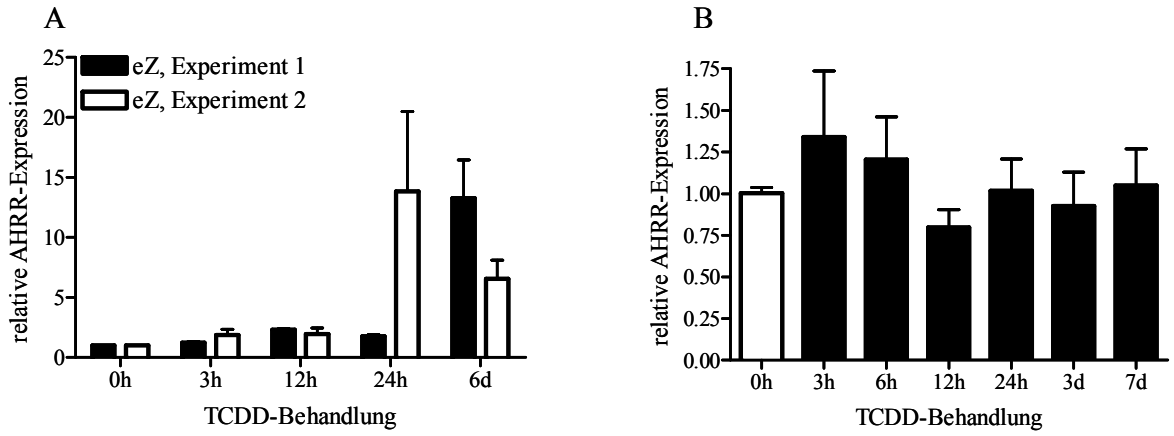

Abb. 18: Induktion des AHRR in epidermalen Zellen nicht aber in LZ.

C57BL/6 Mäuse erhielten eine i.p. Injektion von TCDD (10 µg/kg). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden A) die epidermalen Zellen und B) LZ isoliert und auf AHRR-Expression in Echt-Zeit-PCR untersucht. Angegeben ist die relative Expression, normalisiert auf das Haushaltsgen RPS6 und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle, die auf „1“ gesetzt wurde. Die Standardabweichung in A) resultiert aus einem technischen Replikat, die Standardabweichung in B) ergab sich aus drei unabhängigen Experimenten.

Mittels Echt-Zeit-PCR konnte in reinen LZ eine Expression aber keine Aufregulation des AHRR nach Aktivierung des AHR mit TCDD detektiert werden (Abb. 18B). Es wurden verschiedene Belastungszeitpunkte gewählt, wobei der AHRR zu keinem Zeitpunkt durch TCDD stärker ausgeprägt wurde. Dieser Befund bestätigte erneut das Ergebnis der Microarray-Auswertung und deutete darauf hin, dass LZ aufgrund einer konstitutiven Ausprägung des AHRR gegenüber AHR-vermittelter Geninduktion inert scheinen. Im Folgenden wurde deshalb die Menge an AHRR in LZ mit der Ausprägung in anderen Organen verglichen.

4.3.2 LZ exprimieren den AHRR konstitutiv in großer Menge

Vor kurzem wurde die konstitutive Expression von AHRR mRNA in verschiedenen Organen untersucht. In einer quantitativen Analyse konnte gezeigt werden dass der AHRR in Hirn und Herz im Vergleich zu anderen Organen (Niere, Leber, Milz, Thymus) in hoher Kopienzahl vorliegt (Bernshausen et al., 2006). Diese konstitutive Expression ging einher mit einer schwachen Aktivierbarkeit des AHR in diesen Organen. Um zu untersuchen, wie die AHRR-Expression in LZ mit diesen Organen vergleichbar ist, wurde eine konventionelle semiquantitative PCR durchgeführt, in der die Expression des AHR in reinen LZ mit der in Herz und Hirn verglichen wurde. Abbildung 19 zeigt, dass der AHRR in LZ stärker ausgeprägt wird als in Hirn und Herz. Die hohe konstitutive Expression des AHRR in LZ ist somit eine mögliche Erklärung für die fehlende transkriptionelle Veränderung von LZ nach Aktivierung des AHR mit TCDD.

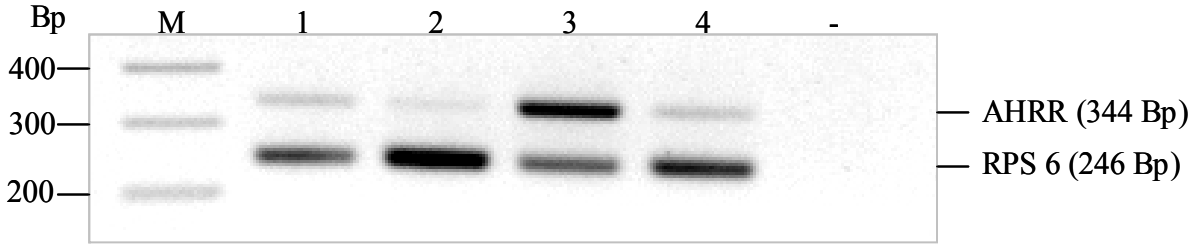

Abb. 19: Langerhans-Zellen weisen eine konstitutive hohe AHRR-Expression auf.
mRNA wurde präpariert, revers transkribiert und in der PCR zur Untersuchung der Expression des AHRR und des Haushaltsgens RPS6 amplifiziert. Die Expression wurde untersucht in 1. Herz, 2. Hirn, 3. LZ aus Wildtyp-Mäusen, 4. LZ aus AHR-defizienten Mäusen. M = 100 bp Standard, - = Negativkontrolle ohne cDNA. Das Bild ist repräsentativ für 2 bis 3 unabhängige Experimente.

Die Ausprägung des AHRR wird durch den AHR-Signalweg reguliert (Baba et al., 2001). Dies konnte durch die Untersuchung des AHRR-Expression in AHR-defizienten LZ bestätigt werden. Der Vergleich zu LZ aus Wildtyp-Mäusen zeigte eine wesentlich geringere AHRR-Expression. Zu erwähnen wäre aber die dennoch nachweisbare Expression von AHRR in LZ aus AHR-defizienten Mäusen im Vergleich zu LZ aus Wildtyp-Mäusen.

4.3.3 Mit einem HDAC-Inhibitor kann die Wirkung des AHRR nicht umgangen werden

Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen (HDAC) beeinflussen die Transkriptions-aktivität, indem sie durch Acetylierung der Histone die Chromatinstruktur von Promotor-regionen ändern (Struhl, 1998). Humane Fibroblasten weisen ähnlich wie LZ eine hohe konstitutive AHRR-Expression auf und zeigen keine CYP1A1-Induktion nach TCDD-Behandlung (Gradin et al., 1993). Gardin *et al.* erreichten durch Einsatz von 25 mM

Natriumbutyrat, einem HDAC-Inhibitor, dass die Fibroblasten auf Aktivierung des AHR mit der Induktion von CYP1A1 reagierten (Gradin et al., 1999).

Bei dem Versuch, Promotoren in LZ für den AHR zugänglich zu machen stellte sich heraus, dass Natriumbutyrat in LZ Apoptose auslöst (Abb. 20). Schon ab Konzentrationen von 5 mM waren über 50% der Zellen apoptotisch. Die, für das Experiment notwendige, Konzentration von 25 mM löste in etwa 70% der Zellen Apoptose aus. Aus diesem Grund konnte der Ansatz nicht weiter verfolgt werden.

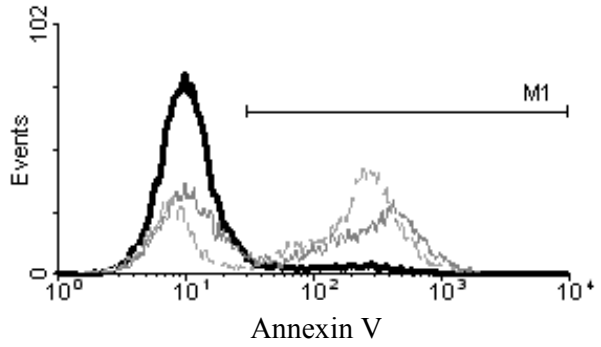

Abb. 20: Der HDAC-Inhibitor Natriumbutyrat induziert Apoptose in LZ

Epidermale Zellen wurden in Kultur für 24 Stunden mit 5 mM (dunkelgraue Kurve) und 25 mM (hellgraue Kurve) bzw. ohne Natriumbutyrat (schwarze Kurve) inkubiert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen MHC-II und Annexin-V gefärbt und im FACS die MHC-II$^+$ Zellen analysiert. Im Bereich M1 liegen die Annexin-V$^+$ (= apoptotische) Zellen.

4.4 TCDD hat einen geringen Effekt auf die Ausprägung von Oberflächenmolekülen auf LZ

Mittels globaler Genexpressionsanalyse konnte kein Einfluss von TCDD auf transkriptioneller Ebene in LZ festgestellt werden. Dieses Ergebnis sollte auf die Analyse von Proteinen erweitert werden. Der AHR ist zwar als Transkriptionsfaktor beschrieben, dennoch werden neben der Regulation der Genexpression weitere Funktionen vermutet (Carlson et al., 2002). Um den Effekt von TCDD auf die Expression verschiedener, funktionell wichtiger Oberflächenproteine zu analysieren, wurden epidermale Zellen isoliert und die LZ auf die Ausprägung charakteristischer Oberflächenproteine im FACS untersucht. Da sich das Spektrum der Oberflächenmoleküle, insbesondere solche für die Aufnahme von Antigenen, deren Präsentation und Ko-stimulation durch Reifung der LZ ändert, wurden die epidermalen Zellen nach der Isolation für 72h kultiviert, um die Reifung der LZ zu induzieren. Diese wurden dann wiederum durchflusszytometrisch analysiert. Im Folgenden werden die frisch

isolierten Zellen als „unreif“, und die für drei Tage kultivierten Zellen als „reif“ bezeichnet (siehe Abb. 9 Population B und D).

4.4.1 Trypsinempfindlichkeit anderer Oberflächenmoleküle neben CD11c

In Kapitel III.1 konnte gezeigt werden, dass das Oberflächenprotein CD11c durch die Protease Trypsin, die zur Trennung der Epidermis von der Dermis eingesetzt wurde, verdaut wurde (Abb. 7). Um im Folgenden eindeutige Aussagen treffen zu können, ob ein Oberflächenprotein auf unreifen LZ nicht ausgeprägt, oder durch die Trypsinbehandlung verdaut wurde, wurde zunächst die Trypsinempfindlichkeit von verschiedenen, auf unreifen LZ nicht nachweisbaren Oberflächenproteinen untersucht. Hierfür wurden LZ isoliert und für drei Tage kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt sollten alle Oberflächenproteine, die von der Trypsinbehandlung betroffen waren, wieder nachweisbar sein, sofern sie nicht durch die Reifung herunter reguliert wurden.

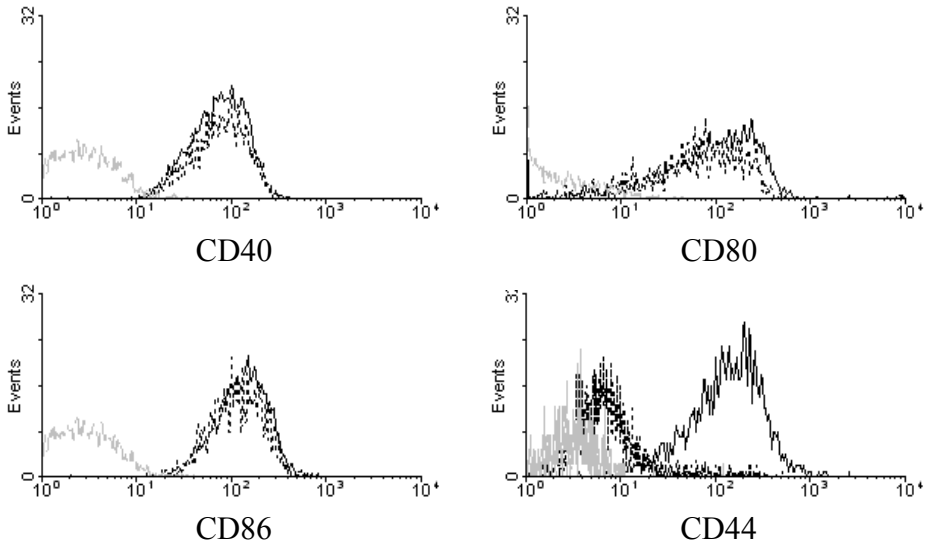

Abb. 21: CD44 wird von Trypsin abgebaut. Kultivierte epidermale Zellen wurden mit 0,25% Trypsin in PBS für 8 min inkubiert. Die Zellen wurden mit Medium gewaschen und mit Antikörpern gegen MHC-II und die angegebenen Oberflächenmarker gefärbt und im FACS analysiert. Abgebildet sind die Histogramme von lebenden MHC-II$^+$ Zellen. (Durchgehende, schwarze Linie = ohne Trypsinbehandlung; gestrichelte schwarze Linie = nach Trypsinbehandlung für 8 min; graue Linie = Isotypkontrolle unbehandelter Zellen).

Die Zellen wurden nach Kultivierung über einen BSA-Dichtegradienten angereichert und für 8 Minuten mit 0,25% Trypsin in PBS bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die entsprechenden Oberflächenmarker mit Antikörpern markiert und im FACS analysiert (Abb. 21). Im Vergleich von unbehandelten LZ (durchgehende, schwarze Linie) zu Trypsin-behandelten LZ (gestrichelte Linie) zeigte sich keine Empfindlichkeit der

Oberflächenproteine CD40 und CD86. Im Histogramm lagen die Kurven beider Gruppen übereinander. Eine schwache Wirkung von Trypsin lag bei CD80 vor, was durch eine leicht Verschiebung der gestrichelten Kurve nach links erkennbar war (Abb. 21, oben rechts). Eine deutliche Empfindlichkeit gegenüber Trypsin war für das Oberflächenprotein CD44 erkennbar. Im Histogramm äußerte sich dies in einer Verschiebung der Kurve der Trypsin-behandelten LZ nach links. Aus diesem Grund konnte keine Aussage über die Expression von CD44 auf unreifen LZ getroffen werden.

4.4.2 TCDD führt zu einer stärkeren Expression von CD86 auf reifen LZ

Die Ausprägung von Oberflächenproteinen ist je nach ihrer Funktion häufig mit dem Differenzierungsstatus einer Zelle verknüpft. Unreife LZ, welche sich durch eine hohe Phagozytosefähigkeit auszeichnen, prägen unter anderem die Phagozytoserezeptoren CD16/CD32 aus. Reife Zellen, deren Hauptaufgabe die Präsentation von Antigen an T-Zellen ist, prägen vermehrt die ko-stimulatorischen Proteine CD40, CD80 und CD86 aus (Banchereau et al., 1998). Für die Migration von der Haut zum Lymphknoten werden Adhäsionsmoleküle wie z.B. CD44 exprimiert. In Tabelle 9 ist das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse zusammengefasst.

Tabelle 9: Angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität lebender MHC-II positiver Zellen. (n ≥ 3)

	CD16/CD32		CD24a		CD40		CD44		CD80		CD86	
	unreif [3]	reif [4]	unreif	reif	unreif	reif	unreif	reif	unreif	reif	unreif	reif
DMSO[1]	14	2***[5]	156	122	13	188***	n.d.	76	2	99*	14	458***[6]
TCDD[2]	14	3**	162	117	14	179***	n.d.	84	3	118***	13	549***

1) C57BL/6 Mäuse wurden für 24h mit DMSO behandelt
2) C57BL/6 Mäuse wurden für 24h mit 10 µg/kg TCDD behandelt
3) epidermale Zellen wurden isoliert und lebende MHC-II$^+$ Zellen analysiert
4) epidermale Zellen wurden isoliert, für 72h kultiviert und lebende MHC-II$^+$ Zellen analysiert
5) durch * werden signifikante Änderungen durch Reifung angezeigt ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***))
6) graue Unterlegung zeigt signifikante Änderungen zwischen DMSO und TCDD-behandelten Zellen an ($p < 0,05$)

Die durch Kultivierung der Zellen induzierte Reifung zeigte sich in der Regulation der untersuchten Oberflächenproteine. In Tabelle 9 wurden signifikante Änderungen zwischen unreifen und reifen LZ durch Sterne gekennzeichnet. Die Phagozytoserezeptoren CD16/CD32 wurden auf unreifen Zellen exprimiert, während diese erwartungsgemäß nach Kultivierung nicht länger nachweisbar waren. Das ko-stimulatorische Molekül CD24a war sowohl in unreifen, als auch in reifen LZ deutlich detektierbar. In reifen LZ war die Expression etwas geringer als in unreifen Zellen, was Daten der Literatur bestätigt (Enk et al., 1994a). Die ko-

stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 waren in unreifen LZ schwach oder gar nicht nachweisbar. Durch Reifung fand aber bei allen untersuchten Proben eine signifikante Aufregulation statt. Das Adhäsionsmolekül CD44 konnte aufgrund der Trypsinbehandlung in unreifen Zellen nicht detektiert werden, auf reifen Zellen wurde dieses Molekül aber ausgeprägt.

Um den Effekt von TCDD auf die Expression von Oberflächenproteinen auf unreifen und reifen LZ zu untersuchen, wurden epidermale Zellen aus Mäusen isoliert, denen 24 Stunden vorher TCDD bzw. DMSO appliziert wurde. In Tabelle 9 wurden signifikante Änderungen zwischen LZ aus DMSO- und TCDD-behandelten Mäusen durch eine graue Unterlegung gekennzeichnet.

Ein Einfluss auf die Expression der Oberflächenmoleküle durch TCDD war lediglich in einem Fall zu erkennen. CD86 war auf reifen LZ aus TCDD-behandelten Mäusen stärker exprimiert als auf Zellen aus DMSO-behandelten Mäusen (siehe Tabelle 9 und Abb. 22).

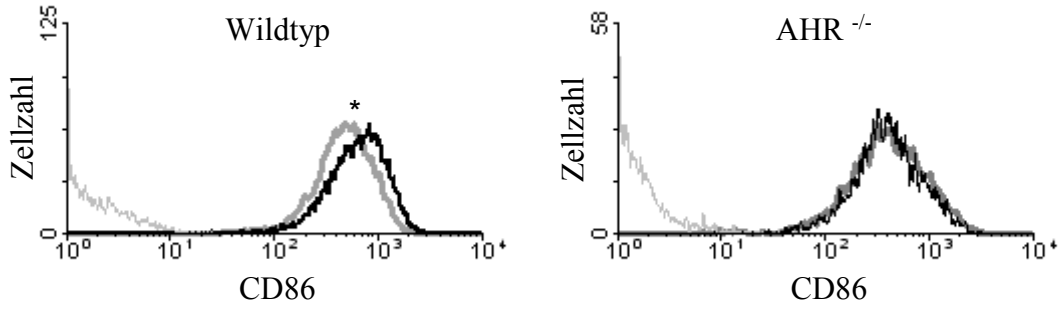

Abb. 22: Die CD86 Expression wird AHR-abhängig durch TCDD reguliert. C57BL/6 und AHR$^{-/-}$ Mäuse wurden mit TCDD (10 µg/kg) oder DMSO als Kontrolle i.p. behandelt. Nach 24 Stunden wurden die epidermalen Zellen isoliert und in Kultur genommen. Nach drei Tagen wurde die Zellsuspension mit Antikörpern gegen MHC-II und CD86 gefärbt und im FACS analysiert. Gezeigt ist je ein repräsentatives Histogramm von drei unabhängigen Experimenten. (Schwarze Kurve = LZ TCDD-behandelter Mäusen; dunkelgraue Kurve = LZ DMSO-behandelter Mäuse; hellgraue Kurve = Isotypkontrolle).

Um zu zeigen, dass die durch TCDD hervorgerufene Regulation vom AHR abhängig war, wurden AHR-defiziente Mäuse mit TCDD injiziert und geprüft, ob der Effekt von TCDD auf die Ausprägung von CD86 auch in Zellen ohne AHR nachweisbar war (Abb. 22). In AHR-defizienten Zellen konnte, im Gegensatz zu LZ aus Wildtyp-Mäusen, keine Veränderung der CD86-Expression nach TCDD-Behandlung beobachtet werden. In der Histogramm-Darstellung zeigte sich bei TCDD-behandelten Wildtyp-Mäusen (schwarze Kurve) im Vergleich zu Zellen aus DMSO-behandelten Wildtyp-Mäusen (dunkelgraue Kurve) eine

Verschiebung der Kurve nach rechts, während die Kurven der DMSO-behandelten und TCDD-behandelten Zellen aus AHR-defizienten Mäusen übereinander lagen.
Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die CD86-Expression in einem AHR-abhängigen Mechanismus nach TCDD-Exposition *in vivo* aufreguliert wird, während alle weiteren untersuchten Oberflächenproteine unverändert blieben.

4.5 TCDD beeinflusst die Phagozytosekapazität der LZ

Mit den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des AHR in LZ keine transkriptionellen Veränderungen hervorruft. Dennoch wurde eine AHR-abhängige Regulation des ko-stimulatorischen Moleküls CD86 auf reifen LZ festgestellt. In dem im Folgenden beschriebenen Experiment wurde der Frage nachgegangen, ob eine Aktivierung des AHR in LZ einen Einfluss auf die Funktion der Zellen hat. Dafür wurde ein Phagozytoseassay gewählt, bei dem frisch isolierte epidermale Zellen aus TCDD-behandelten bzw. DMSO-behandelten Mäusen mit fluoreszierenden Dextranpartikeln inkubiert wurden (Abb. 9, Population B). Eine hohe Phagozytosekapazität ist ein funktionelles Merkmal unreifer Antigen-präsentierender Zellen (Reis e Sousa et al., 1993). Da Keratinozyten ebenfalls über eine moderate Phagozytosekapazität verfügen (Sharlow et al., 2000), wurden die LZ zur Analyse im FACS mit einem MHC-II-Antikörper identifiziert.

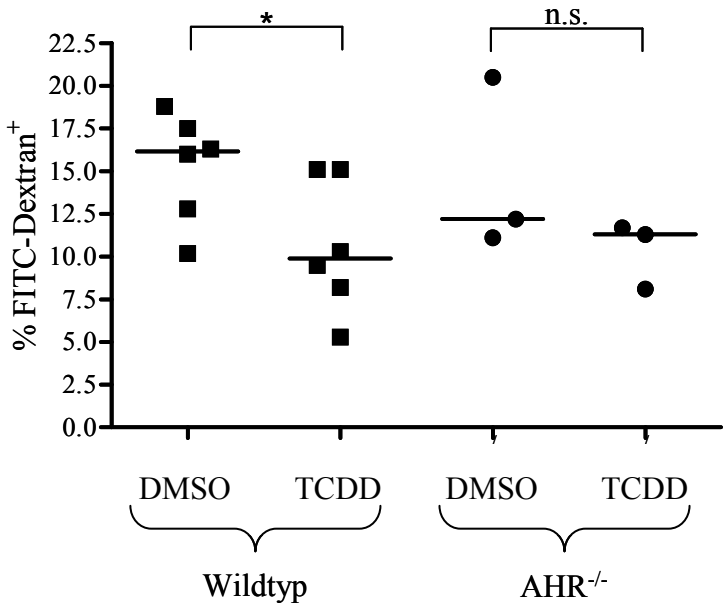

Abb. 23: Die Phagozytosekapazität ist abhängig vom AHR. C57BL/6 und AHR$^{-/-}$ Mäuse wurden mit TCDD (10 µg/kg) oder DMSO als Kontrolle i.p. behandelt. Nach 24 Stunden wurden die epidermalen Zellen isoliert und für 45 min mit 0,5 µg/ml FITC-Dextran bei 37°C bzw. bei 4°C als Kontrolle inkubiert. MHC-II^{+}-Zellen wurden im FACS analysiert. Die Auswertung erfolgte im Vergleich zur 4°C Kontrolle, wobei der Anteil an FITC-Dextran^{+} Zellen mit unspezifischer Bindung bei 4°C von den FITC^{+} Zellen bei 37°C abgezogen wurde. Jeder Punkt ist repräsentativ für ein Experiment mit Zellen je einer Maus.

In Abbildung 23 ist der prozentuale Anteil an lebenden MHC-II$^+$ Zellen aufgeführt, die FITC-Dextran-Partikel aufgenommen hatten. Während ca. 16% der LZ aus Kontrollmäusen Partikel aufgenommen hatten, lag der Anteil an FITC-Dextran$^+$/MHC-II$^+$ Zellen aus TCDD-behandelten Mäusen nur bei 10%. Dieser signifikante Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte bei LZ aus gleich behandelten AHR-defizienten Mäusen nicht festgestellt werden. Es handelte sich bei diesem Befund demnach um einen AHR-abhängigen Mechanismus, über den TCDD die Phagozytosekapazität vermindert.
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass LZ zwar auf transkriptioneller Ebene nicht auf die Aktivierung des AHR reagierten, aber dennoch Veränderungen auf Proteinebene und bei der Untersuchung der Phagozytose stattfanden. Dies macht deutlich, dass der AHR trotz der Blockierung seiner Funktion als Transkriptionsfaktor durch den AHRR in LZ von Bedeutung ist.

5. Vergleich von LZ aus C57BL/6 Wildtyp und AHR$^{-/-}$ Mäusen

Das Vorhandensein von AHR und AHRR in LZ deutete auf eine physiologische Rolle dieses Signalwegs hin. Um die Funktion des AHR in LZ besser zu verstehen, wurden daher LZ aus AHR-defizienten Mäusen mit LZ aus Wildtyp-Mäusen im Hinblick auf den Phänotyp und die Funktion verglichen.

5.1 Phänotypische Unterschiede zwischen WT und AHR-defizienten LZ

In der Epidermis bilden LZ ein Netzwerk mit ihren Dendriten, die ihnen, trotz der geringen Zellzahl ermöglichen, einen großen Raum in der Epidermis abzudecken. Zum Phänotyp gehört auch die Größe einer Zelle und bei LZ auch die Granularität, sowie die Expression der verschiedenen Oberflächenproteine. Im Folgenden sind Unterschiede und Gemeinsamkeiten der phänotypischen Eigenschaften der AHR-defizienten LZ und LZ aus Wildtyp-Mäusen aufgezeigt.

5.1.1 Die dendritische Morphologie der LZ in der Epidermis ist unabhängig vom AHR

Die Dendritenbildung der LZ wurde in Epidermishäutchen untersucht. Die Zellen wurden darin mit einem spezifischen anti-MHC-II-Antikörper detektiert. Als Negativkontrolle wurden Epidermishäutchen von MHC-II-defizienten Mäusen (Aa$^{-/-}$; (Kontgen et al., 1993)) gefärbt.

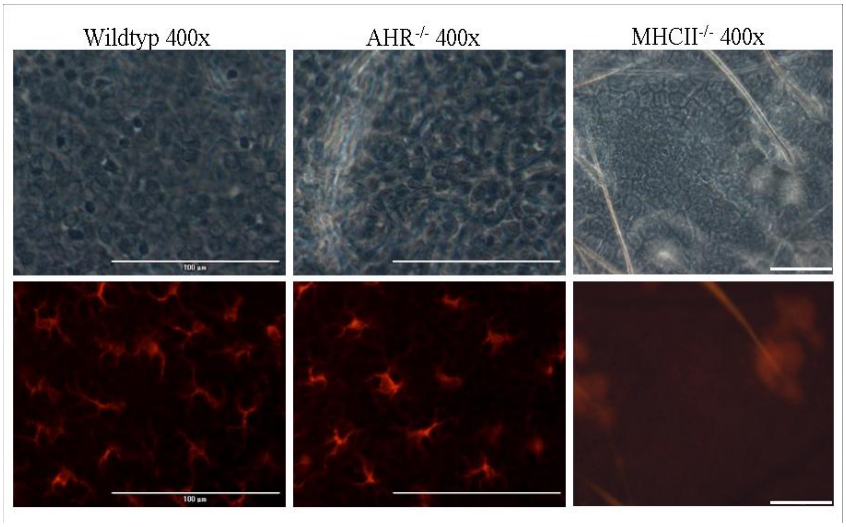

Abb. 24: Die dendritische Morphologie von LZ ist unabhängig vom AHR. Epidermishäutchen wurden wie unter II.2.4 beschrieben präpariert, und mit einem MHC-II-Antikörper gefärbt. Die obere Reihe zeigt die entsprechenden Durchlichtbilder.
Vergrößerung: 400-fach;
weiße Linie = 100 µm

Wie in Abbildung 24 zu erkennen, bilden LZ ein dichtes Netzwerk in der Epidermis, und berühren sich mit den Dendriten teilweise. Ausgewertet wurden die Bilder von jeweils fünf Mäusen. In der Verzweigung der Zellen waren keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Ausprägung des AHR zu erkennen.

5.1.2 Größe und Granularität sind abhängig vom AHR

Der Phänotyp von LZ hängt eng mit dem Reifestatus zusammen. So ist beschrieben, dass die Zellen durch Reifung größer und granulärer werden (Schuler et al., 1985b). Durchflusszytometrisch lässt sich dies über einen Anstieg im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht nachweisen.

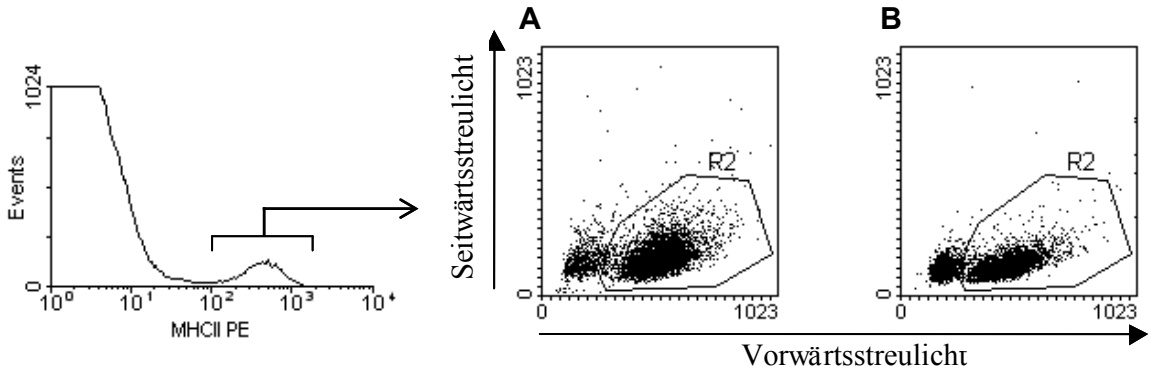

Abb. 25: Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht von WT-LZ (A) und AHR$^{-/-}$ LZ (B) in Punktwolkendarstellungen. Dargestellt ist je ein repräsentatives Bild reifer LZ. Berücksichtigt wurden nur lebende MHC-II^{+} Zellen (R2).Bei den Punkten außerhalb der Markierung R2 handelt es sich um Zelldebris oder vermutlich um tote oder apoptotische Zellen, die routinemäßig von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden.

Im Vergleich reifer LZ aus Wildtyp- und AHR-defizienten Mäusen zeigte sich, dass die Zellen (Abb. 9, Population D) ohne AHR ein anderes Erscheinungsbild im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht hatten (Abb. 25). Nur MHC-II$^+$ Zellen, die in R2 lagen, wurden zur Kalkulation der Größe und Granularität verwendet. (Abb. 26). Dabei wurden die mittleren Intensitäten des Vorwärtsstreulichts (FSC) und des Seitwärtsstreulichts (SSC) als relativer Wert für Größe (C, D) und Granularität (A, B) unreifer und reifer Zellen in R2 herangezogen (Abb. 9, Population B und D). Verglichen wurden LZ aus AHR-defizienten und Wildtyp-Mäusen. Die Mäuse wurden 24 Stunden zuvor entweder mit DMSO oder TCDD behandelt.

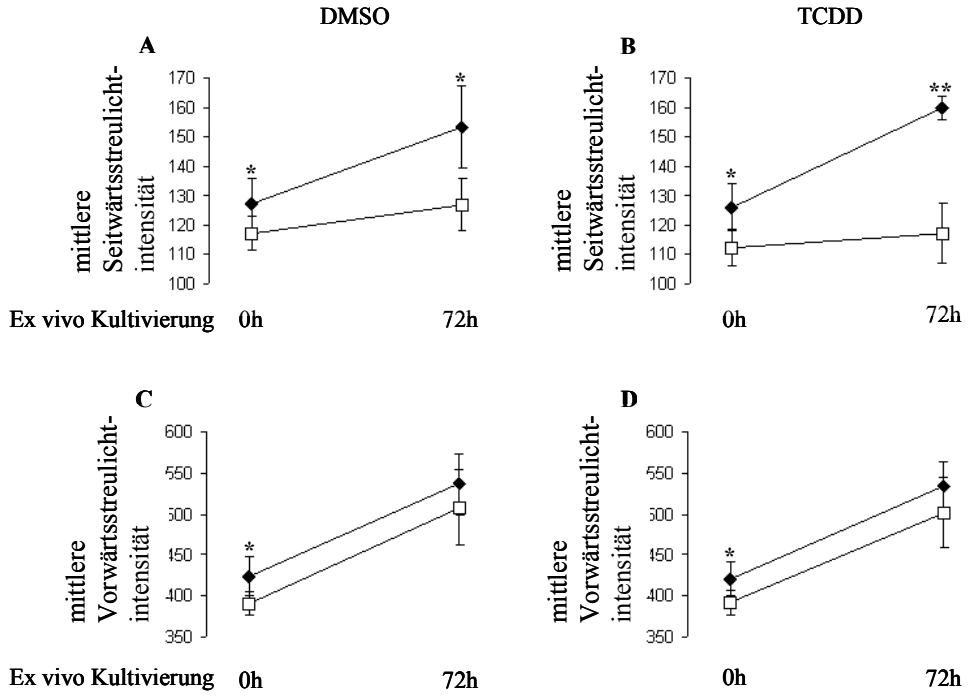

Abb. 26: Die Morphologie von LZ ist abhängig vom AHR. WT und AHR$^{-/-}$ Mäuse wurden mit TCDD (10 µg/kg) bzw. DMSO i.p. behandelt. 24 Stunden später wurden epidermale Zellen isoliert und im FACS analysiert. Ein Aliquot der Zellen wurde für drei Tage *ex vivo* kultiviert und im FACS analysiert. Es wurde ein Auswertefenster auf lebende MHC-II$^+$ Zellen gesetzt (R2) und das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht analysiert. A), B) Die relative Granularität von LZ von DMSO- (A) und TCDD- (B) behandelten WT-Mäusen (schwarz) und AHR$^{-/-}$ (weiß) Mäusen wurde im Seitwärtsstreulicht am FACS analysiert. C), D) Die relative Größe von LZ von DMSO- (C) und TCDD- (D) behandelten Wildtyp-Mäusen (schwarz) und AHR$^{-/-}$ (weiß) Mäusen wurde im Vorwärtsstreulicht am FACS analysiert. ($*$, $p < 0.05$; $**$, $p < 0.01$)

Zu erkennen war, dass die Größe und Granularität durch Reifung der Wildtyp-Zellen nach drei Tagen stark angestiegen war, was Literaturangaben entspricht (Schuler et al., 1985b). Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Mäuse vorher mit TCDD oder DMSO behandelt wurden. Unreife LZ aus AHR-defizienten Mäusen waren signifikant kleiner (FSC, DMSO =

391; FSC, TCDD = 392) und weniger granulär (SSC, DMSO = 117; SSC, TCDD = 112), als die Zellen der Wildtyp-Mäuse (FSC, DMSO = 424; FSC, TCDD = 420; SSC, DMSO = 127; SSC, TCDD = 126). In reifen Zellen aus AHR-defizienten Mäusen kam es im Vergleich zu unreifen Zellen im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen nur zu einer geringen Zunahme der Granularität. Reife AHR-defiziente LZ waren kleiner als reife LZ aus Wildtyp-Mäusen, der Unterschied war aber nicht länger signifikant.
Die Unterschiede in der Morphologie der Zellen in Abhängigkeit vom AHR zeigten deutlich, dass der AHR-Signalweg eine physiologische Rolle in der Entwicklung von LZ einnimmt. Dies sollte in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

5.1.3 Die Ausprägung einiger ko-stimulatorischer Proteine ist abhängig vom AHR

Bei der Analyse der Wildtyp-LZ konnte festgestellt werden, dass durch Reifung der Zellen eine starke Regulation der Oberflächenmoleküle stattfand (siehe Tabelle 9). In Tabelle 10 ist das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse unreifer und reifer LZ aus Wildtyp- und AHR-defizienten Mäusen aufgeführt.

Tabelle 10: Angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) lebender MHC-II positiver Zellen in der epidermalen Zellsuspension. (n ≥ 3)

	CD16/CD32		CD24a		CD40		CD44		CD80		CD86	
	unreif [3]	reif [4]	unreif	reif	unreif	reif	unreif	reif	unreif	reif	unreif	reif
Wildtyp [1]	14	2*** [5]	156 [6]	122	13	188***	n.d.	76	2	99*	14	458***
AHR$^{-/-}$ [2]	13	2**	61	56	10	142*	n.d.	86	2	42	11	401**

1) es wurden epidermale Zellen aus C57BL/6 Mäusen analysiert
2) es wurden epidermale Zellen aus AHR-defizienten Mäusen analysiert
3) epidermale Zellen wurden isoliert und lebende MHC-II$^+$ Zellen analysiert
4) epidermale Zellen wurden isoliert, für 72h kultiviert und lebende MHC-II$^+$ Zellen analysiert
5) durch * werden signifikante Änderungen durch Reifung angezeigt ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***))
6) graue Unterlegung zeigt signifikante Änderungen zwischen Wildtyp- und AHR-defizienten Zellen an ($p < 0,05$)

Die unreifen LZ aus AHR-defizienten Mäusen prägten ebenso wie die Zellen der Wildtyp-Mäuse die ko-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 nicht aus, regulierten diese aber im Zuge der Reifung auf. Die Expression unterschied sich aber im Vergleich zu Wildtyp-LZ. Die Expression von CD80 war signifikant niedriger, bei CD40 zeigte sich lediglich ein Trend in drei unabhängigen Experimenten, welcher allerdings keine statistische Signifikanz erreichte. Die Ausprägung von CD86 zeigte in LZ aus Wildtyp-Mäusen eine Abhängigkeit von der Aktivierung des AHR, indem es durch Exposition mit TCDD aufreguliert wurde (Tab. 9). Im Vergleich von Zellen aus Wildtyp- und AHR-defizienten Mäusen ohne vorherige

Aktivierung des AHR war die Expression von CD86 allerdings vergleichbar. Das ko-stimulatorische Molekül CD24a war signifikant niedriger auf Zellen ohne funktionellen AHR ausgeprägt. Dies war auch in reifen Zellen zu erkennen. Um die Unterschiede in der Expression der Oberflächenproteine zwischen Wildtyp- und AHR-defizienten Zellen deutlicher darzustellen, wurden die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Expression ko-stimulatorischer Proteine auf reifen LZ in einem Histogramm aufgetragen. Die weiße Kurve stammt von Zellen mit AHR, die grau gefüllte Kurve von LZ ohne AHR.

Die Ergebnisse der Oberflächenmarker-Analyse erweitern die Daten der morphologischen Unterschiede und unterstützen die Annahme, dass der AHR in LZ eine physiologische Rolle einnimmt. Zusammengefasst deuten die Befunde auf eine verminderte oder verlangsamte Reifung der Zellen ohne AHR hin.

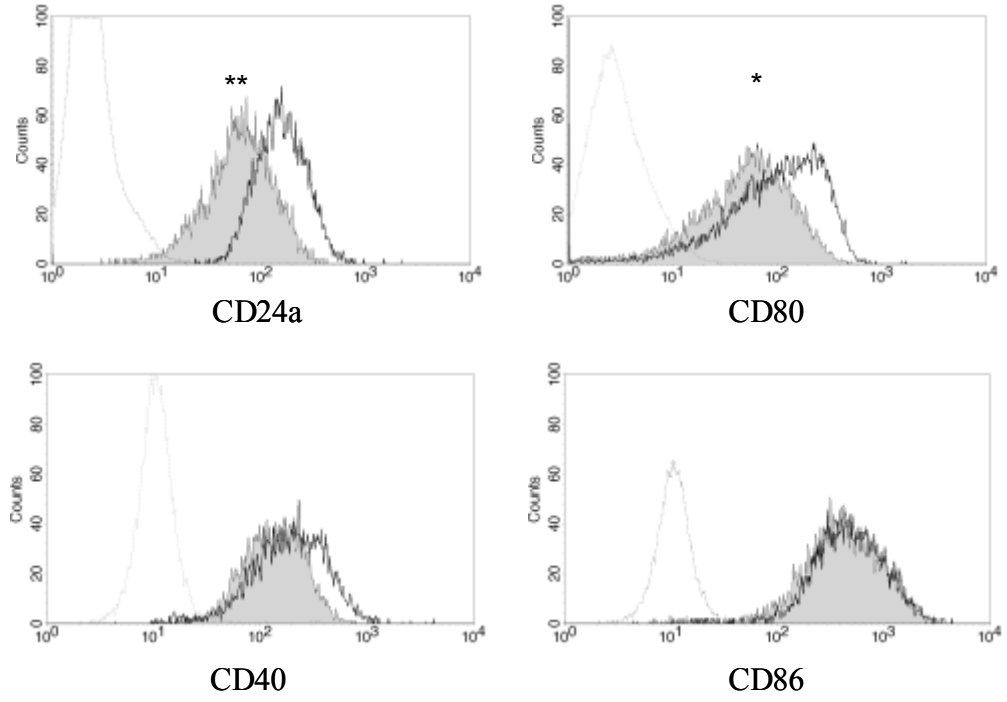

Abb. 27: Reife AHR$^{-/-}$ LZ exprimieren weniger CD24a, CD40 und CD80.

Aus Wildtyp- und AHR-defizienten Mäusen wurden epidermale Zellen isoliert und für drei Tage kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und für die angegebenen Marker mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Die lebenden MHCII^{+}-Zellen wurden im FACS analysiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild aus mind. drei unabhängigen Experimenten. (Grau gefüllte Kurve = LZ aus AHR$^{-/-}$ Mäusen, schwarze Linie = LZ aus WT-Mäusen; hellgraue Kurve = Isotypkontrolle)

5.2 Vergleich der Transkriptome von LZ aus Wildtyp- und AHR$^{-/-}$- Mäusen

Bei der Untersuchung des Genexpressionsprofils der LZ aus TCDD- und DMSO-behandelten Mäuse zeigten sich LZ als inert gegenüber einer Aktivierung des AHR. Dies ließ sich

plausibel durch eine hohe konstitutive AHRR-Expression erklären. In einem Vergleich des Genexpressionsprofils aus Wildtyp-LZ und AHR-defizienten LZ sollte geklärt werden, ob das Fehlen des AHR eine Veränderung des Genexpressionsprofils verursacht. Von über 22.500 Genen, die auf dem Affymetrix Chip repräsentiert sind, waren 127 Gene differentiell ausgeprägt. Davon waren 55 Gene in Wildtyp-Mäusen stärker exprimiert als in $AHR^{-/-}$ Mäusen ($32 \geq 2$; $9 \geq 3$; $14 \geq 4$) und 72 Gene in $AHR^{-/-}$ Mäusen stärker exprimiert als in Wildtyp-Mäusen ($59 \geq 2$; $9 \geq 3$; $4 \geq 4$). Eine Liste aller regulierten Gene befindet sich im Anhang (Tabelle 12). Die mRNA für den *AHRR* und die *TCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase (Tiparp)*, beides bekannte AHR-abhängige Gene, waren in AHR-defizienten Zellen schwach bis gar nicht detektierbar.

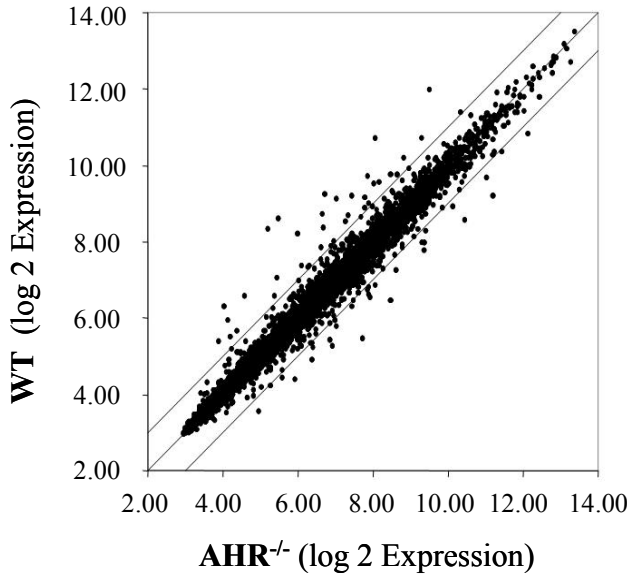

Abb. 28: Gegenüberstellung der globalen Genexpressionsanalyse von Wildtyp- und AHR-defizienten LZ im Punktwolkendiagramm. LZ aus C57Bl/6 Mäusen und $AHR^{-/-}$ Mäusen wurden isoliert und die RNA nach *in vitro*-Amplifikation für eine Microarray-Analyse verwendet. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Liegt ein Punkt außerhalb der äußeren Linien ist dieses Gen mindestens zweifach reguliert.

Mit Hilfe eines Bioinformatikprogramms wurde die regulierten Gene in Gruppen nach ihren verschiedenen biologischen Funktionen zusammengefasst (Martin et al., 2004). In Abbildung 29 sind die drei Gruppen, welche die meisten regulierten Gene enthielten, aufgeführt. In AHR-defizienten LZ waren etwa 20 der 72 stärker ausgeprägten Gene von immunologischer Bedeutung (Abb. 29, links). Darunter befanden sich das *CD68 Antigen* (Phagozytoseregulation; (da Silva et al., 1999)), *CD274 Antigen* (ko-inhibitorisches Molekül; (de Jong et al., 2005)), *IL-1β* (proinflammatorisches Zytokin; (Enk et al., 1993a)), *MHC-II* und verschiedene Interferon-γ induzierte Gene. Viele der regulierten Gene waren dem

Lipidstoffwechsel zuzuordnen (12 von 72 Genen). 10 der 72 Gene sind in den Abbau von Proteinen involviert.

Die meisten Gene, die in AHR-defizienten Zellen schwächer ausgeprägt waren als in Wildtyp-Zellen, konnten der Regulation von Stoffwechselprozessen zugeordnet werden (19 von 55). Von den 55 Genen, sind zwei von immunologischer Bedeutung herauszustellen (Abb. 29, rechts). Dazu gehörte die *Indolamin-pyrrol 2,3, Dioxygenase*, besser bekannt als IDO, die etwa 9-fach schwächer exprimiert war. IDO spielt eine Rolle in der Regulation der Immunantwort durch die Induktion von Toleranz (Finger et al., 2002; Grohmann et al., 2003). Das zweite Gen war die *PAF Acetylhydrolase,* welche die Migration von LZ beeinflusst (Angeli et al., 2004).

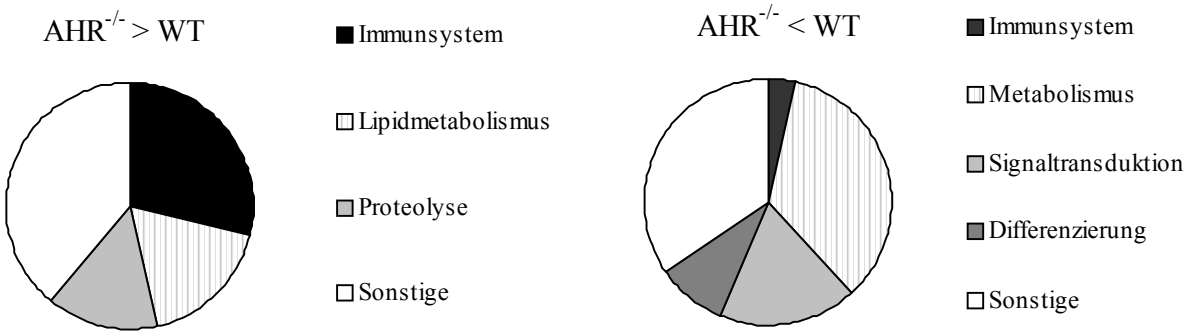

Abb. 29: Mit der G.O.ToolBox Software wurden den regulierten Genen biologische Funktionen in der Zelle zugeordnet. Die drei Gruppen mit den meisten Einträgen sowie das Immunsystem wurden aufgeführt. Im linken Diagramm wurden die Gene ausgewertet, die in AHR-defizienten LZ stärker ausgeprägt waren, auf der rechten Seite wurden die Gene ausgewertet, die in AHR-defizienten LZ schwächer ausgeprägt waren.

5.3 Funktionelle Unterschiede zwischen AHR-defizienten und Wildtyp-LZ

5.3.1 AHR-defiziente LZ sind bessere Phagozyten

Die Oberflächenmarker-Analyse, sowie die morphologischen Unterschiede zwischen Wildtyp- und AHR-defizienten LZ deuteten darauf hin, dass sich letztere in einem unreiferen Status befinden. Da die Phagozytosekapazität mit dem Reifungsgrad der Zellen korreliert, wurde dieser Parameter für LZ aus AHR-defizienten Mäusen bestimmt und mit den Werten aus Wildtyp-Mäusen vergleichen (siehe Abb. 9, Population B). Dieser Assay wurde mit Zellen unbehandelter Mäuse durchgeführt.

In Abbildung 30 ist eine signifikant höhere Phagozytosekapazität von AHR-defizienten LZ im Vergleich zu LZ aus Wildtyp-Mäusen erkennbar. Damit schienen LZ aus AHR-defizienten Mäusen auch aufgrund dieses funktionellen Parameters unreif zu sein.

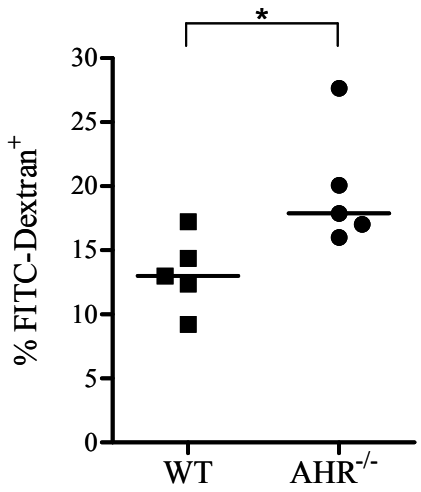

Abb. 30: AHR-defiziente LZ besitzen eine größere Phagozytosekapazität. Frisch isolierte epidermale Zellen wurden für 45 min mit 0,5 µg/ml FITC-Dextran bei 37°C bzw. bei 4°C als Kontrolle inkubiert. Lebende MHC-II$^+$ Zellen wurden im FACS analysiert, die Auswertung erfolgte im Vergleich zur 4°C Kontrolle, wobei die unspezifische Bindung bei 4°C von den FITC$^+$ Zellen bei 37°C subtrahiert wurde. Jeder Punkt ist repräsentativ für das Ergebnis von Zellen je einer Maus.

5.3.2 Die ko-stimulatorischen Fähigkeiten waren nicht beeinflusst

Reife Zellen, deren Hauptaufgabe die Präsentation von Antigen an T-Zellen ist, prägen vermehrt die ko-stimulatorischen Proteine CD40, CD80 und CD86 aus (Steinman, 2003). Die Expression der ko-stimulatorischen Moleküle CD24a, CD40 und CD80 war in AHR-defizienten LZ niedriger als in den Wildtyp-LZ (Abb. 27 und Tab. 10). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die verminderte Expression dieser Oberflächenproteine einen Einfluss auf die stimulatorische Fähigkeit der Zellen hat. In einer allogenen T-Zell-Stimulation wurden T-Zellen der Milz aus SKH1-Mäusen (unbekannter Haplotyp) mit LZ aus AHR-defizienten und Wildtyp-Mäusen (H-2^b Haplotyp) für drei Tage kultiviert (Abb. 31). Die LZ wurden 24 Stunden vor der Ko-Kultivierung isoliert und in Kultur gehalten, um die Ausprägung ko-stimulatorischer Proteine zu induzieren (siehe Abb. 9 Population C). Als Kontrolle wurden LZ mit T-Zellen desselben Haplotyps (H-2^b) kultiviert (syngene Kontrolle, keine Proliferation). LZ allein proliferierten nicht. Zu erkennen war, dass die T-Zellen in Abhängigkeit der Anzahl der LZ proliferierten. In einem Verhältnis von 2000 T-Zellen : 1 LZ war keine Proliferation im Vergleich zur syngenen Kontrolle erkennbar. Das Verhältnis von 200 : 1 und 20 : 1 führte dagegen zu einer deutlichen Proliferation, unabhängig vom eingesetzten Typ der LZ (mit oder ohne AHR). Obwohl die Ausprägung einiger ko-stimulatorischer Oberflächenproteine auf AHR-defizienten Zellen verändert war, konnte unter den getesteten Bedingungen kein Einfluss auf den funktionellen Parameter „T-Zell-Stimulation“ festgestellt werden.

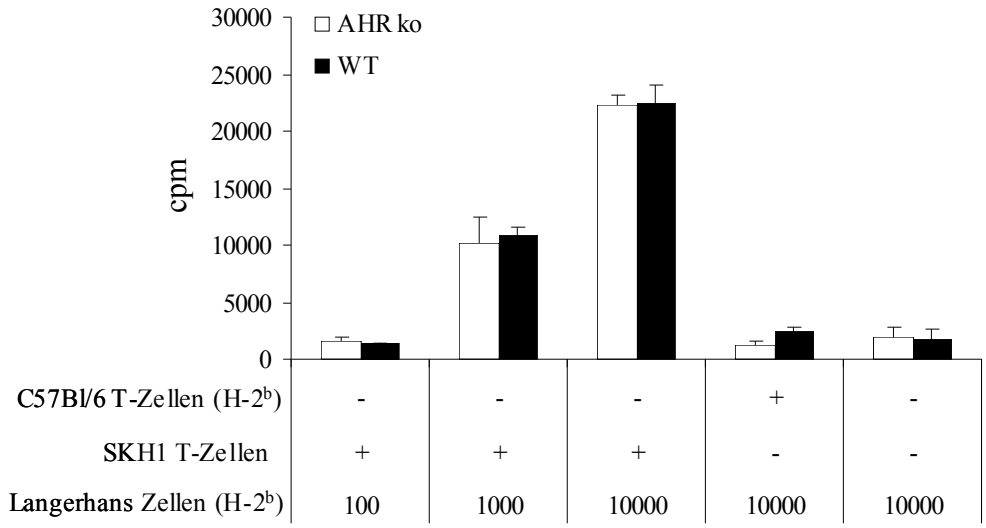

Abb. 31: LZ aus Wildtyp und AHR$^{-/-}$ Mäusen haben eine vergleichbare stimulatorische Aktivität. Je 200000 T-Zellen wurden mit der angegebenen Menge an LZ ko-kultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde nach Zugabe von 0.5 µCi ^{3}H–Thymidin für 18 Stunden durch Messung der „counts per minute“ (cpm) bestimmt. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung einer Dreifach-Bestimmung.

6. Keratinozyten beeinflussen LZ über die AHR-abhängige Expression von Zytokinen

Die Zellen der Epidermis bilden ein sich beeinflussendes Netzwerk. Keratinozyten können je nach Stimulus eine Vielzahl von Zytokinen ausschütten und sind dadurch ein wesentlicher Bestandteil des Hautimmunsystems. Die Keratinozyten produzieren verschiedene Zytokine, die die Funktion und das Überleben der LZ in der Haut beeinflussen. Zu den Zytokinen, welche die Funktion und das Überleben der LZ in der Epidermis aufrechterhalten oder steigern, gehören IL-1, IL-6, IL-15, GM-CSF und TNF-α. IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das die Funktion der LZ inhibiert (Kondo, 1999). Im Folgenden wurde die Ausprägung dieser Zytokine in epidermalen Zellen in Abhängigkeit der Überaktivierung oder des Fehlens des AHR untersucht. Dies sollte klären, ob die beobachteten Effekte bei LZ durch eine veränderte Zytokinexpression von Keratinozyten zu begründen sind.

6.1 AHR-abhängige Zytokinexpression in Keratinozyten

Die AHR-abhängige Regulierung der genannten Zytokine wurde sowohl nach AHR-Aktivierung mit TCDD als auch in AHR-defizienten Zellen untersucht. Nach i.p. Behandlung von Mäusen mit TCDD für 24 Stunden oder 6 Tage konnte die Induktion der mRNA

mehrerer Zytokine festgestellt werden. Die mRNA von IL-6 und IL-10 war nach 24 Stunden etwa zweifach induziert (Abb. 32). Für beide Interleukine war eine Induktion auch nach 6 Tagen erkennbar. Für TNF-α und GM-CSF konnte 6 Tage nach TCDD-Gabe eine deutliche Induktion um das 2,8-fache bzw. 2,9-fache festgestellt werden. Die Standardabweichung in Abbildung 32 resultierte aus drei unabhängigen Experimenten. Für den GM-CSF Wert, wurden die drei unabhängigen Experimente nicht zusammengefasst, da die Induktionen in den Experimenten sehr unterschiedlich waren. GM-CSF wurde jedoch in jedem Fall induziert. Die Induktion lag in einem Bereich von 2,9 bis 39-fach im Vergleich zur Kontrolle. Auf die Transkription von IL-15 und IL-1β hatte die Aktivierung des AHR mit TCDD zu beiden getesteten Zeitpunkten keinen Effekt.

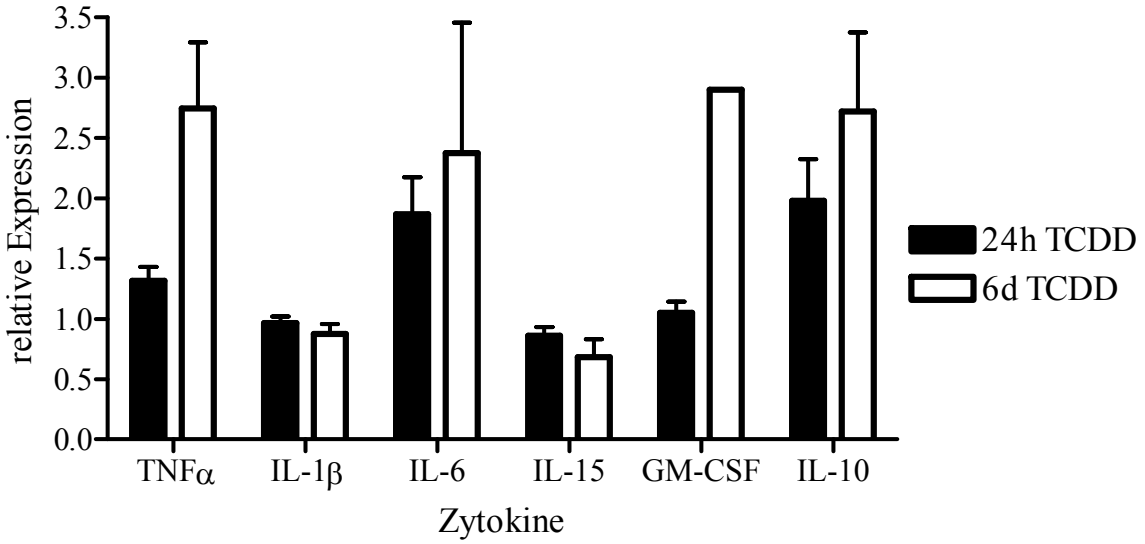

Abb. 32: Die RNA einiger, von Keratinozyten produzierten Zytokine werden durch AHR-Aktivierung induziert.

Mäusen wurde 10 µg/kg TCDD oder als Kontrolle das Lösungsmittel DMSO in Olivenöl i.p. injiziert. Nach 24 Stunden (schwarze Balken) und 6 Tagen (weiße Balken) wurden die epidermalen Zellen aus der Haut isoliert und die Expression der angegebenen Zytokine mittels semi-quantitativer Echt-Zeit-PCR oder konventioneller PCR analysiert. Dargestellt ist die relative Induktion in Zellen von TCDD-behandelten Mäusen im Vergleich zur Expression in Zellen von DMSO-behandelten Mäusen („1“) von drei unabhängigen Experimenten. Von GM-CSF wurde ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

Der Vergleich der Ausprägung von Zytokinen in Wildtyp- und AHR-defizienten Zellen ist in Abbildung 33 dargestellt, dabei wurde die Expression in Wildtyp-Mäusen auf „1“ gesetzt und die Expression in AHR-defizienten Mäusen darauf bezogen. Die Ausprägung von IL-1β, IL15 und IL-10 war in Abwesenheit des AHR vergleichbar zu Wildtyp-Zellen. Die Menge an mRNA von TNF-α und GM-CSF war in AHR-defizienten epidermalen Zellen um mehr als die Hälfte reduziert. Bei GM-CSF war dieser Unterschied signifikant.

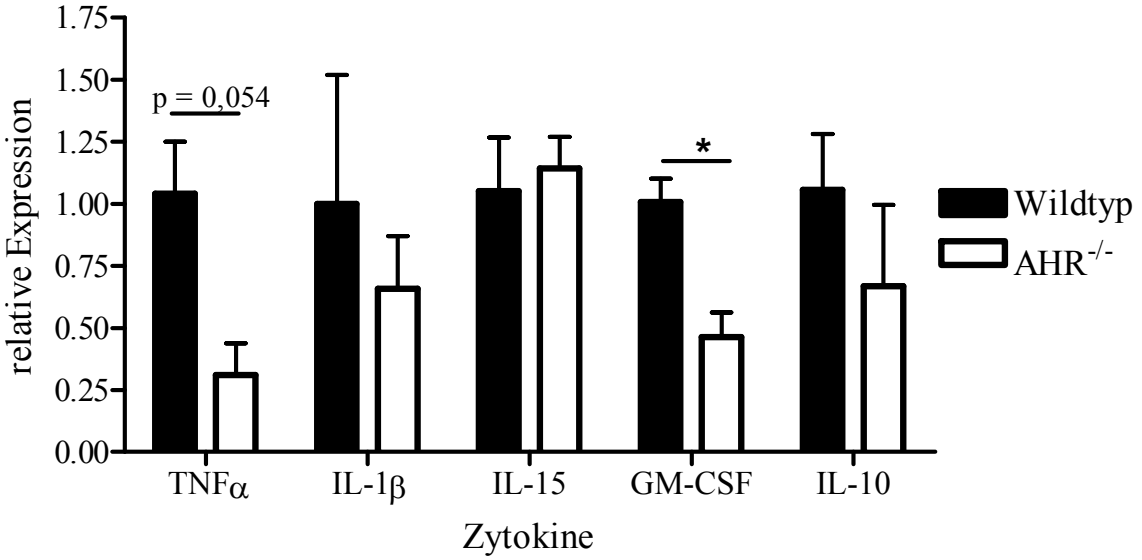

Abb. 33: TNFα und GM-CSF werden von AHR$^{-/-}$ Keratinozyten schwächer exprimiert.

Epidermale Zellen wurden aus der Haut von Wildtyp und AHR-defizienten Mäusen isoliert und die relative Expression der angegebenen Zytokine mittels semi-quantitativer Echt-Zeit-PCR oder konventioneller PCR analysiert, wobei die Expression in Wildtyp-Zellen auf 1 gesetzt wurde. (n = 3 Mäuse)

6.2 Die Sekretion von GM-CSF hat Einfluss auf die umgebenden LZ

GM-CSF wird von Keratinozyten in der Haut sezerniert und ist notwendig für das Überleben der LZ, aber auch für die Expression von CD80 (Ozawa et al., 1996). Da beobachtet wurde, dass epidermale Zellen aus AHR-defizienten Mäusen weniger GM-CSF exprimieren (Abb. 33), und auch auf LZ eine signifikant schwächere CD80 Expression festgestellt wurde (Abb. 27), wurde die GM-CSF-Produktion auch auf Protein-Ebene untersucht. Hierfür wurde der Kultur-überstand von epidermalen Zellen aus Wildtyp- bzw. AHR-defizienten Mäusen mit einem ELISA getestet.

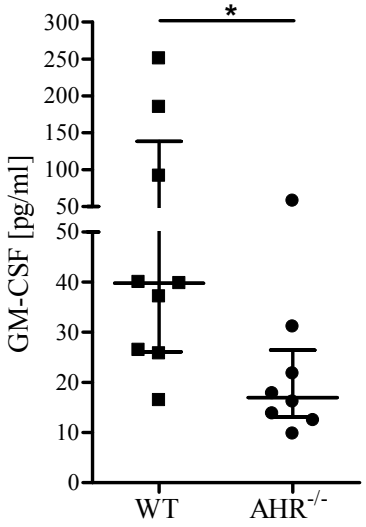

Abb. 34: Epidermale Zellen aus AHR-defizienten Mäusen sezernieren weniger GM-CSF.

Epidermale Zellen wurden isoliert und in einer Zelldichte von 10^6/ml und well in 12-well Platten kultiviert. Der Kulturüberstand wurde nach zwei Tagen abgenommen und ein GM-CSF ELISA nach Herstellerangaben mit 50 µl unverdünntem Überstand durchgeführt. Jeder Punkt entspricht der Zellpräparation einer Maus.

Es zeigte sich, dass die epidermalen Zellen ohne AHR signifikant weniger GM-CSF sezernieren als die Zellen aus den Wildtyp-Mäusen. Dabei war die interindividuelle Schwankung zwischen den Zellpräparationen der einzelnen Mäuse in den Wildtyp-Zellen recht groß.

GM-CSF wird durch IFN-γ negativ reguliert (Ozawa et al., 1996). Da in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass unter anderem $CD4^+$ T-Zellen aus AHR-defizienten Mäuse mehr IFN-γ sezernieren (Negishi et al., 2005), wurde untersucht, ob auch Keratinozyten aus AHR-defizienten Mäusen mehr IFN-γ produzieren. Hierfür wurden 10^6 epidermale Zellen/ml für 4 bis 48 Stunden kultiviert. Um eine IFN-γ-Sekretion zu induzieren, wurden die Zellen mit PMA (150 ng/ml)/Ionomycin (1,5 µg/ml) für 4 Stunden, LPS (100 ng/ml für 22 Stunden) und Concanavalin A (3 µg/ml für 48 Stunden) stimuliert. Unter den getesteten Bedingungen konnte keine Sekretion von IFN-γ festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Weder die Stimulation mit Concanavalin A noch mit PMA/Ionomycin oder LPS führte zu einer nachweisbaren Sekretion von IFN-γ durch epidermale Zellen. Als Positivkontrolle wurden 10^6 Milzzellen/ml ausgesät, die nach Stimulation mit Concanavalin A große Mengen an IFN-γ sezernierten (1,4 ng/ml). Sowohl LPS als auch PMA/Ionomycin induzierten keine INF-γ Sekretion von Milzzellen (Daten nicht gezeigt).

Sollte die verminderte Sekretion von GM-CSF der Grund dafür sein, dass die LZ aus AHR-defizienten Mäusen kleiner und weniger granulär sind und weniger CD80 exprimieren, müsste dieser Befund durch die Zugabe von GM-CSF zur Kultur epidermaler Zellen aufgehoben werden. Um dies zu prüfen, wurden epidermale Zellen aus AHR-defizienten Mäusen mit 10 ng/ml GM-CSF kultiviert, und nach 48 Stunden auf Größe, Granularität und CD80 Expression durchflusszytometrisch überprüft.

Die Expression von CD80 konnte durch Zugabe von GM-CSF zur Kultur AHR-defizienter Zellen signifikant gesteigert werden. Dabei wurde sogar eine höhere Expression als bei den Wildtyp-Zellen erreicht. Wildtyp-Zellen produzieren im Mittel 40 pg/ml (siehe Abb. 34). Da etwa 25 Mal mehr GM-CSF eingesetzt wurde, als von den Zellen normalerweise produziert wird, könnte der Effekt dadurch begründet werden. Sowohl Größe als auch Granularität waren durch die Zugabe von GM-CSF nicht beeinflusst. Diese Parameter waren nach wie vor signifikant unterschiedlich zwischen den Zelltypen mit und ohne AHR.

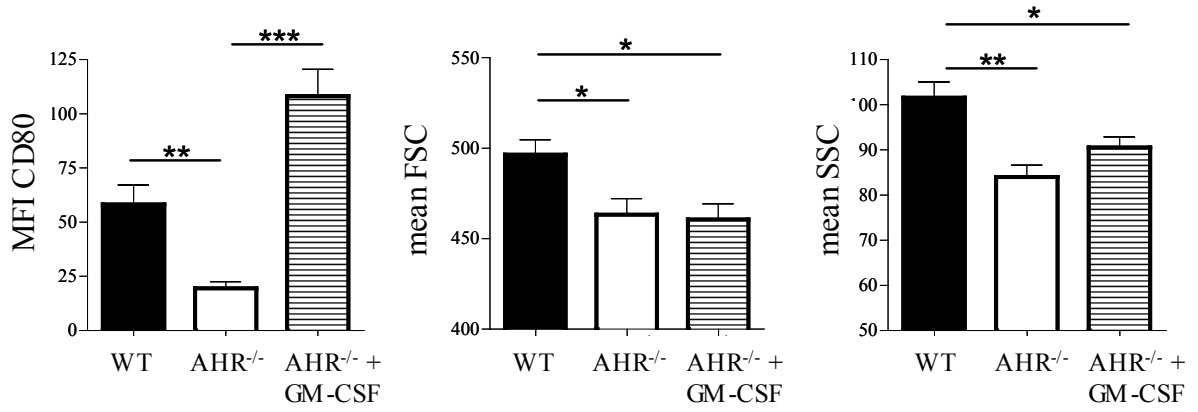

Abb. 35: GM-CSF reguliert die CD80 Expression, hat aber keinen Einfluss auf Größe und Granularität. Epidermale Zellen wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml ausgesät und mit 10 ng/ml GM-CSF kultiviert. 48 Stunden später wurden die Zellen geerntet und lebende $MHCII^+$ Zellen im FACS analysiert (n = 6).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Aktivierung des AHR durch TCDD und vor allem das Fehlen des AHR starke Veränderungen in LZ hervorruft. Diese lassen sich teilweise durch eine extrinsische Regulation über die veränderte Sekretion von Zytokinen durch Keratinozyten erklären, wie hier für GM-CSF gezeigt wurde.

IV. Diskussion

Die Haut kommt täglich in Kontakt mit einer Vielzahl an Fremdstoffen. Dazu gehören auch niedermolekulare Chemikalien, die als potentielle AHR-Liganden gelten, wie beispielsweise Eugenol und Isoeugenol (Kalmes et al., 2006), welche unter anderem in Parfum Verwendung finden. Indirekt gehört auch die UVB-Strahlung dazu, durch die in der Haut der AHR-Ligand 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ) durch Dimerisierung der Aminosäure Tryptophan gebildet werden kann (Fritsche et al., 2007). Wie die Haut diese täglichen Einflüsse verarbeitet, ist weitgehend ungeklärt. Der AHR ist ein biologischer Sensor, der chemische Signale der Umwelt empfängt und in das Zellinnere vermittelt. Als Transkriptionsfaktor überträgt er die Informationen auf die DNA und reguliert die Transkription bestimmter Gene. Zu den am besten untersuchten Zielgenen des AHR gehören in erster Linie Fremdstoff-metabolisierende Enzyme, die den AHR-aktivierenden Liganden abbauen (Carlson et al., 2002; Vrzal et al., 2004; Tijet et al., 2006).
Die niedermolekularen Substanzen, welche an den AHR binden, werden auf Grund ihrer chemischen Struktur normalerweise nicht von T-Zellen erkannt. Wenn an sich harmlose Fremdstoffe allerdings durch den Prozess der Metabolisierung in ein reaktives Molekül umgesetzt werden, können sie an Proteine kovalent binden und als Hapten von T- oder B-Zellen erkannt werden. Durch eine Reihe von Mechanismen stellt das Immunsystem sicher, dass körpereigene Strukturen und nicht-pathogene Antigene nicht erkannt werden, bzw. keine Immunantwort induzieren (Toleranz) (Kisielow et al., 1988; Arnold et al., 1993). Die Haptenisierung von Proteinen kann zur Durchbrechung der Toleranz, und damit zu T-Zell-abhängigen Allergien führen (Riemann et al., 2003). Es ist anzunehmen, dass auch in der Haut Toleranzmechanismen wirken, um Immunantworten gegen nicht pathogene, harmlose Substanzen zu verhindern. Dies könnte Mechanismen zur Vermeidung des Risikos der Haptenisierung von Proteinen durch niedermolekulare Chemikalien einschließen. Wie diese Mechanismen aussehen, und wie sie reguliert werden, ist allerdings unklar. Anderson *et al*. konnten zeigen, dass die Metabolisierung von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen zu reaktiven Metaboliten notwendig ist, um eine Kontakthypersensibilisierung auszulösen. So löste der AHR-Ligand 7,12-Dimethylbenzanthrazen nur eine Reaktion in Mäusen aus, die über einen funktionellen AHR verfügten (Anderson et al., 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wie der AHR in der Haut aktiviert wird, und welche Funktionen er im Immunsystem der Haut einnimmt. Dafür wurden zwei

experimentelle Ansätze verfolgt. Zum einen wurde der AHR durch Injektionen mit TCDD in der Haut aktiviert, und Veränderungen in LZ und Keratinozyten dokumentiert. Ziel war ein Erkenntnisgewinn darüber, ob der AHR die Haut vor adversen Effekten von Fremdstoffen durch deren Abbau schützt, oder ob der AHR zur Generierung proteinreaktiver Substanzen und damit zur Auslösung von Allergien beitragen würde. Zum anderen wurden epidermale Zellen aus AHR-defizienten Mäusen untersucht, um physiologische Funktionen des AHR zu ermitteln.

1. Besitzen LZ immunregulatorische Eigenschaften zur Vermeidung unerwünschter Immunreaktionen gegen niedermolekulare Substanzen?

Um das Potential des AHR in der Haut zu untersuchen, musste zunächst geklärt werden, ob LZ den AHR ausprägen. Für Keratinozyten wurde bereits vor längerem gezeigt, dass sie einen funktionalen AHR enthalten (Swanson, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des AHR zum ersten Mal in primären LZ dokumentiert. Das Expressionsniveau des AHR der epidermalen Zellpopulationen entsprach mindestens dem der Leber und lag über dem des Thymus (Abb. 10). Bei Leber und Thymus handelt es sich um Organe, welche sehr empfindlich auf die Aktivierung des AHR reagieren (Lucier et al., 1973; Clark et al., 1981). Es war deswegen zu vermuten, dass die Aktivierung des AHR auch in der Haut starke Auswirkungen auf die Zellen hat. Überraschenderweise führte die Aktivierung des AHR mit TCDD in LZ im Gegensatz zu Keratinozyten nicht zur Induktion von CYP1A1 und CYP1B1, Markergenen der sogenannten „AHR-Batterie“ (Tijet et al., 2006). Die „AHR-Batterie“ umfasst Gene, die über den AHR-Signalweg reguliert werden und vor allem zur Gruppe der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme gehören. CYP1A1 ist zwar in sehr vielen Zellarten durch TCDD induzierbar, aber nicht in allen. Bisher wurde keine einzelnes Gen gefunden, welches unter allen experimentellen Umständen durch TCDD oder den AHR induziert wird (Frericks et al., 2006), weshalb ein globales Expressionsprofil von LZ für 22.500 Gene nach 24-stündiger Belastung mit TCDD erstellt wurde. TCDD wurde als hochaffiner und bekannt wirksamer Ligand des AHR gewählt, der Zeitpunkt von 24 Stunden hatte in Vorexperimenten eine gute Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 in Keratinozyten gezeigt (Abb. 11). Die Genexpressionsprofile der LZ zeigten, dass das Transkriptom inert gegenüber der TCDD-Belastung war (Abb. 15). Insbesondere waren die Gene der „AHR-Batterie“ nicht induzierbar und waren dementsprechend auf den Chips nicht zu detektieren. Dies führte zu der Annahme, dass primäre LZ nicht in der Lage sind, am AHR-induzierten Fremdstoffmetabolismus teilzunehmen. Über die Fremdstoff-metabolisierende Aktivität primärer LZ gibt es bisher

keine Studien. Anderson *et al.* zeigten nur, dass die murine LZ-ähnliche Zelllinie XS52 in der Lage ist, AHR-Liganden wie 7,12-Dimethylbenzanthrazen und Benz[a]pyren zu metabolisieren (Anderson et al., 1995). LZ-ähnliche Zellen, die aus humanen $CD34^+$ Stammzellen generiert wurden, zeigten eine konstitutive Expression verschiedener Fremdstoff-metabolisierender Gene der CYP450 Familie, darunter auch CYP1A1 und CYP1B1 (Saeki et al., 2002). Die Ergebnisse an primären Zellen, die unmittelbar aus der Haut isoliert wurden zeigen, dass sich Zelllinien sowie *in vitro* generierte und differenzierte Zellen in wesentlichen Eigenschaften von primären Zellen unterscheiden können.

LZ wurden früher als repräsentative Vertreter unreifer DZ betrachtet. Viele Erkenntnisse zur Biologie der DZ entstanden aus Arbeiten mit LZ, welche als unreife Zellen isoliert wurden und so die Untersuchung von Reifungsprozessen der DZ *in vitro* erlaubten (Schuler et al., 1985a; Schuler et al., 1985b; Inaba et al., 1986; Romani et al., 2003). In den letzten Jahren ermöglichten neue Forschungsansätze mit LZ-defizienten Mäusen eine andere Sichtweise auf die Funktion der LZ. Es wurden Mäuse generiert, die den Diphterietoxin-Rezeptor unter der Kontrolle des CD207-Promotors ausprägen. Die Depletion von LZ konnte durch die Gabe von Diphterietoxin bei diesen „knock-in“ Mäusen erzielt werden. (Bennett et al., 2005; Kaplan et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005). Kaplan *et al.* zeigten dabei eine verstärkte Kontakthypersensibilisierungsreaktion gegen DNFB in Abwesenheit von LZ. Dies führte zu der Hypothese, dass LZ regulatorische und tolerogene Funktionen in der Haut haben.
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese neuen Erkenntnisse zur immunregulatorischen Funktion der LZ. In den LZ kam es nach Aktivierung des AHR nicht zur Induktion Fremdstoff-metabolisierender Enzyme. Dies deutet auf eine immunsuppressive Strategie der LZ gegen harmlose niedermolekulare Substanzen hin. Wenn an sich harmlose Fremdstoffe nicht in reaktive Moleküle umgesetzt werden können, stellt dies eine Möglichkeit dar, unerwünschte Immunreaktionen gegen niedermolekulare Chemikalien zu vermeiden.
Offen bleibt, ob metabolisch aktive Keratinozyten reaktive Metabolite generieren und eventuell bereits an Proteine gebunden sezernieren, welche dann von LZ aufgenommen und in Form von Neoantigenen an T-Zellen präsentiert werden könnten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LZ nach TCDD-Exposition eine signifikant geringere Phagozytosekapazität aufwiesen. Als Konsequenz könnte dies die Gefahr verringern, dass proteinreaktive niedermolekulare Chemikalien von LZ aufgenommen werden und über diesen Weg eine unerwünschte Immunreaktion induziert wird. Mit anderen Worten, LZ besäßen Mechanismen, um nicht nur das allergene Risiko durch niedermolekulare Chemikalien für

sich selbst zu minimieren, sondern auch das Risiko der Aufnahme von Allergenen aus den umgebenden Keratinozyten.
Ein weiterer Punkt der in diesem Zusammenhang betrachtet werden sollte, ist die Untersuchung der metabolischen Aktivität der zweiten DZ-Population der Haut, der dermalen DZ (dDZ). Ob dDZ den AHR exprimieren und dieser aktivierbar ist, ist bisher nicht bekannt. dDZ haben immunologisch andere Eigenschaften als LZ (Valladeau et al., 2005). So migrieren sie als erste, etwa 24 Stunden nach Antigenaufnahme zum Haut-drainierenden Lymphknoten, wobei LZ diesen erst nach drei bis vier Tagen erreichen (Kissenpfennig et al., 2005). Zur Klärung, der Frage, ob dDZ eine ähnliche immunsuppressive Strategie zur Vermeidung von Immunreaktionen gegen harmlose niedermolekulare Chemikalien haben wie LZ bedarf es weiterer Experimente.

Es war unerwartet, dass neben den Genen der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme auch kein anderes der 22.500 getesteten Gene auf dem Microarray durch Aktivierung des AHR mit TCDD reguliert wurde (zumindest nicht innerhalb des gewählten Schwellenwertes). Verschiedene Studien belegen starke Effekte von TCDD auf DZ der Milz (Vorderstrasse et al., 2001; Vorderstrasse et al., 2003). So wurden unter anderem 24 Stunden nach i.p. Injektion von 10 µg/kg TCDD, also denselben Bedingungen, die zur Untersuchung der LZ verwendet wurden, fast 200 Gene in den Milz-DZ identifiziert, die mindestens zweifach reguliert waren. Darunter waren auch CYP1A1 und CYP1B1 (Frericks et al., 2006).
Weiterhin sind mehr als 3000 Gene bekannt, die ein XRE in ihrer Promotorregion enthalten (Sun et al., 2004). Darunter befinden sich auch viele Gene von immunologischer Bedeutung wie die Interleukine IL-1β, IL-6 und IL-10 oder die Oberflächenproteine CD24a und CD86, welche zur Ko-Stimulation von T-Zellen dienen. Weiterhin enthalten einige Transkriptionsfaktoren wie c-fos und c-jun XRE, deren Expression sekundäre Antworten des AHR vermitteln kann (Sun et al., 2004). Die tatsächliche Funktionalität der per Computer identifizierten XRE ist allerdings nur für wenige Fälle experimentell nachgewiesen. Es gilt auch zu berücksichtigen, dass XRE zell-spezifisch genutzt werden, da die Transkription von Genen sehr komplex gesteuert wird. Dazu gehört z.B. die Organisation der Chromatin-Struktur, welche die Zugänglichkeit von Genen beeinflusst, sogenannte „Enhancer“, die als Verstärker der Gen-Expression wirken oder weitere in der Zelle vorhandene regulatorische Moleküle, die an der Transkription beteiligt sind. (Knippers, 1997).
Die Existenz eines Moleküls, welches als „Silencer“ die Genexpression durch den AHR negativ beeinflusst, wurde zum ersten Mal in normalen humanen Fibroblasten beschrieben,

bei denen, ebenso wie bei LZ, durch TCDD weder eine CYP1A1- noch eine CYP1B1-Expression induziert werden konnte (Gradin et al., 1999). In der Arbeit von Gradin *et al.* wurde ein ARNT-interagierender Faktor beschrieben, der mit dem inerten Phänotyp der Zellen zusammenhängt und dessen Wirkung durch Zugabe des Histon-Deacetylaseinhibitors Natriumbutyrat, umgangen werden konnte. Ungefähr zur selben Zeit wurde der AHR Repressor (AHRR) zum ersten Mal von Mimura *et al.* beschrieben (Mimura et al., 1999). Der AHRR gehört zur PAS-bHLH Familie und dimerisiert mit ARNT. Dieses Heterodimer kann an XRE binden, jedoch erfolgt aufgrund des Fehlens einer transaktivierenden Domäne im AHRR keine Transkription. Dabei ist der AHRR selbst Zielgen des AHR und damit Bestandteil eines negativen „feedback-loop"- Mechanismus zur Regulation des AHR-Signalwegs (Baba et al., 2001).

Der AHRR ist in LZ sehr stark ausgeprägt. Bernshausen *et al.* zeigten in einem Vergleich der konstitutiven AHRR-Expression in acht verschiedenen Geweben, dass Hirn und Herz die höchste Zahl an AHRR-Transkripten ausprägten (Bernshausen et al., 2006). Im Vergleich zu diesen Organen war die konstitutive Expression in LZ noch wesentlich höher (Abb. 19).

Durch Aktivierung des AHR wurde keine weitere Aufregulation des AHRR in LZ erreicht. Eine Abhängigkeit der AHRR-Transkription von der Präsenz des AHR in der Zelle konnte dennoch gezeigt werden, da LZ aus AHR-defizienten Mäusen deutlich weniger AHRR ausprägten, als LZ aus Wildtyp-Mäusen. Trotz des Fehlens des AHR war der AHRR noch – wenn auch in geringerer Menge - nachweisbar, was darauf hindeutet, dass seine Transkription nicht ausschließlich vom AHR abhängt, bzw. dass neben der induzierbaren auch eine konstitutive Expression vorliegt. Diese könnte durch die bekannten GC-Boxen und eine NF-κB Bindestelle im AHRR-Promoter gesteuert werden (Baba et al., 2001). Da die konstitutive Expression des AHRR in Wildtyp-Zellen jedoch überraschend hoch war – auch in Abwesenheit eines exogen applizierten AHR-Liganden – ist zu vermuten, dass entweder die nicht-AHR-abhängige Regulation des AHRR-Gens wichtiger ist als bisher angenommen, oder dass ein unbekannter endogener Ligand des AHR vorhanden ist, so dass das AHRR-Gen über den AHR als Transkriptionsfaktor reguliert wird (siehe unten). Die erste Möglichkeit führt direkt zu weiteren Fragen bezüglich der physiologischen Rolle des AHRR, außerhalb des gefundenen dramatischen „shut-down" des AHR Signalweges, die jedoch nicht mehr Gegenstand dieser Dissertation sein konnten.

Zurzeit wird am „Institut für umweltmedizinische Forschung" eine Maus mit einem konditionalem AHRR-„knock-out" generiert, in welcher der AHRR zellspezifisch ausgeschaltet werden kann. Durch die Verwendung dieser Maus kann die Bedeutung der

hohen AHRR-Expression in LZ genauer untersucht werden. So ist es denkbar, dass LZ ohne AHRR in der Lage sind, Fremdstoffe zu proteinreaktiven Stoffen zu metabolisieren, und sich in den Tiere leichter eine allergische Reaktion induzieren lässt.
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ursache für die fehlende Regulation von Genen in LZ nach AHR-Aktivierung durch die hohe konstitutive Ausprägung des AHRR erklärbar ist.

Obwohl das Transkriptom durch Aktivierung des AHR im Wesentlichen unverändert blieb, wurde durch TCDD-Belastung eine veränderte Protein-Expression von CD86 auf der Zelloberfläche der LZ, sowie eine verminderte Phagozytose induziert. Diese Beobachtungen waren abhängig vom AHR, da TCDD-behandelte AHR-defiziente Mäuse diesbezüglich keine Unterschiede aufwiesen. Eine erhöhte Ausprägung von CD86 konnte auch bei Milz-DZ nach *in vivo*-Behandlung mit TCDD gezeigt werden. In diesen Zellen war *in vivo* allerdings keine verminderte Phagozytosekapazität zu beobachten (Vorderstrasse et al., 2003), was vermutlich darauf beruht, dass die hier geschilderten Ergebnisse mit einem anderen experimentellen Aufbau, *in vitro,* erzielt wurden.
Die Befunde eröffnen die Frage, ob der AHR Veränderungen in der Zelle hervorruft, die nicht direkt auf seiner Wirkung als Transkriptionsfaktor beruhen.
Der AHR liegt im Zytoplasma als Multiproteinkomplex vor. Es ist daher möglich, dass die Chaperone, die mit dem AHR assoziiert sind, nach der Bindung eines Liganden freigesetzt werden, und andere Signalwege durch Stabilisierung oder Degradation von Proteinen beeinflussen. Ein Beispiel ist die Wirkung von c-src, welches nach Bindung eines Liganden vom AHR dissoziiert und an der Zellmembran den „Epidermal Growth Factor"-Rezeptor aktiviert (Fritsche et al., 2007). Weiterhin ist beschrieben, dass der AHR direkt an NF-κB (an die Untereinheit Rel A) binden kann (Tian et al., 1999). Gezeigt ist auch eine direkte Interaktion zwischen dem AHR und dem Retinoblastomaprotein (Tumorsuppressor), die den Zellzyklus beeinflusst (Puga et al., 2002).
Eine weiterer Mechanismus über den TCDD eine Veränderung der Expression von CD86 sowie eine verminderte Phagozytose in LZ induzieren kann, ohne dass eine Veränderung im Genexpressionsprofil in LZ evident ist besteht darin, dass LZ in der Epidermis von Keratinozyten umgeben sind, welche durch die *in vivo*-Injektion von TCDD ebenfalls Veränderungen erfahren.
In der Haut gibt es ein sogenanntes Zytokinnetzwerk. Verschiedene Zellen produzieren Zytokine, die wiederum auf benachbarte Zellen wirken können. Zytokine sind

niedermolekulare Glycoproteine, die transient produziert werden, und ihre biologische Aktivität im pikomolaren Bereich durch Bindung an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche ausüben. Zytokine können sich gegenseitig beeinflussen, indem sie sich gegenseitig induzieren, oder die Zellfunktion in einer synergistischen oder antagonistischen Weise lenken (Kirchner et al., 1994). Keratinozyten sind in der Lage je nach Stimulus eine Vielzahl von Zytokinen auszuschütten und sind dadurch ein wesentlicher Bestandteil des Hautimmunsystems (Luger et al., 1990; McKenzie et al., 1990; Kondo, 1999). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-15, GM-CSF und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in epidermalen Zellen untersucht, da diese die Funktion und das Überleben der LZ in der Epidermis regulieren (Heufler et al., 1988; Belsito et al., 1989; Koch et al., 1990; Enk et al., 1993b; Loser et al., 2004). Die mRNA von TNF-α, IL-6, GM-CSF und IL-10 wurden durch Aktivierung des AHR mit TCDD induziert (Abb. 32).
Zur Regulation von IL-10 in Keratinozyten durch den AHR existiert bislang keine Studie. IL-10 wird von aktivierten Keratinozyten ausgeschüttet (Enk et al., 1992) was bewirkt, dass aus LZ, die potentielle Stimulatoren einer Immunantwort sind tolerogene Zellen werden, was in der Folge eine Hapten-spezifische Toleranz *in vivo* induzieren kann (Enk et al., 1994b). Die erhöhte Ausprägung von IL-10-mRNA nach Aktivierung des AHR könnte somit einen weiteren unterstützenden Mechanismus darstellen, unerwünschte Immunreaktionen gegen niedermolekulare Chemikalien zu vermeiden. Ob IL-10 die Phagozytosekapazität von LZ reguliert, oder einen Einfluss auf die Ausprägung von CD86 hat, ist nicht klar. Sinnvoll wären weiterführende Experimente unter Verwendung spezifischer IL-10-Antikörper *in vivo* oder in der Zellkultur epidermaler Zellen zur genaueren Analyse.

Eine Induktion von IL-6 durch TCDD in Keratinozyten wurde bisher nicht gezeigt. Grundsätzlich ist IL-6 ein Zielgen des AHR, da in fötalen Thymusorgankulturen eine erhöhte Expression nach TCDD-Behandlung gemessen wurde (Lai et al., 1997). IL-6 spielt eine Rolle in der lokalen Kontrolle der LZ-Dichte (Belsito et al., 1989), die durch Gabe von IL-6 gesteigert werden kann. In der einzigen bisher veröffentlichten Studie zur Wirkung von TCDD auf LZ wurden die Effekte in C57BL/6 Mäusen und hairless-Mäusen (HRS/J) verglichen. (Puhvel et al., 1989). Während nach topischer Behandlung mit TCDD kein Unterschied in der LZ-Dichte der Epidermis von C57BL/6 Mäusen zu erkennen war, führte TCDD in den hairless-Mäusen (HRS/J) zu verschiedenen Veränderungen. Die LZ waren kleiner und bildeten weniger Dendriten aus, die Zahl der LZ/mm² Epidermis nahm zu. In

wieweit diese Befunde durch Aktivierung des AHR zu erklären sind, wurde nicht untersucht, lassen sich aber möglicherweise auf die erhöhte Sekretion von IL-6 zurückführen. Aus bisher unbekannten Gründen reagieren hairless-Mäuse sensibler auf die Aktivierung des AHR mit TCDD, weshalb verschiedene Hautreaktionen bei diesem Mausstamm im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen beobachtet werden konnten (Knutson et al., 1982; Connor et al., 1994b). Für einen weiteren Erkenntnisgewinn zur Rolle des AHR in der Haut, könnten die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Experimente in hairless-Mäusen wiederholt werden. Die Generierung einer hairless-Maus ohne AHR könnte diesbezüglich weitere Aufklärung liefern.

Eine Induktion von TNF-α in der Haut und GM-CSF im Serum durch TCDD konnte in anderen Studien *in vivo* beschrieben werden, wobei die Quelle dieser Zytokine ungeklärt blieb (Connor et al., 1994a; Prell et al., 1995). TNF-α ist, ebenso wie GM-CSF notwendig zur Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit von LZ in Kultur (Koch et al., 1990). In einer Studie von Simon *et al.* konnte gezeigt werden, dass TNF-α einen negativen Einfluss auf die Morphologie von LZ hat und so deren Fähigkeit zur Induktion einer Kontakthypersensibilisierung hemmt (Simon et al., 1991). Ebenso wie bei IL-10 könnte die vermehrte Produktion von TNF-α einen unterstützenden Mechanismus darstellen, unerwünschte Immunreaktionen gegen niedermolekulare Chemikalien zu vermeiden.

Die Transkription von IL-1β kann durch den AHR reguliert werden (Lai et al., 1997), ebenso wie die posttranskriptionale Modifizierung (Henley et al., 2004). IL-1β wird konstitutiv exprimiert, und in Keratinozyten und LZ als inaktives Peptid gelagert, um bei Bedarf innerhalb von Minuten ausgeschüttet werden zu können (Enk et al., 1993a). Es konnte in den durchgeführten Experimenten keine erhöhte mRNA-Expression festgestellt werden, was die Erkenntnisse von Henley *et al.* dahingehend unterstützt, dass IL-1β in Keratinozyten durch Aktivierung des AHR posttranskriptional modifiziert wird.

Sowohl IL-1β als auch TNF-α supprimieren die Expression von CYP1A1 (Vrzal et al., 2004). Beide Zytokine können im Falle einer Immunreaktion sehr schnell von Keratinozyten und LZ ausgeschüttet werden (Enk et al., 1993a). Es ist denkbar, dass diese Zytokine zur Suppression von CYP1A1 beitragen, weshalb dieses Gen in LZ durch Aktivierung des AHR mit TCDD nicht induziert werden konnte (Abb. 12).

2. Besitzt der AHR eine physiologische Funktion in LZ?

Die bisher gezeigten Ergebnisse unterstreichen eine physiologische Funktion des AHR neben der Regulation des Fremdstoffmetabolismus (Marlowe et al., 2005; Puga et al., 2005). Interessanterweise ist das Immunsystem besonders empfindlich für AHR-vermittelte Veränderungen nach Exposition und Bindung hochaffiner AHR-Liganden wie TCDD. Systemisch ist der Effekt eine generelle Immunsuppression (Urso et al., 1980; Ward et al., 1984; Frank et al., 1988), einer der empfindlichsten Symptome betrifft Differenzierungsvorgänge im Thymus, was in kurzer Zeit zu starker Thymusatrophie führt. (Dencker et al., 1985). Thymozyten sind in ihrer Proliferation inhibiert, sie zeigen Veränderungen in ihrer Differenzierung und gehen nach AHR-Aktivierung vermehrt in Apoptose. Effekte auf B-Zellen umfassen die AHR-vermittelte Inhibition der IgM-Produktion und eine negative Beeinflussung der B-Zell-Proliferation. Generell lässt sich sagen, dass jeder Arm des Immunsystems durch TCDD-Belastung beeinträchtigt ist, sowohl Zellen und Moleküle des adaptiven als auch des nicht-adaptiven Immunsystems sind betroffen (Esser, 2002). Für die vorliegende Arbeit ist relevant, dass die Arbeiten aus der Gruppe um Kerkvliet zeigen, dass TCDD als Aktivierungsstimulus für Milz-DZ wirkt (Vorderstrasse et al., 2001) woran sich zeigt, wie unterschiedlich selbst „nah verwandte“ Zelltypen auf AHR-Aktivierung reagieren.

Um zu verstehen, warum der AHR in LZ einerseits so stark exprimiert wird, während andererseits seine Funktion als Transkriptionsfaktor durch den AHRR blockiert wird, und um eine mögliche physiologische Funktion des AHR in LZ zu untersuchen, wurden die immunologischen Eigenschaften bezüglich des Phänotyps und der Funktion von LZ aus Wildtyp-Mäusen mit LZ aus AHR-defizienten Mäusen verglichen. Die Zellen wurden hierfür in verschiedenen Reifestadien untersucht, da sich die immunologischen Fähigkeiten der Zellen mit ihrem Differenzierungsstatus verändern. Aus kleinen, wenig granulären Zellen, die eine hohe Phagozytosekapazität besitzen, aber nur schwache T-Zell-Stimulatoren sind, werden im Laufe der Reifung große, granuläre Zellen, die nicht mehr phagozytieren, aber effektive Stimulatoren der T-Zell-Proliferation sind. Die Reifung der LZ wurde in den Experimenten *in vitro* induziert (Schuler et al., 1985b).

Bei der durchflusszytometrischen Analyse unreifer und reifer LZ zeigte sich, dass Zellen, die den AHR nicht ausprägen, kleiner und weniger granulär waren. Da, wie oben erwähnt eine enge Korrelation zwischen Reifung und morphologischen Veränderungen besteht, was bei den Wildtyp-LZ auch bestätigt werde konnte, deutet dieses Ergebnis an, dass der AHR in die

Reifung von LZ involviert ist. Zur Untermauerung dieser Vermutung wurden weitere Reifungsparameter untersucht.

Die ko-stimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 werden in unreifen LZ nur schwach bis gar nicht ausgeprägt, werden aber durch Reifung der Zellen aufreguliert, und geben T-Zellen notwendige Aktivierungssignale. LZ ohne funktionellen AHR prägten weniger CD40 und CD80 auf ihrer Oberfläche aus. Genau wie die „unreife“ Morphologie, deutet auch dieser Befund auf eine verminderte Reifung der AHR-defizienten LZ hin.

Zur weiteren Analyse des Reifestatus der LZ wurde die Phagozytosekapazität der Zellen untersucht. Es wurde gezeigt, dass mehr LZ aus AHR-defizienten Mäusen Partikel aufnahmen, als Zellen der Wildtyp-Mäuse. Damit schienen LZ, die keinen AHR ausprägen auch aufgrund dieses funktionellen Parameters unreif zu sein.

CD24a wurde von Enk *et al.* als ko-stimulatorisches Molekül auf LZ beschrieben (Enk et al., 1994a), aber im Gegensatz zu CD40, CD80 und CD86 exprimieren auch unreife LZ hohe Mengen an CD24a. AHR-defiziente LZ zeigten eine signifikant niedrigere CD24a Expression, diese war sowohl auf unreifen als auch auf reifen Zellen nachweisbar. Kerkvliet *et al*. zeigten in ihren Arbeiten eine direkte AHR-abhängige Aufregulation von CD24a auf Milz-DZ durch TCDD (Vorderstrasse et al., 2001). Die Expression konnte auf LZ durch Aktivierung des AHR mit TCDD nicht gesteigert werden, dennoch sprechen beide Ergebnisse dafür, dass CD24a über den AHR reguliert wird. Dieses Expressionsmuster ist mit dem des AHRR vergleichbar. Auch der AHRR ließ sich durch TCDD nicht weiter induzieren und war in AHR-defizienten Zellen wesentlich schwächer ausgeprägt. Diese Befunde deuten darauf hin, dass der AHR in den LZ durchaus über einen Liganden aktivierbar ist oder zu einem Zeitpunkt während der Entwicklung der LZ aktiviert wurde.

Seit langem wird angenommen, dass ein oder mehrere endogene Liganden des AHR existieren. Es wird für unwahrscheinlich gehalten, dass polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wie TCDD – obwohl in der Natur vorkommend – physiologisch sind (Denison et al., 2003). Liganden könnten durch die Nahrung aufgenommen werden, oder vom Körper selbst synthetisiert werden. Mögliche endogene Liganden, d.h. AHR-bindende Moleküle, wurden aus der Lunge und dem Urin isoliert (Adachi et al., 2001; Song et al., 2002). Sehr interessant sind jüngste Ergebnisse zu dem UVB-Photoprodukt FICZ, das in Hautzellen durch UV-Licht aus Tryptophan entsteht und den AHR zumindest in Keratinozyten aktiviert (Wei et al., 1998; Fritsche et al., 2007). Ob, wann und durch welchen endogenen Liganden der AHR in LZ aktiviert wird, kann nur spekuliert werden. Auch LZ

sind UV-Strahlung ausgesetzt, und es stellt sich die Frage, ob FICZ auch in LZ entsteht, oder ob die Expression der Indolamin-pyrrol 2,3, Dioxygenase in LZ (einem Enzym, das Tryptophan abbaut) verhindert, dass FICZ gebildet wird (siehe unten). Die Ergebnisse zeigen, dass in LZ die Exposition mit dem hochaffinen und kaum abbaubaren Ligand TCDD nicht zur Transkription von Genen Fremdstoff-metabolisierender Enzyme führt. FICZ hat eine wesentlich schnellere „Turnover-Rate" und könnte daher anders wirken als TCDD. Möglicherweise wird der AHR auch in den Vorläuferzellen der LZ über einen endogenen Liganden aktiviert, bevor sie die Epidermis erreichen, was erklären könnte, warum frisch isolierte LZ aus AHR-defizienten Mäusen einen andere Reifungsstatus haben als Wildtyp-Zellen. Von den Vorläuferzellen der LZ prägen sowohl Knochenmarkszellen (Frericks et al., 2007) als auch Monozyten (Laupeze et al., 2002) den AHR aus.

Da die beiden ko-stimulatorischen Moleküle CD24a und CD80 auf den AHR-defizienten Zellen signifikant schwächer ausgeprägt waren, eröffnete sich die Frage, ob dies in Bezug auf die stimulatorischen Fähigkeiten gegenüber T-Zellen eine funktionelle Relevanz hat.
Das Ergebnis der allogenen T-Zell-Stimulation zeigte eine vergleichbare Stimulations-kapazität von LZ unabhängig von der Ausprägung des AHR (Abb. 31). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre, dass beide Moleküle (ebenso wie CD40) von AHR-defizienten LZ zwar schwächer ausgeprägt wurden, aber dennoch nachweisbar waren. Gleichzeitig war die Expression von CD86 vom Fehlen des AHR unbeeinflusst und so „mengenmäßig" möglicherweise noch genügend ko-stimulatorische Signale für die T-Zell-Aktivierung vorhanden. Eine weitere Begründung wäre, dass CD24a und CD80 besonders die Proliferation von T_H1-Zellen unterstützen (Enk et al., 1994a; Ozawa et al., 1996), während in dem durchgeführten Assay naive T-Zellen eingesetzt wurden. Zur Klärung, ob die verminderte Expression der beiden ko-stimulatorischen Moleküle auf AHR-defizienten LZ die Proliferation von T_H1-Zellen negativ beeinflusst, könnten *in vitro* Proliferationsassays mit einem Antigen-spezifischen T_H1-Klon durchgeführt werden (Ozawa et al., 1996).
Eine Rolle des AHR in der T_H1/T_H2 Balance wurde schon von Negishi *et al.* diskutiert (Negishi et al., 2005). In ihrer Studie konnten sie zeigen, dass in naiven AHR-defizienten T-Zellen die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöht war. Über GATA-3 wird die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H2-Zellen induziert. Dieser Befund unterstreicht die Beobachtung, dass AHR-defiziente LZ geringere Mengen der T_H1-regulierenden ko-stimulatorischen Moleküle CD24a und CD80 exprimieren.

Wie oben schon geschildert, hat die Aktivierung des AHR mit TCDD Auswirkungen auf die Expression verschiedener Zytokine, die von Keratinozyten zur Regulation von LZ ausgeschüttet werden. Eine potentielle Wechselwirkung dieser beiden Zelltypen sollte auch in Abhängigkeit des AHR bei AHR-defizienten Zellen untersucht werden (Abb. 33). Sowohl TNF-α als auch GM-CSF wurden durch Aktivierung des AHR mit TCDD stärker exprimiert und waren umgekehrt in AHR-defizienten Zellen geringer ausgeprägt. Dieses Ergebnis lässt eine Abhängigkeit der Regulation beider Zytokine vom AHR vermuten. Wie oben schon beschrieben, sind beide Zytokine notwendig für das Überleben der LZ in der Haut (Heufler et al., 1988; Koch et al., 1990). GM-CSF unterstützt zusätzlich die immunstimulatorische Kapazität der LZ, indem es die Expression von CD80 aufreguliert (Ozawa et al., 1996). Da AHR-defiziente LZ geringere Mengen an CD80 auf ihrer Oberfläche ausprägen, wurde der Befund der geringeren GM-CSF-Expression auf Proteinebene reproduziert. In einem GM-CSF-ELISA konnte bestätigt werden, dass AHR-defiziente Zellen signifikant weniger GM-CSF sezernierten (Abb. 34). Der Beweis, dass die geringere Sekretion von GM-CSF Ursache ist für die geringere Expression von CD80 auf AHR-defizienten LZ, konnte dadurch erbracht werden, dass LZ aus AHR-defizienten Mäusen, die mit GM-CSF kultiviert wurden, eine erhöhte CD80-Expression aufwiesen (Abb. 35). Der Zusatz von GM-CSF hatte keinen Einfluss auf die Größe und Granularität der LZ, was bedeutet, dass andere Faktoren, wie möglicherweise TNF-α, welches ebenfalls in geringerer Menge von AHR-defizienten Zellen exprimiert wurde, eine Rolle spielen. Möglicherweise ist hier auch ein Zusammenspiel von beiden Zytokinen wichtig. Dies könnte in einer Kultivierung von AHR-defizienten LZ mit TNF-α mit oder ohne GM-CSF ermittelt werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob auch die anderen Oberflächenproteine, die in AHR-defizienten LZ schwächer ausgeprägt waren (CD24a und CD40), von der verminderten Zytokinexpression betroffen sind.

Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass INF-γ in AHR-defizienten Mäusen stärker ausgeprägt wird, als in Wildtyp-Mäusen, sowohl auf mRNA-Ebene in naiven $CD4^+$ T-Zellen (Frericks et al., 2006), als auch auf Proteinebene in Antigen-aktivierten Milzzellen (Rodriguez-Sosa et al., 2005). IFN-γ ist ein negativer Regulator der GM-CSF-Sekretion von Keratinozyten (Ozawa et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte weder in Wildtyp- noch in AHR-defizienten Zellen der Epidermis eine IFN-γ Sekretion gemessen werden. Es ist beschrieben, dass weder Keratinozyten (McKenzie et al., 1990) noch LZ (Tada et al., 2003) IFN-γ sezernieren können, aber eine Population von γδ-T-Zellen in der Epidermis dazu in der Lage ist (Sugaya et al., 1999). Eine Gruppe aus Japan konnte $CD11b^+$ Zellen in der Haut als Quelle für IFN-γ identifizieren, um was für einen Zelltyp es sich dabei handeln könnte wurde

nicht geklärt (Yoneda et al., 2003). Welcher Mechanismus der AHR-abhängigen verminderten Sekretion von GM-CSF zugrunde liegt, muss daher weiter untersucht werden.

Die Analyse von Veränderungen im globalen Expressionsprofil eines Zelltyps, die durch experimentelle Eingriffe verursacht werden können, kann wichtige Hinweise geben. Es wurden deshalb die Genexpressionsprofile von LZ mit und ohne AHR verglichen. Von den 22.500 Genen auf dem Microarray waren 127 Gene mindestens zweifach reguliert. Davon waren 55 Gene in Wildtyp-LZ stärker exprimiert als in AHR-defizienten LZ und 72 Gene in AHR-defizienten LZ stärker exprimiert als in Wildtyp-LZ. Die Beobachtung, dass in AHR^- defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen auch Gene stärker exprimiert werden, wurde schon an anderer Stelle gezeigt (Frericks et al., 2006). Offenbar reprimiert der AHR die Transkription dieser Gene im Wildtyp, unklar ist auf welchem Wege. Diskutiert werden als Mechanismen Interaktionen des AHR mit anderen Signalwegen und Transkriptionsfaktorkaskaden (Carlson et al., 2002), oder die Existenz von sogenannten inhibitorischen XRE, die die Transkription von Genen über den AHR verhindern (Wang et al., 2001).

Die meisten in AHR-defizienten LZ differentiell exprimierten Gene sind im Zusammenhang mit dem AHR bisher nicht untersucht worden, es waren aber einige Gene von immunologischer Bedeutung moduliert. Besonders interessant und hier erstmals gezeigt ist die stark verminderte Expression des Gens für das Enzym Indolamin-pyrrol 2,3, Dioxygenase (IDO) in AHR-defizienten LZ und damit die AHR-Abhängigkeit dieses Enzyms. IDO ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Tryptophanabbau. Durch Tryptophanmangel und/oder die Bildung verschiedener Metabolite kommt es zu einer verminderten T-Zell-Proliferation und einer vermehrten Apoptose von T-Zellen, was einen wesentlichen Einfluss auf die Induktion von Toleranz hat (Finger et al., 2002; Grohmann et al., 2003). Erzeugung von lokalem Tryptophanmangel wird als tolerogener Mechanismus angesehen. Während IDO in unreifen LZ nicht nachweisbar ist, wird es durch Kultivierung aufreguliert (von Bubnoff et al., 2004), was den unreifen Phänotyp der AHR-defizienten LZ nochmals unterstreicht. Ob die verminderte IDO-Expression in AHR-defizienten LZ eine funktionelle Relevanz hat, werden weitere Experimente zeigen müssen. Weiterhin wurde in AHR-defizienten Zellen eine 2,7-fach erhöhte Expression der RNA für das CD274-Antigen gefunden, auch bekannt als B7-H1 oder Programmed death-Ligand 1. Es handelt sich dabei um ein ko-inhibitorisches Molekül, welches durch Bindung an den Rezeptor PD-1 auf T-Zellen deren Proliferation und Produktion von Effektorzytokinen inhibiert (de Jong et al., 2005). Dieses Molekül hat

demnach eine ähnliche Funktion wie IDO, wird aber gegenläufig exprimiert, bestätigt aber das Ergebnis der geringeren Expression ko-stimulatorischer Moleküle auf AHR-defizienten LZ. Die gefundenen Veränderungen unterstreichen die Hypothese einer vorwiegend tolerogenen Funktion von LZ, die durch das Fehlen des AHR noch unterstützt wird.

Zusammenfassend deuten die Erkenntnisse dieser Arbeit darauf hin, dass LZ immunregulatorische Funktionen zur Vermeidung unerwünschter Immunreaktionen gegen niedermolekulare Chemikalien besitzen (Abb. 36). LZ nahmen unter den getesteten Bedingungen nicht am AHR-induzierten Fremdstoffmetabolismus teil, was durch eine hohe konstitutive Ausprägung des AHRR zu begründen ist. Ob dies eine Strategie zur Immunsuppression gegen harmlose niedermolekulare Substanzen darstellt, müssen weitere Experimente zeigen. Dazu gehört der Einsatz konditionaler AHRR-defizienter Mäuse, die derzeit im Labor von Prof. Irmgard Förster am IUF generiert werden. Es muss außerdem geklärt werden, ob die Beobachtungen mit anderen AHR-Liganden und Belastungsprotokollen reproduziert werden können, und welche Rolle Keratinozyten in der Immunreaktion gegen niedermolekulare Chemikalien einnehmen.

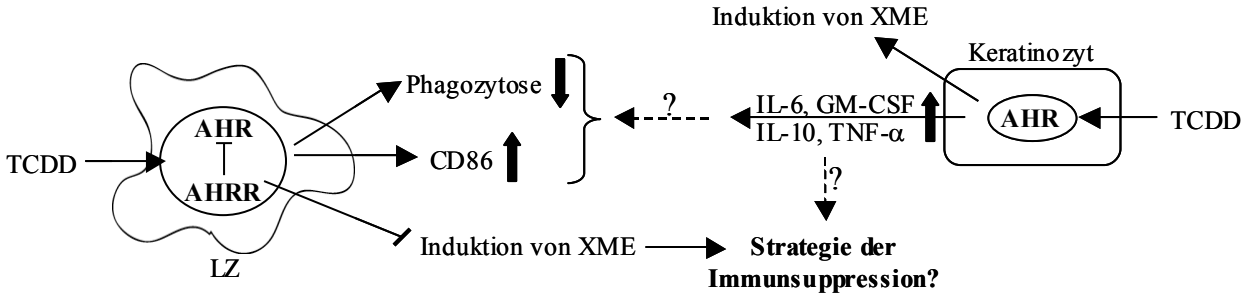

Abb. 36: Besitzen LZ immunregulatorische Eigenschaften zur Vermeidung unerwünschter Immunreaktionen gegen niedermolekulare Substanzen? Aufgeführt sind Ergebnisse und verbleibende Fragen zur Klärung dieser Hypothese.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass der AHR eine physiologische Rolle in LZ einnimmt (Abb. 37). Die Ergebnisse lassen auf einen Einfluss des AHR in der Regulation der Reifung der Zellen schließen. Da der Reifungszustand von DZ mit der Fähigkeit eine Immunantwort auszulösen oder zu unterdrücken einhergeht (Lutz et al., 2002), ist zu vermuten, dass die verminderte Reifung der LZ in Abwesenheit des AHR funktionelle Relevanz bezüglich der Induktion einer Immunantwort hat. Hierzu werden weitere Experimente notwendig sein.

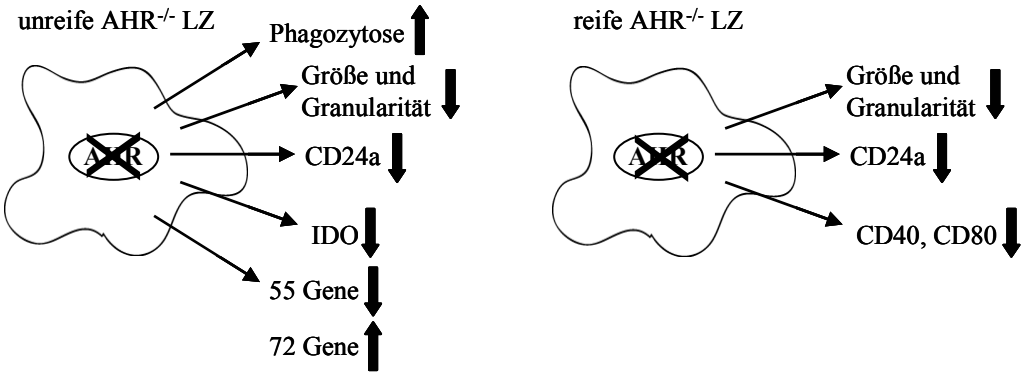

Abb. 37: Ergebnisse zur Hypothese, dass der AHR eine physiologische Rolle in LZ erfüllt. Gezeigt sind die Unterschiede zu entsprechenden Wildtyp-LZ.

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Überaktivierung des AHR in LZ nicht die gegenteiligen Effekte induziert, wie das vollständige Fehlen des AHR. In Tabelle 11 wurden die Ergebnisse gegenübergestellt.

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Ergebnisse von AHR-defizienten LZ und LZ mit überaktiviertem AHR im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-LZ

AHR fehlt[1)]		AHR überaktiviert[2)]
↓	Größe[3), 4)]	-
↓	Granularität[3), 4)]	-
↑	Phagozytose[3)]	↓
↓	CD24a[3), 4)]	-
↓	CD40[4)]	-
↓	CD80[4)]	-
-	CD86[4)]	↑
55 ↓ 72 ↑	Genexpression[3)]	-
↓	AHRR[3)]	-
↓	IDO[3)]	-

1) Aufgelistet sind die Veränderungen bei AHR-defizienten LZ im Vergleich zu Wildtyp-LZ
2) Aufgelistet sind die Veränderungen bei LZ aus C57BL/6 Mäusen mit überaktiviertem AHR nach 24 stündiger Behandlung mit TCDD (10 µg/kg, i.p.) im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-LZ
3) Unreife LZ sind direkt aus der Haut isoliert und untersucht worden (siehe Abb. 9 Population A und B)
4) LZ wurden vor der Analyse für drei Tage kultiviert (siehe Abb. 9 Population D)

LZ, welchen der AHR fehlte, verhielten sich anders als LZ aus Wildtyp-Mäusen, bei denen der AHR trotz Exposition mit einem starken Liganden nicht zu einer detektierbaren Änderung des Transkriptoms führte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Regulation von Außen (durch Keratinozyten und Melanozyten) stattfindet, wie für GM-CSF in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Die Ergebnisse zur Rolle des AHR-Signalwegs in LZ, insbesondere als mögliche zelluläre Strategie zur Kontrolle unerwünschter Immunreaktion gegen niedermolekulare Substanzen, werden neue Ansätze für Prävention und Behandlung solcher allergischer Erkrankungen bieten.

V. Zusammenfassung

Der Arylhydrocarbon Rezeptor (AHR) ist ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor, welcher unter anderem die Expression Fremdstoff-metabolisierender Enzyme und damit den Abbau niedermolekularer chemischer Substanzen reguliert. Der AHR nimmt darüber hinaus auch physiologische Aufgaben unter anderem in der Regulation des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung wahr. Die Haut kommt als Barriereorgan mit einer Vielzahl an niedermolekularen chemischen Substanzen in Kontakt. Weiterhin führt die Aktivierung des AHR in der Haut durch Exposition mit exogenen AHR-Liganden wie polychlorierten Biphenylen und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) zu einer Reihe von Effekten. Dennoch ist die Ausprägung und Funktion des AHR in der Haut bisher nur unzureichend untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte um ersten Mal die Expression des AHR in Langerhans Zellen (LZ) nachgewiesen werden. Überraschenderweise blieben LZ jedoch inert gegenüber einer TCDD-induzierten Genexpression. Dies konnte durch eine ungewöhnlich hohe konstitutive Ausprägung des AHR-Repressors erklärt werden. Da durch Metabolisierung von niedermolekularen chemischen Substanzen Haptene entstehen könnten, die eine Kontaktdermatitis auslösen können, könnte die Blockierung des AHR-abhängigen Fremdstoffmetabolismus in LZ eine mögliche Strategie zur Vermeidung des Risikos allergischer Reaktionen gegenüber harmlosen niedermolekularen Substanzen darstellen.

Im Vergleich von LZ aus Wildtyp- und AHR-defizienten Mäusen konnte eine physiologische Rolle des AHR in der Reifung und Funktion von LZ nachgewiesen werden. In einer Genexpressionsanalyse zeigten sich 127 Gene in Abhängigkeit vom AHR differenziell reguliert, darunter auch 22 Gene von immunologischer Relevanz. Zellen AHR-defizienter Mäuse zeigten einen unreifen Phänotyp, was sich darin äußerte, dass die Zellen kleiner und weniger granulär waren und deutlich geringere Mengen der ko-stimulatorischen Moleküle CD24a, CD40 und CD80 auf ihrer Oberfläche ausprägten. Ebenfalls hatten die LZ weniger Transkripte des immunregulatorischen Gens *IDO*. Eine verminderte Fähigkeit zur Reifung zeigte sich auch durch eine erhöhte Phagozytosekapazität. Die beobachteten Effekte ließen sich zum Teil auf eine durch Aktivierung oder Fehlen des AHR veränderte Zytokin-expression, unter anderem des Wachstumsfaktors GM-CSF von Keratinozyten erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der AHR in der Haut wesentliche physiologische Funktionen jenseits der Regulation des Fremdstoffmetabolismus erfüllt und eine mögliche immunsuppressive Strategie gegen harmlose niedermolekulare Substanzen darstellt.

Summary

The arylhydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated transcription factor that controls the expression of xenobiotic metabolizing enzymes, which degrade many low molecular weight chemicals (LMWC). The AHR is also involved in regulation of physiological processes including cell cycle and cell differentiation. The skin as a barrier organ is in frequent contact to a wide range of LMWC from the environment. Furthermore, the skin is a well-known target of the toxic effects of AHR ligands like polychlorinated biphenyls and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Nevertheless data about the expression and function of the AHR in the skin is still elusive.

This dissertation shows for the first time abundant expression of the AHR in Langerhans cells (LC). Surprisingly, LC were inert to gene induction via the AHR after *in vivo* activation with TCDD. Concomitantly the AHR inhibitor AHR repressor (AHRR) is strongly expressed. Metabolization of LMWC may result in protein-reactive intermediates which are potential haptens, and may trigger allergic reactions including contact dermatitis. As will be discussed, the AHRR mediated control of AHR induced metabolization may represent part of a risk strategy preventing adverse immune responses against harmless substances.

Comparative analysis of LC from wildtype and AHR-deficient mice revealed a conceivable physiological role of the AHR in maturation and function in LC. In comparison of the gene expression profiles 127 genes were differentially regulated among them 22 genes of immunological relevance. LC from AHR-deficient mice exhibited a more immature phenotype by several parameters. LC without AHR were smaller and less granular. Moreover, their maturation capacity was impaired as they poorly up-regulated the co-stimulatory molecules CD24a, CD40 and CD80 on the cell surface. Furthermore, the LC contained fewer transcripts of the immunoregulatory gene *IDO*. An impaired maturation was also shown by an enhanced phagocytic capacity. The observed effects can be partially explained by a differentially regulated expression of cytokines by surrounding keratinocytes, e.g. GM-CSF, dependent on the activation of the AHR with TCDD or in the absence of the AHR.

In conclusion, this data suggests a critical role for the AHR in LC maturation and a contribution in immunosuppressive strategies of the skin against harmless chemicals.

VI. Literaturverzeichnis

Adachi,J., Mori,Y., Matsui,S., Takigami,H., Fujino,J., Kitagawa,H., Miller,C.A., III, Kato,T., Saeki,K., und Matsuda,T. (2001) Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. J. Biol. Chem. 276, 31475-31478.

Allan,R.S., Smith,C.M., Belz,G.T., van Lint,A.L., Wakim,L.M., Heath,W.R., und Carbone,F.R. (2003) Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. Science. 301, 1925-1928.

Anderson,C., Hehr,A., Robbins,R., Hasan,R., Athar,M., Mukhtar,H., und Elmets,C.A. (1995) Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons. J. Immunol. 155, 3530-3537.

Angeli,V., Llodra,J., Rong,J.X., Satoh,K., Ishii,S., Shimizu,T., Fisher,E.A., und Randolph,G.J. (2004) Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. Immunity. 21, 561-574.

Arnold,B., Schonrich,G. und Hammerling,G.J. (1993) Multiple levels of peripheral tolerance. Immunol.Today. 14, 12-14

Baba,T., Mimura,J., Gradin,K., Kuroiwa,A., Watanabe,T., Matsuda,Y., Inazawa,J., Sogawa,K., und Fujii-Kuriyama,Y. (2001) Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. J. Biol. Chem. 276, 33101-33110.

Banchereau,J. und Steinman,R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 392, 245-252.

Baugh,L.R., Hill,A.A., Brown,E.L., und Hunter,C.P. (2001) Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. Nucleic Acids Res. 29, E29-

Becker,Y. (2003) Milestones in the research on skin epidermal Langerhans/dendritic cells (LCs/DCs) from the discovery of Paul Langerhans 1868-1989. Virus Genes. 26, 131-134.

Belsito,D.V., Epstein,S.P., Schultz,J.M., Baer,R.L., und Thorbecke,G.J. (1989) Enhancement by various cytokines or 2-beta-mercaptoethanol of Ia antigen expression on Langerhans cells in skin from normal aged and young mice. Effect of cyclosporine A. J. Immunol. 143, 1530-1536.

Bennett,C.L., van Rijn,E., Jung,S., Inaba,K., Steinman,R.M., Kapsenberg,M.L., und Clausen,B.E. (2005) Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. J. Cell Biol. 169, 569-576.

Bernshausen,T., Jux,B., Esser,C., Abel,J., und Fritsche,E. (2006) Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. Arch. Toxicol. 80, 206-211.

Birbeck,M.S., Breathnach,A.S., und Everall,J.D. (1961) An electron microscopic study of basal melanocyte and high level clear cell (Langerhans cell) in vitiligo. J. Invest Dermatol. 37, 51-63.

Carlson,D.B. und Perdew,G.H. (2002) A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. J. Biochem. Mol. Toxicol. 16, 317-325.

Clark,D.A., Gauldie,J., Szewczuk,M.R., und Sweeney,G. (1981) Enhanced suppressor cell activity as a mechanism of immunosuppression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 168, 290-299.

Connor,K.T. und Aylward,L.L. (2006) Human response to dioxin: aryl hydrocarbon receptor (AhR) molecular structure, function, and dose-response data for enzyme induction indicate an impaired human AhR. J. Toxicol. Environ. Health B Crit Rev. 9, 147-171.

Connor,M.J., Nanthur,J., und Puhvel,S.M. (1994a) Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on TNF-alpha levels in the skin of congenic haired and hairless mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 129, 12-15.

Connor,M.J., Puhvel,S.M., Sakamoto,M., und Nanthur,J. (1994b) The hr locus and the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in newborn mice. Arch. Toxicol. 69, 87-90.

da Silva,R.P. und Gordon,S. (1999) Phagocytosis stimulates alternative glycosylation of macrosialin (mouse CD68), a macrophage-specific endosomal protein. Biochem. J. 338 (Pt 3), 687-694.

de Jong,E.C., Smits,H.H., und Kapsenberg,M.L. (2005) Dendritic cell-mediated T cell polarization. Springer Semin. Immunopathol. 26, 289-307.

Dencker,L., Hassoun,E., d'Argy,R., und Alm,G. (1985) Fetal thymus organ culture as an in vitro model for the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its congeners. Mol. Pharmacol. 27, 133-140.

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

Diliberto,J.J., Akubue,P.I., Luebke,R.W., und Birnbaum,L.S. (1995) Dose-response relationships of tissue distribution and induction of CYP1A1 and CYP1A2 enzymatic activities following acute exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 130, 197-208.

Dunagin,W.G. (1984) Cutaneous signs of systemic toxicity due to dioxins and related chemicals. J. Am. Acad. Dermatol. 10, 688-700.

Eberwine,J., Belt,B., Kacharmina,J.E., und Miyashiro,K. (2002) Analysis of subcellularly localized mRNAs using in situ hybridization, mRNA amplification, and expression profiling. Neurochem. Res. 27, 1065-1077.

Enk,A. und J.Knop. (2002) Das Immunsystem der Haut. Die gelben Hefte. 42, 1-10.

Enk,A.H., Angeloni,V.L., Udey,M.C., und Katz,S.I. (1993a) An essential role for Langerhans cell-derived IL-1 beta in the initiation of primary immune responses in skin. J. Immunol. 150, 3698-3704.

Enk,A.H., Angeloni,V.L., Udey,M.C., und Katz,S.I. (1993b) Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. J. Immunol. 151, 2390-2398.

Enk,A.H. und Katz,S.I. (1992) Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. J. Immunol. 149, 92-95.

Enk,A.H. und Katz,S.I. (1994a) Heat-stable antigen is an important costimulatory molecule on epidermal Langerhans' cells. J. Immunol. 152, 3264-3270.

Enk,A.H., Saloga,J., Becker,D., Mohamadzadeh,M., und Knop,J. (1994b) Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. J. Exp. Med. 179, 1397-1402.

Esser,C. (2002) The role of the Ah-Receptor in the immune system: Heading from toxicology to immunology. Recent Res. Devel. Mol. Pharmacol. 1, 141-155.

Fernandez-Salguero,P., Pineau,T., Hilbert,D.M., McPhail,T., Lee,S.S., Kimura,S., Nebert,D.W., Rudikoff,S., Ward,J.M., und Gonzalez,F.J. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. Science. 268, 722-726.

Fernandez-Salguero,P.M., Ward,J.M., Sundberg,J.P., und Gonzalez,F.J. (1997) Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. Vet. Pathol. 34, 605-614.

Finger,E.B. und Bluestone,J.A. (2002) When ligand becomes receptor--tolerance via B7 signaling on DCs. Nat. Immunol. 3, 1056-1057.

Frank,D.M. und Blumer,J.L. (1988) Alteration of methylcholanthrene-mediated suppression of cutaneous delayed hypersensitivity by benzoflavone treatment of C57BL/6J mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 95, 72-81.

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

Frericks,M., Temchura,V.V., Majora,M., Stutte,S., und Esser,C. (2006) Transcriptional signatures of immune cells in aryl hydrocarbon receptor (AHR)-proficient and AHR-deficient mice. Biol. Chem. 387, 1219-1226.

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

Gasiewicz,T.A., Geiger,L.E., Rucci,G., und Neal,R.A. (1983) Distribution, excretion, and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J, DBA/2J, and B6D2F1/J mice. Drug Metab Dispos. 11, 397-403.

Geyer,H.J., Schramm,K.W., Feicht,E.A., Behechti,A., Steinberg,C., Bruggemann,R., Poiger,H., Henkelmann,B., und Kettrup,A. (2002) Half-lives of tetra-, penta-, hexa-, hepta-, and octachlorodibenzo-p-dioxin in rats, monkeys, and humans--a critical review. Chemosphere. 48, 631-644.

Giulietti,A., Overbergh,L., Valckx,D., Decallonne,B., Bouillon,R., und Mathieu,C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods. 25, 386-401.

Goerz,G. und Merk,H. (1992) [The effect of foreign-substance-metabolizing enzymes on skin diseases]. Hautarzt. 43, 65-72.

Gradin,K., Toftgard,R., Poellinger,L., und Berghard,A. (1999) Repression of dioxin signal transduction in fibroblasts. Identification Of a putative repressor associated with Arnt. J. Biol. Chem. 274, 13511-13518.

Gradin,K., Wilhelmsson,A., Poellinger,L., und Berghard,A. (1993) Nonresponsiveness of normal human fibroblasts to dioxin correlates with the presence of a constitutive xenobiotic response element-binding factor. J. Biol. Chem. 268, 4061-4068.

Greenlee,W.F., Dold,K.M., und Osborne,R. (1985) Actions of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on human epidermal keratinocytes in culture. In Vitro Cell Dev. Biol. 21, 509-512.

Greim, H and Deml, E (1996) Toxikologie. Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner. Wiley-VCH.

Grohmann,U., Fallarino,F., und Puccetti,P. (2003) Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. Trends Immunol. 24, 242-248.

Gu,Y.Z., Hogenesch,J.B., und Bradfield,C.A. (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 40, 519-561.

Hahn,M.E. (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. Chem. Biol. Interact. 141, 131-160.

Halaban, R., Hebert, D. N, and Fisher, D. E. (2003) Biology of Melanocytes in Fitzpatrick´s Dermatology in General Medicine. McGraw-Hill New York

Harris,N.L. und Ronchese,F. (1999) The role of B7 costimulation in T-cell immunity. Immunol. Cell Biol. 77, 304-311.

Hemmi,H., Yoshino,M., Yamazaki,H., Naito,M., Iyoda,T., Omatsu,Y., Shimoyama,S., Letterio,J.J., Nakabayashi,T., Tagaya,H., Yamane,T., Ogawa,M., Nishikawa,S., Ryoke,K., Inaba,K., Hayashi,S., und Kunisada,T. (2001) Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. Int. Immunol. 13, 695-704.

Henley,D.V., Bellone,C.J., Williams,D.A., Ruh,T.S., und Ruh,M.F. (2004) Aryl hydrocarbon receptor-mediated posttranscriptional regulation of IL-1beta. Arch. Biochem. Biophys. 422, 42-51.

Henry,E.C., Kende,A.S., Rucci,G., Totleben,M.J., Willey,J.J., Dertinger,S.D., Pollenz,R.S., Jones,J.P., und Gasiewicz,T.A. (1999) Flavone antagonists bind competitively with 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) to the aryl hydrocarbon receptor but inhibit nuclear uptake and transformation. Mol. Pharmacol. 55, 716-725.

Heufler,C., Koch,F., und Schuler,G. (1988) Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. J. Exp. Med. 167, 700-705.

Holsapple,M.P., Snyder,N.K., Wood,S.C., und Morris,D.L. (1991) A review of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced changes in immunocompetence: 1991 update. Toxicology. 69, 219-255.

Inaba,K., Schuler,G., Witmer,M.D., Valinksy,J., Atassi,B., und Steinman,R.M. (1986) Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. Distinct requirements for stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. J. Exp. Med. 164, 605-613.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2001) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag.

Jeuken,A., Keser,B.J., Khan,E., Brouwer,A., Koeman,J., und Denison,M.S. (2003) Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits. J. Agric. Food Chem. 51, 5478-5487.

Jones,C.L. und Reiners,J.J., Jr. (1997) Differentiation status of cultured murine keratinocytes modulates induction of genes responsive to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Arch. Biochem. Biophys. 347, 163-173.

Jones,G. und Greig,J.B. (1975) Pathological changes in the liver of mice given 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Experientia. 31, 1315-1317.

Kalmes,M., Neumeyer,A., Rio,P., Hanenberg,H., Fritsche,E., und Blomeke,B. (2006) Impact of the arylhydrocarbon receptor on eugenol- and isoeugenol-induced cell cycle arrest in human immortalized keratinocytes (HaCaT). Biol. Chem. 387, 1201-1207.

Kaplan,D.H., Jenison,M.C., Saeland,S., Shlomchik,W.D., und Shlomchik,M.J. (2005) Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. Immunity. 23, 611-620.

Katz,S.I., Tamaki,K., und Sachs,D.H. (1979) Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. Nature. 282, 324-326.

Kimmig,J. und Schulz,K.H. (1957) [Occupational acne (so-called chloracne) due to chlorinated aromatic cyclic ethers.]. Dermatologica. 115, 540-546.

Kirchner, H., Kruse, A., Neustock, P., and Rink, L. (1994) Cytokine und Interferone. Spektrum Akademischer Verlag.

Kisielow,P.; Bluthmann,H.; Staerz,U.D.; Steinmetz,M.; von,Boehmer H. (1988) Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. Nature. 333, 742-746

Kissenpfennig,A., Henri,S., Dubois,B., Laplace-Builhe,C., Perrin,P., Romani,N., Tripp,C.H., Douillard,P., Leserman,L., Kaiserlian,D., Saeland,S., Davoust,J., und Malissen,B. (2005) Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. Immunity. 22, 643-654.

Knippers, R. (1997) Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag.

Knutson,J.C. und Poland,A. (1982) Response of murine epidermis to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: interaction of the ah and hr loci. Cell. 30, 225-234.

Koch,F., Heufler,C., Kampgen,E., Schneeweiss,D., Bock,G., und Schuler,G. (1990) Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture, but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, without inducing their functional maturation. J. Exp. Med. 171, 159-171.

Koliopanos,A., Kleeff,J., Xiao,Y., Safe,S., Zimmermann,A., Buchler,M.W., und Friess,H. (2002) Increased arylhydrocarbon receptor expression offers a potential therapeutic target for pancreatic cancer. Oncogene. 21, 6059-6070.

Kondo,S. (1999) The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 4, 177-183.

Kontgen,F., Suss,G., Stewart,C., Steinmetz,M., und Bluethmann,H. (1993) Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. Int. Immunol. 5, 957-964.

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

Langerhans,P. (1868) Über die Nerven der menschlichen Haut. Virchows Arch. 44, 325-337.

Laupeze,B., Amiot,L., Sparfel,L., Le Ferrec,E., Fauchet,R., und Fardel,O. (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. J. Immunol. 168, 2652-2658.

Li,W., Donat,S., Dohr,O., Unfried,K., und Abel,J. (1994) Ah receptor in different tissues of C57BL/6J and DBA/2J mice: use of competitive polymerase chain reaction to measure Ah-receptor mRNA expression. Arch. Biochem. Biophys. 315, 279-284.

Loser,K., Mehling,A., Apelt,J., Stander,S., Andres,P.G., Reinecker,H.C., Eing,B.R., Skryabin,B.V., Varga,G., Schwarz,T., und Beissert,S. (2004) Enhanced contact hypersensitivity and antiviral immune responses in vivo by keratinocyte-targeted overexpression of IL-15. Eur. J. Immunol. 34, 2022-2031.

Lucier,G.W., McDaniel,O.S., Hook,G.E., Fowler,B.A., Sonawane,B.R., und Faeder,E. (1973) TCDD-induced changes in rat liver microsomal enzymes. Environ. Health Perspect. 5, 199-209.

Luger,T.A. und Schwarz,T. (1990) Evidence for an epidermal cytokine network. J. Invest Dermatol. 95, 100S-104S.

Lutz,M.B. und Schuler,G. (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? Trends Immunol. 23, 445-449.

Mackenzie,I.C. und Squier,C.A. (1975) Cytochemical identification of ATPase-positive langerhans cells in EDTA-separated sheets of mouse epidermis. Br. J. Dermatol. 92, 523-533.

Marlowe,J.L. und Puga,A. (2005) Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. J. Cell Biochem. 96, 1174-1184.

Martin,D., Brun,C., Remy,E., Mouren,P., Thieffry,D., und Jacq,B. (2004) GOToolBox: functional analysis of gene datasets based on Gene Ontology. Genome Biol. 5, R101-

Marzulli, F. N and Maibach, H. I. (1996) Dermatotoxicology. Washington, DC: Taylor and Francis.

McKenzie,R.C. und Sauder,D.N. (1990) The role of keratinocyte cytokines in inflammation and immunity. J. Invest Dermatol. 95, 105S-107S.

Mimura,J., Ema,M., Sogawa,K., und Fujii-Kuriyama,Y. (1999) Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. Genes Dev. 13, 20-25.

Mimura,J., Yamashita,K., Nakamura,K., Morita,M., Takagi,T.N., Nakao,K., Ema,M., Sogawa,K., Yasuda,M., Katsuki,M., und Fujii-Kuriyama,Y. (1997a) 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.

Moses,M., Lilis,R., Crow,K.D., Thornton,J., Fischbein,A., Anderson,H.A., und Selikoff,I.J. (1984) Health status of workers with past exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the manufacture of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid: comparison of findings with and without chloracne. Am. J. Ind. Med. 5, 161-182.

Mukai,M. und Tischkau,S.A. (2007) Effects of tryptophan photoproducts in the circadian timing system: searching for a physiological role for aryl hydrocarbon receptor. Toxicol. Sci. 95, 172-181.

Nagata,T., Takahashi,Y., Ishii,Y., Asai,S., Nishida,Y., Murata,A., Koshinaga,T., Fukuzawa,M., Hamazaki,M., Asami,K., Ito,E., Ikeda,H., Takamatsu,H., Koike,K., Kikuta,A., Kuroiwa,M., Watanabe,A., Kosaka,Y., Fujita,H., Miyake,M., und Mugishima,H. (2003a) Transcriptional profiling in hepatoblastomas using high-density oligonucleotide DNA array. Cancer Genet. Cytogenet. 145, 152-160.

Nagata,T., Takahashi,Y., Ishii,Y., Asai,S., Sugahara,M., Nishida,Y., Murata,A., Chin,M., Schichino,H., Koshinaga,T., Fukuzawa,M., und Mugishima,H. (2003b) Profiling of genes differentially expressed between fetal liver and postnatal liver using high-density oligonucleotide DNA array. Int. J. Mol. Med. 11, 713-721.

Nazarenko,D.A., Dertinger,S.D., und Gasiewicz,T.A. (2001) In vivo antagonism of AhR-mediated gene induction by 3'-methoxy-4'-nitroflavone in TCDD-responsive lacZ mice. Toxicol. Sci. 61, 256-264.

Negishi,T., Kato,Y., Ooneda,O., Mimura,J., Takada,T., Mochizuki,H., Yamamoto,M., Fujii-Kuriyama,Y., und Furusako,S. (2005) Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. J. Immunol. 175, 7348-7356.

Overbergh,L., Giulietti,A., Valckx,D., Decallonne,R., Bouillon,R., und Mathieu,C. (2003) The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. J. Biomol. Tech. 14, 33-43.

Ozawa,H., Aiba,S., Nakagawa, und Tagami,H. (1996) Interferon-gamma and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. Eur. J. Immunol. 26, 648-652.

Pabon,C., Modrusan,Z., Ruvolo,M.V., Coleman,I.M., Daniel,S., Yue,H., und Arnold,L.J., Jr. (2001) Optimized T7 amplification system for microarray analysis. Biotechniques. 31, 874-879.

Pfaffl,M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29, e45-

Poland,A., Palen,D., und Glover,E. (1982) Tumour promotion by TCDD in skin of HRS/J hairless mice. Nature. 300, 271-273.

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

Puga,A., Tomlinson,C.R., und Xia,Y. (2005) Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. Biochem. Pharmacol. 69, 199-207.

Puga,A., Xia,Y., und Elferink,C. (2002) Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. Chem. Biol. Interact. 141, 117-130.

Puhvel,S.M. und Sakamoto,M. (1988) Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on murine skin. J. Invest Dermatol. 90, 354-358.

Puhvel,S.M., Sakamoto,M., Ertl,D.C., und Reisner,R.M. (1982) Hairless mice as models for chloracne: a study of cutaneous changes induced by topical application of established chloracnegens. Toxicol. Appl. Pharmacol. 64, 492-503.

Puhvel,S.M., Sakamoto,M., und Reisner,R.M. (1989) Effect of TCDD on the density of Langerhans cells in murine skin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 99, 72-80.

Reis e Sousa, Stahl,P.D., und Austyn,J.M. (1993) Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. J. Exp. Med. 178, 509-519.

Riemann,H., Schwarz,T., und Grabbe,S. (2003) [Pathomechanisms of the elicitation phase of allergic contact dermatitis]. J. Dtsch. Dermatol. Ges. 1, 613-619.

Rodriguez-Sosa,M., Elizondo,G., Lopez-Duran,R.M., Rivera,I., Gonzalez,F.J., und Vega,L. (2005) Over-production of IFN-gamma and IL-12 in AhR-null mice. FEBS Lett. 579, 6403-6410.

Romani,N., Holzmann,S., Tripp,C.H., Koch,F., und Stoitzner,P. (2003) Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. APMIS. 111, 725-740.

Saeki,M., Saito,Y., Nagano,M., Teshima,R., Ozawa,S., und Sawada,J. (2002) mRNA expression of multiple cytochrome p450 isozymes in four types of cultured skin cells. Int. Arch Allergy Immunol. 127, 333-336.

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

Schoop,V.M., Mirancea,N., und Fusenig,N.E. (1999) Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. J. Invest Dermatol. 112, 343-353.

Schuler,G., Romani,N., und Steinman,R.M. (1985a) A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. J. Invest Dermatol. 85, 99s-106s.

Schuler,G. und Steinman,R.M. (1985b) Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. J. Exp. Med. 161, 526-546.

Sharlow,E.R., Paine,C.S., Babiarz,L., Eisinger,M., Shapiro,S., und Seiberg,M. (2000) The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. J. Cell Sci. 113 (Pt 17), 3093-3101.

Simon,J.C., Edelbaum,D., Bergstresser,P.R., und Cruz,P.D., Jr. (1991) Distorted antigen-presenting function of Langerhans cells induced by tumor necrosis factor alpha via a mechanism that appears different from that induced by ultraviolet B radiation. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 8, 190-194.

Song,J., Clagett-Dame,M., Peterson,R.E., Hahn,M.E., Westler,W.M., Sicinski,R.R., und DeLuca,H.F. (2002) A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 14694-14699.

Steinman,R.M. (2003) Some interfaces of dendritic cell biology. APMIS. 111, 675-697.

Struhl,K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. Genes Dev. 12, 599-606.

Sugaya,M., Nakamura,K., und Tamaki,K. (1999) Interleukins 18 and 12 synergistically upregulate interferon-gamma production by murine dendritic epidermal T cells. J. Invest Dermatol. 113, 350-354.

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

Suskind,R.R. und Hertzberg,V.S. (1984) Human health effects of 2,4,5-T and its toxic contaminants. JAMA. 251, 2372-2380.

Swanson,H.I. (2004) Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: an aryl hydrocarbon receptor perspective. Chem. Biol. Interact. 149, 69-79.

Tada,Y., Asahina,A., Fujita,H., Sugaya,M., und Tamaki,K. (2003) Langerhans cells do not produce interferon-gamma. J. Invest Dermatol. 120, 891-892.

Tang,A., Amagai,M., Granger,L.G., Stanley,J.R., und Udey,M.C. (1993) Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. Nature. 361, 82-85.

Tauchi,M., Hida,A., Negishi,T., Katsuoka,F., Noda,S., Mimura,J., Hosoya,T., Yanaka,A., Aburatani,H., Fujii-Kuriyama,Y., Motohashi,H., und Yamamoto,M. (2005) Constitutive expression of aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes causes inflammatory skin lesions. Mol. Cell Biol. 25, 9360-9368.

Temchura,V.V., Frericks,M., Nacken,W., und Esser,C. (2005) Role of the aryl hydrocarbon receptor in thymocyte emigration in vivo. Eur. J. Immunol. 35, 2738-2747.

Tian,Y., Ke,S., Denison,M.S., Rabson,A.B., und Gallo,M.A. (1999) Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. J. Biol. Chem. 274, 510-515.

Tijet,N., Boutros,P.C., Moffat,I.D., Okey,A.B., Tuomisto,J., und Pohjanvirta,R. (2006) Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. Mol. Pharmacol. 69, 140-153.

Timbrell, J. A. (1993) Toxikologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag.

Urso,P. und Gengozian,N. (1980) Depressed humoral immunity and increased tumor incidence in mice following in utero exposure to benzo[alpha]pyrene. J. Toxicol. Environ. Health. 6, 569-576.

Valladeau,J., Clair-Moninot,V., Dezutter-Dambuyant,C., Pin,J.J., Kissenpfennig,A., Mattei,M.G., Ait-Yahia,S., Bates,E.E., Malissen,B., Koch,F., Fossiez,F., Romani,N., Lebecque,S., und Saeland,S. (2002) Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. J. Immunol. 168, 782-792.

Valladeau,J., Ravel,O., zutter-Dambuyant,C., Moore,K., Kleijmeer,M., Liu,Y., Duvert-Frances,V., Vincent,C., Schmitt,D., Davoust,J., Caux,C., Lebecque,S., und Saeland,S. (2000) Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. Immunity. 12, 71-81.

Valladeau,J. und Saeland,S. (2005) Cutaneous dendritic cells. Semin. Immunol. 17, 273-283.

von,B.D., Bausinger,H., Matz,H., Koch,S., Hacker,G., Takikawa,O., Bieber,T., Hanau,D., und de la,S.H. (2004) Human epidermal langerhans cells express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. J. Invest Dermatol. 123, 298-304.

Vorderstrasse,B.A., Dearstyne,E.A., und Kerkvliet,N.I. (2003) Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the antigen-presenting activity of dendritic cells. Toxicol. Sci. 72, 103-112.

Vorderstrasse,B.A. und Kerkvliet,N.I. (2001) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects the number and function of murine splenic dendritic cells and their expression of accessory molecules. Toxicol. Appl. Pharmacol. 171, 117-125.

Vrzal,R., Ulrichova,J., und Dvorak,Z. (2004) Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ Palacky. Olomouc. Czech. Repub. 148, 3-10.

Wang,F., Samudio,I., und Safe,S. (2001) Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. Mol. Cell Endocrinol. 172, 91-103.

Ward,E.C., Murray,M.J., Lauer,L.D., House,R.V., Irons,R., und Dean,J.H. (1984) Immunosuppression following 7,12-dimethylbenz[a]anthracene exposure in B6C3F1 mice. I. Effects on humoral immunity and host resistance. Toxicol. Appl. Pharmacol. 75, 299-308.

Wei,Y.D., Helleberg,H., Rannug,U., und Rannug,A. (1998) Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. Chem. Biol. Interact. 110, 39-55.

Williams,D. und Woodhouse,K. (1995) The relationship between age and cutaneous aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity. Age Ageing. 24, 213-216.

Yamashita,F. und Hayashi,M. (1985) Fetal PCB syndrome: clinical features, intrauterine growth retardation and possible alteration in calcium metabolism. Environ. Health Perspect. 59, 41-45.

Yao,E.F. und Denison,M.S. (1992) DNA sequence determinants for binding of transformed Ah receptor to a dioxin-responsive enhancer. Biochemistry. 31, 5060-5067.

Yoneda,Y., Hirota,R., Tashiro,J., Okada,M., Sakurai,K., Lee,K., Ueda,K., Kubota,T., und Yoshida,R. (2003) Cellular origin of IFN-gamma essential for hair cycle in normal skin. J. Interferon Cytokine Res. 23, 299-305.

Zhang,S., Qin,C., und Safe,S.H. (2003) Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. Environ. Health Perspect. 111, 1877-1882.

Zhao,X., Deak,E., Soderberg,K., Linehan,M., Spezzano,D., Zhu,J., Knipe,D.M., und Iwasaki,A. (2003) Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. J. Exp. Med. 197, 153-162.

Anhang

Verwendete Abkürzungen

AHR	Arylhydrocarbon Rezeptor
AHRR	AHR-Repressor
α-NF	Alpha-Naphtoflavon
ARNT	AHR nuclear translocator
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CP	Crossing point
CYP	Cytochrom P450
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNFB	2,4-Dinitrofluorobenzol
dNTP	Desoxy-nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiohtreitol
DZ	Dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eZ	epidermale Zellen
FACS	fluorescence-activated cell sorter/scanner
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GM-CSF	granulocyte-macrophage stimulating factor
HAK	halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe
HDAC	Histondeacetylase
HSP90	Heatschock Protein 90

IDO	Indolamin-pyrrol 2,3, Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
LD	Letale Dosis
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Langerhans-Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
MNF	3´-Methoxy-4´-Nitroflavon
NHM	Normale humane Melanozyten
OD	Optische Dichte
PAS	Per-Arnt-Sim
PBS	Phosphate-buffered saline
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol Myristat Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
RPS6	Ribosomales Protein S6
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
TCDD	2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
T_H	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UVB	Ultraviolett B
WT	Wildtyp
XME	Xenobioten-metabolisierende Enzyme
XRE	Xenobiotika-responsives Element

Tabelle 12: Auflistung aller regulierten Gene im Genexpressionsvergleich von LZ aus Wildtyp- und AHR-defizienten Mäusen.

Probeset-ID [a]	Genbezeichnung	Δ Log 2 [b]
1428301_at	Multiple Gene Symbols	-3,92
1452731_x_at	Multiple Gene Symbols	-3,65
1420437_at	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	-3,14 [1), 4)]
1420796_at	aryl-hydrocarbon receptor repressor	-3,11 [4), 6)]
1417434_at	glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	-2,62 [4)]
1450750_a_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	-2,62 [4), 5)]
1418465_at	neutrophil cytosolic factor 4	-2,52 [4), 6)]
1450627_at	progressive ankylosis	-2,52
1419647_a_at	immediate early response 3	-2,43
1416008_at	special AT-rich sequence binding protein 1	-2,24 [4)]
1421923_at	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)	-2,18 [6)]
1428306_at	DNA-damage-inducible transcript 4	-2,16
1417389_at	glypican 1	-2,11
1430700_a_at	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase)	-2,04 [1), 4)]
1419240_at	testis expressed gene 14	-2,03 [4)]
1424451_at	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1B	-1,98
1418401_a_at	dual specificity phosphatase 16	-1,86 [6)]
1416811_s_at	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha, beta	-1,80
1460444_at	arrestin, beta 1	-1,80 [6)]
1424836_a_at	CLIP associating protein 2	-1,75 [4)]
1448471_a_at	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	-1,71
1424303_at	DEP domain containing 7	-1,66
1417110_at	mannosidase 1, alpha	-1,59
1434180_at	pleckstrin homology domain containing, family C (with FERM domain) 1	-1,58
1460245_at	killer cell lectin-like receptor, subfamily D, member 1	-1,55
1449799_s_at	plakophilin 2	-1,49
1452160_at	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	-1,48 [4)]
1424649_a_at	tetraspanin 8	-1,45
1418471_at	placental growth factor	-1,45 [5)]
1422320_x_at	per-hexamer repeat gene 5	-1,39
1423707_at	transmembrane protein 50B	-1,37
1456120_at	RIKEN cDNA 3110001I20 gene	-1,36
1424268_at	spermine oxidase	-1,35 [4)]
1416892_s_at	RIKEN cDNA 3110001A13 gene	-1,35
1427655_a_at	RIKEN cDNA A630038E17 gene	-1,34
1424704_at	runt related transcription factor 2	-1,32 [4), 5), 6)]
1449348_at	membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily member 6)	-1,28
1418072_at	histone cluster 1, H2bc	-1,27 [4)]
1417111_at	mannosidase 1, alpha	-1,27 [4)]
1419738_a_at	tropomyosin 2, beta	-1,26
1419178_at	CD3 antigen, gamma polypeptide	-1,26 [6)]
1448303_at	glycoprotein (transmembrane) nmb	-1,25 [4)]
1416379_at	pannexin 1	-1,20
1429527_a_at	phospholipid scramblase 1	-1,20 [5)]
1435137_s_at	RIKEN cDNA 1200015M12 gene	-1,20
1417262_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	-1,19 [4)]
1450407_a_at	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	-1,18
1451415_at	RIKEN cDNA 1810011O10 gene	-1,12

Probeset-ID	Genbezeichnung	Δ Log 2
1423489_at	monocyte to macrophage differentiation-associated	-1,11
1417225_at	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 5	-1,10
1453472_a_at	SLAM family member 7	-1,08
1416129_at	ERBB receptor feedback inhibitor 1	-1,08
1435551_at	formin homology 2 domain containing 3	-1,08
1449433_at	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	-1,05 [6)]
1419872_at	colony stimulating factor 1 receptor	-1,05 [4), 6)]
1425028_a_at	tropomyosin 2, beta	-1,03
1416543_at	nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	-1,03 [4)]
1427418_a_at	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	-1,02 [4), 5), 6)]
1426812_a_at	RIKEN cDNA 9130404D14 gene	-1,01
1450642_at	RIKEN cDNA 3110001I20 gene	-1,00
1416382_at	cathepsin C	1,00 [1), 3)]
1417292_at	interferon gamma inducible protein 47	1,00
1454169_a_at	epithelial stromal interaction 1 (breast)	1,00
1451127_at	expressed sequence AW146242	1,00
1451564_at	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	1,00
1424775_at	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A	1,02 [1)]
1448883_at	legumain	1,02 [3)]
1455581_x_at	hypothetical protein 9530028C05	1,02
1422707_at	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide	1,03
1451457_at	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog	1,04 [5)]
1418776_at	RIKEN cDNA 5830443L24 gene	1,04 [1)]
1451860_a_at	tripartite motif protein 30	1,05
1427820_at		1,05
1433446_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	1,07 [2)]
1420804_s_at	C-type lectin domain family 4, member d	1,07 [1)]
1427235_at	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, X chromosome	1,07
1450698_at	dual specificity phosphatase 2	1,08
1448124_at	glucuronidase, beta	1,08
1420342_at	ganglioside-induced differentiation-associated-protein 10	1,09
1453196_a_at	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 2	1,09 [1)]
1438322_x_at	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	1,10 [2)]
1417381_at	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	1,10 [1), 3)]
1422476_at	interferon gamma inducible protein 30	1,11 [1)]
1450646_at	cytochrome P450, family 51	1,11 [2), 3)]
1456386_at	RNA binding motif protein 39	1,11
1449164_at	CD68 antigen	1,12
1427229_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	1,12 [2)]
1418131_at	SAM domain and HD domain, 1	1,13 [1)]
1435493_at	desmoplakin	1,14
1456494_a_at	tripartite motif protein 30 /// expressed sequence AI451617	1,16
1434366_x_at	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	1,16
1454268_a_at	cytochrome b-245, alpha polypeptide	1,16
1415822_at	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	1,17 [2)]
1426972_at	SEC24 related gene family, member D (S. cerevisiae)	1,17
1422823_at	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	1,17 [3)]
1420464_s_at		1,18
1450004_at	thymic stromal lymphopoietin	1,19
1449399_a_at	interleukin 1 beta	1,19 [1)]
1423418_at	farnesyl diphosphate synthetase	1,22 [2)]

Probeset-ID	Genbezeichnung	Δ Log 2
1451310_a_at	cathepsin L	1,22 [3)]
1417490_at	cathepsin B	1,22 [3)]
1452349_x_at	interferon activated gene 205 /// myeloid cell nuclear differentiation antigen	1,24
1450648_s_at	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	1,24
1435330_at		1,26
1450883_a_at	CD36 antigen	1,26 [2)]
1427076_at	macrophage expressed gene 1 /// similar to macrophage expressed gene 1	1,28
1427347_s_at	tubulin, beta 2a, 2b	1,28
1416635_at	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	1,28
1418392_a_at	guanylate nucleotide binding protein 3	1,29 [1)]
1433428_x_at	transglutaminase 2, C polypeptide	1,29 [3)]
1455900_x_at	transglutaminase 2, C polypeptide	1,30
1453851_a_at	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	1,30 [1)]
1452087_at	epithelial stromal interaction 1 (breast)	1,31
1435290_x_at	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	1,31 [1)]
1437726_x_at	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	1,31 [1), 3)]
1435494_s_at	desmoplakin	1,32
1416021_a_at	Fabp5	1,34 [2)]
1451596_a_at	sphingosine kinase 1	1,36 [2)]
1424761_at	cDNA sequence BC011487	1,36
1417025_at	histocompatibility 2, class II antigen E beta	1,37 [1)]
1418809_at	paired-Ig-like receptor A2	1,37
1452348_s_at		1,40
1425477_x_at	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	1,41 [1)]
1437277_x_at	transglutaminase 2, C polypeptide	1,42
1419714_at	CD274 antigen	1,43 [1)]
1422533_at	cytochrome P450, family 51	1,43
1422639_at	calcitonin-related polypeptide, beta	1,46
1449254_at	secreted phosphoprotein 1	1,51 [1), 2)]
1449153_at	matrix metallopeptidase 12	1,51 [3)]
1452231_x_at	interferon activated gene 203	1,53 [1)]
1451721_a_at	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	1,54
1423467_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4B	1,56
1436172_at	hypothetical protein 9530028C05	1,60
1434380_at	guanylate binding protein 6	1,63 [1)]
1419599_s_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	1,63
1448995_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 4	1,64 [1)]
1435331_at	expressed sequence AI447904	1,65
1426906_at	interferon activated gene 203	1,66
1419598_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	1,68
1416022_at	fatty acid binding protein 5, epidermal	1,88
1452431_s_at	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha; E alpha	1,99
1423100_at	FBJ osteosarcoma oncogene	2,02
1418580_at	receptor transporter protein 4	2,05
1415904_at	lipoprotein lipase	2,27 [2)]
1436996_x_at	P lysozyme structural	2,52

[a)] Jedem Gen ist zur eindeutigen Identifizierung eine Proben-ID zugewiesen

[b)] Die Δ Log 2 ist die Differenz aus der log2 Expression in $AHR^{-/-}$ Zellen und Wildtyp-Zellen, d.h. Werte mit einem negativen Vorzeichen werden in $AHR^{-/-}$ Zellen schwächer exprimiert.

[1) - 6)] Zuordnung der biologische Funktion laut G.O.ToolBox (Martin et al., 2004)

[1)] Immunsystem

[2)] Lipidstoffwechsel

[3)] Proteolyse

[4)] Metabolismus

[5)] Zelldifferenzierung

[6)] Signaltransduktion

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH vom 01.10.2003 – 10.01.2008 mit finanzieller Unterstützung der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf erstellt.

Teile der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

Bernshausen,T., Jux,B., Esser,C., Abel,J., and Fritsche,E. (2006) Tissue distribution and function of the Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) in C57BL/6 and Aryl hydrocarbon receptor deficient mice. Arch. Toxicol. 80, 206-211.

Stutte S, Jux B, Esser C, Förster I. (2008) CD24a Expression Levels Discriminate Langerhans Cells from Dermal Dendritic Cells in Murine Skin and Lymph Nodes. J Invest Dermatol., in Druck.

Bettina Jux, Markus Frericks and Charlotte Esser. Impairment of maturational competence of cultured Langerhans cells from aryl hydrocarbon receptor (ahr) null mice and suppression of ahr signalling points to its role in LC tolerogenic strategy. J Immunol., eingereicht.

Danksagung

In erster Linie danke ich Prof. Dr. Charlotte Esser für die gute wissenschaftliche Betreuung, die Unterstützung und die geduldige Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Peter Proksch danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke der Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie:
Ninon Krahnke-Schoelzel, Babette Martiensen, Alla Velgach und Swantje Steinwachs danke ich für die technische Unterstützung im Laboralltag.

Markus Frericks danke ich für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Microarrays.

Andreas Goergens, Stephie Kadow und Steffi Chmill danke ich vor allem für die moralische Unterstützung.

Prof. Dr. Irmgard Förster, Dr. Heike Weighardt, Meike Winter, Ingo Uthe und Markus Korkowski danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Susi Stutte für alle wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche und das außergewöhnliche Teamwork.

Michael Nowak danke ich für seine wunderbare Unterstützung (auch aus der Ferne), ohne die vieles nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern danke ich für „die guten Gene“.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Die Bedeutung des Arylhydrocarbon Rezeptors für die Reifung und Funktion epidermaler Langerhans-Zellen in der Maus“ selbständig verfasst und neben den angegebenen Quellen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 03. Dezember 2007