

***Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR) als
Regulator der metabolischen Flexibilität und
von Immunfunktionen adulter dendritischer
epidermaler T-Zellen***

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Simon Leander Sollberg
aus Köln

Düsseldorf, den 27.05.2026

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

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

Berichterstatte^rin: Prof. Dr. Charlotte Esser
Berichterstatte^r: Prof. Dr. Sebastian Wesselborg

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2026

-Meiner Familie gewidmet-

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Abstract	XII
Zusammenfassung	XIV
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Haut als immunologisches Grenzorgan.....	1
1.2. Epidermale $\gamma\delta$ T-Zellen	2
1.2.1. Entwicklung und Migration zur Haut.....	4
1.2.2. Homöostase, Wundheilung und Tumormunität	6
1.2.3. Metabolismus in T-Zellen.....	10
1.3. Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR).....	12
1.3.1. Bedeutung von AHR in Immunzellen allgemein (z. B. Th17, IELs).....	14
1.4. Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Mausmodell.....	19
2.2. Chemikalien und Reagenzien	20
2.3. Puffer und Kulturmedium	21
2.4. Antikörper.....	22
2.5. Oligonukleotid-Primer	22
2.6. Zellbiologische Methoden.....	25
2.6.1. Zellkultur und -haltung	25
2.6.2. Herstellung einer DETC-Zellkulturlinie mit AHR-Deletion	25
2.6.3. Passagieren und Zellzählung.....	26
2.6.4. Zellbehandlungen	27
2.6.4.1. Stimulation von DETC-Zellkulturlinie 7-17.....	27

2.6.4.2.	Apoptose-Assay (Nicoletti-Puffer)	27
2.6.5.	Durchflusszytometrie	27
2.6.6.	Isolation von DETC aus der Ohrepidermis	28
2.6.7.	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) von DETC	28
2.6.8.	Herstellung von abgelösten Epidermisschichten für histologische Untersuchung	29
2.6.9.	Metabolische Untersuchung mittels Seahorse-Analyse	30
2.6.10.	Morphologische Analyse von 7-17-Zellen	32
2.7.	Molekularbiologische Methoden	34
2.7.1.	RNA-Isolation	34
2.7.1.1.	Isolation von RNA aus 7-17-Zellen	34
2.7.1.2.	Isolation von RNA aus isolierten und sortierten DETC	34
2.7.1.3.	Konzentrationsbestimmung der RNA	35
2.7.2.	RNA-Sequenzierung mit Oxford-Nanopore-Technologie	35
2.7.2.1.	Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten	36
2.7.3.	cDNA-Synthese	37
2.7.4.	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	38
2.7.5.	Immunoblot (Western Blot)	38
2.7.6.	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	39
2.8.	Behandlungen von Mäusen	40
2.8.1.	Tamoxifen-Injektion zur Deletion des AHR in DETC	40
2.8.2.	Mechanische Störung der epidermalen Barriere und Messung des transepidermalen Wasserverlusts	41
2.9.	Statistische Analyse	41
3.	Ergebnisse	42
3.1.	Durchflusszytometrische Isolierung und Charakterisierung von DETC ^{WT} und DETC ^{ΔAHR}	42
3.2.	AHR-Deletion verändert das Transkriptionsprofil von DETC nach epidermaler Verletzung	44
3.2.1.	Globale Transkriptionsveränderungen und Signalwege (GSEA)	44
3.2.2.	AHR beeinflusst immunrelevante Genprogramme in DETC	51
3.3.	Geringere Oberflächenausprägung des γδ T-Zellrezeptors in AHR-defizienten DETC	56
3.4.	Funktionelle Konsequenzen des AHR-Verlusts in vivo	58

3.4.1.	Verhalten von DETC am Wundrand	58
3.4.2.	Einfluss der AHR-Deletion in DETC auf die epidermale Barriere	60
3.5.	Validierung der 7-17-Zelllinie als Modell zur Untersuchung des AHR-abhängigen Einflusses auf $\gamma\delta$ TCR-Expression in vitro	62
3.6.	AHR beeinflusst die Aktivierung und den Metabolismus von 7-17-Zellen	64
3.6.1.	AHR ist erforderlich für eine effiziente Aktivierung von 7-17-Zellen	65
3.6.2.	AHR-Deletion reduziert den glykolytischen Anteil der ATP-Produktion und erhöht den Beitrag der oxidativen Phosphorylierung	68
3.6.3.	AHR reguliert die Expression zentraler glykolytischer Enzyme	71
3.6.4.	AHR-Deletion verändert die Proteinexpression von HK1 und HK2	75
3.6.5.	AHR-Deletion verändert die Expression zentraler Regulatoren der metabolischen Reprogrammierung	76
3.6.6.	AHR-Deletion erhöht das mitochondriale Membranpotenzial in 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen	78
3.6.7.	Die AHR-Deletion beeinflusst nicht die Apoptoserate von 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen	80
3.7.	Einfluss des AHR auf homöostatische und Effektor-Funktionen von 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen	81
3.7.1.	AHR beeinflusst die Expression homöostatischer Zytokinrezeptoren in 7-17-Zellen	82
3.7.2.	AHR reguliert die Zytokin-Expression von CCL3 und CCL4 in 7-17-Zellen	84
4.	Diskussion	87
4.1.	Der Arylhydrocarbon-Rezeptor als Regulator der metabolischen Programmierung	88
4.2.	Einfluss des AHR auf TCR-Expression und Aktivierungsfähigkeit von DETC	91
4.3.	Zusammenhang zwischen metabolischer Regulation und TCR-Signaltransduktion	94
4.4.	Bedeutung der AHR-abhängigen Regulation für DETC-Homöostase und Wundantwort	97
4.5.	Einordnung der Ergebnisse in die AHR-vermittelte Regulation der Hautimmunität	100
5.	Schlussfolgerung	103
6.	Literatur	105
7.	Anhang	127
7.1.	Validierung des AHR-Knockouts in 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen	127
7.2.	Qualitätskontrolle der RNA-Sequenzierungs-Daten mittels PCA	128
7.3.	Seahorse-Analyse	129

Danksagung	131
-------------------------	------------

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der murinen Haut und ihre typischen Immunzellen	1
Abbildung 2: Die Rolle der DETC bei der Hauthomöostase und der Wundheilung	8
Abbildung 3: Signalweg des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AHR).	13
Abbildung 4: Schematische Übersicht über das Tamoxifen-induzierbare $\gamma\delta$ -T-Zell-spezifische AHR-Knockout-Modell	19
Abbildung 5: Repräsentative Darstellung der sequenziellen Gating-Strategie zur Identifikation von DETC mittels Durchflusszytometrie	29
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS) sowie der Wirkmechanismen der verwendeten Inhibitoren bei der Seahorse-Analyse.....	31
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Untersuchung von isolierten DETC ^{ΔAHR}	43
Abbildung 8: Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene (DEG) in DETC ^{ΔAHR} zu den Zeitpunkten ti0h und ti24h.....	45
Abbildung 9: Hallmark Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) von durchflusszytometrisch sortierten DETC ^{WT} und DETC ^{ΔAHR} 0 h (A) und 24 h (B) nach Ohrverletzung	46
Abbildung 10: Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene (DEG) in EZ ^{ΔAHR} zu den Zeitpunkten ti0h und ti24h	48
Abbildung 11: Hallmark Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) der epidermalen Zellfraktion von DETC ^{WT} - und DETC ^{ΔAHR} -Mäusen 0 h (A) und 24 h (B) nach Ohrverletzung.	49
Abbildung 12: Heatmap der immunassoziierten differentiell exprimierten Gene in DETC nach Verletzung (ti0h)	52
Abbildung 13: Heatmap der immunassoziierten differentiell exprimierten Gene in DETC nach Verletzung (ti24h)	54
Abbildung 14: AHR-defiziente aurikuläre DETC zeigen bei ti0h eine reduzierte $\gamma\delta$ TCR-Expression auf der Zelloberfläche, die sich bei ti48h normalisiert.	57
Abbildung 15: AHR beeinflusst die Gewebekomöostase von DETC.....	59
Abbildung 16: Untersuchung der epidermalen Barrierefunktion bei DETC ^{WT} - und DETC ^{ΔAHR} -Mäusen.	61
Abbildung 17: Überprüfung der TCR-Genexpression und -Oberflächenexpression in 7-17 ^{WT} und 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen.....	63
Abbildung 18: Untersuchung der Aktivierung und Morphologie von 7-17 ^{WT} und 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen	66
Abbildung 19: Echtzeit-ATP-Produktionsraten, bestimmt durch den Seahorse XF ATP Rate Assay in 7-17 ^{WT} - und 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen unter Basalbedingungen und nach 24-stündiger α CD3/ α CD28-Stimulation.....	69
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Glykolyse und der analysierten Gene.	71
Abbildung 21: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) und der analysierten Gene.....	72
Abbildung 22: Analyse der Expression von Glykolyse- und OXPHOS-assoziierten Genen in 7-17 ^{WT} - und 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen.....	73
Abbildung 23: Erhöhte HK1-Proteinexpression in 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen	75

Abbildung 24: Reduzierte HK2-Proteinexpression in 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen.....	76
Abbildung 25: Analyse der Expression Metabolismus-assoziierter Gene in 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen	77
Abbildung 26: Untersuchung der mitochondrialen Funktion in 7-17 ^{WT} - und 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen	79
Abbildung 27: Analyse der Apoptose in 7-17 ^{WT} - und 7-17 ^{ΔAHR} -Zellen	81
Abbildung 28: Analyse der IL-15Rα- und IL-7Rα-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene in AHR- defizienten 7-17-Zellen	83
Abbildung 29: Einfluss von AHR auf die Zytokin- und Chemokinexpression in T-Zellen nach TCR- Stimulation.....	85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Garman- und der Heilig & Tonegawa-Nomenklatur	3
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	20
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Kulturmedien sowie deren Zusammensetzung.....	21
Tabelle 4: Verwendete Antikörper und deren Verdünnung.....	22
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotid-Primer, deren Gennummer und Sequenz	22

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
2-DG	2-Desoxy-D-Glukose
AHR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AIP	AHR-interagierendes Protein
ALDOA	Aldolase A
AMP	Antimikrobielles Peptid
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APC	Allophycocyanin
ARNT	<i>Arylhydrocarbon nuclear translocator</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATP5MC3	ATP-Synthase-Membranuntereinheit c, Lokus 3
β2MG	β2-Mikroglobulin
BaP	Benzo[a]pyren
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BTNL	Butyrophilin-like Molekül
CCL-	Chemokin (C-C-Motiv) Ligand-
CCR-	Chemokin (C-C-Motiv) Rezeptor-
CD	<i>Cluster of Differentiation-</i>
cDC1	Klassische dendritische Zelle Typ 1
cDC2	Klassische dendritische Zelle Typ 2
cDNA	Komplementäre DNA
COX4I1	Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 4, Isoform 1
COX5B	Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5B
CYP1A1/1B1	Cytochrom-P450-Enzym 1A1 /1B1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEG	Differentiell exprimiertes Gen
DETC	Dendritische epidermale T-Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DN-DC	Doppelt-negative dendritische Zelle
ds-cDNA	Doppelsträngige cDNA
DTT	Dithiothreitol
eATP	Extrazelluläres ATP
ECAR	Extrazelluläre Ansäuerungsrate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ENO1	Alpha-Enolase
EpSCs	Epidermale Stammzellen
EZ	Epidermale Zellfraktion
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FC	fache Veränderung (<i>fold change</i>)

FCS	Fötales Kälberserum
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]carbazol
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
γδTCR	γδ-T-Zell-Rezeptor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLUT1	Glukosetransporter Typ 1
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GO	Gene Ontology
gRNA	guide-RNA
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
H60c	NKG2D-Ligand der H60-Familie
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HIF-1α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-Alpha
HIF-1β	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-Beta / ARNT
HK1	Hexokinase 1
HK2	Hexokinase 2
HRMA	Hochauflösende Schmelzanalyse
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP90	<i>Heat-Shock</i> -Protein 90
IEL	Intraepithelialer Lymphozyt
IFN-γ	Interferon-γ
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1
IL-	Interleukin-
ILC2	Angeborene lymphoide Zelle Typ 2
IL-xR	Interleukin-x-Rezeptor
IL-xRα	Interleukin-x-Rezeptor-α-Kette
ITE	2-(1H-Indol-3-ylcarbonyl)-4-thiazolcarbonsäuremethylester
JAK	Januskinase
JAML	<i>Junctional Adhesion Molecule-like</i> Protein
KGF-1/2	Keratinocyten-Wachstumsfaktor 1/2
KO	<i>Knockout</i>
LDHA	Laktatdehydrogenase A
LDHB	Laktatdehydrogenase B
LHC	Langerhans-Zelle
MAIT	Mucosa-assoziierte invariante T-Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität

MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II
MitoATP	Mitochondriale ATP-Produktion
mitoOCR	Mitochondriale Sauerstoffverbrauchsrate
Mo-DC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle
mRNA	Messenger-RNA
MT-ATP6	ATP-Synthase-Untereinheit 6 (mitochondrial kodiert)
MØ	Makrophage
mTOR	Mechanistisches Ziel von Rapamycin
MYC	MYC-Protoonkogen
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NDUFA9	NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase-Untereinheit A9
NDUFS1	NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase-Kernuntereinheit S1
NES	Normalisierter <i>Enrichment Score</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2D</i>
NKT	Natürliche Killer-T-Zelle
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate
OD	Optische Dichte
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PAS	PER-ARNT-SIM-Domäne
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDHE2	Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes)
PDHX	Pyruvatdehydrogenase-Komponente X
PE	Phycoerythrin
PEP	Phosphoenolpyruvat
PER	Protonen-Efflux-Rate
PFKFB3	6-Phosphofructo-2-Kinase/Fruktose-2,6-Bisphosphatase 3
PGAM1	Phosphoglyceratmutase 1
PGC-1α	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter-Rezeptor-γ Koaktivator 1α
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
PGK2	Phosphoglyceratkinase 2
PI	Propidiumiodid
PKM	Pyruvatkinase
PKM2	Pyruvatkinase M2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRKAA1	AMP-aktivierte Proteinkinase, katalytische Untereinheit α1
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RHEB	Ras-homolog angereichert im Gehirn

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RORyt	RAR-related orphan receptor gamma t
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RPMIc	RPMI <i>complete</i>
RPS6	Ribosomales Protein S6
RPTOR	Regulator-assoziiertes Protein von mTOR
RT	Raumtemperatur
S1PR1	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1
SCFA	Kurzkettige Fettsäure
SDHB	Succinatdehydrogenase-Eisen-Schwefel-Untereinheit
SDHD	Succinatdehydrogenase-Cytochrom-b-Untereinheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
SKINT-1	Selektions- und Erhaltungsp Protein intraepithelialer T-Zellen 1
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TCR	T-Zell-Rezeptor
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
Th17	T-Helferzelle 17
TMRM	Tetramethylrhodamin-Methylester
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TotalATP	Gesamte ATP-Produktion
Tr1	Typ-1 regulatorische T-Zelle
Treg	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRM	Geweberesidente Gedächtnis-T-Zelle
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
XRE	Xenobiotika-Responsive-Element

Abstract

The skin is a complex immunological organ that harbors a variety of specialized immune cells. In mice, dendritic epidermal T cells (DETC) are tissue-resident $\gamma\delta$ T cells that play a central role in epidermal homeostasis and wound healing. The arylhydrocarbon-receptor (AHR) is essential for the persistence of neonatal DETC, but its role in established adult DETC remains unclear.

To investigate this, a tamoxifen-inducible, DETC-specific AHR knockout mouse model as well as a cell culture model of the DETC cell line 7-17 were used, and the consequences of AHR deletion were examined *in vivo* and *in vitro*.

Analysis of the transcriptome of DETC isolated from adult mice revealed a pronounced, genotype-dependent alteration of metabolic and immune-associated signaling pathways, which became particularly evident after injury and was reflected in a differential regulation of TCR signaling and activation programs.

Even under basal conditions, AHR-deficient DETC exhibited an increased oxidative phosphorylation (OXPHOS) pathway and a reduced inflammatory signature. Following tissue injury, wild-type DETC (DETC^{WT}) cells exhibited a typical glycolysis-driven activation program. In contrast, AHR-deficient DETC (DETC^{ΔAHR}) cells maintained an oxidative metabolic profile with reduced activation of glycolytic pathways.

Deletion of the AHR led to reduced cell-surface expression of the $\gamma\delta$ T-cell receptor ($\gamma\delta$ TCR), weakened TCR-dependent activation (as evidenced by lower CD69 expression and loss of filopodia retention), and reduced induction of the activation-associated chemokines CCL3 and CCL4. Metabolic analyses using Seahorse analysis revealed a reduced glycolytic contribution to ATP production in AHR-deficient cells, accompanied by an increased mitochondrial membrane potential and enhanced ATP production from oxidative phosphorylation (OXPHOS). Accordingly, the expression of key glycolytic enzymes, particularly hexokinase 2 (HK2), was reduced, while compensatory signatures were detected through increased expression of hexokinase 1 (HK1) and hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α).

In summary, my data identify the AHR as a central regulator of metabolic flexibility and activation competence in epidermal $\gamma\delta$ T cells, which controls TCR-dependent signal transduction, functional activation programs, and adaptation to tissue-specific and

environmental signals via the coordination of glycolytic and oxidative metabolic pathways.

Zusammenfassung

Die Haut ist ein komplexes immunologisches Organ, das eine Vielzahl spezialisierter Immunzellen beherbergt. In Mäusen sind dendritische epidermale T-Zellen (DETC) gewebsständige $\gamma\delta$ T-Zellen, die eine zentrale Rolle bei der Homöostase und der Wundheilung der Epidermis spielen. Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR) ist für die Persistenz neonataler DETC essenziell, seine Rolle in etablierten adulten DETC ist jedoch nicht vollständig geklärt.

Um dies zu untersuchen, wurden ein Tamoxifen-induzierbares, DETC-spezifisches AHR-Knockout-Mausmodell sowie ein Zellkulturmodell der DETC-Zelllinie 7-17 verwendet und die Folgen der AHR-Deletion *in vivo* und *in vitro* untersucht.

Die Analyse des Transkriptoms von DETC, isoliert aus adulten Mäusen, zeigte eine ausgeprägte, genotypabhängige Veränderungen metabolischer und immunassoziierter Signalwege, die insbesondere nach Verletzung deutlich wurden und sich in einer differenziellen Regulation der TCR-Signalgebung und der Aktivierungsprogramme widerspiegelten.

Selbst im Ruhezustand wiesen AHR-defiziente DETC einen Anstieg der Signalwege der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) und eine reduzierte Entzündungs-Signatur auf. Nach Verletzung des Gewebes zeigten DETC-Zellen vom Wildtyp ein typisches Glykolyse-getriebenes Aktivierungsprogramm, während AHR-defiziente DETC-Zellen ein oxidatives Stoffwechselprofil mit reduzierter Anreicherung glykolytischer Stoffwechselwege beibehielten.

Die Deletion des AHR führte zu einer reduzierten Expression des $\gamma\delta$ T-Zellrezeptors ($\gamma\delta$ TCR) auf der Zelloberfläche, einer abgeschwächten TCR-abhängigen Aktivierung (erkennbar an geringerer CD69-Expression und fehlender Retraktion der Dendriten) sowie zu einer reduzierten Induktion der Aktivierungs-assoziierten Chemokine CCL3 und CCL4. Metabolische Analysen mittels Seahorse-Analyse zeigten einen reduzierten glykolytischen Beitrag zur ATP-Produktion in AHR-defizienten Zellen, begleitet von einem erhöhten mitochondrialen Membranpotenzial und einer gesteigerten ATP-Produktion durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS). Entsprechend war die Expression wichtiger glykolytischer Enzyme, insbesondere der Hexokinase 2 (HK2), reduziert, während gleichzeitig kompensatorische Signaturen durch eine erhöhte Expression von

Hexokinase 1 (HK1) und Hypoxie-induziertem Faktor 1 α (HIF-1 α) nachgewiesen werden konnten.

Zusammenfassend identifizieren meine Daten den AHR als zentralen Regulator der metabolischen Flexibilität und der Aktivierungskompetenz in epidermalen $\gamma\delta$ -T-Zellen, der über die Koordination glykolytischer und oxidativer Stoffwechselwege die TCR-abhängige Signaltransduktion, funktionelle Aktivierungsprogramme sowie die Anpassung an gewebespezifische und umweltabhängige Signale steuert.

1. Einleitung

1.1. Die Haut als immunologisches Grenzorgan

Die Haut ist das erste Grenzorgan, das in kontinuierlichem Kontakt mit der Außenwelt steht. Ihre einzigartige Barrierefunktion ist unerlässlich, um den Organismus wirksam vor externen Pathogenen und Umwelteinflüssen zu schützen (Abbildung 1).

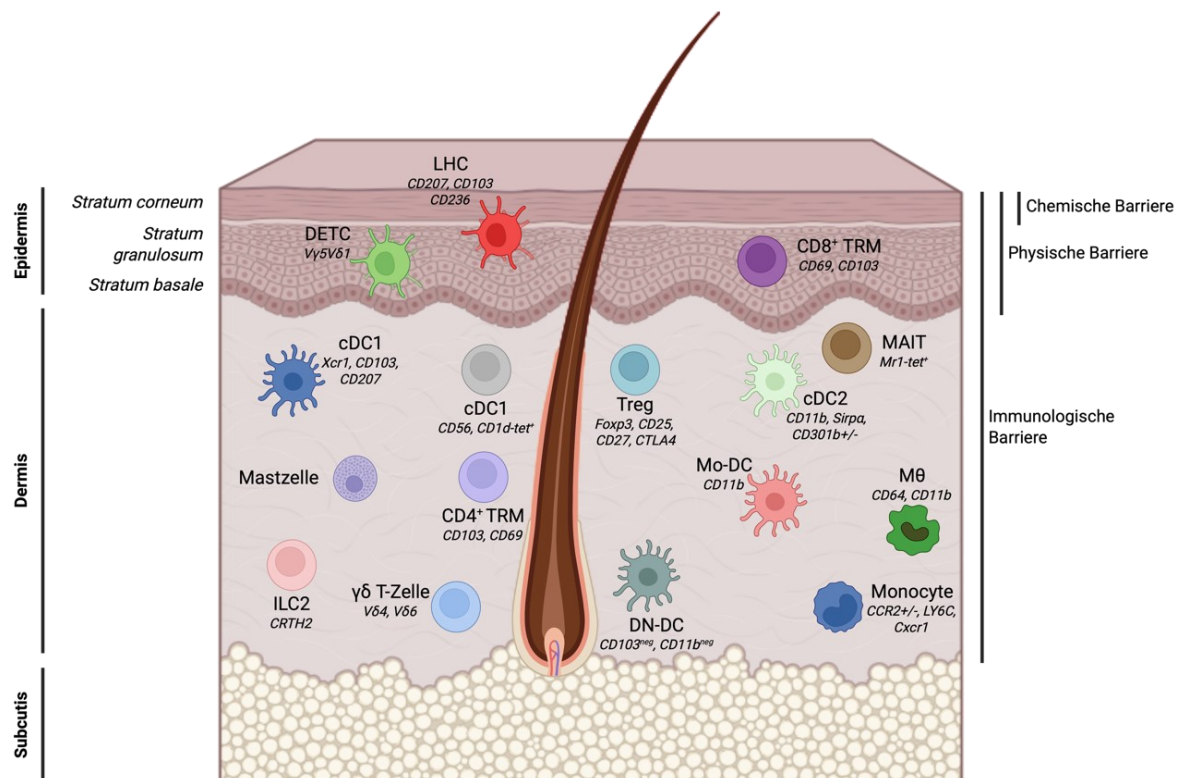


Abbildung 1: Aufbau der murinen Haut und ihre typischen Immunzellen. Die murine Haut gliedert sich in die Cutis (Epidermis und Dermis) sowie die darunterliegende Subcutis. Die lipidreiche, saure Epidermis bildet eine wichtige chemische und physische Barriere, die durch Immunzellen in der Epidermis und der Dermis ergänzt wird. Dargestellt sind die klassischen Immunzelltypen der murinen Haut sowie deren typische Oberflächenmarker. Abkürzungen: DETC (Dendritische epidermale T-Zellen), cDC1 (Klassische dendritische Zelle Typ 1), cDC2 (Klassische dendritische Zelle Typ 2), DN-DC (Doppelt-negative dendritische Zelle), ILC2 (Angeborene lymphoide Zelle Typ 2), LHC (Langerhans-Zelle), MAIT (Mucosa-assoziierte invariante T-Zelle), Mo-DC (Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle), Mφ (Makrophagen), NKT (Natürliche Killer-T-Zelle), Treg (Regulatorische T-Zelle), TRM (Geweberesidente Gedächtnis-T-Zelle). (Eigene Darstellung, angelehnt an Zhang et al. (1); erstellt mit BioRender.com)

Die Haut gliedert sich in drei Hauptschichten. Die äußerste Schicht, die Epidermis, besteht aus geschichteten Keratinozyten in fortschreitenden Differenzierungsstadien und bildet das Plattenepithel. Dieses Epithel ist entscheidend, da es unter anderem den übermäßigen Wasserverlust des Körpers verhindert. Neben den Keratinozyten beherbergt die Epidermis auch Melanozyten, die in der untersten Schicht, dem *Stratum basale*, liegen. Als Reaktion auf UV-Exposition bilden diese Zellen Melanin, ein

Pigment, das UV-Strahlen absorbiert und die Haut so vor Schäden schützt. Die zweite Schicht ist die im Vergleich deutlich dickere Dermis. Sie besteht hauptsächlich aus Fibroblasten, die durch die Produktion von Kollagen und weiteren Strukturproteinen eine robuste extrazelluläre Matrix bilden. Im Gegensatz zur Epidermis enthält die Dermis vitale Strukturen wie Blut- und Lymphgefäße, Nerven, Haarfollikel und Schweißdrüsen. Die letzte zur Haut gehörende Schicht ist die Subcutis, auch Unterhaut genannt, die aus lockerem Binde- und Fettgewebe besteht. Sie dient als schützendes Polster und fungiert als Energiespeicher, Wärmeisolation und Polsterung. Diese drei Schichten sind in allen Wirbeltieren zu finden und dienen als Nische für verschiedene Immunzellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems.

Auch den Haarfollikeln wird eine immunologische Relevanz zugeschrieben. Diese Strukturen, die sich durch die Dermis und die Epidermis ziehen, sind nicht nur für die Haarbildung zuständig, sondern beherbergen auch einen Großteil des Hautmikrobioms. Aufgrund dieser Gegebenheit findet hier eine wichtige Interaktion zwischen Immunsystem und Mikrobiom statt. Untersuchungen legen nahe, dass die Produktion von Chemokinen an den Haarwurzeln die Migration von Immunzellen beeinflusst, wobei die Haarfollikel möglicherweise von Monozyten und Langerhans-Zellen (LHC) als Route genutzt werden, um in und aus der Epidermis zu gelangen (2).

Die Epidermis beherbergt Gedächtnis- $\alpha\beta$ -T-Zellen (3,4) sowie Langerhans-Zellen. Hinzu kommen $\gamma\delta$ T-Zellen, die in der Maus den Großteil der epidermalen T-Zellen ausmachen (5). Aufgrund ihrer einzigartigen dendritischen Morphologie wurden diese Zellen als dendritische epidermale T-Zellen (DETC) bezeichnet. Im Gegensatz dazu kommen $\gamma\delta$ T-Zellen in der humanen Epidermis nur in sehr geringer Zahl vor und weisen keine dendritische Morphologie auf (6).

1.2. Epidermale $\gamma\delta$ T-Zellen

Die $\gamma\delta$ T-Zellen sind eine spezielle Untergruppe der CD3-positiven T-Zellen, die insbesondere in den Schleimhäuten von Menschen und Mäusen vorkommen. Während sie im peripheren Blut lediglich 1–5% der zirkulierenden T-Zellen ausmachen, können sie in Epithelgeweben wie dem Reproduktionstrakt, der Epidermis und dem Gastrointestinaltrakt 10 – 100% der dort residenten T-Zellen ausmachen (7).

Die Klassifizierung dieser Zellen variiert zwischen den Spezies. Bei Mäusen erfolgt die Unterscheidung der $\gamma\delta$ T-Zellen häufig anhand der Nutzung unterschiedlicher

V γ -Gene, während beim Menschen die Einteilung nach V δ -Genen erfolgt. Die dendritischen epidermalen T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen der murinen Epidermis, werden nach der Garman-Nomenklatur (8) als V γ 3V δ 1 T-Zellen bezeichnet, während sie gemäß der Heilig & Tonegawa-Nomenklatur (9) als V γ 5V δ 1 T-Zellen bezeichnet werden. Die letztgenannte Nomenklatur findet in dieser Arbeit Anwendung.

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Garman- und der Heilig & Tonegawa-Nomenklatur.

Garman	Heilig & Tonegawa	Vorkommen
V γ 1.1	V γ 1	Milz Lymphknoten, Blut
V γ 1.2	V γ 2	Thymus, peripheren Organen, Lunge, Darmepithel
V γ 1.3	V γ 3	Fötalem Thymus
V γ 2	V γ 4	Lunge, Dermis, Lymphknoten
V γ 3 (DETC)	V γ 5	Epidermis (DETC)
V γ 4	V γ 6	Genitaltrakt, Lunge, Peritonealhöhle, Dermis, Kolon
V γ 5	V γ 7	Darm (Intestinale IEL)

Der $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor ($\gamma\delta$ TCR) der DETC entsteht während der embryonalen Entwicklung im fetalen Thymus. Im Gegensatz zu anderen T-Zell-Subpopulationen exprimieren DETC einen nahezu invarianten $\gamma\delta$ TCR. Im Rahmen der TCR-Entwicklung kommt es durch die V(D)J-Rekombination zur Generierung einer hohen Diversität an TCRs. Bei DETC ist dieser Prozess stark eingeschränkt. Es werden bevorzugt Gensegmente kombiniert, für die γ -Kette V γ 5 - J γ 1 - C γ 1 (*Trgv5 – Trgj1 – Trgc1*) und für die δ -Kette V δ 1 - D δ 2 - J δ 2 - C δ (*Trdv1 – Trdd2 – Trdj2 – Trdc*), wodurch nahezu ein identischer TCR entsteht (10,11).

Der Grund für diesen invarianten TCR ohne junktionale Diversität ist der Entwicklungszeitpunkt im fetalen Thymus. Das Enzym, welches regulär für die Insertion von Nukleotiden an den Verbindungsstellen der Gensegmente verantwortlich

ist, die sogenannte terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT), weist zu diesem Zeitpunkt eine verminderte Aktivität auf (12,13).

Die $\gamma\delta$ T-Zellen in den Epithelgeweben sind Teil der dort ansässigen Lymphozyten, den sogenannten intraepithelialen Lymphozyten (engl. *Intraepithelial lymphocytes*, IELs). Epithelgewebe bestehen aus einem Netzwerk sich ständig erneuernder Zellen, die effektiv eine Abgrenzung zwischen Außenwelt und Körper bilden. Sie erfüllen eine essenzielle Schutzfunktion, indem sie den Körper gleichzeitig vor Wasser- und Nährstoffverlust, physischen Schäden und dem Eindringen von Pathogenen bewahren (14,15).

Durch diese Abgrenzung zur Außenwelt ist das Epithel ständigem Kontakt mit Mikroben (Bakterien, Viren, Pilze) ausgesetzt, die das Mikrobiom der Haut und anderer Epithelgewebe ausmachen. Die meisten dieser Mikroben sind harmlos, oft sogar nützlich, etwa durch die Herstellung von Vitaminen während der Verdauung, die der Körper selbst nicht synthetisieren kann. Dennoch stellt die ständige Präsenz potenzieller Pathogene eine anhaltende Gefahr dar. Dies macht eine strikte Kontrolle der Integrität des Epithels und der Immunantwort unabdingbar, welche vor allem durch die residenten IELs vermittelt wird (16,17).

In den letzten Jahren konnten viele Fragen bezüglich der Entwicklung, Reifung und Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen geklärt werden. Die größte Frage bleibt jedoch weiterhin offen: Bisher konnte kein spezifisches Antigen zur Aktivierung epithelialer $\gamma\delta$ T-Zellen identifiziert werden. Mögliche Hinweise liefern die Butyrophilin-ähnlichen Moleküle (engl. *Butyrophilin-like molecules*, BTNLS), die spezifische Untergruppen von $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren können. Diese Moleküle wurden ebenfalls in bestimmten Epithelgeweben, wie der Haut und dem Darm, nachgewiesen. In Verbindung mit der regulatorischen Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen deutet dies auf den Einfluss der BTNL-Moleküle hin. Sie fördern gewebespezifisch die Expansion und Reifung der $\gamma\delta$ T-Zellen (18–20).

1.2.1. Entwicklung und Migration zur Haut

In der naiven Wildtyp (WT)-Maus besteht das epidermale T-Zell-Kompartiment aus hochspezialisierten T-Zellen, die aufgrund ihrer dendritischen Morphologie auch als dendritische epidermale T-Zellen bezeichnet werden. Die ersten T-Zellen, die im Thymus der Maus gebildet werden, sind DETC, die den kanonischen V γ 5V δ 1

T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor*, TCR) ausbilden. Diese Zellen entstehen ausschließlich während des embryonalen Entwicklungszeitraums von E13 bis E18, wandern anschließend in die Epidermis ein und erhalten dort selbst eine gewisse Zelldichte (10,21).

Das Interleukin-7-Rezeptor (IL-7R)-Signal spielt eine zentrale Rolle für die V(D)J-Rekombination der γ TCR-Gene während der T-Zell-Entwicklung im Thymus. Untersuchungen mit IL-7R- oder IL-7-defizienten Mäusen zeigten den entscheidenden Einfluss dieses Signals auf die Entwicklung und das Überleben der $\gamma\delta$ T-Zellen (22–24). Der IL-7R-Signalweg wird in $V\gamma 5^+$ T-Zellen über den JAK/STAT-Signalweg vermittelt. In JAK3- oder STAT5-defizienten Mäusen konnten weder DETC-Vorläufer im Thymus noch adulte DETC in der Epidermis nachgewiesen werden (25,26).

Nach der Einwanderung in die Haut wird die homöostatische Zellzahl der DETC vor allem durch Interleukin-15 (IL-15) reguliert, das von den epithelialen Nachbarzellen produziert wird. Ein Verlust der IL-15- und/oder IL-15R-Produktion führt zum vollständigen Verschwinden der DETC aus der Epidermis (27–29).

Ursprünglich wurde angenommen, dass der DETC-spezifische $V\gamma 5V\delta 1$ TCR für die Migration und das Verbleiben der Zellen in der Haut verantwortlich sei. In $V\gamma 5$ -defizienten Mäusen konnten jedoch weiterhin $V\delta 1^+$ T-Zellen gebildet werden und in die Epidermis einwandern (30). In $V\delta 1$ -defizienten Mäusen hingegen wandern $CD4^+CD8^+ \alpha\beta$ T-Zellen in die Haut ein, die weitgehend die Funktionen der WT DETC übernehmen. Dies zeigt sich durch die Expression der Rezeptoren IL-7R und IL-15R sowie co-stimulierender Moleküle wie NKG2D (engl. *Natural Killer Group 2D*) und JAML (engl. *Junctional Adhesion Molecule-like Protein*) (31). Obwohl der TCR keinen direkten Einfluss auf die Lokalisierung der DETC in der Epidermis hat, weisen DETC mit einem TCR-Signaldefekt eine veränderte *skin-homing*-Eigenschaft auf (32). Ein ausreichendes TCR-Signal im Thymus steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Expression des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors (S1PR1), der eine zentrale Rolle beim Austritt der T-Zellen aus dem Thymus spielt (33).

Ein weiterer Faktor, der die Persistenz der DETC im Epithelgewebe beeinflusst, ist die Expression des Transkriptionsfaktors Arylhydrocarbon-Rezeptors (AHR). In *AHR-Knockout* Mäusen konnte gezeigt werden, dass DETC diesen benötigen, um sich langfristig im Gewebe zu halten. Ohne AHR wandern die Zellen zwar in die Epidermis

ein, verschwinden jedoch innerhalb von drei Wochen nach der Geburt der Mäuse wieder. Der Verlust der AHR-defizienten DETC wurde auf eine fehlende Proliferation nach der Einwanderung in die Epidermis zurückgeführt (34).

Bei der Migration vom Thymus in das Hautepithelgewebe müssen DETC zwei zentrale Herausforderungen bewältigen. Zum einen die Überwindung der großen Distanz zwischen Thymus und Haut, zum anderen den Übertritt über das dermale mikrovaskuläre Endothel in die Epidermis.

Die Migration über größere Distanzen wird durch Chemokine gesteuert. Im Falle der DETC erfolgt dies über den Chemokinrezeptor CCR10 und dessen Ligand CCL27. Beim Austritt aus dem Thymus exprimieren DETC vermehrt CCR10 (35), während CCL27 von Keratinozyten produziert wird (36). In CCR10-defizienten jungen Mäusen wurde eine deutlich reduzierte Anzahl von DETC in der Epidermis beobachtet (37). Die verbliebenen V γ 5V δ 1 T-Zellen konnten jedoch expandieren und den Verlust kompensieren, sodass in adulten Mäusen wieder WT-typische Zellzahlen erreicht wurden. Dies weist auf zusätzliche Mechanismen hin, die die Homöostase der DETC in der Haut unterstützen.

Der Chemokinrezeptor CCR4 wird von adulten DETC in der Epidermis exprimiert, während die Oberflächenexpression von CCR10 in diesem Stadium abnimmt. Im Gegensatz zu CCR10 führte die Deletion von CCR4 zu einer deutlichen Reduktion der DETC-Zahl in der Epidermis (38). Daraus lässt sich schließen, dass CCR10 vor allem für die Migration, CCR4 hingegen für die Erhaltung der DETC in der Haut verantwortlich ist.

Nach erfolgreicher Migration folgt der kritische Schritt des Übertritts durch das dermale mikrovaskuläre Endothel in die Epidermis. Dieser Prozess wird durch die Expression von E- und P-Selektin-Liganden ermöglicht, die mit den entsprechenden Selektinen am Endothel interagieren (39). Das Fehlen dieser Liganden führt zu einer deutlichen Reduktion der DETC-Zahl in der Epidermis (38).

1.2.2. Homöostase, Wundheilung und Tumormunität

Dendritische epidermale T-Zellen gehören zu den ersten Immunzellen der murinen Epidermis, die auf physische oder pathogene Reize reagieren. Unter homöostatischen Bedingungen breiten die Dendriten der DETC sich basal und apikal zum *Stratum corneum* aus. Die basalen Fortsätze verankern die Zellen an den von Keratinozyten

gebildeten *Tight Junctions*, während die apikal gerichteten Dendriten hochmobil bleiben. Ohne extrinsische Stimulation verbleiben die DETC jedoch an ihrem Ort (40,41).

Über ihre Dendriten stehen DETC mit Keratinozyten, Langerhans-Zellen und Melanozyten in engem Kontakt und können dadurch Stresssignale im Gewebe frühzeitig wahrnehmen. Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen, die für ihre Aktivierung Haupthistokompatibilitätskomplex-II-(MHC-II) -gebundenes Antigen benötigen, reagieren DETC unabhängig von MHC-II direkt auf Pathogene und geschädigte körpereigene Zellen (42).

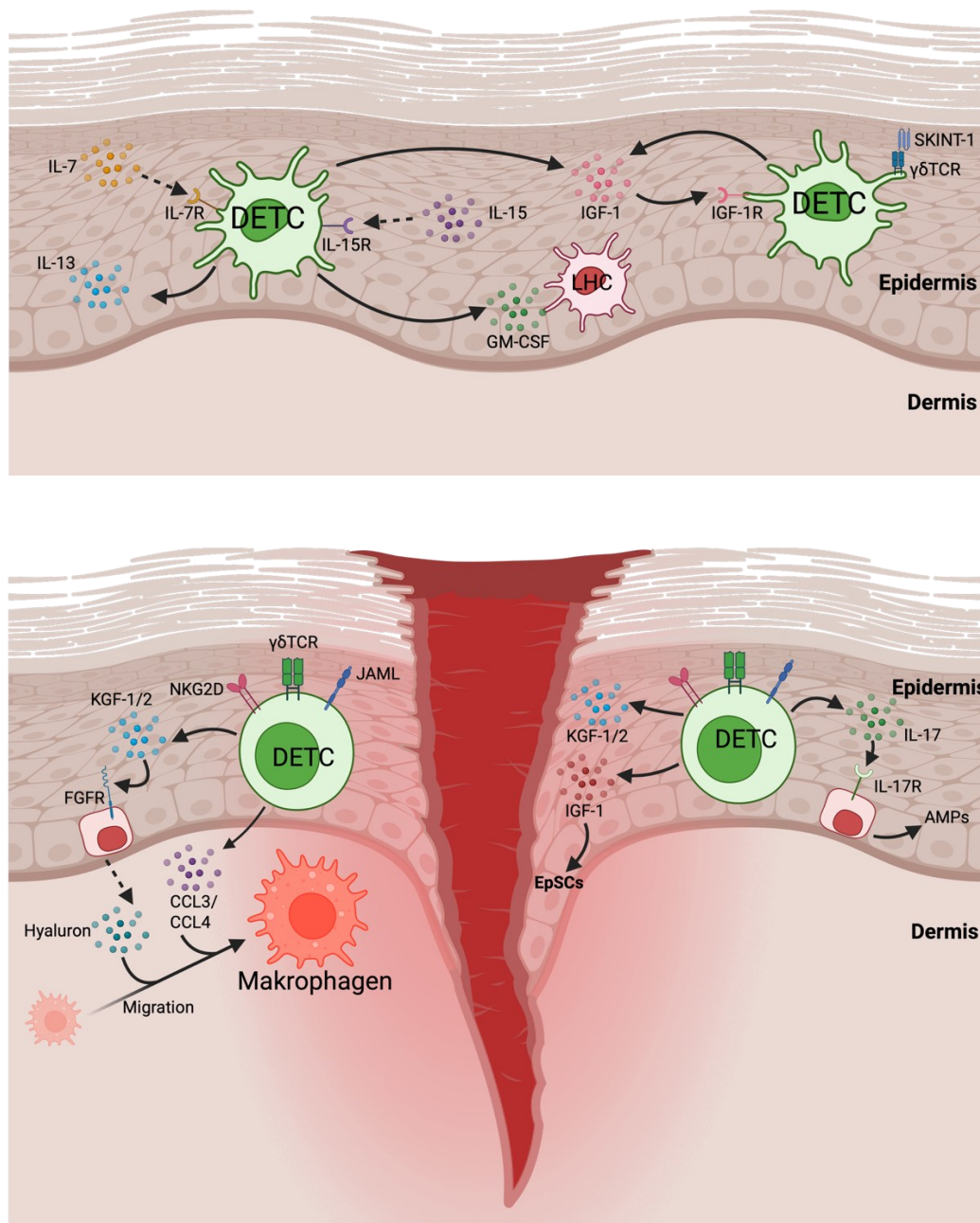


Abbildung 2: Die Rolle der DETC bei der Hauthomöostase und der Wundheilung. (A) Im homöostatischen Zustand produzieren DETC konstitutiv Zytokine und Wachstumsfaktoren, um die Proliferation und Apoptose von Keratinozyten zu regulieren. Außerdem sind sie die Hauptquelle für GM-CSF, welches für die Reifung von Langerhans-Zellen essenziell ist. Die Interaktion zwischen $\gamma\delta$ TCR und SKINT-1 erhält die epidermale Integrität und fördert die Immunüberwachung. (B) Bei einer Verletzung werden DETC vollständig aktiviert und ziehen ihre Filopodien ein. Durch die Sekretion von Chemokinen wie CCL3 und CCL4 rekrutieren sie aktiv Makrophagen zum Wundrand, aber auch indirekt über KGF-1/2, das von FGFR auf Keratinozyten erkannt wird und die Sekretion von Hyaluron initiiert. Abkürzungen: DETC (Dendritische epidermale T Zelle), LHC (Langerhans-Zelle), IL-7 (Interleukin 7), IL-7R (Interleukin 7-Rezeptor), IL-13 (Interleukin 13), IL-15 (Interleukin 15), IL-15R (Interleukin 15-Rezeptor), IL-17 (Interleukin 17), IL-17R (Interleukin 17-Rezeptor), GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor), CCL3 (Chemokin (C-C-Motiv) Ligand 3), CCL4 (Chemokin (C-C-Motiv) Ligand 4), $\gamma\delta$ TCR ($\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor), SKINT-1 (Selektions- und Erhaltungsprotein intraepithelialer T-Zellen 1), KGF-1/2 (Keratinozyten Wachstumsfaktor 1/2), IGF-1 (Insulin Wachstumsfaktor 1), JAML (Junktionsadhäsionsmolekül-ähnliches Protein), NKG2D (Rezeptor der natürlichen Killerzell-Gruppe 2, Mitglied D), AMP (Antimikrobielles Peptid). EpSCs (Epidermale Stammzellen). (Eigene Darstellung, angelehnt an Hao et al.(43); erstellt mit BioRender.com)

Obwohl der V γ 5V δ 1 TCR nicht für die Zellmigration verantwortlich zu sein scheint, wurde gezeigt, dass in Tcrd^{-/-} Mäusen $\alpha\beta$ T-Zellen mit unterschiedlichen/nicht-kanonischen TCRs in die Epidermis einwandern (31). Die Zahl dieser Zellen verringert sich jedoch im Verlauf der Zeit, da sie keine Signale der Nachbarzellen über den kanonischen $\gamma\delta$ TCR empfangen können (44). Ein weiterer Hinweis auf die Notwendigkeit eines funktionierenden T-Zell-Kompartiments bei diesen Mäusen ist die erhöhte Apoptoserate der Keratinozyten. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass ohne DETC die Produktion des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 1 (engl. *Insulin-like growth factor 1*, IGF-1) ausbleibt. Die von DETC sezernierte IGF-1-Produktion reduziert die intrinsische Apoptose und ermöglicht eine autokrine Rückkopplungsschleife, die zugleich zur Aufrechterhaltung der DETC-Population beiträgt (45).

Verletzte oder gestresste Keratinozyten exprimieren Liganden, die DETC MHC-unabhängig aktivieren. Aktivierte DETC verbleiben in der Nähe des Wundrands und fördern die Heilung durch die Sekretion verschiedener Zytokine, Chemokine sowie der Wachstumsfaktoren IGF-1 und Keratinozyten Wachstumsfaktor 1 und 2 (engl. *Keratinocyte growth factor 1 and 2*, KGF-1, KGF-2) (46–49). Darüber hinaus tragen DETC zur Rekrutierung weiterer Zellen des angeborenen Immunsystems bei. Dies kann durch die direkte Sekretion von Chemokinen wie CCL3 und CCL4 erfolgen (50,51), aber auch indirekt über die Freisetzung von KGF-1/2, welche über den *Fibroblast Growth Factor* Rezeptor (FGFR) auf Keratinozyten wirken und unter anderem die Produktion von Hyaluron induzieren (52,53). Dies wiederum unterstützt die Zellmigration und die Geweberegeneration.

Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen exprimieren DETC weder CD4 noch CD8 noch CD27 (54). Für eine effektive Aktivierung benötigen sie daher andere Oberflächenmoleküle. Bislang wurden drei relevante Moleküle identifiziert: *Junctional Adhesion Molecule-like Protein* (JAML), *Natural Killer Group 2D* (NKG2D) und Semaphorin-4D (CD100) (55–58). Können die Liganden dieser Moleküle von Keratinozyten nicht gebildet werden, resultiert dies in einer gestörten bzw. verzögerten Wundheilung.

Die Interaktion von JAML mit seinem Liganden, dem Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor, induziert die Proliferation der DETC sowie die Produktion proinflammatorischer Zytokine und von KGF-1 (56). Wird die Interaktion zwischen

NKG2D und seinem Liganden H60c unterbunden, reduziert sich ebenfalls die Sekretion von KGF (59). Die Unterbrechung beider Signalwege führt zu ähnlichen Wundheilungsdefekten wie in *Tcrd*^{-/-} Mäusen.

Ein weiteres Merkmal des Aktivierungszustands von DETC ist die Retention ihrer Filopodien. Dieser Prozess wird vor allem über die Signalweiterleitung von CD100 vermittelt, bei der ERK-Kinase und Cofilin aktiviert werden. Durch die Hochregulierung von Plexin B2 auf Keratinozyten, dem Liganden von CD100, wird die Abrundung der DETC eingeleitet. Dieser Vorgang ermöglicht die Migration der Zellen zum Wundrand, während Störungen in diesem Signalweg die Migration beeinträchtigen (57).

Neben ihrer Rolle bei der Wundheilung sind DETC auch an der Bekämpfung der malignen Entartung von Hautzellen beteiligt (60). Durch die akute Hochregulation der NKG2D-Liganden Rae-1 auf Keratinozyten kommt es zu einer schnellen, gleichzeitigen und reversiblen Aktivierung der DETC und Langerhans-Zellen sowie zu einer verstärkten Infiltration unkonventioneller $\alpha\beta$ T-Zellen. Interessanterweise limitieren DETC die Karzinogenese, während Langerhans-Zellen diese fördern (61).

Den Rezeptoren JAML und CD100 konnte bislang keine direkte Beteiligung an der Tumorabwehr zugeschrieben werden, was jedoch auf die begrenzte Datenlage zu diesen Molekülen zurückzuführen sein kann. Dennoch weist die aktuelle Forschungslage darauf hin, dass $\gamma\delta$ T-Zellen, insbesondere aufgrund ihrer Fähigkeit zur MHC-II-unabhängigen Antigenerkennung, ein vielversprechendes Ziel für künftige tumorimmunologische Therapien darstellen (62).

1.2.3. Metabolismus in T-Zellen

Über den Metabolismus von $\gamma\delta$ T-Zellen ist bislang nur wenig bekannt. Im Gegensatz dazu sind $\alpha\beta$ T-Zellen deutlich besser erforscht. Erste Studien zum Energiestoffwechsel von T-Zellen lassen sich bereits auf die Mitte des 20. Jahrhunderts zurückdatieren. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich der Energiestoffwechsel und die Nährstoffaufnahme signifikant veränderten, sobald T-Zellen aktiviert wurden (63).

Frühe Untersuchungen zeigten überraschenderweise, dass sich T-Zellen im Ruhezustand hauptsächlich auf die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) zur Energiegewinnung stützen (64). Nach der Aktivierung durch Antigenpräsentation steigt der Anteil des Adenosintriphosphats (ATP) aus der anaeroben Glykolyse (65). Dieser

Mechanismus wurde ursprünglich in malignen Zellen beobachtet und als „Warburg-Effekt“ bezeichnet (66,67).

Die Glykolyse liefert im Vergleich zur OXPHOS eine geringere ATP-Ausbeute. Dennoch bietet sie entscheidende Vorteile, denn obwohl durch die Glykolyse nur etwa zwei ATP-Moleküle pro Glukosemolekül erzeugt werden, erfolgt die ATP-Produktion wesentlich schneller. Im Vergleich dazu werden etwa 30–32 ATP-Moleküle bei vollständiger Oxidation der Glukose durch die OXPHOS gewonnen. Darüber hinaus stellt die Glykolyse essenzielle Zwischenprodukte für die Nukleotid- und Lipidsynthese bereit (68). Zudem ist die Produktion bestimmter Zytokine, wie Interferon- γ (IFN- γ), direkt von einem aktiven glykolytischen Stoffwechsel abhängig (69–71).

Naive $\alpha\beta$ T-Zellen verlassen sich im Ruhezustand primär auf die OXPHOS (72). Stoßen sie jedoch erstmals auf ein komplementäres Antigen, differenzieren sie zu Effektor-T-Zellen und gewinnen vermehrt ATP durch die Glykolyse (73). Nach der Aktivierung verfünffzehnfachte sich innerhalb von etwa 96 Stunden der ATP-Anteil, der durch die Glykolyse generiert wird (65). Diese Umstellung der Energiegewinnung ermöglicht es den T-Zellen, Zytokine wie IFN- γ oder Tumornekrosefaktor α (TNF- α) effizient zu produzieren und zu sezernieren (74).

Nach der Antigenerkennung und einer erfolgreichen Immunantwort sterben die meisten der klonal expandierten Effektor-T-Zellen wieder ab (75). Einige wenige überleben als Gedächtniszellen, um bei einer erneuten Infektion schneller und effektiver reagieren zu können (76,77). Diese Gedächtniszellen zeichnen sich unter anderem dadurch aus, dass sie eine verbesserte Kopplung glykolytischer Enzyme mit mitochondrialen Mechanismen aufweisen und bei erneutem Antigenkontakt schneller auf die Glykolyse umstellen können (78).

Während der Metabolismus von $\alpha\beta$ T-Zellen sowohl im Ruhezustand als auch im aktivierten Zustand bereits gut charakterisiert ist, bleibt der Stoffwechsel von $\gamma\delta$ T-Zellen bislang weniger gut untersucht. Obwohl es in der humanen Epidermis kein direktes funktionelles Äquivalent zu den murinen DETC gibt, weisen diese eine funktionelle Ähnlichkeit zu den Gewebe-residenten Gedächtnis-T-Zellen (engl. *Tissue-resident memory T cells*, TRMs) auf. Beide Zelltypen überwachen die Epidermis kontinuierlich, reagieren auf Stress oder Gewebeschäden und tragen langfristig zur Wundheilung und zur Gewebereparatur bei (79,80).

Bekannt ist, dass DETC nach Aktivierung über den $\gamma\delta$ TCR durch Stimulation mit α CD3/ α CD28 ebenfalls den Warburg-Effekt zeigen, also eine verstärkte Energiebereitstellung über die Glykolyse (81). Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass kurzkettige Fettsäuren (engl. *Short-chain fatty acids*, SCFAs), vor allem Butyrat, welches durch bakterielle Fermentation von Ballaststoffen und Stärke im Darm entsteht, dem Warburg-Effekt entgegenwirken und die Sekretion von IFN- γ verringern (81,82).

Darüber hinaus wurde der Zusammenhang zwischen TCR-Stimulation, Stoffwechselaktivität und Zytokinproduktion bei DETC näher untersucht. Während DETC vor allem für ihre ausgeprägte IFN- γ -Produktion nach TCR-Stimulation bekannt sind, führt eine Hemmung der Glykolyse zu einer deutlichen Reduktion dieser Zytokinproduktion (83). Ein weiterer interessanter Befund ist, dass adulte DETC im Vergleich zu proliferierenden neonatalen DETC eine geringere glykolytische Kapazität aufweisen. Diese reduzierte Kapazität beeinflusst direkt sowohl die schnelle IL-13-Antwort nach Aktivierung als auch die verzögerte IFN- γ -Produktion der adulten DETC (83). Diese Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Bedeutung der Glykolyse beziehungsweise des Warburg-Effekts für die Immunfunktionen der DETC.

1.3. Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR)

Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR) ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor der *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Familie. Aufgebaut ist er mit einer N-terminalen bHLH-Ligandenbindungsdomäne, einer C-terminalen variablen Domäne sowie einer PER-ARNT-SIM (PAS)-DNA-Bindungsdomäne. Der AHR ist auf einem Gen kodiert, das bei einer Vielzahl von Organismen gefunden wurde. Dazu gehören Nematoden, Muscheln, Fruchtfliegen und alle Wirbeltiere, was darauf hindeutet, dass es sich um ein stark konserviertes Gen handelt, das bereits vor der evolutionären Divergenz vor 550 Millionen Jahren vorhanden war (84).

Im basalen Zustand befindet sich der AHR im Zytosol gebunden in einem Komplex mit dem Chaperon HSP90, dem Co-Chaperon p23 sowie dem AHR-interagierenden Protein (AIP). HSP90 bindet sowohl an die bHLH- als auch an die PAS-Domäne und verhindert dadurch die Degradation des AHR (85). Das Co-Chaperon p23 interagiert wiederum mit dem AHR und HSP90 und verhindert die Translokation des AHR durch Bindung an ein anderes bHLH-PAS-Protein, den *Arylhydrocarbon nuclear translocator*

(ARNT) (86). Nach Bindung eines Liganden unterliegt der AHR Konformationsänderungen, wobei die Komplexproteine HSP90, p23 und AIP die bHLH-PAS-Domäne für den ARNT freigeben und die Bildung des AHR/ARNT-Heterodimers ermöglichen (87). Dieses Heterodimer ist nun in der Lage, das DNA-Sequenzmotiv 5'GCGTG-3', auch als *xenobiotic response element* (XRE) bekannt, zu binden (88). Dieses XRE befindet sich unter anderem in der Promotorregion von Phase-I- und Phase-II-Entgiftungsenzymen wie Cyp1A1, Cyp1B1 und weiteren (89) (Abbildung 3).

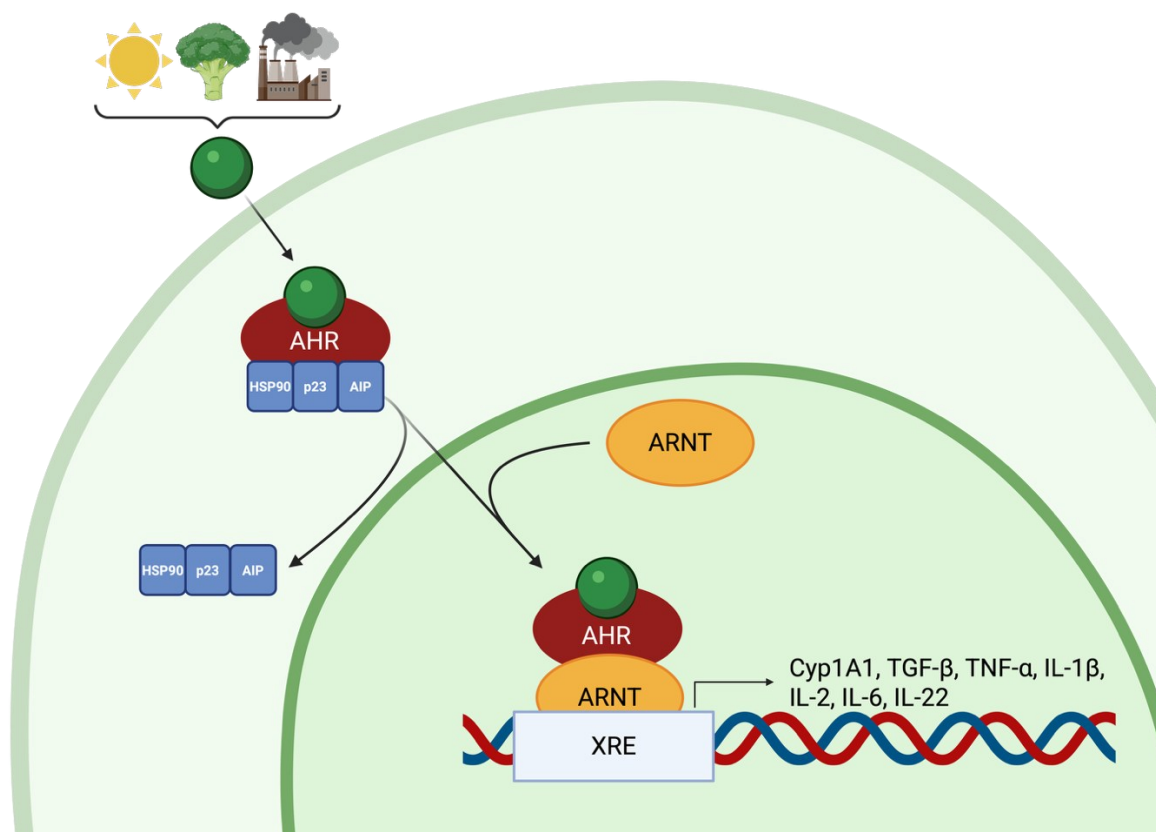


Abbildung 3: Signalweg des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AHR). Nach Bindung eines Liganden dissoziiert der AHR von HSP90, p23 und AIP und transloziert aus dem Zytosol in den Zellkern. Dort dimerisiert er mit ARNT und reguliert über die XRE-Sequenz die Expression AHR-abhängiger Gene wie Cyp1A1, Cyp1B1 und weitere (Erstellt mit BioRender.com).

Zu den Liganden des AHR gehören eine Vielzahl von Substanzen, darunter polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, halogenierte aromatische Verbindungen sowie endogene und mikrobiell gebildete Metabolite (z.B. Indolderivate). Funktionell lassen sich diese in endogene und exogene Liganden unterteilen. Besonders gut charakterisiert ist 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD), das 1976 durch das Seveso-Unglück große Aufmerksamkeit erlangte. Bei diesem Vorfall gelangte durch einen Wärmestau und die daraus resultierende Druckentlastung über ein Sicherheitsventil ca. 1 kg TCDD in die Umwelt. Die

hochaffine Bindung an den AHR beobachteten Poland et al. erstmals und beschrieben TCDD als persistenten, nicht umsetzbaren Liganden, der eine starke und langanhaltende AHR-Aktivierung vermittelte (90). Als ein weiterer exogener AHR-Ligand wurde Benzo[a]pyren (BaP) identifiziert, der ebenfalls sowohl die AHR-abhängige Genexpression als auch gentoxische Effekte auslöst (91).

Den exogenen AHR-Liganden stehen die endogenen gegenüber, insbesondere Tryptophan-Derivate wie 6-Formylindolo[3,2-b]carbazol (FICZ), das durch UV-abhängige Photokonversion von Tryptophan entsteht und hochaffin an den AHR bindet (92). Auch Kynurenin, ein weiterer Metabolit von Tryptophan, wurde als endogener AHR-Ligand beschrieben, der in immunologischen Kontexten das Überleben und die Motilität von Tumorzellen begünstigt (93).

Auch kommensale Bakterien tragen wesentlich zur Bereitstellung von AHR-Liganden bei. Darmmikroorganismen metabolisieren Tryptophan zu einer Vielzahl von Indolderivaten, wie Indol-3-Aldehyd oder Indol-3-Essigsäure, die ebenfalls als AHR-Agonisten wirken. Diese spielen eine entscheidende Rolle für die Immunhomöostase im Darm. Mikrobiell produziertes Indol-3-Aldehyd fördert die IL-22-Produktion und unterstützt damit die mukosale Barrierefunktion (94).

Ein entscheidender Punkt, in dem sich exogene und endogene AHR-Liganden unterscheiden, ist ihre Stoffwechselstabilität. Endogene Liganden werden in der Regel rasch durch AHR-induzierte Enzyme wie Cyp1A1 abgebaut und bewirken dadurch eine transiente Signalaktivierung. Im Gegensatz dazu führen die persistenten exogenen Liganden wie TCDD und BaP zu einer längeren und häufig toxischen AHR-Aktivierung (95,96).

1.3.1. Bedeutung von AHR in Immunzellen allgemein (z. B. Th17, IELs)

Der AHR ist an der Regulation verschiedener T-Zellpopulationen beteiligt, insbesondere FoxP3⁺ regulatorische (Tregs) und Typ-1 regulatorische T-Zellen (Tr1) wurden untersucht. Die Aktivierung des AHR durch verschiedene exogene und endogene Liganden (TCDD, ITE, Kyn) förderte die Differenzierung von FoxP3⁺ Tregs. Vor allem die direkte transkriptionelle Regulation von FoxP3, epigenetische Modifikationen und die Modulation dendritischer Zellen gehören dabei zu den Mechanismen, die eine Rolle spielen (97–99). Außerdem konnte beobachtet werden, dass der AHR den regulatorischen Phänotyp stabilisieren kann, indem er die STAT1-Aktivierung hemmt

und den Transkriptionsregulator Aiolos induziert. Durch diesen Regulator werden Effektor-assoziierte Gene wie *IL2* unterdrückt (100–102).

Der AHR trägt auch zur Differenzierung und zur suppressiven Funktion von Tr1-Zellen (FoxP3⁺ IL-10⁺ CD4⁺ T-Zellen) bei. IL-27 induziert in diesen Zellen die AHR-Expression über STAT3. Durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie c-Maf fördert der AHR die Expression wichtiger Zytokine der Immunregulation, darunter IL-10 und IL-21 (103). Darüber hinaus induziert der AHR zusammen mit STAT3 die Expression von CD39 (Ectonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolase 1, ENTPD1), das proinflammatorisches extrazelluläres ATP (eATP) abbaut und dadurch zur suppressiven Aktivität von Tr1-Zellen beiträgt (104,105). Die Freisetzung von eATP durch die Aktivierung von T-Zellen hemmt die Differenzierung von Tr1-Zellen über den HIF-1 α -Signalweg (104,105). HIF-1 α konkurriert mit AHR um die Interaktion mit ARNT, auch HIF-1 β genannt, und unterdrückt dadurch die AHR-abhängige Tr1-Differenzierung (105). Durch die Induktion von CD39 senkt der AHR den eATP-Spiegel und wirkt diesem Mechanismus entgegen, wodurch die AHR-abhängige Tr1-Zelldifferenzierung unterstützt wird (105). Die Wechselwirkungen zwischen AHR und HIF-1 α regulieren außerdem den Glukosestoffwechsel in Tr1-Zellen (105).

Neben seinem Einfluss auf regulatorische T-Zellen beeinflusst der AHR auch die Differenzierung von Effektor-T-Zellen wie T-Helferzellen 17 (Th17-Zellen). Th17-Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR γ t und produzieren IL-17A. Sie sind an Immunreaktionen gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze beteiligt (106,107). In Th17-Zellen wird der AHR stark exprimiert, und seine Aktivierung durch endogene Liganden verstärkt die Th17-Differenzierung und die IL-22-Produktion (108–110). Vor allem durch die Unterdrückung inhibitorischer Signalwege wie der IL-2-, STAT1- und STAT5-Signalwege (100). Das Fehlen des AHR führt zu einer reduzierten IL-22-Produktion, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass der AHR die Rekrutierung von ROR γ t an den IL-22-Promotor unterstützt (109). Diese Effekte des AHR treten hauptsächlich in den frühen Stadien der Th17-Zellen auf, wenn die Zellen noch viel IL-10 produzieren und ihr proinflammatorisches Potenzial noch nicht vollständig entwickelt ist (111).

Auch auf Gewebe-assoziierte Lymphozyten in Epithelbarrieren hat der AHR-Signalweg Auswirkungen. So beeinflusst er beispielsweise die IL-22-Produktion in Th22-Zellen

und reguliert die Expression wichtiger Faktoren für ihre Funktion in der Schleimhautimmunität (112).

Die systemische Aktivierung von AHR durch TCDD beeinträchtigt die antivirale Antwort von CD8⁺ T-Zellen durch Modulation der DC (113). Außerdem ist die Reaktion von CD8⁺ T-Zellen von TCDD-exponierten Mäusen auf eine Influenza-Virusinfektion schwächer, was auf eine langfristige Funktionsstörung aufgrund epigenetischer Veränderungen hinweist (114). Die Expression des AHR in gewebsresidenten CD8⁺ T-Zellen (TRM) ist im Gegensatz zu anderen CD8⁺ T-Zellen deutlich höher. Durch den AHR wird in diesen Zellen die Persistenz in der Haut sowie deren Schutzfunktion gegenüber mikrobiellen Infektionen unterstützt (115).

Auch in anderen $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen wird der AHR exprimiert. Die Deletion des AHR führt zu einer deutlichen Reduktion intraepithelialer Lymphozyten wie V γ 5⁺ T-Zellen in der Haut (34) sowie V γ 7⁺ T-Zellen und CD8 $\alpha\alpha$ $\alpha\beta$ T-Zellen (116). Darüber hinaus ist der AHR ebenfalls für die IL-22-Produktion von IL-17A-produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen erforderlich (117).

Transkriptionsanalysen von DETC aus AHR-defizienten, neonatalen Mäusen deckten zahlreiche Veränderungen der Genexpression auf. Mehrere differentiell exprimierte Gene standen im Zusammenhang mit Zellproliferation, Ionenhomöostase, Zytoskelett-Organisation und Entzündungssignalen (118). Dabei stellten entzündungsbezogene Signalwege die größte Gruppe der AHR-abhängigen Transkriptionsveränderungen dar. Die erhöhte Expression von *Ifng*, *Gzmf* und *Pdl1* ließ auf ein erhöhtes proinflammatorisches Potenzial in DETC von AHR-defizienten Mäusen schließen (118). Außerdem wiesen Mäuse ohne AHR-Repressor eine deutliche Reduktion der DETC in der Epidermis auf, was die strenge Regulierung des AHR-Signalwegs für die Gewebekomöostase unterstreicht (118).

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass der AHR eine zentrale Rolle bei der Regulation verschiedener T-Zellpopulationen spielt. Insbesondere deren Differenzierung, Effektor-Funktionen und metabolische Signalwege werden durch den AHR gesteuert. Die transkriptionelle Veränderung und das erhöhte Entzündungspotenzial in DETC von AHR-defizienten Mäusen unterstreichen die Bedeutung des AHR für die Aufrechterhaltung der Homöostase und die funktionelle Regulation der DETC in der Haut. Diese Beobachtungen liefern eine starke Begründung

für die weitere Erforschung der Rolle des AHR in DETC und deren immunüberwachende Funktion.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AHR) in der immunüberwachenden Funktion von epidermalen dendritischen T-Zellen (DETC) zu untersuchen.

Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass der AHR eine entscheidende Rolle bei der frühen Entwicklung und Etablierung von DETC in der Haut spielt. Eine AHR-Defizienz bei Mäusen verhindert die erforderliche Expansion der DETC nach der Einwanderung in die Epidermis, wodurch diese innerhalb der ersten drei Lebenswochen nahezu vollständig verschwinden (34).

Darüber hinaus wurde in DETC aus AHR-defizienten, neonatalen Mäusen vor ihrem Verschwinden eine ausgeprägte proinflammatorische Signatur festgestellt, die sich unter anderem durch eine erhöhte Expression von *Ifng*, *Gzmf* und *Pdl1* sowie von Chemokinrezeptoren und -liganden wie *Ccr5*, *Ccl1* und *Ccr2* auszeichnet (118).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der AHR sowohl die Persistenz als auch die Funktionen der neonatalen DETC maßgeblich beeinflusst. Allerdings ist bislang unklar, welche Rolle der AHR in bereits etablierten, adulten DETC spielt.

Durch die Generierung eines induzierbaren, DETC-spezifischen AHR-*Knockout*-Mausmodells ist es nun möglich, den Einfluss des AHR in adulten DETC gezielt zu untersuchen, ohne die frühen Entwicklungsprozesse zu beeinflussen.

Vor diesem Hintergrund zielt diese Arbeit darauf ab, ein molekulares Verständnis der Rolle des AHR in adulten DETC zu gewinnen. Dabei soll untersucht werden, wie sich der Verlust des AHR auf inflammatorische und Aktivierungs-assoziierte Prozesse, metabolische Programme sowie die funktionelle Reaktion epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen auf Stress im Gewebe auswirkt.

2. Material und Methoden

2.1. Mausmodell

TCRdCreERS-RFP-AHRflox-Mäuse wurden aus einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-TCRd-Linie (119) mit einer ROSA26-RFP-Linie 2 (120) gekreuzt (zur Verfügung gestellt von Immo Prinz, Medizinische Hochschule Hannover) und anschließend mit Mäusen, deren AHR loxP-flankiert ist, gekreuzt (Abbildung 4).

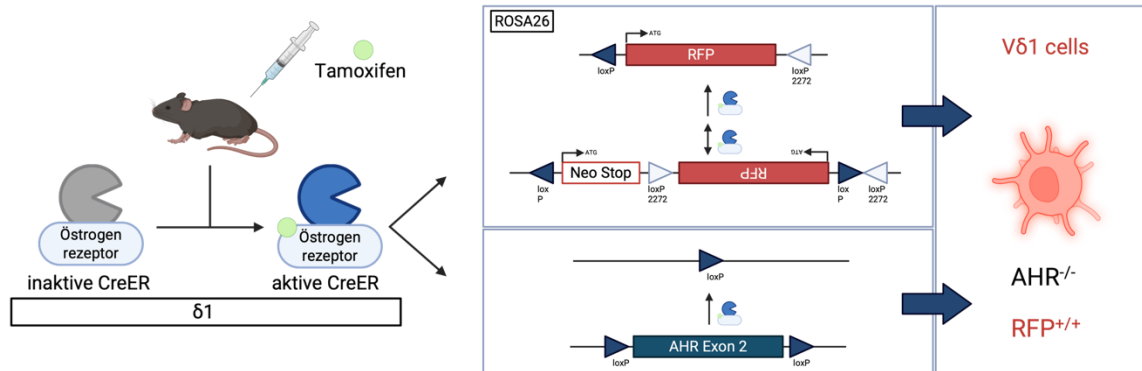


Abbildung 4: Schematische Übersicht über das Tamoxifen-induzierbare $\gamma\delta$ -T-Zell-spezifische AHR-Knockout-Modell. Eine Tamoxifen-induzierbare Cre-TCRd-Mauslinie wurde mit ROSA26-RFP-Mäusen und anschließend mit Mäusen gekreuzt, deren AHR loxP-flankiert ist. Nach Verabreichung von Tamoxifen löscht die Cre-vermittelte Rekombination das AHR-Exon 2 in $\gamma\delta$ -T-Zellen und induziert die RFP-Expression, wodurch rekombinierte Zellen identifiziert werden können.

Die daraus resultierende Linie AHR-flox/iCRE RFP deletiert den AHR spezifisch in $V\delta 1^+$ Zellen nach Tamoxifen-Injektion mit der höchsten Effizienz in DETC (DETC ^{Δ AHR}). Als Kontrolle verwendeten wir RFP-AHRflox-Mäuse, bei denen der AHR nach Tamoxifen-Injektion aufgrund des Fehlens von Cre-Rekombinase nicht deletiert wird (DETC^{WT}). Durch das RFP-DeltaNEO-Flip-Allel, welches im ROSA26-Locus eingefügt wurde, wird bei einer erfolgreichen Deletion in DETC ^{Δ AHR} RFP exprimiert. Dadurch lassen sich die Zellen mittels Fluoreszenz identifizieren und sortieren sowie die Wirksamkeit der Deletion bestimmen. Die Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen in unserer Tierhausanlage gezüchtet und gehalten, mit einer angereicherten Umgebung, *ad libitum*-Zugang zu Futter und Wasser sowie einem 12/12-Stunden-Lichtzyklus. Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV), NRW, Aktenzeichen 81-02.04.2022.A244, durchgeführt.

2.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Produkt	Hersteller	Katalognummer
2-Desoxy-D-Glucose	Sigma Aldrich	#D8375
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	#M-6250
Antimycin A	Sigma Aldrich	#A8674
BAM15	Sigma Aldrich	#SML1760
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis	#11930
Bromphenolblau	Cytiva	#11575005
Concanavalin A	Sigma Aldrich	#C5275
DAPI	Carl Roth	#6335
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth	#4984
Dithiothreitol	Sigma Aldrich	#3860-OP
dNTP	Carl Roth	#K039.1
EDTA (1%)	PAN-Biotech	#P10-026100
Ethanol	Carl Roth	#0911
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech	#P30-3031
L-Glutamin	PAN-Biotech	#P04-80050
Glycerol	Sigma Aldrich	#G2025
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth	#HN78
Hoechst 33342	Invitrogen	#H3570
Humanes IL-2	PeproTech®	#200-02
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich	#1049360500
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth	#3904
Maisöl	Thermo Fisher Scientific™	#405435000
MitoSox™ Rot	Thermo Fisher Scientific™	#M36007
MitoTracker™ Grün	Thermo Fisher Scientific™	#M7514
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega	#M1701
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich	#S2002
Natriumchlorid	Carl Roth	#3957
Natriumcitrat	Sigma Aldrich	#C-8532
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis	#20763
Natriumpyruvat	PAN-Biotech	#P04-43100
Nicht-essenzielle Aminosäuren	PAN-Biotech	#P08-32100)
NP-40/Igepal CA-630	Sigma Aldrich	#I-8896
Oligomycin	Sigma Aldrich	#HY-16589
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech	#P06-07100
PMSF	Sigma Aldrich	#P-7626
Propidiumiodid	Sigma Aldrich	#P4864
Hexanukleotid Random-Primer-Mix	Carl Roth	#HP28
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific™	#EO0381
Rotenon	Sigma Aldrich	#R8875
Tamoxifen	Sigma Aldrich	#T5648
Salzlösung nach Hanks (HBSS)	PAN-Biotech	# P04-32505
Seahorse XF 1.0 M Glukoselösung	Agilent Technologies	#103577-100

Seahorse XF 100 mM Pyruvatlösung	Agilent Technologies	#103578-100
Seahorse XF 200 mM Glutaminlösung	Agilent Technologies	#103579-100
Tetramethylrhodamin, Methylester, Perchlorat (TMRM)	Thermo Fisher Scientific™	#T668
Triton® X-100	Carl Roth	#3051
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich	#T8154
Trypsin (2,5%)	PAN-Biotech	#P10-022100
Trypsin 0,05%/EDTA 0,02%	PAN-Biotech	#P10-023100
Tween® 20	Carl Roth	#9127
Wässriges Eindeckmedium mit DAPI	Abcam	#ab104139
WesternBright Chemilumineszenz Substrat	Biozym®	#541004

2.3. Puffer und Kulturmedium

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Kulturmedien sowie deren Zusammensetzung.

Puffer/Medium	Konzentration		Zusammensetzung
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137	mM	Natriumchlorid (NaCl)
	2,68	mM	Kaliumchlorid (KCl)
	8,09	mM	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)
	1,47	mM	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
RPMI complete (RPMIc)	500	ml	RPMI 1640 (PAN-Biotech, #P04-18525)
	10	%	FCS Supreme (Hitze-inaktiviert)
	1	mM	Natriumpyruvat
	100	µM	Nicht-essenzielle Aminosäuren
	100	U	Penicillin
	100	µg	Streptomycin
	0,63	mM	HEPES
	2	mM	L-Glutamin
	50	µM	β-Mercaptoethanol
FACS-Puffer	2	mM	EDTA
	2	%	FCS Supreme (Hitze-inaktiviert)
	ad.		PBS
Seahorse XF RPMI_{Assay}	100	ml	Seahorse XF RPMI Medium (Agilent Technologies, #103576-100)
	11,1	mM	Seahorse XF 1.0 M Glukoselösung
	2,05	mM	Seahorse XF 200 mM Glutaminlösung
	2	mM	L-Glutamin
	1	mM	Seahorse XF 100 mM Pyruvatlösung
	100	µM	Nicht-essenzielle Aminosäuren
	50	µM	β-Mercaptoethanol
Nicoletti-Puffer	0,1	% (w/v)	Natriumcitrat
	0,1	% (v/v)	Triton® X-100
	50	µg/ml	Propidiumiodid
Laemmli-Puffer	312,5	mM	TRIS, pH 6,8
	10	%	SDS
	50	%	Glycerol
	250	mM	DTT
			+ Spatelspitze Bromphenolblau

TGS-Puffer	100	ml	10x Rotiphorese® 10x SDS PAGE (Carl Roth GmbH & Co. KG, #3060)
	900	ml	Aqua dest.
TBS-T-Puffer	150	mM	Natriumchlorid
	50	mM	TRIS, pH 7,6
	0,1	%	Tween® 20 (Carl Roth GmbH + Co. KG, #9127)
RIPA-Puffer	25	mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150	mM	Natriumchlorid
	0,1	mM	EDTA
	1	% (w/v)	NP-40/Igepal CA-630
	1	% (w/v)	Desoxycholsäure
	0,1	% (w/v)	SDS
	0,025	% (w/v)	Natriumazid
	5	µg/ml	PMSF

2.4. Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und deren Verdünnung

Antikörper	Konjugat	Klon	Hersteller	Katalognummer	Verdünnung
Purified Hamster Anti-Maus CD3e	Unkonjugiert	145-2C11	BD Biosciences	#553058	1:200
Purified Hamster Anti-Maus CD28	Unkonjugiert	37.51	BD Biosciences	#553295	1:200
Purified Anti-Maus CD16/32	Unkonjugiert	93	BioLegend®	#101302	1:200
Anti-Maus TCR g/d	APC	GL3	BioLegend®	#118116	1:200
Anti-Maus CD69	PE	H1-2F3	BioLegend®	#104507	1:200
Armenian-Hamster Anti-Maus γδ TCR	FITC	GL3	BD Biosciences	#553177	1:200
Goat-Anti-Armenian Hamster IgG (H+L)	Alexa Fluor™ 488 (AF488)		Invitrogen	#A78963	1:200
Anti-Maus CD127 (IL-7Rα)	APC	S18006K	BioLegend®	#158205	1:200
Anti-Maus CD215 (IL-15Rα)	PE	6B4C88	BioLegend®	#153503	1:200
Anti-AHR Antikörper	Unkonjugiert	2D1F9	Proteintech®	#67785-1-lg	1:1000
Anti-Beta 2-Mikroglobulin	Unkonjugiert		NovusBiologicals	#NBP2-15566	1:1000
Anti-Hexokinase I	Unkonjugiert	C35C4	Cell Signaling		1:1000
Anti-Hexokinase II	Unkonjugiert	C64G5	Cell Signaling	#2867T	1:1000
Ziege Anti-Hase HRP Sekundärer Antikörper	HRP		WesternSure®	#926-80011	1:5000
Ziege Anti-Maus HRP Sekundärer Antikörper	HRP		WesternSure®	#926-80010	1:5000

2.5. Oligonukleotid-Primer

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotid-Primer, deren Gennummer und Sequenz.

Gen (Primernamen)	Gennummer	Sense-Primer 5´-3´	Antisense-Primer 5´-3´
Ribosomales Protein S6	NM_009096.3	TACTGTGCCTCGTCGGTTG	TGAATCTTGGGTGCTTTGGT

(IB06RPS6RTf)			
Hexokinase 2 (LS01_mHK2_169)	NM_013820.4	GAGAGATCGACATGGGCTCA	TCGAAGGAGCCAGTGGTAAG
6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase 3 (LS02_mPFKFB3_171)	NM_133232.3	TTAGCTGCCCTGAGAGATGT	AACAGTAGGGTCGTCACAGA
Pyruvatkinase (LS03_mPKM_135)	NM_011099.4	GCTCGGCTGAATTTCTCTCA	TCCCTTTGTATCCAGAGCCA
Laktatdehydrogenase A (LS04_mLDHA_184)	NM_001136069.2	ACGTGGCTTGGAAAATCAGT	ACATTCACACCACTCCACAC
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase-Untereinheit A9 (LS05_mNDUFA9_113)	NM_025358.3	TCATGCACCTTCGTCTGATG	ATTGATGACCACGTTGCTGT
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase-Kernuntereinheit S1 (LS06_mNDUFS1_144)	NM_145518.2	AAGATTCGAGTGACAACCGG	AAACAGCATTTTGGGAGGGT
Succinatdehydrogenase-Eisen-Schwefel-Untereinheit (LS07_mSDHB_163)	NM_023374.4	AACCTCGAATGCAGACGTAC	TTGCCTCCGTTGATGTTTAT
Succinatdehydrogenase-Cytochrom-b-Untereinheit (LS08_mSDHD_197)	NM_025848.3	TGTGTCAGCATTTCTCCAGG	CCAGAGAGTAGTCCACCACA
Ubichinol-Cytochrom-c-Reduktase-Kernprotein 2 (LS09_mUQCRC2_130)	NM_025899.2	AGGAAGTCACCAGCCTTTTG	GACTTGGTTGTAGGCAGCAT
Rieske-Eisen-Schwefel-Protein (Komplex III) (LS10_mUQCRFS1_152)	NM_025710.2	CTGTTCTGGATGTGAAGCGA	ATAGTCAGAGAAGTCGGGCA
Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 4, Isoform 1 (LS11_mCOX4i1_169)	NM_009941.3	TATGCTTTCCCCACTTACGC	TCTCGTTAAACTGGATGCGG
Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 5B (LS12_mCOX5B_106)	NM_009942.2	GATAGCAGCACAGAAGGGAC	TCTCTTGTGCTGATGGACG
ATP-Synthase-Membranuntereinheit c, Lokus 3 (LS14_mATP5MC3_108)	NM_175015.3	TGCATCAGTGTTATCTCGGC	CTGGTCTGAAACTCCCTTCG
Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor γ Koaktivator 1α (LS16_mPGC1_199)	NM_008904.3	GAAGACGGATTGCCCTCATT	GGTCTGAGTGCTAAGACCG
Superoxiddismutase 2 (LS17_mSOD2_150)	NM_013671.3	GTGAACAATCTCAACGCCAC	CTTAGGGCTCAGGTTTGTC
Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A (LS18_mTFAM_184)	NM_009360.4	AGGAGGCCAAAGGATGATTCG	CGGATGAGATCACTTCGTCC
Interleukin-7 Rezeptor (LS19_mIL7R_164)	NM_008372.4	AACCTGTGCTATGGCCTAGT	AAAACCTTCCACCTCGTCCC
CD69 (LS20_mCD69_129)	NM_001033122.4	GATGCTGCTACTCTTGCTGT	GCCATTGCCCCATTCCATG
AMP-aktivierte Proteinkinase,	NM_001013367.3	ACTCAACCGGCAGAAGATTC	TGGTGTACTGATGACCTGGT

katalytische Untereinheit $\alpha 1$ (LS21_mPRKAA1_121)			
mTOR (LS22_mMTOR_172)	NM_020009.2	GACTGAAGAGCCGGAATGAG	CCCTTCTCTCATTGGCATC
T-Zell Rezeptor Delta Variable Region 1 (LS35_mTrdv1_107)	ENSMUSG0000007686 4	GCTTGCTTGGCTATTGACATT	AGCTCATGGTGACTTCATCTC
T-Zell Rezeptor Gamma Variable Region 5 (LS36_mTrgv5_149)	ENSMUSG0000007674 7	TCTTCTGTCTTTGACCTGTGT	TCAGTTGGTACCAGTGCACA
T-Zell Rezeptor Gamma Konstante Region 1 (LS38_mTrgc1_170)	ENSMUSG0000007674 9	TGGGGAAGAGCACAGATGT	GTAGGCAGAGGTGATCGTGA
T-Zell Rezeptor Delta Konstante Region (LS41_mTrdc_168)	ENSMUSG0000010487 6	CACACAAATTCAGAGCCTTGC	CCTCATGTCAGCCACCTTA
MYC-Protoonkogen (LS42_mMyc)	NM_010849.4	TTGAAGGCTGGATTTCCTTGGG C	TCGTCGCAGATGAAATAGGGCTG T
Hypoxie-induzierbarer Faktor 1α (LS43_mHif1a)	NM_001422142.1	AGCTTCTGTTATGAGGCTCACC	TGACTTGATGTCATCGTCCTC
Hexokinase 1 (LS44_mHk1)	NM_001146100	CGGAATGGGGAGCCTTTGG	GCCTTCCTTATCCGTTTCAATGG
Dihydrolipoyl-Transacetylase E2 Untereinheit (LS47_mPdhe2)	NM_008811	TCCCTCCGCATCAGAAGGT	CCAACTGGAACATCTCTGGTC
Pyruvatdehydrogenase-Komponente X (LS48_mPdhx)	NM_175094	GTGCTGGAGACTCGTTATGTG	CCTGTTTCCAATCTTCCCCTTC
Phosphoglyceratkinase 1 (LS49_mPgk1)	NM_008828	ATGTCGCTTTCCAACAAGCTG	GCTCCATTGTCCAAGCAGAAT
Pyruvatkinase M2 (LS52_mPkm2)	NM_011099	GCCGCCTGGACATTGACTC	CCATGAGAGAAATTCAGCCGAG
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (LS53_mG6pdx)	NM_008062	AGCCACATGAATGCCCTGC	CCACGATGATGCGGTTCCA
Aldolase A (LS61_mAldoa)	NM_001177307	CAAGTGCGCTGTGTGCTA	GCATAACGGGCCAGAACATTG
Phosphoglyceratmutase 1 (LS63_mPgam1)	NM_023418	TCTGTGCAGAAGAGAGCAATCC	CTGTGACACCGCCATAGTGT
α-Enolase (LS64_mEno1)	NM_023119	TGCGTCCACTGGCATCTAC	CAGAGCAGGCGCAATAGTTTTA
Glukosetransporter Typ 1 (LS71_mGlut1)	NM_011400	CTCTGTGCGGGGCATGATTG	TTGGAGAAGCCCATAAGCACA
Interleukin-15 Rezeptor α (LS74_IL15Ra_186)	NM_008358.3	CAAATGTTGCCCACTGGACA	CTGTCTCTGTGGTCATTGCG

Interferon- γ (KM17_IFNgp5)	NM_008337.4	GGCCATCAGCAACAACATAA	ATCAGCAGCGACTCCTTTTC
Chemokin (C-C-Motiv) Ligand 3 (KM03-CCL3)	NM_011337.2	CAGCCAGGTGTCATTTTCCT	CTCAAGCCCCTGCTCTACAC
Chemokin (C-C-Motiv) Ligand 4 (KM04-CCL4)	NM_013652.2	CCCACTTCCTGCTGTTTCTC	GAGGAGGCCTCTCCTGAAGT
Tumornekrosefaktor- α (mTNFa_129)	NM_001278601.1	GTGCCTATGTCTCAGCCTCT	CTGATGAGAGGGAGGCCATT

2.6. Zellbiologische Methoden

2.6.1. Zellkultur und -haltung

Die 7-17 DETC-Zelllinie wurde von Charlotte M. Bonefeld, Universität Kopenhagen, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert, dem zusätzlich 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 100 μ M nicht-essenzielle Aminosäuren, 100 U Penicillin, 0,1 mg Streptomycin, 0,63 mM HEPES und 50 μ M 2-Mercaptoethanol zugegeben wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂. Als Wachstumsfaktoren wurden 1 ng/ml humanes IL-2 und alle 4 Wochen 5 μ g/ml Concanavalin A für 6 h zugegeben. Die Langzeitkultivierung erfolgte ausschließlich in einer T175-Zellkulturflasche, für Experimente und die kurzzeitige Kultivierung (max. 1 Tag) wurden entsprechend T75-Zellkulturflaschen, 6-Well-Platten, 24-Well-Platten oder 96-Well-Platten verwendet.

2.6.2. Herstellung einer DETC-Zellkulturlinie mit AHR-Deletion

Die Generierung der 7-17 AHR-KO-Zellkulturlinie (7-17 ^{Δ AHR}) wurde mittels CRISPR/Cas9 durch die hauseigene Core Unit „*Genome engineering and model development*“ (GEMD) durchgeführt.

Eine *guide*-RNA (gRNA), die auf Exon 10 des AHR-Gens abzielt (5'-CTTCATGTTTGCTACCGGAGAGG-3'), wurde mit dem CRISPR-Designtool CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) erstellt und in eine modifizierte Version des PX458-Plasmids (Addgene, #48138) eingefügt (121). Der so entstandene bicistronische Vektor enthielt sowohl die gRNA als auch die Cas9-Nuklease. Zur Bewertung der Funktionalität und Effizienz der gRNA wurde eine hochauflösende Schmelzanalyse (HRMA) mit den folgenden Primern durchgeführt: vorwärts 5'-ACGAGAGCATTACAGAAGCGA-3' und rückwärts 5'-TGTACGAGATCTCCAGCCCT-3'.

Das Plasmid wurde mithilfe der Neon-Elektroporation (Invitrogen™ Neon™ NxT Electroporation System) in die Zellen eingebracht. Die transfizierten Zellen wurden auf dem BD ARIA III™ (Becton Dickinson) mit der BD Diva 8.0™ Software auf grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein*, GFP) selektiert. Die Zellen wurden als heterogene Zellpopulation kultiviert, da die 7-17-Zellen Kontakt mit anderen 7-17-Zellen benötigen, um zu wachsen. Aufgrund dessen konnten 7-17^{ΔAHR}-Zellen nicht vereinzelt und kultiviert werden. Die heterogene Zellpopulation wurde mittels PCR unter Verwendung der HRMA-Primer untersucht, um die mutierte Stelle in ein pGEM-T-Plasmid zu klonieren. Drei Minipräparationen wurden mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Die AHR-Deletion der verwendeten Zellen wurde vor den Experimenten mittels Western-Blot überprüft (Abbildung S 1) und lag bei ca. 85% der Zellen aus der heterogenen Zellpopulation.

2.6.3. Passagieren und Zellzählung

Nach der Kultivierung der 7-17-Zellen für sieben Tage wurden die Zellen in der Regel passagiert. Dafür wurde das RPMIc abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Für die anschließende Ablösung wurden 5 ml 2 mM EDTA auf die Zellen gegeben und für 5 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach mikroskopischer Bestätigung, dass die Zellen in Lösung waren, wurden 13 ml RPMIc hinzugefügt und die Zellsuspension 8 min bei Raumtemperatur (RT) und 200 g zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurde das Zellpellet in 1 ml RPMIc (+ 1 ng/ml human IL-2) resuspendiert, 10-20 µl entnommen, 1:2 mit Trypanblau vermengt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Der Anteil der toten Zellen, die durch den Farbstoff blau gefärbt werden, lag normalerweise zwischen 0 – 5%. Mit folgender Formel ließ sich die Anzahl der Zellen berechnen:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{Gezählte Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Gezählte Quadrate}} * 10^4$$

Für die Kultivierung in 6-Well-Platten wurden 1*10⁵ Zellen/well, in T75-Zellkulturflaschen 2,5*10⁵ – 5*10⁵, in T175-Zellkulturflaschen 0,75*10⁶ – 1*10⁶ ausgesät.

2.6.4. Zellbehandlungen

2.6.4.1. Stimulation von DETC-Zellkulturlinie 7-17

Zur Stimulierung von 7-17-Zellen wurden 3 µg/ml anti-CD3ε (Klon: 145-2C11, #553058, BD Biosciences) in PBS auf eine 6-, 24- oder 96-Well-Platte aufgetragen. $1 \cdot 10^5$ Zellen pro 6-Well (für qPCR), $1 \cdot 10^5$ Zellen pro 24-Well (für morphologische Analyse) oder $5 \cdot 10^4$ Zellen (metabolische Analyse) wurden in die anti-CD3ε-beschichteten Wells oder in die mit PBS vorbehandelten Kontrollwells gesät. Während der Aussaat wurden dem Medium zusätzlich 2 µg/ml anti-CD28 (Klon: 37.51, #553295, BD Biosciences) zugesetzt.

2.6.4.2. Apoptose-Assay (Nicoletti-Puffer)

Die Überprüfung der Apoptoserate der 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen erfolgte mithilfe des Nicoletti-Assays (122). Dazu wurden die Zellen nach der jeweiligen Behandlung abgelöst (siehe 2.6.3) und das Zellpellet in Nicoletti-Puffer, bestehend aus 0,1% (w/v) Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100 und 50 µg/ml Propidiumiodid (PI) in destilliertem Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für mindestens 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, um die Permeabilisierung der Zellmembran sowie die Färbung der DNA durch PI zu gewährleisten.

Die Messung und Analyse der DNA-Fragmentierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie am BD Canto II und der BD DIVA™ 8.0 Software. Die Identifizierung apoptotischer Zellen erfolgte anhand des Sub-G1-DNA-Gehalts. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software FlowJo 10.8.1 (FlowJo LLC).

2.6.5. Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden $3 \cdot 10^5$ 7-17^{WT} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen verwendet. Die Fc-Bindungsstellen wurden mit 5 µg/ml Ultra-LEAF™ Purified anti-Maus CD16/32 für 10 min bei 4 °C blockiert, bei 200 g für 8 min bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend 20 Minuten lang bei 4 °C mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern in FACS-Puffer gefärbt. Anschließend wurden Zellproben bei 200 g, 8 min und 4 °C zentrifugiert und ein weiteres Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Kurz vor der Messung wurde DAPI in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben.

Die Analyse und Auswertung erfolgte mit einem CytoFLEX S Durchflusszytometer (Beckman Coulter, 4-Laser-System (405 nm; 488 nm; 561 nm; 638 nm)) unter Verwendung der CytExpert-Software (Version 2.6.0.105). Zellbestandteile, Dubletten und tote Zellen wurden anhand der Lichtstreuungseigenschaften und der DAPI-Färbung ausgeschlossen. Es wurden zwischen $1 \cdot 10^4$ und $2 \cdot 10^4$ DAPI-negative Zellereignisse aufgenommen. Eine Liste der verwendeten Antikörper und Konzentrationen sind in Tabelle 4 zu finden.

Zur Analyse der mitochondrialen Parameter wurden $2 \cdot 10^5$ – $3 \cdot 10^5$ 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen 30 Minuten lang bei 4 °C in HBSS mit 250 nM MitoTracker™, zur Bestimmung der mitochondrialen Masse, mit 2,5 μM MitoSOX™ zur Erkennung der mitochondrialen Superoxidproduktion oder mit 10 nM TMRM zur Messung des mitochondrialen Membranpotenzials inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen bei 200 g, 8 min und 4 °C zentrifugiert und anschließend in FACS-Puffer resuspendiert. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde DAPI in einer Endkonzentration von 0,1 μg/ml hinzugegeben.

2.6.6. Isolation von DETC aus der Ohrepidermis

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, die gelochten Ohren (0 h, 24 h, 48 h oder 72 h nach Ohrlochung) entfernt und mit der Hautseite nach unten auf 1% EDTA gelegt und 3,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Epidermis wurde mit einer Pinzette vorsichtig von der Dermis getrennt und in PBS (+ 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA, 1 mg/ml Kollagenase P, 200 U/ml DNase I) für 40 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von RPMIc (+ 1 ng/ml humanes IL-2) gestoppt, und die Zellen wurden durch wiederholtes Aspirieren und Dispensieren getrennt. Die Zellsuspension wurde durch ein 70-μm-Sieb (BD Biosciences) gefiltert und bei 200 g für 8 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und das Zellpellet in 10 ml RPMIc (+ 1 ng/ml humanes IL-2) resuspendiert. Die Zellen wurden bis zur Antikörperfärbung über Nacht bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.6.7. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) von DETC

Vor der Färbung wurde die Zellsuspension 8 Minuten lang bei 200 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und die Konzentration mit RPMIc (+ 1 ng/ml humanes IL-2) auf $1 \cdot 10^7$ lebende Zellen pro ml eingestellt. Die Fc-Bindungsstellen

wurden mit 5 µg/ml Ultra-LEAF™ Purified anti-Maus CD16/32 blockiert. Für die Oberflächenfärbung wurde APC anti-Maus TCR γ/δ in einer Konzentration von 1 µg/ml in FACS-Puffer bei 4 °C für 20 min verwendet. Unmittelbar vor der Sortierung wurde DAPI (0,1 µg/ml Endkonzentration) zugegeben, um tote Zellen zu exkludieren. Die *Gating*-Strategie ist Abbildung 5 zu entnehmen.

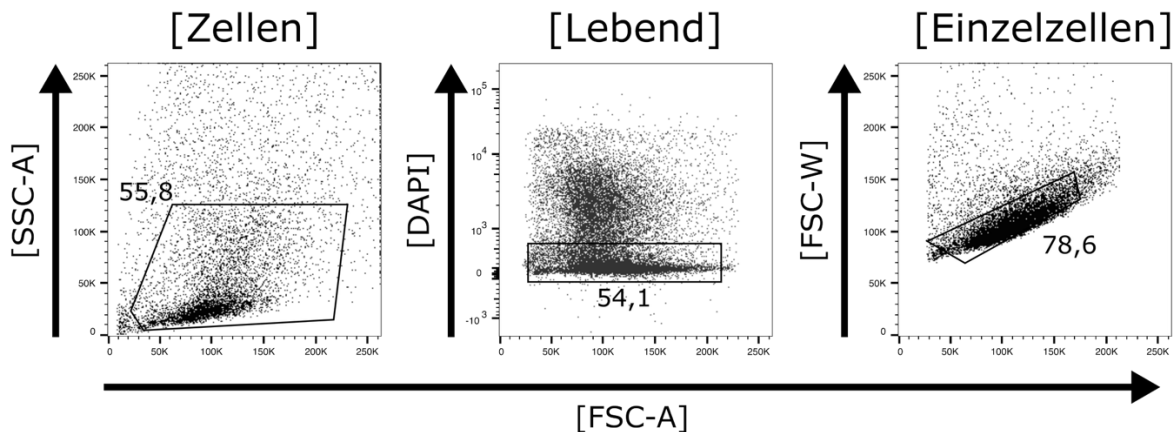


Abbildung 5: Repräsentative Darstellung der sequenziellen *Gating*-Strategie zur Identifikation von DETC mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden mit dem BD Aria III™ sortiert und mit der BD DIVA™ 8.0 Software analysiert. Tote Zellen wurden mittels DAPI, Dubletten mittels FSC-A/FSC-W ausgeschlossen. Die dargestellten Werte entsprechen den prozentualen Anteilen der jeweiligen Population (123).

Die DETC wurden mit dem BD ARIA III™ und der BD DIVA™ 8.0 Software sortiert und analysiert. Für die Sortierung und Analyse wurde ein sequenzielles *Gating* in zweidimensionalen Plots verwendet. Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wurden angewandt, um Dubletten, und DAPI-Positivität, um tote Zellen gemäß den Richtlinien für die Durchflusszytometrie (123) auszuschließen. $\gamma\delta$ TCR-positive Zellen wurden als DETC^{WT} ($\gamma\delta$ TCR⁺ RFP⁻) definiert, DETC^{ΔAHR}-Zellen ($\gamma\delta$ TCR⁺ RFP⁺) wurden zusätzlich nach RFP sortiert. Die Reinheit der sortierten Zellen lag zwischen 90% und 99%. Außerdem wurde die epidermale Zellfraktion ($\gamma\delta$ TCR⁻ RFP⁻) ebenfalls sortiert und im Folgenden EZ^{WT}, bzw. EZ^{ΔAHR} genannt.

2.6.8. Herstellung von abgelösten Epidermisschichten für histologische Untersuchung

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Ohren (0 h, 24 h, 48 h oder 72 h nach der Ohrlochung) wurden entfernt. Die Ohrhautblätter wurden mit der Hautseite auf 1% EDTA in 1x phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gelegt und für 3,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Epidermis wurde abgezogen, und die unspezifische Bindungsstelle wurde mit 10% FCS in PBS bei RT für 1 h unter Schütteln blockiert. Die DETC wurden mit 2,5 µg/ml FITC Hamster Anti-Maus $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor (Klon: GL3,

#553177, BD Pharmingen™) in 1% FCS/PBS über Nacht gefärbt, geschüttelt bei 4 °C. Anschließend wurde dreimal mit 1% FCS/PBS bei RT gewaschen und mit 2,5 µg/ml Ziege anti-aramenischer Hamster IgG (H+L) Alexa Fluor™ 488 (polyklonal, #A78963, Invitrogen) und 2,5 µg/ml Ziege anti-Ratte IgG, Texas Red-X (polyklonal, #T-6392, Invitrogen) in 1% FCS/PBS für 2 h bei RT geschüttelt gefärbt. Nach dreimaligem Waschen wurden die epidermalen Ohrblätter auf einem Objektträger ausgebreitet und mit einem DAPI-haltigen Eindeckmedium (Fluoroshield, Abcam) montiert. Die Bilder wurden mit dem Zeiss Axio Imager.M2 aufgenommen.

2.6.9. Metabolische Untersuchung mittels *Seahorse*-Analyse

Die metabolischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Deutschen Diabetes-Zentrum (DDZ) in Düsseldorf durchgeführt. Das Stoffwechselprofil von 7-17-Zellen wurde mittels der *Seahorse*-Analyse (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) bestimmt. Diese Methode misst die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette und der zytosolischen Glykolyse durch die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, in pmol/min) bzw. der extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR, in mpH/min). Aus der ECAR wurde zusätzlich die Protonen-Efflux-Rate (PER) berechnet, die als Maß für die glykolytische Protonenfreisetzung dient. Die OCR spiegelt die mitochondriale Atmung wider. Die Experimente wurden in einem 96-Well-Format mit dem *Seahorse* XF Cell Mito Stress Test Kit und dem *Seahorse* XF Glycolytic Rate Assay Kit (Agilent Technologies) durchgeführt (81,124,125). Die 96-Well-Platte wurde vor dem Experiment beschichtet, entweder mit 3 µg/ml anti-CD3ε in PBS oder nur mit PBS. Für jede Behandlung wurden sechs technische Replikate analysiert. Insgesamt wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die Zellen in den anti-CD3ε-beschichteten Vertiefungen wurden zusätzlich mit 2 µg/ml anti-CD28 (Klon 37.51, #16-0281, eBioscience) behandelt. Alle Proben wurden 24 Stunden lang bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Eine Stunde vor der Messung wurde das Kulturmedium durch *Seahorse* XF RPMI_{Assay} ersetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und 0% CO₂ wurde die Stoffwechselaktivität mit dem *Seahorse* XFe96-Gerät (Agilent Technologies) gemessen.

Es wurden vier Basalmessungen (3 min mischen, 3 min messen) durchgeführt, gefolgt von drei Messungen nach Zugabe der einzelnen Inhibitoren (3 min mischen, 3 min messen).

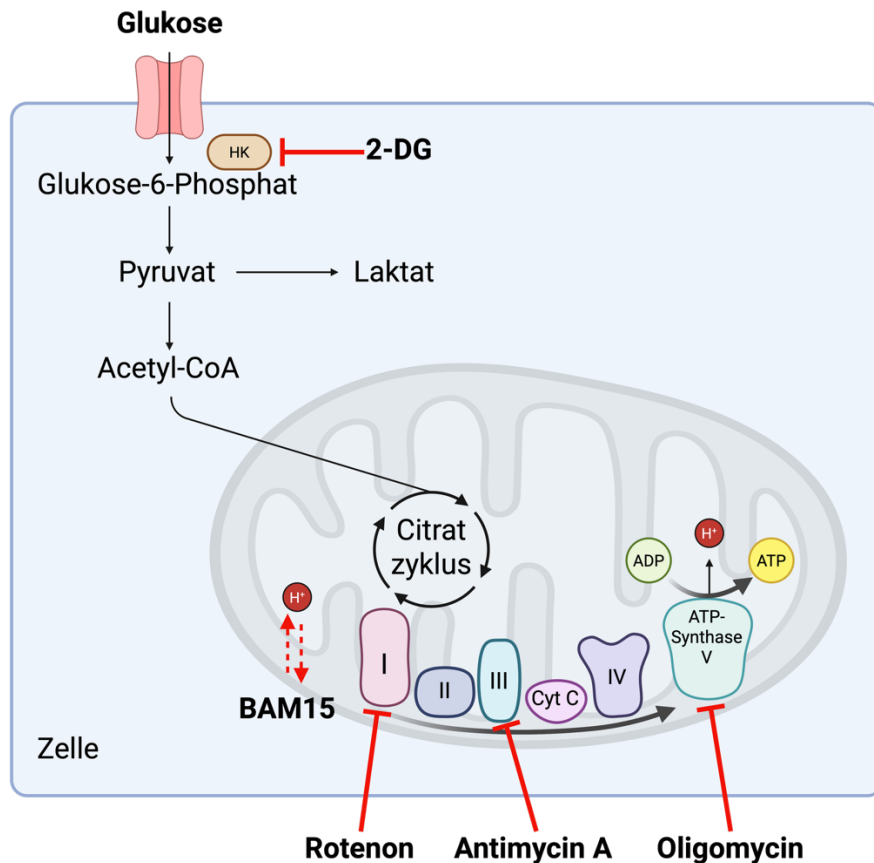


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Glykolyse und oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) sowie der Wirkmechanismen der verwendeten Inhibitoren bei der Seahorse-Analyse. 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG) hemmt die Hexokinase, Oligomycin die ATP-Synthase, BAM15 entkoppelt die Atmung durch Aufhebung des Protonengradienten, Antimycin A/Rotenon hemmen die Elektronentransportkette an Komplex III und Komplex I der OXPHOS. (Erstellt mit BioRender.com)

Die verwendeten Inhibitoren waren in dieser Reihenfolge 1 μ M Oligomycin, 2,5 μ M BAM15 als Entkoppler (126,127), 0,5 μ M Antimycin/Rotenon und 5 mM 2-Desoxy-D-Glucose mit 0,57 mM Hoechst 33342. Oligomycin hemmt die ATP-Synthase (Komplex V) und ermöglicht dadurch die Bestimmung des ATP-gekoppelten Anteils der Atmung, während BAM15 die maximale respiratorische Kapazität durch Entkopplung der Atmungskette induziert. Antimycin A und Rotenon inhibieren Komplex I und Komplex III und dadurch die mitochondriale Elektronentransportkette vollständig, wodurch die nicht-mitochondriale Respiration bestimmt werden kann. 2-Desoxy-D-Glucose (2-DG) inhibiert das Glykolyseeingangsenzym, die Hexokinase, und lässt dadurch Rückschlüsse auf den glykolytischen Anteil der gemessenen ATP-Produktion zu.

Nach Abschluss der Messung wurde die Zellzahl pro Well mittels Hoechst-Färbung bestimmt, um die metabolischen Messwerte auf die Zellkerne mit dem Cytation 5 Imaging Reader (BioTek, USA) gezählt und die Messungen auf 10.000 Zellen/Well normiert.

Die Daten wurden mit der WAVE-Software Version 2.6 (Agilent Technologies) erfasst, und die Rohdaten für OCR und Protonen-Efflux-Rate (PER, von WAVE aus ECAR berechnet) wurden zur weiteren Analyse in Excel™ 2025 (Microsoft) exportiert (128).

Die Basalatmung (mitoOCR) und die Basalglykolyse (glycoPER) wurden als die durchschnittlichen OCR- und PER-Werte vor der Zugabe eines Inhibitors definiert. Zur Bestimmung der mitochondrialen Basalatmung wurde die nicht-mitochondriale OCR (gemessen nach Injektion von Antimycin A/Rotenon) von der basalen OCR subtrahiert. Die mitochondriale ATP-Produktion (MitoATP) wurde als Differenz zwischen basaler OCR und der OCR nach Oligomycin-Injektion berechnet. Die glykolytische ATP-Produktion (GlykoATP) wurde direkt aus der GlykoPER abgeleitet. Die gesamte ATP-Produktion (TotalATP) ergibt sich aus der Summe von MitoATP und GlykoATP.

Die maximale mitochondriale Respiration wurde aus der OCR nach Zugabe des Entkopplers BAM15 abzüglich der nicht-mitochondrialen OCR berechnet. Die respiratorische Reservekapazität wurde als Differenz zwischen maximaler und basaler mitochondrialer Respiration bestimmt.

Die glykolytische Reservekapazität wurde als Differenz zwischen maximaler PER und basaler GlykoPER berechnet.

Das Protonenleck wurde aus der OCR nach Oligomycin abzüglich der nicht mitochondrialen OCR bestimmt und beschreibt den Anteil der mitochondrialen Respiration, der unabhängig von der ATP-Synthese erfolgt.

Die Kopplungseffizienz wurde als Verhältnis der mitochondrialen ATP-Produktion zur basalen mitochondrialen Respiration berechnet (128).

2.6.10. Morphologische Analyse von 7-17-Zellen

Um die Morphologie vor und nach α CD3/ α CD28-Stimulation von 7-17-Zellen zu untersuchen, wurden 24-Well-Platten verwendet. Die Wells wurden entweder nur mit PBS als Kontrolle oder mit anti-CD3-Antikörper in einer Endkonzentration von 3 μ g/ml in PBS beschichtet. Pro Well wurden 200 μ l der Antikörperlösung verwendet, und die

Platten wurden 1,5 Stunden lang bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung entfernt.

Die 7-17-Zellen wurden geerntet, gezählt und mit einer Dichte von 1*10⁵ Zellen pro Well in einem Volumen von 1 ml RPMIc (+ 1 ng/ml humanes IL-2) ausgesät. Zu den Zellen, die in CD3 beschichteten Wells ausgesät wurden, wurde dem Medium anti-CD28 Antikörper in einer Endkonzentration von 2 µg/ml hinzugefügt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Um die Zellen nach der Behandlung zu fixieren, wurde das Medium entfernt und 500 µl eiskaltes 99,6% Methanol pro Well zugegeben. Nach Entfernung des Methanols wurde die Färbung mit 500 µl Gill Nr. 3-Hämatoxylin-Lösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Wells wurden dann 5 – 10 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gespült. Um ein Ablösen der Zellen zu verhindern, wurde der Wasserstrahl nicht direkt auf die Zellschicht gerichtet, sondern die Platte in einen Behälter gestellt, in den Wasser kontinuierlich floss.

Die Bilder wurden mit einem Lichtmikroskop (Leica DMI1) mit einem 4-fach-Objektiv aufgenommen. Pro Well wurden vier zufällig ausgewählte Bildfelder aufgenommen, sodass pro Behandlung insgesamt zwölf Bilder analysiert wurden. Jede Behandlung wurde in drei Well durchgeführt. Die Analyse der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ (Version 2.14.0) unter der Verwendung der anlernbaren Weka-Segmentierung. Die Zirkularität wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zirkularität} = \frac{4\pi * \text{Fläche}}{\text{Umfang}^2}$$

Der Wert 1,0 entspricht einem perfekten Kreis, während Werte nahe 0,0 auf langgestreckte und unregelmäßige Formen hindeuten.

2.7. Molekularbiologische Methoden

2.7.1. RNA-Isolation

2.7.1.1. Isolation von RNA aus 7-17-Zellen

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem innuPREP RNA Mini Kit 2.0 (Innuscreen GmbH). Das Zellpellet wurde im bereitgestellten Lysisbuffer resuspendiert und für 5 min inkubiert. Durch die Verwendung der ersten Silica-Membran-Zentrifugationssäule wurden genomische-DNA (gDNA) und andere störende Zellbestandteile aus der Probe entfernt. Dem Filtrat wurde eine äquivalente Menge an 70% Ethanol beigelegt, wodurch die Dielektrizitätskonstante sinkt und die Bindung der RNA an der zweiten Silica-Membran-Zentrifugationssäule ermöglicht wird. Danach erfolgten Waschschriffe zunächst mit einem Hochsalz-Waschpuffer, anschließend mit einem Niedrigsalz-Waschpuffer. Um anschließend übrig gebliebenes Ethanol zu entfernen, wurde die Zentrifugationssäule bei Raumtemperatur offen für 5 min stehen gelassen, anschließend zentrifugiert, um auch das Ethanol auf der Silica-Membran zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 20 µl RNase-freiem H₂O, wobei nach der Zugabe erneut für 5 min gewartet wurde. Es erfolgte eine weitere Elution mit 20 µl RNase-freiem H₂O, um die maximale Ausbeute zu erreichen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte an einem Spektralphotometer und die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert

2.7.1.2. Isolation von RNA aus isolierten und sortierten DETC

Aus den sortierten epidermalen γδ T-Zellen wurde unmittelbar danach die RNA gewonnen. Verwendet wurde das RNeasy Micro Kit (Qiagen). Die DETC wurden bei 500 g, RT, 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 75 µl Lysisbuffer (+ 10 µl/ml β-2-Mercaptoethanol) dazugegeben.

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Auf die Verwendung von Carrier-RNA wurde verzichtet, um Interferenzen bei der RNA-Sequenzierung zu verhindern. Die RNA erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 7 µl RNase-freiem H₂O, wobei nach Zugabe des Wassers die Säulen für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden, um die maximale Ausbeute zu erzielen. Auf eine Quantifizierung der RNA wurde verzichtet, um einen Verlust der geringen RNA-Menge zu vermeiden. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C gelagert.

2.7.1.3. Konzentrationsbestimmung der RNA

Um die Konzentration der RNA zu bestimmen, wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) mit einem Spektralphotometer (NanoDrop Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific) gemessen. Die OD_{280} -Messung dient dazu, Proteinverunreinigungen in der Probe auszuschließen. Hochreine RNA hat einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,8 – 2,0. Die Konzentration der RNA ($\mu\text{g/ml}$) wird berechnet, indem der OD_{260} -Wert, der Verdünnungsfaktor sowie der festgelegte Multiplikationsfaktor von 40 für RNA miteinander multipliziert werden.

2.7.2. RNA-Sequenzierung mit Oxford-Nanopore-Technologie

Um die Rolle des AHR in DETC zu untersuchen, wurde eine RNA-Seq-basierte Transkriptomanalyse an FACS-sortierten DETC-Zellen aus gestanzten Ohren von Wildtyp-Mäusen ($DETC^{WT}$) und von DETC-spezifischen AHR-*Knockout*-Mäusen ($DETC^{\Delta AHR}$) durchgeführt. Zusätzlich zu den FACS-sortierten DETC wurde die verbleibende epidermale Zellfraktion (EZ) von $DETC^{WT}$ -Mäusen (EZ^{WT}) und $DETC^{\Delta AHR}$ -Mäusen ($EZ^{\Delta AHR}$) gewonnen, RNA isoliert und anschließend sequenziert. Die Ohren wurden durch Ohrlochstechen verletzt (145), und die Zellen wurden entweder unmittelbar nach der Isolation (Isolationszeitpunkt 0 h, ti0h) oder 24 h nach der Verletzung (ti24h) analysiert. Für die Analyse wurden jeweils getrennt für die Zeitpunkte ti0h und ti24h direkte Vergleiche zwischen $DETC^{\Delta AHR}$ und $DETC^{WT}$ sowie zwischen $EZ^{\Delta AHR}$ und EZ^{WT} durchgeführt.

Vor der Bibliothekspräparation wurden die Proben wie beschrieben (129) einer doppelsträngigen cDNA-Synthese (ds-cDNA) und -Amplifikation unterzogen. Aufgrund der sehr geringen RNA-Konzentrationen der FACS-sortierten DETC-Zellen wurden die Proben mit einem Einsatz von 1 pg verarbeitet und die ds-cDNA-Amplifikation über 23 Zyklen durchgeführt. Für Proben mit einer Konzentration unter 1 ng/ μl nach der Aufreinigung wurden weitere 8 Zyklen durchgeführt. Für EZ^{WT} und $EZ^{\Delta AHR}$ wurden 10 ng als Input verwendet und die ds-cDNA-Amplifikation über 15 Zyklen durchgeführt. Für drei Proben mit einer Konzentration unter 1 ng/ μl wurde die ds-cDNA-Synthese wiederholt, und die ds-cDNA-Amplifikation wurde über weitere acht Zyklen durchgeführt. Für die Bibliothekspräparation wurden äquimolare Mengen (40,6 fmol) pro Probe als Input für das Native Barcoding Kit 24 V14 SQK-NBD114.24 (Oxford Nanopore Technologies) verwendet. 48 fmol der finalen Bibliothek wurden auf eine

PromethION-Flowzelle geladen und 72 h lang auf einem P2-Solo-Gerät sequenziert. Die Basenbestimmung und Ausrichtung am Mausreferenzgenom (GRCm39.115) erfolgten mit Dorado (Version 0.4.3+656766b). Anschließend wurden die Rohzählwerte mit dem R-Paket Rsubread (Version 2.12.3) generiert und in eine Zählmatrix exportiert.

Die RNA-Sequenzierung wurde von der hauseigenen Core Unit „*Genome engineering and model development*“ (GEMD) durchgeführt.

2.7.2.1. Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten

Die Rohzählwerte wurden aus Excel-Dateien importiert und nach Identifizierung der Genannotationen (Ensembl-ID und Gensymbol) in eine Zählmatrix übertragen. Die differentielle Genexpressionsanalyse wurde mit dem R-Paket edgeR (Version 4.2.2) in R (Version 4.4.1) unter Verwendung eines verallgemeinerten linearen Modells (GLM) durchgeführt. Das Design wurde als ~0+Gruppe definiert, wodurch direkte Vergleiche zwischen den Gruppen (DETC^{WT} vs. DETC^{ΔAHR}, EZ^{WT} vs. EZ^{ΔAHR}) ermöglicht wurden.

Nach dem Filtern der Gene mit geringer Expression mittels filterByExpr wurde eine TMM-Normalisierung (calcNormFactors) durchgeführt. Die Dispersion wurde mit einem robusten Schätzer (estimateDisp (robust = TRUE)) bestimmt, gefolgt von einer Quasi-Likelihood-GLM-Anpassung (glmQLFit (robust = TRUE)). Der statistische Test für die differentielle Expression wurde mit glmQLFTest unter Verwendung des Kontrasts DETC^{ΔAHR} vs. DETC^{WT}, bzw. EZ^{ΔAHR} vs. EZ^{WT} durchgeführt.

Für die funktionelle Klassifizierung der Veränderung des Transkriptoms wurde eine Hallmark Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) mit dem R-Paket fgsea (Version 1.30.0) durchgeführt. Gene wurden anhand einer Rangmetrik sortiert, die Richtung und Signifikanz der veränderten Expression kombiniert (Ranking = sign(logFC) × -log₁₀(p-value)).

Bei mehrfach vorkommenden Gensymbolen wurde jeweils der Eintrag mit der höchsten Signifikanz berücksichtigt. Die Hallmark-Gensätze aus der MSigDB (Kategorie H) für *Mus musculus* wurden mit dem msigdbR-Paket (Version 25.1.1) als Referenz geladen (130). Die GSEA wurde mit einer minimalen Gensatzgröße von 10 und einer maximalen Größe von 500 Genen durchgeführt. Die angereicherten Signalwege wurden nach dem FDR-korrigierten p-Wert (Benjamini-Hochberg FDR) sortiert.

Immunassoziierte Gene wurden anhand von Gene Ontology (GO)-Annotationen (GO:0002376 (*immune system process*), GO:0006955 (*immune response*), GO:0002250 (*adaptive immune response*), GO:0006954 (*inflammatory response*), GO:0002682 (*regulation of immune system process*)) unter Verwendung des R-Pakets *org.Mm.eg.db* (Version 3.19.1) identifiziert und durch eine kuratierte Liste von TCR-Genen (*Trac*, *Trbc1*, *Trbc2*, *Trdc*, *Trgc1*, *Trgc2*, *Trav*, *Traj*, *Trbv*, *Trbj*, *Trdv*, *Trgv*) sowie Komponenten des TCR-Signalwegs (*Cd3d*, *Cd3e*, *Cd3g*, *Cd247*, *Trat1*, *Lcp2*, *Lat*, *Lat2*, *Themis*, *Lck*, *Fyn*, *Zap70*, *Itk*, *Txk*, *Ptpnc*, *Ptpn6*, *Ptpn11*, *Cd4*, *Cd8a*, *Cd8b1*, *Icos*, *Cd28*, *Ctla4*, *Pdcd1*, *Nfatc1*, *Nfatc2*, *Rel*, *Rela*, *Nfkb1*, *Nfkb2*, *Jun*, *Fos*, *Trbc1*, *Trbc2*, *Il7r*, *Ccr7*, *Klrd1*, *Klrb1c*, *Ccr10*, *Cxcr3*, *Itgae*, *Rora*) ergänzt. Immunbezogene Gene mit nominaler Signifikanz ($p < 0,05$) wurden ausgewählt. Zur Visualisierung wurden Heatmaps der logCPM-Werte nach zeilenweiser Z-Score-Skalierung erstellt, unter Verwendung des Pakets *ComplexHeatmap* (Version 2.20.0).

2.7.3. cDNA-Synthese

Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde Gesamt-RNA von 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen verwendet. Es wurden 200 ng Gesamt-RNA pro Reaktion eingesetzt.

Zunächst wurde die RNA zusammen mit dem Hexanukleotid-*Random-Primer*-Mix und einem 10 mM dNTP-Mix für 5 min bei 65 °C im T3000 PCR Thermocycler (Biometra) denaturiert und anschließend sofort auf 4 °C gekühlt.

Die reverse Transkription erfolgte in einem Reaktionsansatz aus 5x RT-Puffer (Promega), 100 mM Dithiothreitol, RiboLock RNase Inhibitor sowie 200 U M-MLV Reverse Transkriptase mit folgenden Bedingungen im T3000 PCR Thermocycler (Biometra):

Temperatur	Zeit (min)
25 °C	10
37 °C	50
70 °C	15
4 °C	Ende

Bis zur weiteren Verwendung für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (2.7.4) wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert.

2.7.4. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Für Untersuchungen der Genexpression von 7-17-Zellen wurde die quantitative PCR (qPCR) verwendet. Dies wurde mithilfe eines Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Verwendung eines SYBR Green Master Mix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Zeit	40 x
95 °C	5 min	
95 °C	8 s	
70 °C	20 s	

Relative Veränderungen der Genexpression wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ -Methode berechnet. Alle Proben wurden zunächst auf das Haushaltsgen *Rps6* normalisiert. Metabolische, $\gamma\delta$ TCR-Gene und IL7Ra/IL15Ra wurden zusätzlich für die unbehandelte 7-17^{WT}-Kontrollprobe normalisiert. Die Zytokin- und Chemokin-Analysen wurden für die α CD3/ α CD28-stimulierte 7-17^{WT}-Probe normalisiert.

Eine Liste der verwendeten Primer findet sich in Tabelle 5.

2.7.5. Immunoblot (Western Blot)

Um die Proteinexpression von 7-17^{WT}- und 7-17 ^{Δ AHR}-Zellen zu ermitteln, wurde ein Western Blot durchgeführt. Am Vortag wurden die Zellen in einer 6-Loch-Platte ausgesät und gegebenenfalls noch für 24 h α CD3/ α CD28 stimuliert. Für die Proteingewinnung wurden die Zellen von der Kulturplatte abgelöst, indem sie einmal mit PBS gewaschen und anschließend 250 μ l 2 mM EDTA hinzugefügt und für ca. 5 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Nachdem der Ablösevorgang mikroskopisch bestätigt worden war, wurde 1 ml RPMIc zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wurde bei 200 g, 8 min, RT abzentrifugiert und das Pellet in RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natriumdesoxychlorat, 0,1% SDS) mit 1 mM des Protease-Inhibitors Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert. Die Lysate wurden für 25 min auf Eis inkubiert, alle 5 min gevortext und anschließend bei 14.000 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Für die weitere Analyse wurde der Überstand verwendet.

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay (ROTI®Quant) gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Es wurden 15-30 µg Protein pro Probe mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert.

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit 10%igem Gel (TGX Stain Free FastCast Acrylamide 10%, BioRad) aufgetrennt, bis die Proben vollständig in das Sammelgel gelangt waren, durch das Anlegen einer Spannung von 80 V, anschließend von 120 V. Der anschließende Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Trans-Blot Turbo RTA Mini 0,2 µm PVDF Transfer Kit, BioRad) erfolgte im Semi-Dry-Verfahren nach Herstellerangaben.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur in 5% (w/v) BSA in TBS-T (20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 137 mM NaCl, 0,1% Tween-20) blockiert. Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C in 5% BSA in TBS-T mit den primären Antikörpern inkubiert. Alle verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Die Membranen wurden viermal mit TBS-T (je 5 min) gewaschen und anschließend mit den HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (Tabelle 4) für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut viermal mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der Proteinsignale erfolgte mittels Chemilumineszenz ECL-Substrats (WesternBright Chemilumineszenz Substrat Quantum, Biozym), erfasst im LI-COR Odyssey Fc Imager (LI-COR). Die quantitative Auswertung der Bandenintensität erfolgte mit ImageJ (NIH). Die Proteinexpression wurde auf das Referenzprotein β -2-Microglobulin (b2MG) normalisiert.

2.7.6. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Um die Konzentration von IFN- γ in 7-17-Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurden $1 \cdot 10^5$ 7-17-Zellen in 1 ml RPMIc (+ 1ng/ml humanes IL-2) Medium pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und zur Entfernung von Zellbestandteilen bei 200 g, 8 min zentrifugiert. Die Quantifizierung von IFN- γ erfolgte mittels eines Sandwich-enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA MAX™ Deluxe Set Mouse IFN- γ , Biolegend) nach Herstellerangaben.

Eine 96-Well-Platte wurde zunächst über Nacht bei 4 °C mit einem IFN- γ -spezifischen *Capture*-Antikörper beschichtet. Nach vier Waschschritten wurden unspezifische

Bindungen mittels Assay-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Anschließend wurden sowohl die Standardproben als auch die vorbereiteten Zellkulturüberstände aufgetragen und für 2 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellüberstände von unbehandelten 7-17-Zellen wurden 1:10, von α CD3/ α CD28-stimulierten 7-17-Zellen 1:500 mit Assay-Puffer verdünnt.

Nach vier Waschschritten wurde ein biotinylierter Detektionsantikörper gegen Maus-IFN- γ hinzugefügt und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut viermal gewaschen, bevor eine Avidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase (HRP) zugegeben und für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert wurde. Nach fünf weiteren Waschschritten, wobei die Waschlösung für 1 min in den Wells inkubiert wurde, wurde die Farbreaktion durch Zugabe des TMB-Substrats entwickelt. Nach 10 min Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung beendet.

Die Absorption wurde anschließend bei 450 nm im Mikroplatten-Reader (Tecan) gemessen. Zur Korrektur von Hintergrundsignalen wurde die Absorption bei 570 nm von den bei 450 nm gemessenen Werten subtrahiert. Die IFN- γ Konzentration der Proben wurde mittels einer Standardkurve bestimmt, die aus seriellen 1:2-Verdünnungen (0–1000 pg/ml) des rekombinanten IFN- γ Standards generiert wurde.

2.8. Behandlungen von Mäusen

Für alle Experimente wurden weiblich Mäuse im Alter von 8-10 Wochen verwendet. Sowohl die DETC^{WT}- als auch die DETC^{AAHR}-Linie wurden identisch behandelt. Alle experimentellen Eingriffe erfolgten nach Erlaubnis und durch Auflagen des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV), NRW, Aktenzeichen 81-02.04.2022.A244.

2.8.1. Tamoxifen-Injektion zur Deletion des AHR in DETC

Um die Deletion des AHR in DETC zu induzieren, wurde Tamoxifen intraperitoneal verabreicht. Hierfür erhielten die Mäuse 1 mg Tamoxifen, „gelöst in 100 μ l Maiskeimöl pro Injektion. Die Injektion erfolgte innerhalb einer Woche an den Tagen Montag, Mittwoch und Freitag. Sowohl die DETC^{WT}-Kontrollmauslinie als auch die zu untersuchende DETC^{AAHR}-Mauslinie wurden mit Tamoxifen behandelt. Die Experimente erfolgten drei Wochen nach der ersten Tamoxifen-Injektion.

2.8.2. Mechanische Störung der epidermalen Barriere und Messung des transepidermalen Wasserverlusts

Zur Feststellung der Hautbarriere wurde der transepidermale Wasserverlust (TEWL) gemessen. Um den Rückenbereich zu rasieren, wurden die Tiere kurzzeitig unter Isofluran-Narkose gesetzt. Anschließend wurde zunächst der basale TEWL als Ausgangswert der Hautbarriere bestimmt. Zur mechanischen Störung der epidermalen Barriere wurde der rasierte Rücken anschließend mittels der Klebeband-Abrisstechnik behandelt. Nach der mechanischen Entfernung von Teilen der *Stratum corneum* wurde der TEWL erneut bestimmt. Die Messungen erfolgten zu den Zeitpunkten 5, 10, 15 und 30 Minuten sowie 24 Stunden nach der Behandlung. Zur Aufzeichnung wurde das TEWAMETER 300 (Courage + Khazaka Electronic) verwendet. Dadurch konnten sowohl die unmittelbare Störung als auch die anschließende Regeneration der Hautbarriere analysiert werden.

2.9. Statistische Analyse

Für den Vergleich zweier unabhängiger Gruppen wurde ein zweiseitiger t-Test mit Welch-Korrektur durchgeführt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-way ANOVA) durchgeführt, wobei für explorative Analysen der Fisher-LSD-Test und für multiple Vergleiche eine Šidák-Korrektur verwendet wurde. Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism (Version 10.5.0) verwendet.

Ein Unterschied wurde als statistisch signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ war. Die statistische Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten ist in Abschnitt 2.7.2.1 erläutert.

3. Ergebnisse

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass der AHR für die Persistenz von DETC in jungen Mäusen erforderlich ist. Fehlt der AHR konstitutiv, gehen DETC innerhalb der ersten drei Lebenswochen aus der Epidermis verloren (34). In diesem Zeitraum wiesen DETC ein proinflammatorisch aktiviertes Profil auf (118), bislang blieb aber unklar, welche Rolle der AHR in bereits etablierten adulten DETC spielt.

Durch die Generierung eines Tamoxifen-induzierbaren Mausmodells ist es nun möglich, den AHR spezifisch in adulten DETC zu deletieren und damit seine Funktion unabhängig von neonatalen Entwicklungs- und Persistenz-Effekten zu untersuchen.

Eine besondere experimentelle Herausforderung bestand darin, dass DETC in der murinen Epidermis nur einen kleinen Anteil von 1-5% der Zellen ausmachen und nach der Isolation nur in begrenzter Zahl verfügbar sind (7). Dies schränkte Analysen ein, die größere Zellmengen erforderten. Ergänzend zu den *in vivo* Experimenten wurde daher die DETC-Zelllinie 7-17 verwendet, um weiterführende Untersuchungen durchzuführen, für die große Mengen an Zellen benötigt werden. Zeitgleich reduziert es die Anzahl der Versuchstiere im Sinne des 3R-Prinzips.

3.1. Durchflusszytometrische Isolierung und Charakterisierung von DETC^{WT} und DETC^{ΔAHR}

Zur Untersuchung der Rolle des AHR in der adulten Epidermis wurde ein konditionell deletierbares Mausmodell herangezogen (siehe Material und Methoden 2.1.). Bei diesem Mausmodell führte die Tamoxifen-Injektion dazu, dass der AHR spezifisch in DETC deletiert wurde. Zeitgleich wurde durch die Aktivierung der Cre-Rekombinase das rot fluoreszierende Protein (RFP) in den Zellen exprimiert, das auf einem DeltaNeo-Flip-Allel im ROSA26-Lokus lag. Dadurch war es möglich, nach Isolation der DETC aus der murinen Epidermis mit Hilfe der Durchflusszytometrie diese DETC^{ΔAHR}-Zellen ($\gamma\delta$ TCR⁺ RFP⁺) zu identifizieren und zu sortieren (Abbildung 7).

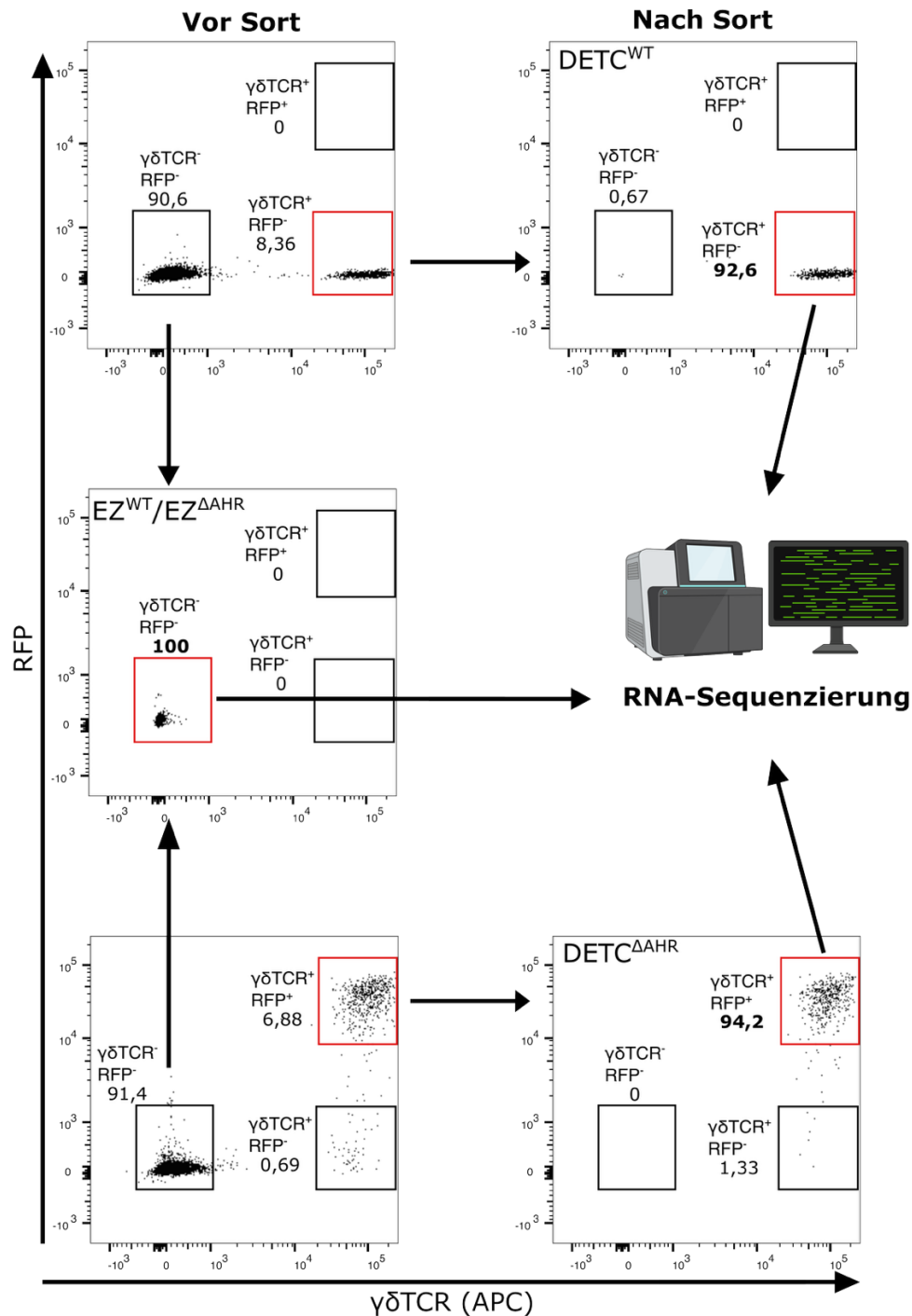


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Untersuchung isolierter DETC^{ΔAHR}. Tote Zellen wurden mit Hilfe von DAPI ausgeschlossen. Die Zellsuspension wurde mit einem APC anti-Maus TCR γ/δ Antikörper gefärbt. DETC, bei denen die Cre-Rekombinase durch die Injektion von Tamoxifen aktiviert und der AHR deletiert wurde, exprimierten zusätzlich RFP. Abkürzungen: DETC (Dendritische epidermale T-Zellen), EZ (Epidermale Zellfraktion), RFP (Rot fluoreszierendes Protein), γδTCR (γδ T-Zell-Rezeptor), APC (Allophycocyanin).

Die Isolation der DETC aus der aurikulären Epidermis erfolgte wie beschrieben (2.6.6). Nachdem die DETC in einer Zellsuspension vorlagen, wurden sie über Nacht in einem auf T-Zellen abgestimmten Medium (RPMIc + 1 ng/ml humanes IL-2) im Kühlschrank (4 °C) gelagert. Die Isolation erfordert eine Inkubation der Epidermis in Trypsin, wobei

auch der $\gamma\delta$ TCR auf der Oberfläche verloren geht und eine durchflusszytometrische Sortierung nicht möglich war. Am darauffolgenden Tag und nach der Inkubation im Kühlschrank konnte der $\gamma\delta$ TCR wieder angefärbt werden.

Die Anzahl der $\gamma\delta$ TCR⁺RFP⁺-Zellen (DETC ^{Δ AHR}) war in einzelnen Tieren unterschiedlich und betrug 4,06 – 6,88% aller Einzelzellen. Die Anzahl der $\gamma\delta$ TCR⁺RFP-Zellen in DETC ^{Δ AHR}-Mäusen lag zwischen 0,35% und 0,98%. Die Deletionsrate des AHR in DETC lag zwischen 84,49 – 94,46% (n=6).

Diese Ergebnisse bestätigen die erfolgreiche Isolation und Deletion des AHR in DETC ^{Δ AHR} und bilden die Grundlage für die nachfolgenden funktionellen und transkriptomischen Analysen.

3.2. AHR-Deletion verändert das Transkriptionsprofil von DETC nach epidermaler Verletzung

3.2.1. Globale Transkriptionsveränderungen und Signalwege (GSEA)

Dendritische epidermale T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Reaktion der Haut auf Verletzungen und Stress (45). Aufgrund dessen wurde untersucht, wie der Verlust des AHR in aurikulären DETC die Transkription in diesen und umliegenden epidermalen Zellen ($\gamma\delta$ TCR⁺RFP⁺) nach der Verletzung beeinflusst. Bei ti24h musste eine DETC^{WT}-Probe von der Analyse ausgeschlossen werden, da sie nach der Qualitätskontrolle deutlich von anderen Proben abwich (Abbildung S 2).

Dafür wurde die Genexpression der DETC ^{Δ AHR} ($\gamma\delta$ TCR⁺RFP⁺) und DETC^{WT} ($\gamma\delta$ TCR⁺RFP⁺) direkt nach (engl. *time of isolation* 0 h, ti0h) und 24 h nach Ohrlochung (ti24h) analysiert. Abbildung 8 zeigt die Überlappung der differentiell exprimierten Gene (DEG) in DETC ^{Δ AHR} zwischen ti0h und ti24h.

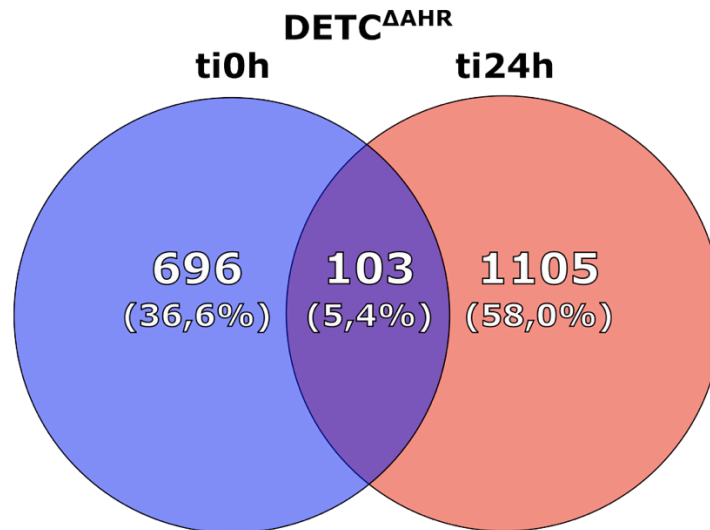


Abbildung 8: Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene (DEG) in DETC^{ΔAHR} zu den Zeitpunkten ti0h und ti24h. Berücksichtigt wurden Gene mit einem p-Wert < 0,05. Dargestellt ist die Anzahl der exklusiv sowie gemeinsam regulierten Gene zwischen den beiden Zeitpunkten. Die Zahlen geben die absolute Anzahl der Gene an, die Prozentwerte beziehen sich auf die Gesamtzahl der in der Analyse enthaltenen DEG.

Bei ti0h wurden 799 DEG (p-Wert < 0,05) identifiziert, 504 waren in DETC^{ΔAHR} hoch- und 295 herunterreguliert. Zum Zeitpunkt ti24h erhöhte sich die Anzahl der DEG auf 1.208, von denen 595 hoch- und 613 herunterreguliert waren. Dies zeigt, dass sich das Transkriptom der DETC^{ΔAHR} im zeitlichen Verlauf der Verletzungsantwort deutlich verändert. Insbesondere nimmt die Anzahl der herunterregulierten Gene bei ti24h in DETC^{ΔAHR} zu (295 vs. 613). Die Überlappung der DEG zwischen ti0h und ti24h ist mit 103 Genen (5,4%) vergleichsweise gering, was auf eine zeitabhängige Regulation unterschiedlicher Genprogramme hinweist.

Zur funktionellen Interpretation der RNA-Sequenzierungsdaten zwischen DETC^{WT} und DETC^{ΔAHR} zu den Zeitpunkten ti0h (Abbildung 9A) und ti24h (Abbildung 9B) wurde eine Hallmark Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) durchgeführt. Die Hallmark GSEA wurde eingesetzt, um Veränderungen in biologischen Prozessen auf Ebene von Signalwegen zu erfassen, anstatt einzelne Gene isoliert zu betrachten. Dafür wurden Gene zu 50 funktionellen Gruppen zusammengefasst, wodurch sich komplexe Transkriptionsänderungen besser in einen biologischen Kontext einordnen lassen (130).

Für die Analyse wurden Ranglisten der DEG für ti0h und ti24h verwendet, wobei die Gene anhand einer Metrik sortiert wurden, die sowohl die Richtung als auch die

Signifikanz der veränderten Genexpression berücksichtigte ($\text{sign}(\log\text{FC}) \cdot -\log_{10}(\text{p-Wert})$).

In Abbildung 9 sind für ti0h (Abbildung 9A) und ti24h (Abbildung 9B) die zehn am stärksten angereicherten Hallmark-Signalwege nach FDR-korrigiertem p-Wert (Benjamini-Hochberg FDR) dargestellt.

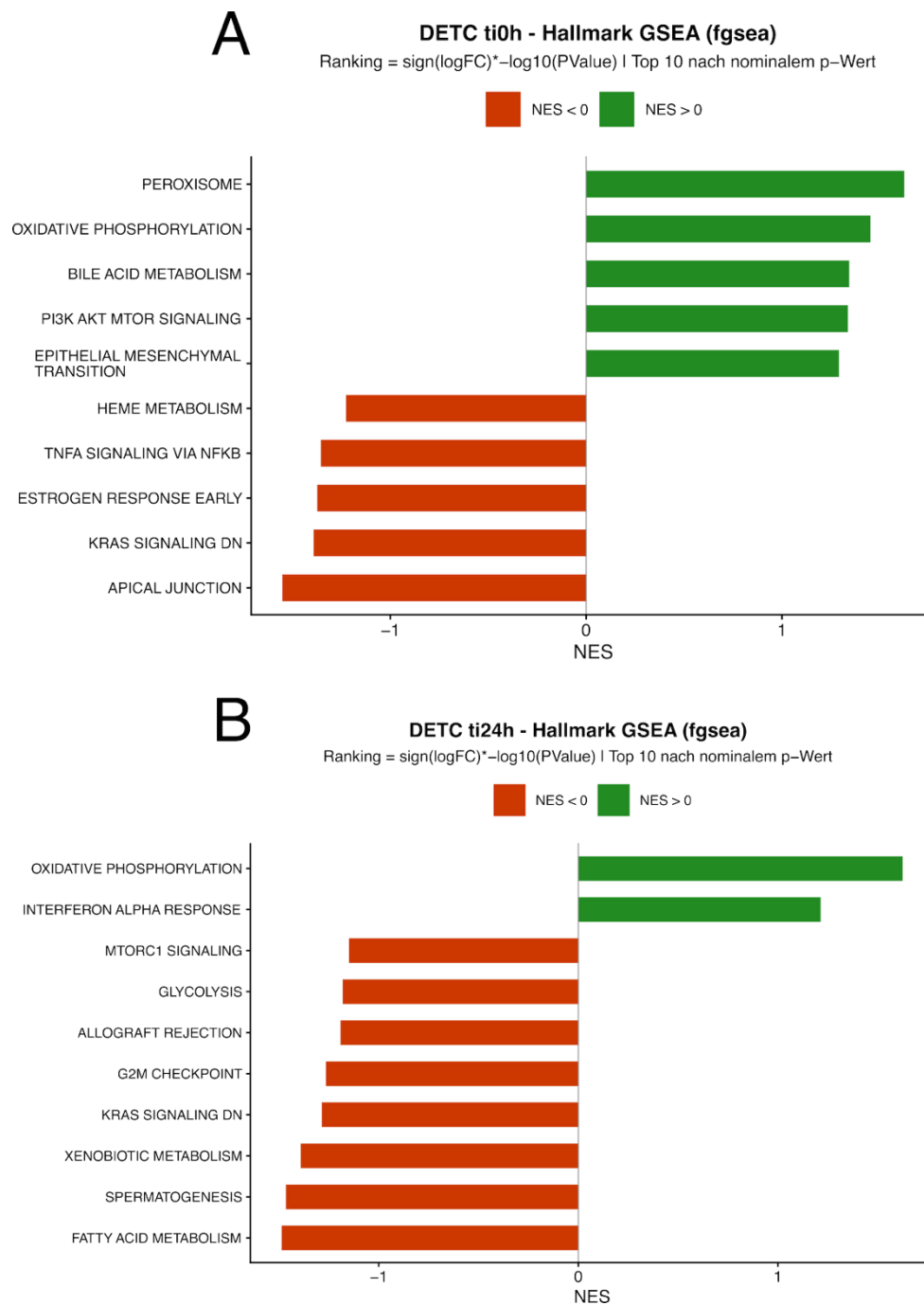


Abbildung 9: Hallmark Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) von durchflusszytometrisch sortierten DETC^{WT} und DETC^{AAHR} 0 h (A) und 24 h (B) nach Ohrverletzung. Die normalisierten Anreicherungswerte (NES) der am stärksten angereicherten Signalwege sind nach dem FDR-korrigierten p-Wert (Benjamini-Hochberg-FDR) sortiert. Positive NES (grün) zeigen eine Anreicherung in DETC^{AAHR} an, negative NES (rot) eine Anreicherung in DETC^{WT}.

Insgesamt zeigt die Hallmark-GSEA, dass der Verlust des AHR in DETC^{ΔAHR} mit einer stärkeren Repräsentation metabolischer Signalwege und einer geringeren Repräsentation inflammatorischer Signalwege verbunden ist.

Bei Zeitpunkt ti0h (Abbildung 9A) waren mehrere Signalwege (FDR <0,25) in DETC^{ΔAHR} positiv angereichert, darunter *Oxidative_Phosphorylation* (Normalised enrichment score (NES) = 1,45) und *Peroxisome* (NES = 1,62), die mit mitochondrialen und oxidativen Stoffwechselprozessen assoziiert sind. Gleichzeitig waren proinflammatorische Signalwege wie *Tnfa_Signaling_Via_Nfkb* (NES = -1,35) und *Apical_Junction* (NES = -1,55) negativ angereichert. Damit zeigt sich im Vergleich zu DETC^{WT} zum Zeitpunkt ti0h in DETC^{ΔAHR} eine Anreicherung metabolischer Signalwege bei gleichzeitiger reduzierter Anreicherung inflammatorischer Signalwege.

Zum Zeitpunkt ti24h nach Verletzung der Epidermis (Abbildung 9B) war erneut in DETC^{ΔAHR} die *Oxidative_Phosphorylation* (NES = 1,63) positiv angereichert. Dies spricht dafür, dass mitochondrial-assoziierte Genprogramme auch 24 h nach Verletzung weiterhin in DETC^{ΔAHR} im Vergleich zu DETC^{WT} stärker repräsentiert sind.

Zeitgleich waren *Fatty_Acid_Metabolism* (NES = -1,49) und *Glycolysis* (NES = -1,18, nicht signifikant) negativ angereichert. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in DETC^{ΔAHR} während der Gewebereaktion auf Verletzung erhalten bleibt, während andere metabolische Programme wie der Fettsäuremetabolismus und die Glykolyse im Vergleich zu DETC^{WT} reduziert sind.

DETC stehen über ihre Dendriten kontinuierlich mit Keratinozyten und anderen epidermalen Zellen in Kontakt. Daher wurde zusätzlich untersucht, wie sich der AHR-Verlust in DETC auf die umliegende epidermale Zellfraktion (EZ^{ΔAHR} für DETC^{ΔAHR}-Mäuse, EZ^{WT} für DETC^{WT}-Mäuse) auswirkt (Abbildung 10).

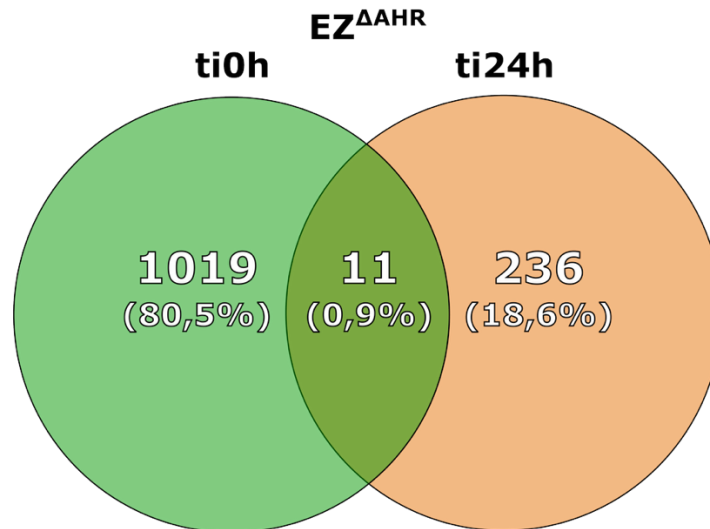


Abbildung 10: Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene (DEG) in $EZ^{\Delta AHR}$ zu den Zeitpunkten ti0h und ti24h. Berücksichtigt wurden Gene mit einem p-Wert $< 0,05$. Dargestellt ist die Anzahl der exklusiv sowie gemeinsam regulierten Gene zwischen den beiden Zeitpunkten. Die Zahlen geben die absolute Anzahl der Gene an, die Prozentwerte beziehen sich auf die Gesamtzahl der in der Analyse enthaltenen DEG.

Bei ti0h konnten in $EZ^{\Delta AHR}$ im Vergleich zu EZ^{WT} 1030 DEG identifiziert werden, von denen 850 hoch- und 180 herunterreguliert waren. Nach 24 h waren es hingegen nur noch 247 DEG, von denen 106 hoch- und 141 herunterreguliert waren.

Die Anzahl der DEG in $EZ^{\Delta AHR}$ ist damit bei ti24h deutlich geringer als bei ti0h. Außerdem zeigt das Venn-Diagramm, dass nur 11 Gene zu beiden Zeitpunkten gemeinsam differentiell exprimiert wurden. Dies spricht dafür, dass sich die transkriptomischen Programme zwischen ti0h und ti24h deutlich unterscheiden.

Analog zur Analyse der DETC wurde zur funktionellen Einordnung der differentiellen Genexpression in der epidermalen Zellfraktion eine Hallmark GSEA für die Zeitpunkte ti0h (Abbildung 11A) und ti24h (Abbildung 11B) durchgeführt.

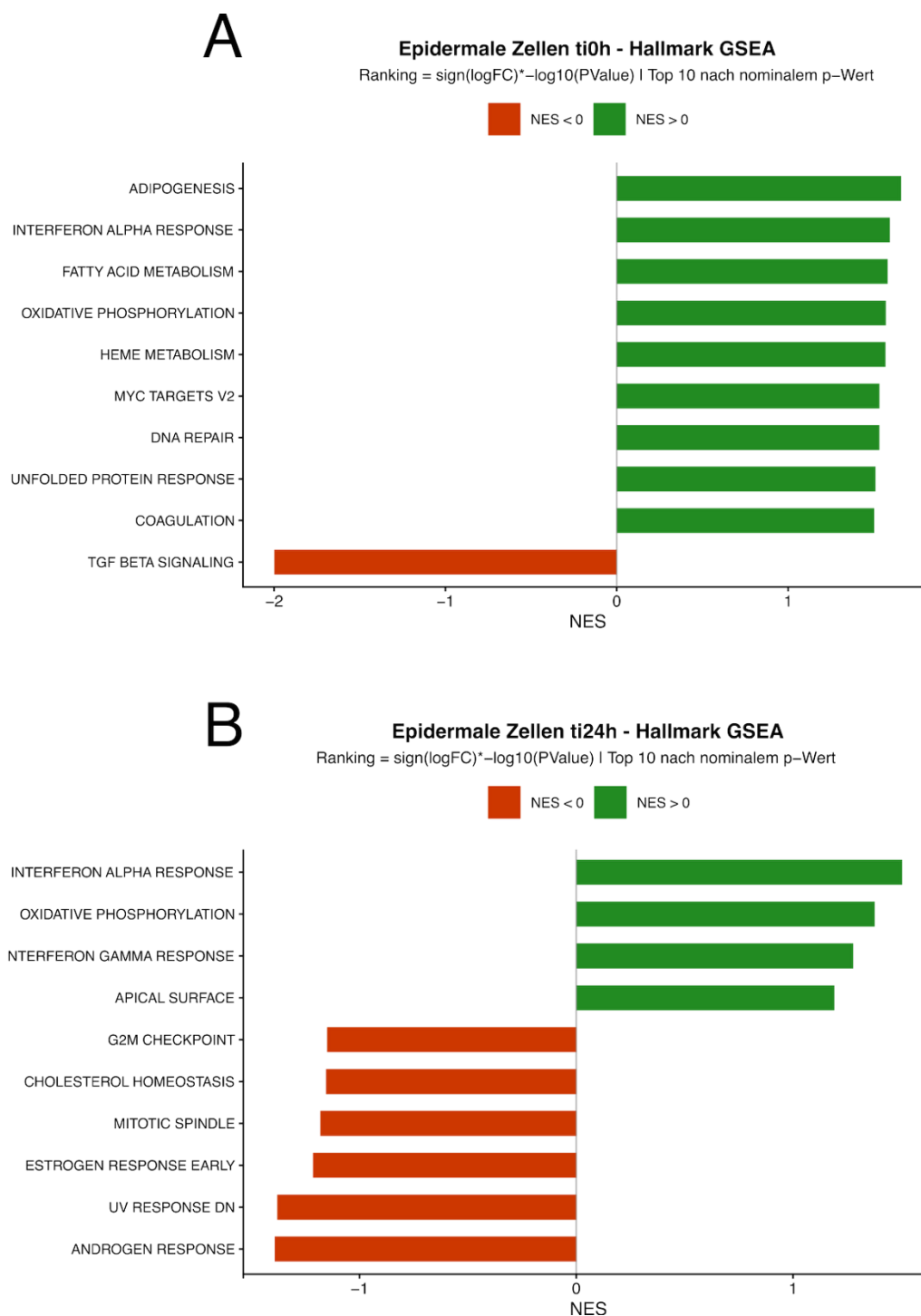


Abbildung 11: Hallmark Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) der epidermalen Zellfraktion von DETC^{WT}- und DETC^{ΔAHR}-Mäusen 0 h (A) und 24 h (B) nach Ohrverletzung. Die normalisierten Anreicherungswerte (NES) der am stärksten angereicherten Signalwege sind nach dem FDR-korrigierten p-Wert (Benjamini-Hochberg-FDR) sortiert. Positive NES (grün) zeigen eine Anreicherung in DETC^{ΔAHR} an, negative NES (rot) eine Anreicherung in DETC^{WT}.

In der epidermalen Zellfraktion zeigten sich zum Zeitpunkt ti0h (Abbildung 11A) ebenfalls mehrere angereicherte Signalwege (FDR < 0,25) in EZ^{ΔAHR}. Diese Veränderungen weisen darauf hin, dass der Verlust des AHR in DETC nicht nur diese Zellpopulation selbst betrifft, sondern auch die umliegenden epidermalen Zellen unmittelbar nach der Verletzung beeinflusst.

Zu den stark angereicherten Signalwegen in $EZ^{\Delta AHR}$ gehörten insbesondere metabolische Signalwege (*Adipogenesis* (NES = 1,66), *Fatty_Acid_Metabolism* (NES = 1,58), *Oxidative_Phosphorylation* (NES = 1,57)), Stressantworten (*Xenobiotic_Metabolism* (NES = 1,41), *Unfolded_Protein_Response* (NES = 1,59)), sowie Proliferations-assoziierte Programme (*Myc_Targets_V2* (NES = 1,53), *E2F_Targets* (NES = 1,34), *DNA_Repair* (NES = 1,53)).

Auch immunassoziierte Signalwege wie *Interferon_Alpha_Response* (NES = 1,59) und *Complement* (NES = 1,37) waren in $EZ^{\Delta AHR}$ angereichert, was im Vergleich zu EZ^{WT} auf eine stärkere Repräsentation immunbezogener Programme hinweist.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die $EZ^{\Delta AHR}$ unmittelbar nach der Verletzung ein breites transkriptionelles Aktivierungsmuster einnimmt, das durch ausgeprägte metabolische, proliferative sowie immunologische Signalwege gekennzeichnet ist.

TGF_Beta_Signaling (NES = -2,00) war der einzige signifikant negativ angereicherte Signalweg, der häufig mit Differenzierungsprozessen und Zellzyklushemmung in Verbindung gebracht wird (131,132).

Im Gegensatz zu ti0h zeigt die GSEA für die $EZ^{\Delta AHR}$ ti24h (Abbildung 11B) keine nach FDR signifikant angereicherten Signalwege. Obwohl einzelne Signalwege moderate NES-Werte aufwiesen, erreichte keiner der Hallmark-Gensets statistische Signifikanz. Dies spricht dafür, dass auf Ebene der Hallmark-Signalwege keine robuste globale Anreicherung mehr nachweisbar war.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der Verlust des AHR in DETC mit veränderten Genexpressionen sowohl in DETC als auch in umliegenden epidermalen Zellen assoziiert ist. Fehlt der AHR in $DETC^{\Delta AHR}$, waren Signalwege angereichert, die mit der mitochondrialen Atmung (OXPHOS) verbunden sind, während inflammatorische Signalwege reduziert erscheinen.

Währenddessen zeigten umliegende epidermale Zellen der $DETC^{\Delta AHR}$ -Maus nach Verletzung des Ohrs ein ausgeprägtes Aktivierungsmuster, das metabolische, proliferative und immunologische Prozesse umfasst. Zum Zeitpunkt ti24h war keine vergleichbar starke Signalweganreicherung mehr nachweisbar. Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse dafür, dass AHR-abhängige Programme in adulten DETC wesentlich zur Koordination der frühen epidermalen Antwort auf eine Verletzung

beitragen und deren Verlust in DETC^{ΔAHR} und EZ^{ΔAHR} zu einer zeitabhängigen Veränderung der Transkriptionsprogramme führt.

3.2.2. AHR beeinflusst immunrelevante Genprogramme in DETC

Zur detaillierten Analyse immunologisch relevanter Veränderungen wurden differenziell exprimierte Gene (DEG) nach einer Stanzbiopsie des Ohres gesondert betrachtet. Dafür wurden die DEG zwischen aurikulären DETC^{WT} und DETC^{ΔAHR} zu den Zeitpunkten ti0h und ti24h analysiert. Immunrelevante Gene wurden auf Grundlage von GO-Annotationen sowie einer kuratierten Liste von TCR- und T-Zell-assoziierten Signalwegkomponenten (> 40 Gene) ausgewählt.

Zum Zeitpunkt ti0h war die Expression von insgesamt 30 immunologisch relevanten Genen mit nominaler Signifikanz ($p < 0,05$) verändert. In DETC^{ΔAHR} waren 19 Gene hoch- und 11 Gene herunterreguliert im Vergleich zu DETC^{WT}-Zellen (Abbildung 12).

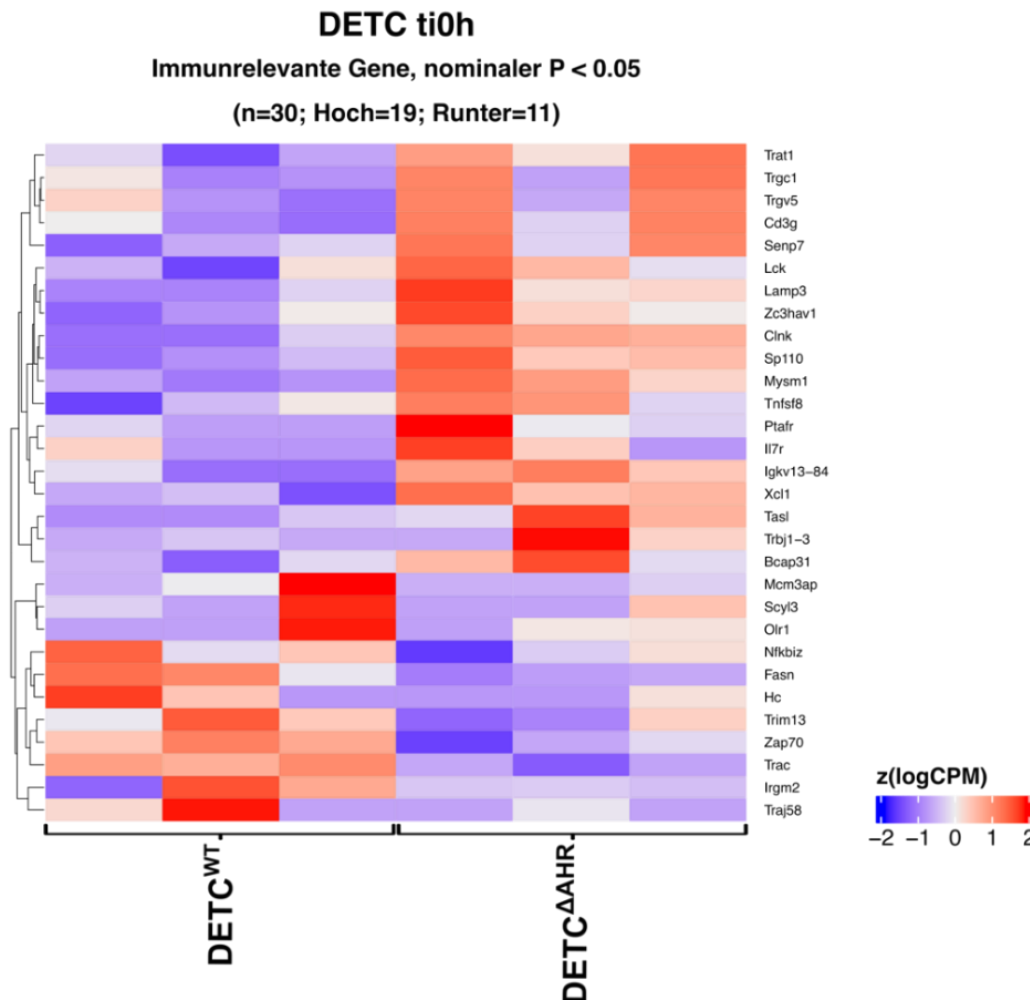


Abbildung 12: Heatmap der immunassoziierten differentiell exprimierten Gene in DETC nach Verletzung (ti0h). Heatmap-Darstellung der immunassoziierten differentiell exprimierten Gene in durchflusszytometrisch sortierten DETC^{WT}- und DETC^{ΔAHR}-Zellen zum Zeitpunkt ti0h nach Ohrlochung. Die differenzielle Genexpressionsanalyse wurde mit edgeR unter Verwendung eines verallgemeinerten linearen Modells (~0+Gruppe) und einer robusten Dispersionsschätzung durchgeführt, wobei DETC^{ΔAHR} vs. DETC^{WT} analysiert wurde. Die Daten wurden mittels TMM normalisiert. Immunbezogene Gene wurden basierend auf *Gene Ontology* (GO)-Annotationen (GO:0002376 (*immune system process*), GO:0006955 (*immune response*), GO:0002250 (*adaptive immune response*), GO:0006954 (*inflammatory response*), GO:0002682 (*regulation of immune system process*)) sowie einer kuratierten Liste von TCR-Genen und Komponenten des TCR-Signalwegs (*Trac*, *Trbc1*, *Trbc2*, *Trdc*, *Trgc1*, *Trgc2*, *Trav*, *TraJ*, *Trbv*, *Trbj*, *Trdv*, *Trgv*, *Cd3d*, *Cd3e*, *Cd3g*, *Cd247*, *Trat1*, *Lcp2*, *Lat*, *Lat2*, *Themis*, *Lck*, *Fyn*, *Zap70*, *Itk*, *Txk*, *Ptpnc*, *Ptpn6*, *Ptpn11*, *Cd4*, *Cd8a*, *Cd8b1*, *Icos*, *Cd28*, *Ctla4*, *Pdcd1*, *Nfatc1*, *Nfatc2*, *Rel*, *Rela*, *Nfkb1*, *Nfkb2*, *Jun*, *Fos*, *Trbc1*, *Trbc2*, *Il7r*, *Ccr7*, *Klrd1*, *Klrb1c*, *Ccr10*, *Cxcr3*, *Itgae*, *Rora*) definiert. Nur Gene mit nominaler Signifikanz ($p < 0,05$, unkorrigiert) wurden berücksichtigt. Die Expressionswerte sind als zeilenweise Z-transformierte logCPM-Werte dargestellt. Die Zeilen wurden hierarchisch geclustert und die Spalten nach Genotyp geordnet (DETC^{WT} links, DETC^{ΔAHR} rechts).

Auffallend war die erhöhte Expression mehrerer $\gamma\delta$ TCR-Struktur- und -Komponentengene in DETC^{ΔAHR}, darunter *Trgc1*, *Trgv5*, *Cd3g* und das TCR-assoziierte Adapterprotein *Trat1*. Währenddessen zeigten DETC^{WT} eine höhere Expression zentraler Signaltransduktionsmoleküle wie *Zap70* und *Nfkbiz*, was auf Unterschiede in der Regulation von TCR-Signaltransduktion und NF- κ B-abhängiger

Transkriptionsaktivierung unmittelbar nach einer Gewebeschädigung hindeuten könnte. Da DETC einen nahezu invarianten V γ 5V δ 1-TCR besitzen, deutet die veränderte Expression dieser Gene darauf hin, dass der Verlust des AHR in DETC Δ AHR die Transkription von TCR-assoziierten Komponenten beeinflusst. In Kombination mit der vergleichsweise höheren Expression von Signaltransduktionsmolekülen in DETC^{WT} kann dieses Muster eine veränderte Regulation des $\gamma\delta$ TCR und der nachgeschalteten Signalweiterleitung bedeuten.

Darüber hinaus waren Gene wie *Il7r*, *Xcl1*, *Lamp3*, *Tnfsf8* und *Ptafr* erhöht. *Il7r* ist essenziell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von DETC (24,133), während *Xcl1* und *Tnfsf8* mit Immunzellinteraktionen und Aktivierungsprozessen assoziiert sind (134,135).

Bei ti24h musste eine DETC^{WT}-Probe von der Analyse ausgeschlossen werden, da sie nach der Qualitätskontrolle deutlich von anderen Proben abwich (Abbildung S 2). In den übrigen Proben wurden 53 immunologisch relevante Gene ($p < 0,05$) identifiziert. Davon waren 23 in DETC Δ AHR höher und 30 niedriger exprimiert als in DETC^{WT} (Abbildung 13).

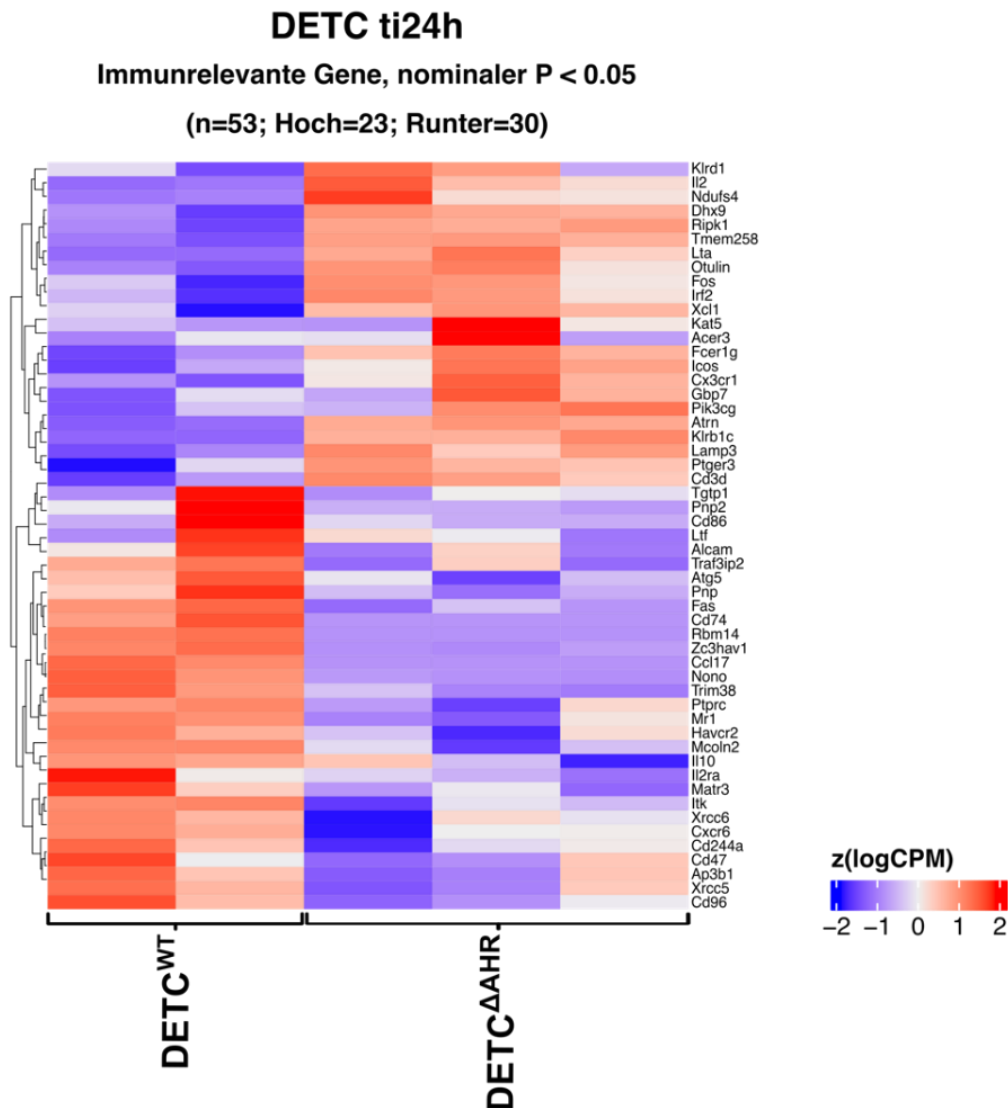


Abbildung 13: Heatmap der immunassoziierten differentiell exprimierten Gene in DETC nach Verletzung (ti24h). Heatmap-Darstellung der immunassoziierten differentiell exprimierten Gene in FACS-sortierten DETC^{WT}- und DETC^{ΔAHR}-Zellen zum Zeitpunkt ti24h nach Ohrlochung. Eine DETC^{WT}-Probe wurde aufgrund der *Principal Component Analysis* (Abbildung S 2) von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die differenzielle Genexpressionsanalyse wurde mit edgeR unter Verwendung eines verallgemeinerten linearen Modells (~0+Gruppe) und einer robusten Dispersionsschätzung durchgeführt, wobei DETC^{ΔAHR} vs. DETC^{WT} analysiert wurde. Die Daten wurden mittels TMM normalisiert. Immunbezogene Gene wurden basierend auf *Gene Ontology* (GO)-Annotationen (GO:0002376 (*immune system process*), GO:0006955 (*immune response*), GO:0002250 (*adaptive immune response*), GO:0006954 (*inflammatory response*), GO:0002682 (*regulation of immune system process*)) sowie einer kuratierten Liste von TCR-Genen und Komponenten des TCR-Signalwegs (*Trac, Trbc1, Trbc2, Trdc, Trgc1, Trgc2, Trav, Traj, Trbv, Trbj, Trdv, Trgv, Cd3d, Cd3e, Cd3g, Cd247, Trat1, Lcp2, Lat, Lat2, Themis, Lck, Fyn, Zap70, Itk, Txk, Ptpoc, Ptpn6, Ptpn11, Cd4, Cd8a, Cd8b1, Icos, Cd28, Ctla4, Pdcd1, Nfatc1, Nfatc2, Rel, Rela, Nfkb1, Nfkb2, Jun, Fos, Trbc1, Trbc2, Il7r, Ccr7, Klr1d1, Klr1b1c, Ccr10, Cxcr3, Itgae, Rora*) definiert. Nur Gene mit nominaler Signifikanz ($p < 0,05$, unkorrigiert) wurden berücksichtigt. Die Expressionswerte sind als zeilenweise Z-transformierte logCPM-Werte dargestellt. Die Zeilen wurden hierarchisch geclustert und die Spalten nach Genotyp geordnet (DETC^{WT} links, DETC^{ΔAHR} rechts).

Es wurde eine erhöhte Expression von Genen in DETC^{ΔAHR} beobachtet, die mit Aktivierungs- und zellulären Antwortprozessen assoziiert ist. Dazu gehören *Il2* und *Fos* als klassische Aktivierungs- und Proliferationsgene, *Ripk1* und *Pik3cg* als intrazelluläre

Signalmoleküle, aber auch *Icos* und *Cx3cr1*, die an Co-stimulation und Zellmigration beteiligt sind.

Besonders interessant ist die erhöhte Expression der beiden NK-assoziierten Rezeptoren *Klrd1* und *Klr1c*. *Klrd1* kodiert CD94, das mit Mitgliedern der NKG2-Rezeptorfamilie Heterodimere bildet und an der Erkennung veränderter Zellen beteiligt ist (136). Die Expression solcher Rezeptoren wird typischerweise mit zytotoxischen oder NK-Zell-assoziierten Funktionen in Verbindung gebracht (137,138).

DETC^{WT}-Zellen zeigten im Gegensatz zu DETC^{ΔAHR} eine erhöhte Expression mehrerer Gene, die mit T-Zell-Interaktionen, Immunregulation und Gewebsintegration assoziiert sind, darunter *Il10*, *Il2ra* (*Cd25*), *Cd86*, *Cd74*, *Ptprc* (*Cd45*), *Itk* und *Cxcr6*. Diese Gene sind überwiegend regulatorischen Funktionen, der TCR-assoziierten Signalweiterleitung und der Gewebeassoziation zuzuordnen.

Die veränderte Expression immunrelevanter Gene zwischen DETC^{ΔAHR} und DETC^{WT} weist auf unterschiedliche Stress- und Wundantworten hin. Während DETC^{ΔAHR} vermehrt Gene exprimiert, die mit Aktivierung (z.B. *Il2*, *Fos*), Signalweiterleitung (z.B. *Ripk1*, *Pik3cg*) und Zellinteraktion (z.B. *Icos*, *Klrd1*, *Klr1c*) assoziiert sind, zeigen DETC^{WT} ein Expressionsmuster, das Gene enthält, die mit Immunregulation (z.B. *Il10*, *Il2ra*), TCR-Signalweiterleitung (z.B. *Itk*, *Ptprc*) und Gewebeassoziation (z.B. *Cxcr6*) in Verbindung stehen.

Die RNA-Sequenzierungsdaten aus aurikulären DETC-Zellen zeigen, dass der AHR die Expression immunrelevanter Gene während der Reaktion auf Gewebeschädigung beeinflusst. Unmittelbar nach Verletzung (ti0h) wiesen DETC^{ΔAHR} im Vergleich zu DETC^{WT} Unterschiede vor allem in Genen auf, die mit dem $\gamma\delta$ TCR und der Signalweiterleitung assoziiert sind.

Bei ti24h wurden diese Unterschiede in DETC^{ΔAHR} deutlicher und umfassten eine größere Anzahl an unterschiedlichen Genen. Im Vergleich zu ti0h treten nun vermehrt Gene in den Vordergrund, die mit Aktivierung, Proliferation und Zellinteraktion assoziiert sind. Dabei sind *Il2* und *Fos* als klassische Aktivierungsmarker bekannt (139,140), während *Icos* und *Cx3cr1* mit T-Zell-Interaktion und Migration im Zusammenhang stehen (137,141). Auffällig war zudem die erhöhte Expression der NK-assoziierten Rezeptoren *Klrd1* und *Klr1c*, die auch auf bestimmten T-Zell-Subpopulationen wie DETC exprimiert werden können (136).

Im Gegensatz dazu wiesen DETC^{WT} eine erhöhte Expression mehrerer Gene auf, die mit Immunregulation (z.B. *Il10*) sowie mit TCR-Signalweiterleitung (z.B. *Itk*, *Ptprc*) in Verbindung stehen (142,143).

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass der Verlust des AHR die Expression von TCR-assoziierten Komponenten sowie die nachgeschalteten Signalwege verändert.

3.3. Geringere Oberflächenausprägung des $\gamma\delta$ T-Zellrezeptors in AHR-defizienten DETC

Um zu untersuchen, ob die in der RNA-Sequenzierung beobachtete, erhöhte $\gamma\delta$ TCR-Genexpression auch zu einer veränderten Oberflächenexpression des Rezeptors auf DETC führt, wurde die $\gamma\delta$ TCR-Expression in der Epidermis nach Ohrlochung mikroskopisch analysiert.

Die Stanzbiopsie des Ohres erfolgte analog zum RNA-Sequenzierungsansatz. Direkt nach der Lochung (ti0h) und 48 h später (ti48h) wurden die Tiere getötet, die Ohren präpariert, die Epidermis abgelöst, fixiert, mit einem anti- $\gamma\delta$ TCR-Antikörper gefärbt, mikroskopisch aufgenommen und anschließend die mittlere Fluoreszenzintensität quantitativ mittels ImageJ/Fiji ausgewertet (Abbildung 14).

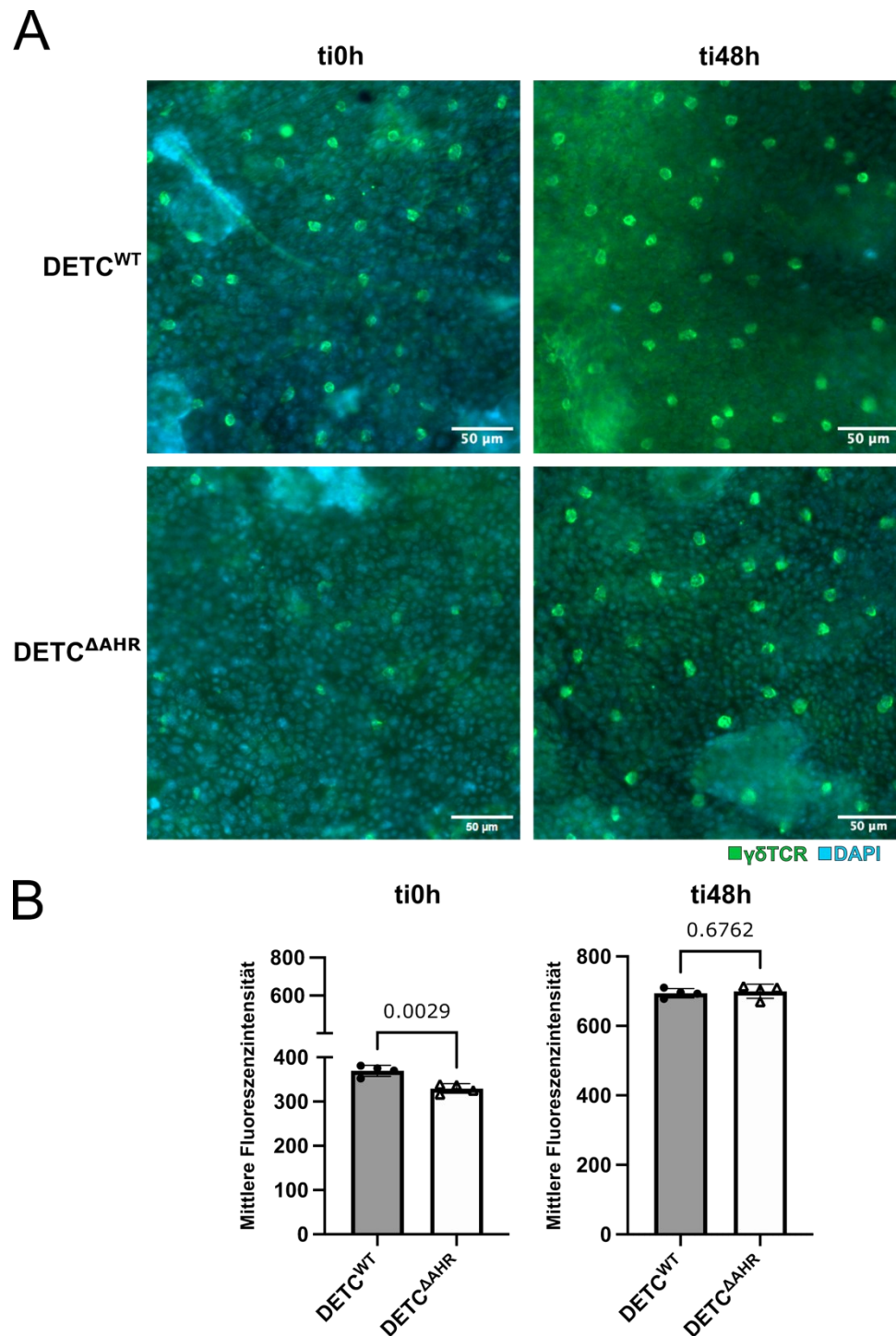


Abbildung 14: AHR-defiziente aurikuläre DETC zeigen bei ti0h eine reduzierte $\gamma\delta$ TCR-Expression auf der Zelloberfläche, die sich bei ti48h normalisiert. (A) Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der murinen Epidermis, die für $\gamma\delta$ TCR (Alexa Fluor 488) am Wundrand (auf der linken Seite der Bilder) zu den angegebenen Zeitpunkten gefärbt wurden. Maßstabsbalken wie angegeben: 50 μ m. (B) Quantifizierung der TCR-Oberflächenexpression in der Nähe des Wundrandes, gemessen als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Für jeden Genotyp wurden die DETC, die im Bereich von 0 – 2000 μ m vom Wundrand entfernt lagen, automatisch mit ImageJ analysiert. Die Daten stellen den Mittelwert $\pm$ SD von n=4 Mäusen pro Zeitpunkt dar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem t-Test mit Welch-Korrektur. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Im Vergleich zu den RNA-Sequenzierungsdaten zeigte sich auf Proteinebene ein gegensätzlicher Trend. Repräsentative Aufnahmen der Epidermis von DETC^{AAHR}-Mäusen wiesen bei ti0h eine deutlich geringere $\gamma\delta$ TCR-Fluoreszenzintensität im

Vergleich zu DETC^{WT}-Mäusen auf (Abbildung 14A). Zum Zeitpunkt ti48h war hingegen kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen DETC^{ΔAHR} und DETC^{WT} erkennbar.

Bei der Aktivierung ziehen DETC ihre dendritischen Fortsätze ein und nehmen eine rundliche Morphologie an (50). Hinsichtlich der Retraktion der Dendriten zeigten sich zwischen den beiden Genotypen weder bei ti0h noch bei ti48h Unterschiede.

Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität (Abbildung 14B) zeigte eine reduzierte $\gamma\delta$ TCR-Proteinexpression in DETC^{ΔAHR} unmittelbar nach der Verletzung (-10,9 %), die sich über einen Zeitraum von 48 h auf das Niveau des DETC^{WT} normalisiert.

Neben der reduzierten $\gamma\delta$ TCR-Oberflächenausprägung fiel zudem auf, dass in der aurikulären Epidermis von DETC^{ΔAHR}-Mäusen bei ti0h weniger DETC^{ΔAHR} nachweisbar waren, was im Folgenden untersucht wird.

3.4. Funktionelle Konsequenzen des AHR-Verlusts *in vivo*

3.4.1. Verhalten von DETC am Wundrand

Da in der mikroskopischen Analyse der $\gamma\delta$ TCR-Expression eine verminderte Anzahl an DETC^{ΔAHR} im Wundbereich auffiel, wurde diese Beobachtung im nächsten Schritt quantitativ untersucht. Bekanntermaßen tragen DETC durch die Sekretion von Zytokinen, darunter KGF-1, zur epidermalen Homöostase und Wundheilung bei (144). Um zu untersuchen, ob die beobachteten molekularen Veränderungen durch die Deletion des AHR funktionelle Konsequenzen für DETC^{ΔAHR} *in vivo* haben, wurde die Dynamik der DETC^{WT}- und DETC^{ΔAHR}-Zellen in einem Ohrwundmodell analysiert (145). Mittels Stanzbiopsien wurden kleine Wunden in die Ohrhaut eingebracht. Epidermale Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Verletzung (ti0h) sowie 48 h (ti48h) danach von den Ohren präpariert, fixiert und die mögliche Migration zum Wundrand, die Verteilung der DETC sowie die Morphologie untersucht (Abbildung 15A, B). Die Zellzahlen wurden in vordefinierten Abständen zum Wundrand (Abbildung 15C) gezählt und als Zellen/mm² angegeben (Abbildung 15D, E).

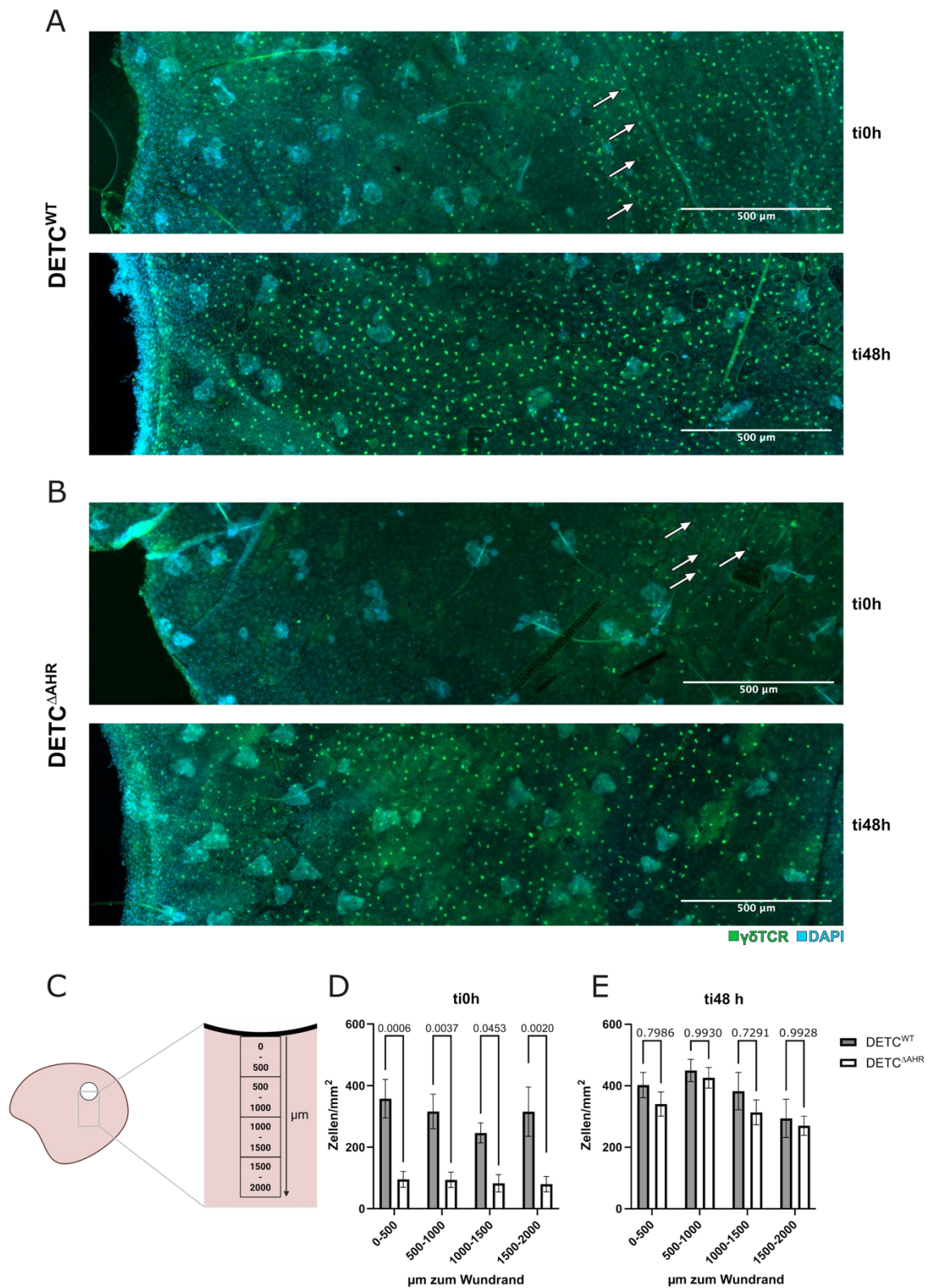


Abbildung 15: AHR beeinflusst die Gewebemöostase von DETC. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der Epidermis von DETC^{WT} ti0h und ti48h (A) und DETC ^{Δ AHR} ti0h und ti48h (B), die für γ DTCR (Alexa Fluor 488) am Wundrand zu den angegebenen Zeitpunkten gefärbt wurden. Maßstabsbalken wie angegeben (500 μ m). Weiße Pfeile bei ti0h markieren DETC mit dendritischer Morphologie. Der Wundrand ist auf der linken Seite der Bilder. (C) Links: Schema zur Veranschaulichung des Bereichs zur Zählung von DETC in der Epidermis um eine Ohrlochung herum (0-2000 μ m vom Wundrand). Rechts: Quantifizierung der DETC-Verteilung relativ zum Wundrand bei ti0h und ti48h. Die Daten stellen den Mittelwert $\pm$ SD von n=5-7 Mäusen pro Zeitpunkt dar. Die statistische Analyse wurde mit einer Two-way ANOVA (Šidák-Post-hoc Test) durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Die DETC wurden mithilfe eines AF488-konjugierten anti- $\gamma\delta$ TCR-Antikörpers gefärbt, während die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt wurden. Repräsentative dendritische DETC sind bei ti0h bei beiden Genotypen durch weiße Pfeile markiert (Abbildung 15A, B). Morphologisch zeigten die DETC beider Genotypen die typische Retraktion der Dendriten als Reaktion auf die Aktivierung unmittelbar um den Wundrand herum bei ti0h. Bei ti48h konnten keine DETC mit einer dendritischen Morphologie mehr beobachtet werden (Abbildung 15A, B).

Anders verhält es sich jedoch mit der Anzahl der DETC ^{Δ AHR} in der Epidermis. Im Vergleich zu DETC^{WT}-Zellen zeigte die Analyse bei ti0h eine signifikante Verringerung von ca. 75% der Anzahl der DETC ^{Δ AHR} in jedem der vordefinierten Bereiche (0 – 500 μ m; 500 – 1000 μ m; 1000 – 1500 μ m; 1500 – 2000 μ m) um den Wundrand (Abbildung 15D). Die Anzahl der DETC ^{Δ AHR} im Wundbereich nahm innerhalb von 48 h nach der Verletzung zu und erreichte mit DETC^{WT}-Zellen vergleichbare Zahlen (Abbildung 15E).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass DETC ^{Δ AHR}-Zellen sind zwar anfänglich in geringerer Anzahl in der aurikulären Epidermis vorhanden, sind aber in der Lage, auf Gewebeverletzung zu reagieren. Die anfängliche reduzierte Anzahl der DETC ^{Δ AHR}-Zellen wurde über einen Zeitraum von 48 h kompensiert und erreichte vergleichbare Zahlen mit den DETC^{WT}-Zellen.

3.4.2. Einfluss der AHR-Deletion in DETC auf die epidermale Barriere

Da DETC zur epidermalen Homöostase beitragen, wurde anschließend untersucht, ob die beobachteten Veränderungen auch mit einer Beeinträchtigung der Hautbarrierefunktion einhergehen. Dafür wurde der transepidermale Wasserverlust (engl. *Transepidermal water loss*, TEWL) von DETC^{WT}- und DETC ^{Δ AHR}-Mäusen vor und 0 min, 10 min, 15 min und 30 min nach der mechanischen Reizung durch den Abriss eines Klebestreifens gemessen (Abbildung 16). Außerdem wurde die Wiederherstellung der Hautbarrierefunktion nach 24 h untersucht. Frühere Studien zeigten in AHR-defizienten- und Keratinozyten-spezifischen (K5) AHR KO-Mäusen Beeinträchtigungen der epidermalen Barrierefunktionen (146).

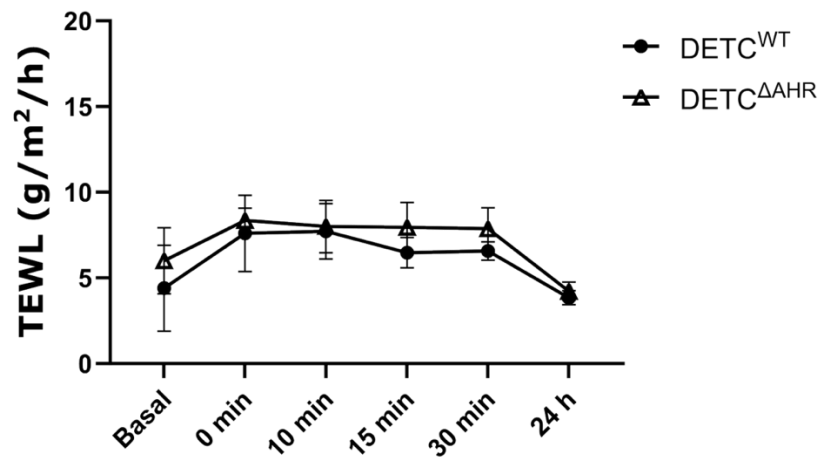


Abbildung 16: Untersuchung der epidermalen Barrierefunktion bei DETC^{WT}- und DETC^{ΔAHR}-Mäusen. Die Integrität der Hautbarriere wurde durch Messung des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) nach mechanischer Reizung durch den Abriss eines Klebestreifens untersucht. Pro Genotyp wurden n=4 Tiere verwendet. Die statistische Analyse wurde mit einer Two-way ANOVA (Šidák-Post-hoc Test) durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Im Gegensatz zu den AHR-defizienten- und K5 AHR KO-Mäusen wiesen DETC^{ΔAHR}-Mäuse im Vergleich zu DETC^{WT}-Mäusen keine Veränderungen der Hautbarriere-Integrität auf. Die basalen TEWL-Werte waren zwischen beiden Genotypen vergleichbar (4,4 g/m²/h vs. 6 g/m²/h). Nach dem Abriss des Klebestreifens zeigten beide Gruppen, wie zu erwarten, einen moderaten Anstieg des TEWL (7,6 g/m²/h vs. 8,0 g/m²/h). 24 h nach der Reizung der Haut war der TEWL in beiden Genotypen wieder auf Ausgangsniveau, was bedeutet, dass auch die DETC^{ΔAHR}-Mäuse ihre Hautbarriere reparieren konnten.

Zusammengenommen deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die Deletion des AHR in DETC^{ΔAHR} für die Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der epidermalen Barrierefunktion nicht erforderlich ist. Damit zeigen die *in vivo* Daten deutliche molekulare und zelluläre Veränderungen in AHR-defizienten DETC, jedoch mit den verwendeten Methoden keine messbare Beeinträchtigung der Barrierefunktion. Um diese AHR-abhängigen molekularen und zellulären Veränderungen weiter zu untersuchen, wurde im Folgenden auf ein Zellkulturmodell zurückgegriffen.

3.5. Validierung der 7-17-Zelllinie als Modell zur Untersuchung des AHR-abhängigen Einflusses auf $\gamma\delta$ TCR-Expression *in vitro*

Da funktionelle und mechanistische Analysen in primären DETC aufgrund der geringen Zellzahl in der Epidermis nur eingeschränkt möglich sind, wurde im Folgenden die DETC-Zelllinie 7-17 als Modellsystem verwendet. Bevor diese Zelllinie für weiterführende Untersuchungen eingesetzt wurde, wurde zunächst überprüft, ob sie den *in vivo* beobachteten AHR-abhängigen TCR-Phänotyp widerspiegelt. Da DETC, bzw. 7-17-Zellen einen nahezu invarianten V γ 5V δ 1-TCR exprimieren, wurden Gene analysiert, die zentrale Bestandteile der γ - und δ -Kette kodieren. Während *Trgv5* und *Trgc1* für variable beziehungsweise konstante Elemente der γ -Kette stehen, werden *Trdv1* (variables Element) und *Trdc* (konstantes Element) der δ -Kette zugeordnet. Hierzu wurde RNA von 7-17^{WT} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen im basalen Zustand sowie nach 24-stündiger Stimulation mit α CD3/ α CD28 gewonnen. Im Anschluss wurden die TCR-Gene *Trgv5*, *Trgc1*, *Trdv1* und *Trdc* mittels qPCR quantifiziert. Ergänzend dazu wurde die TCR-Oberflächenausprägung vor und nach Stimulation mit α CD3/ α CD28 durchflusszytometrisch überprüft (Abbildung 17).

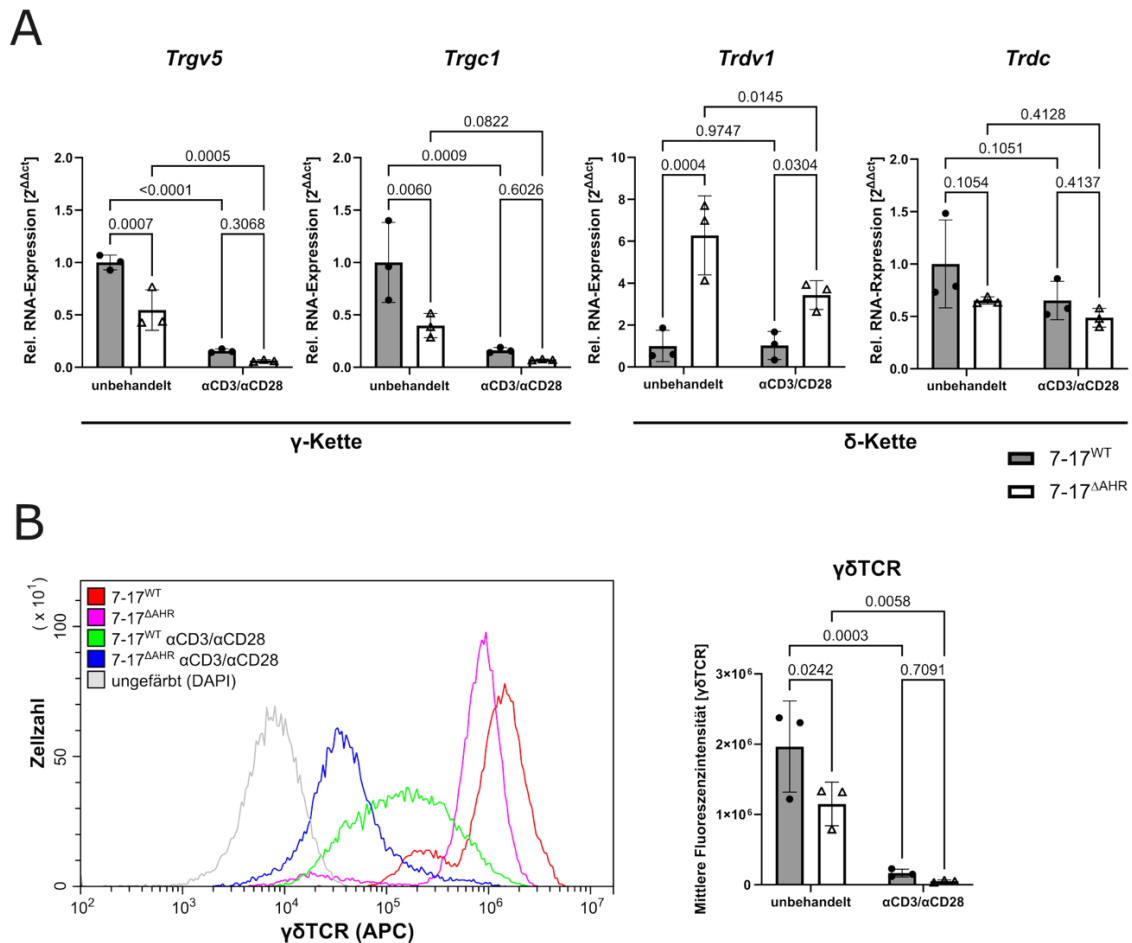


Abbildung 17: Überprüfung der TCR-Genexpression und -Oberflächenexpression in 7-17^{WT} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen. Die Zellen wurden im unbehandelten Zustand oder nach 24 h αCD3/αCD28-Stimulation für die Bestimmung der TCR-Genexpression (A) oder der TCR-Oberflächenpräsentation (B) verwendet. (A) Quantitative PCR-Analyse der TCR-Gene *Trgv5*, *Trgc1*, *Trdv1* und *Trdc*. Die dargestellten Werte zeigen die relative Genexpression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalisiert auf *Rps6* und auf den Mittelwert un behandelter 7-17^{WT}-Zellen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von zwei technischen Duplikaten, dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD von $n=3$ biologischen Replikaten. Die statistische Analyse wurde mittels Two-way ANOVA (unkorrigierter Fisher-LSD post-hoc Test) durchgeführt. (B) Links: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der TCR-Oberflächenpräsentation ($n=3$) von 7-17^{WT} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen nach Färbung mit einem APC-konjugierten Anti-Maus γδTCR Antikörper. Rechts: Quantitative Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität der durchflusszytometrischen Analyse. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD von $n=3$ biologischen Replikaten. Die statistische Analyse wurde mittels Two-way ANOVA (unkorrigierter Fisher-LSD post-hoc Test) durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

Die Analyse der TCR-Genexpression zeigte, dass die γTCR-Gene *Trgv5* (0,54-fache Veränderung (FC)) und *Trgc1* (0,39 FC) im unbehandelten Zustand in 7-17^{ΔAHR}-Zellen stark reduziert waren im Vergleich zu 7-17^{WT}-Zellen (Abbildung 17A). Nach Stimulation mit αCD3/αCD28 verringerte sich die Expression dieser Gene sowohl in 7-17^{ΔAHR}-Zellen als auch in 7-17^{WT}-Zellen massiv, sodass keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen mehr festgestellt wurden.

Im Gegensatz dazu konnte eine deutlich erhöhte Expression des Gens *Trdv1* in 7-17^{ΔAHR}-Zellen sowohl im unbehandelten als auch im αCD3/αCD28-stimulierten Zustand festgestellt werden. Die absolute Expression von *Trdv1* war jedoch sehr gering

(ct-Wert: 28). Für *Trdc* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen 7-17^{ΔAHR} und 7-17^{WT} beobachtet werden (Abbildung 17A). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Verlust des AHR in 7-17^{ΔAHR}-Zellen vor allem mit einer veränderten Expression γ -Ketten-assoziiierter TCR-Gene einhergeht.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass 7-17^{ΔAHR}-Zellen eine geringere $\gamma\delta$ TCR-Oberflächenexpression als 7-17^{WT}-Zellen aufwiesen (Abbildung 17B). Nach Stimulation mit α CD3/ α CD28 zeigte sich eine Verringerung des $\gamma\delta$ TCR in beiden Genotypen im Vergleich zum unbehandelten Zustand. Dieser Effekt war jedoch in 7-17^{ΔAHR}-Zellen stärker ausgeprägt. Dieses Muster entspricht der Internalisierung des TCR nach TCR-abhängiger T-Zell-Aktivierung, um eine Überstimulation zu verhindern (147,148).

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass 7-17^{ΔAHR}-Zellen den *in vivo* beobachteten Phänotyp einer reduzierten $\gamma\delta$ TCR-Oberflächenexpression abbilden und damit ein geeignetes Modellsystem darstellen, um weiterführende Untersuchungen zum Einfluss des AHR auf funktionelle Konsequenzen durchzuführen.

3.6. AHR beeinflusst die Aktivierung und den Metabolismus von 7-17-Zellen

Die Aktivierung von T-Zellen ist eng mit einer Anpassung des zellulären Metabolismus verknüpft. Aufgrund des erhöhten Energiebedarfs kommt es dabei zu einer Umstellung des Energiestoffwechsels. Anstelle der effizienten ATP-Produktion durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) greift die aktivierte T-Zelle verstärkt auf die Glykolyse zurück, wie von Warburg erstmals für maligne Karzinomzellen beschrieben wurde (149). Auch wenn die Glykolyse weniger ATP-Moleküle pro Glukosemolekül ergibt (ca. 2 ATP im Vergleich zu etwa 30-32 ATP bei vollständiger oxidativer Verwertung), ermöglicht sie eine deutlich schnellere Bereitstellung von Energie und Biosynthesebausteinen. Dies ist insbesondere für die Produktion von Effektor-Molekülen wie IFN- γ relevant, das von DETC produziert wird und mit einer Umprogrammierung des Stoffwechsels und hohen Glykolyse-Raten im Zusammenhang steht (150).

Bereits die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung (siehe 3.2) von aurikulären DETC^{ΔAHR} wiesen im Gegensatz zu DETC^{WT} auf eine Anreicherung von OXPHOS-assoziierten

Gen-Sets bei gleichzeitiger Abnahme Glykolyse-assoziiierter Gen-Sets 24 h nach Verletzung des Gewebes hin.

Da die Aktivierung von T-Zellen maßgeblich über den TCR vermittelt wird, deutet die in DETC^{ΔAHR} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen beobachtete reduzierte γδTCR-Oberflächenexpression auf eine beeinträchtigte Aktivierungsfähigkeit der Zellen hin, die mit Veränderungen des Metabolismus einhergehen könnten.

3.6.1. AHR ist erforderlich für eine effiziente Aktivierung von 7-17-Zellen

Zur funktionellen Einordnung der reduzierten γδTCR-Oberflächenexpression wurde zunächst die Aktivierungsfähigkeit von 7-17^{ΔAHR}-Zellen untersucht. Hierfür wurden 7-17^{WT} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen im unbehandelten, sowie nach Stimulation mit αCD3/αCD28 für 24 h hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression (Abbildung 18A) und RNA-Expression von CD69 (Abbildung 18B), sowie ihrer morphologischen Veränderung nach Aktivierung (Abbildung 18C, D) analysiert.

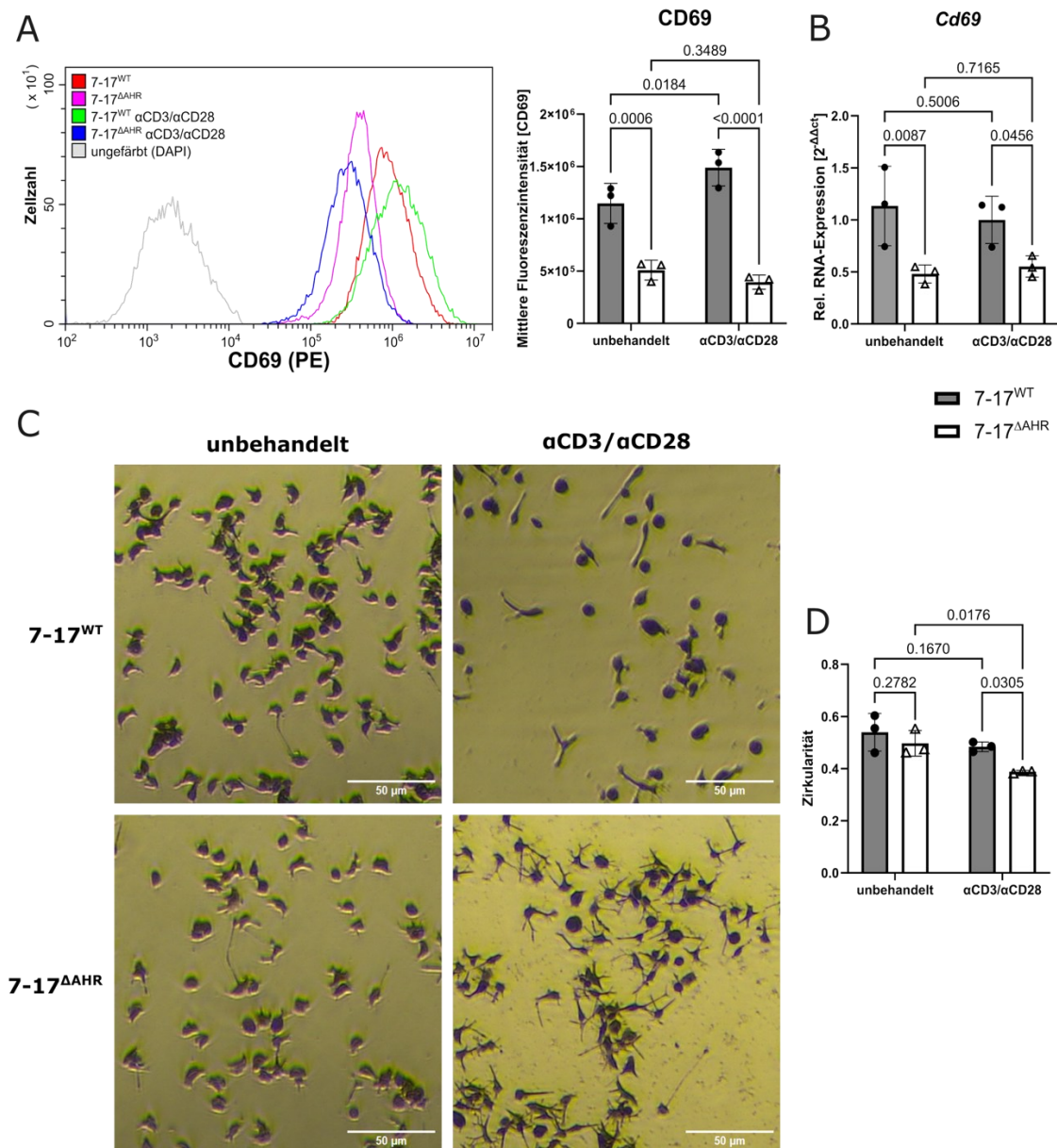


Abbildung 18: Untersuchung der Aktivierung und Morphologie von 7-17^{WT} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen. (A) Links: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der CD69-Oberflächenpräsentation (n=3) von 7-17^{WT} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen nach Färbung mit einem PE-konjugierten Anti-Maus-CD69 Antikörper. Rechts: Quantitative Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität der durchflusszytometrischen Analyse. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD von n=3 biologischen Replikaten. Die statistische Analyse wurde mittels Two-way ANOVA (Fisher-LSD post-hoc Test) durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet. (B) Relative *Cd69*-mRNA-Expression, gemessen mittels quantitativer PCR. Die dargestellten Werte zeigen die relative Genexpression (2^{-ΔΔCt}), normalisiert auf *Rps6* und auf den Mittelwert unbehandelter 7-17^{WT}-Zellen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von zwei technischen Duplikaten, dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD von n=3 biologischen Replikaten. Die statistische Analyse wurde mittels Two-way ANOVA (Fisher-LSD post-hoc Test) durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet. (C) Repräsentative Hellfeld-Mikroskopie-Bilder von 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen, gefärbt mit Hämatoxylin-Lösung (Gill Nr. 3). Die Bilder wurden mit einem Leica DMiL LED-Inversmikroskop aufgenommen. Maßstab: 50 μm. (D) Bioinformatische Analyse der Hellfeld-Mikroskopie-Bilder (Repräsentativ in (C) dargestellt) mittels ImageJ und Weka Segmentation. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 12 ausgewerteten Bildern, dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD von n=3 biologischen Replikaten. Die statistische Analyse wurde mittels Two-way ANOVA (Fisher-LSD post-hoc Test) durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

Die Expression von CD69 ist ein etablierter Marker für die T-Zell-Aktivierung und Gewebepersistenz. In durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde eine verringerte Oberflächenexpression von CD69 in 7-17^{ΔAHR}-Zellen festgestellt. Dieser Unterschied war sowohl vor als auch nach der Behandlung mit αCD3/αCD28 nachweisbar (Abbildung 18A). Die quantitative Auswertung ergab, dass 7-17^{WT}-Zellen im Gegensatz zu 7-17^{ΔAHR}-Zellen nach Behandlung mit αCD3/αCD28 einen signifikanten Anstieg der CD69-Proteinexpression zeigten, der für eine effektive T-Zell-Aktivierung charakteristisch ist (Abbildung 18A).

Dieses Ergebnis wurde durch die quantitative Analyse der *Cd69*-Genexpression bestätigt. In 7-17^{ΔAHR}-Zellen war die Expression von *Cd69* sowohl im unbehandelten als auch im αCD3/αCD28-stimulierten Zustand um etwa 50% reduziert im Vergleich zu 7-17^{WT}-Zellen (Abbildung 18B). Die Stimulation mit αCD3/αCD28 führte nach 24 h weder in 7-17^{WT}- noch 7-17^{ΔAHR}-Zellen zu einer signifikanten Veränderung der *Cd69*-Expression.

Als Nächstes wurde untersucht, ob eine geringere γδTCR-Expression und die damit verbundene verminderte Reaktivität auf Stimulation sich auch in der aktivierungsabhängigen Zellmorphologie widerspiegelt. Es ist bekannt, dass DETC bei TCR-Aktivierung ihre typische dendritische Morphologie verlieren und sich abrunden (50).

Bei der Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen wurde eine erwartungsgemäße Retraktion der Dendriten in 7-17^{WT}-Zellen nach αCD3/αCD29-Stimulation beobachtet (Abbildung 18D). Auffällig war jedoch, dass manche 7-17^{WT}-Zellen weiterhin einzelne Ausläufer bildeten, wodurch die Gesamtzirkularität der Population beeinflusst wurde und keine signifikante Zunahme der Zirkularität festgestellt werden konnte (Abbildung 18C). Im Gegensatz dazu konnte bei 7-17^{ΔAHR}-Zellen nach Stimulation mit αCD3/αCD28 eine signifikant verstärkte Ausbildung dendritischer Strukturen beobachtet werden (Abbildung 18C, D).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die AHR-Deletion mit einer reduzierten Aktivierungsfähigkeit von 7-17^{ΔAHR}-Zellen einhergeht. Da die Aktivierung von T-Zellen eng mit der metabolischen Reprogrammierung verknüpft ist, stellt sich die Frage, ob die beobachteten Unterschiede im Aktivierungsverhalten von 7-17^{ΔAHR}-Zellen

mit Veränderungen der glykolytischen und mitochondrialen ATP-Produktion einhergehen.

3.6.2. AHR-Deletion reduziert den glykolytischen Anteil der ATP-Produktion und erhöht den Beitrag der oxidativen Phosphorylierung

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der zelluläre Energiemetabolismus von 7-17^{WT} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen im unbehandelten Zustand und nach Stimulation mit αCD3/αCD28 mittels *Seahorse*-Analyse überprüft. Die *Seahorse*-Analyse ist eine etablierte Methode, um die mitochondriale Atmung anhand der Sauerstoffverbrauchsrate (engl. *Oxygen consumption rate*, OCR) sowie die glykolytische Aktivität über die extrazelluläre Säuerungsrate (engl. *Extracellular acidification rate*, ECAR) zu messen. Durch die sequenzielle Injektion definierter Substrate und Inhibitoren lässt sich die mitochondriale Atmung funktionell aufschlüsseln (Abbildung 19).

Das Experiment wurde repliziert, wobei die beobachteten Ergebnisse konsistent waren (Abbildung S 3).

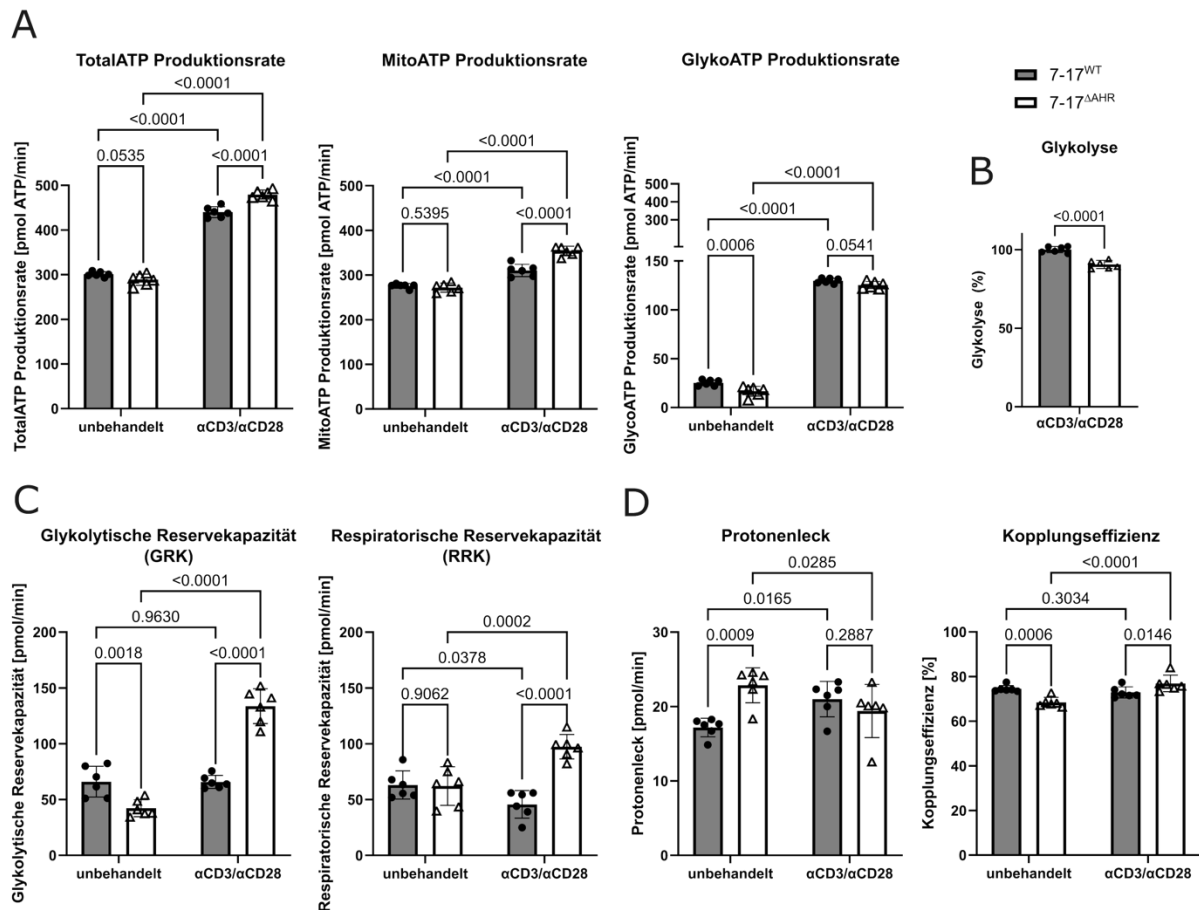


Abbildung 19: Echtzeit-ATP-Produktionsraten, bestimmt mittels des Seahorse XF ATP Rate Assays in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen unter Basalbedingungen und nach 24-stündiger αCD3/αCD28-Stimulation. (A) Die TotalATP Produktion und die ATP-Produktionsrate aus der Glykolyse (GlykoATP Produktionsrate) und der oxidativen Phosphorylierung (MitoATP Produktionsrate) wurden berechnet. (B) Die glykolytische ATP-Produktion in stimulierten 7-17^{WT}-Zellen wurde für den relativen Vergleich auf 100% festgelegt. (C–D) Respiratorische Reservekapazität (SRC) und glykolytische Reservekapazität (SGC), berechnet aus Seahorse-Messungen nach BAM15- bzw. Oligomycin-Behandlung. Alle Daten wurden auf 10.000 Zellen normiert und als Mittelwert ± SD von sechs technischen Replikaten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte für (A), (C) und (D) mittels Two-way ANOVA (Fisher-LSD post-hoc Test), für (B) mittels zweiseitigem t-Test mit Welch-Korrektur. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Wie erwartet produzieren αCD3/αCD28 aktivierte 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen mehr ATP (Abbildung 19A). In 7-17^{WT}-Zellen stieg die TotalATP Produktionsrate von 301,07 pmol ATP/min auf 440,06 pmol ATP/min an, während sie in 7-17^{ΔAHR}-Zellen von 288,69 pmol ATP/min auf 479,40 pmol ATP/min anstieg.

Bei der Betrachtung des relativen Beitrags von Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung zur ATP-Produktion zeigten sich moderate Unterschiede zwischen 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen. Während 7-17^{WT}-Zellen nach TCR-Stimulation einen größeren Anteil ihres ATP über die Glykolyse generierten (29,5% der TotalATP Produktionsrate), war die GlykoATP Produktionsrate in 7-17^{ΔAHR}-Zellen reduziert (26,2% der TotalATP Produktionsrate) (Abbildung 19A). Dies entspricht einer relativen Abnahme der Gesamtglykolyse von 11,4% (Abbildung 19B).

Im Gegensatz dazu war die MitoATP-Produktion nach Stimulation mit α CD3/ α CD28 in 7-17 Δ AHR-Zellen im Vergleich zu 7-17 WT -Zellen erhöht (341,07 vs. 317,5 pmol ATP/min), was einer Zunahme von 4,7% entspricht. Dies zeigt, dass die Deletion des AHR zu einer metabolischen Verschiebung zugunsten mitochondrialer ATP-Produktion führt, wodurch 7-17 Δ AHR-Zellen trotz der reduzierten GlykoATP Produktionsrate eine höhere TotalATP Produktionsrate als 7-17 WT -Zellen erreichten.

Um zu untersuchen, wie flexibel die Zellen auf einen erhöhten Energiebedarf reagieren können, wurden anschließend die glykolytische Reservekapazität (GRK) und die respiratorische Reservekapazität (RRK) analysiert. Die GRK beschreibt die zusätzliche glykolytische Kapazität über die basale Glykolyse hinaus, die RRK hingegen spiegelt die zusätzliche mitochondriale Atmungskapazität wider, die über die basale Atmung hinaus mobilisiert werden kann.

Im unbehandelten Zustand war die GRK in 7-17 Δ AHR-Zellen im Vergleich zu 7-17 WT -Zellen signifikant reduziert (Abbildung 19C). Während 7-17 WT -Zellen eine SGC von 66,05 pmol/min aufwiesen, lag diese in 7-17 Δ AHR-Zellen bei 42,25 pmol/min. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach TCR-Stimulation eine SGC von 133,62 pmol/min in 7-17 Δ AHR-Zellen und lag damit deutlich über der SGC von 65,74 pmol/min in 7-17 WT -Zellen.

Im Gegensatz zu der GRK zeigte sich bei der RRK im basalen Zustand keine signifikanten Unterschiede zwischen 7-17 WT - (63,04 pmol/min) und 7-17 Δ AHR-Zellen (62,11 pmol/min). Nach α CD3/ α CD28-Stimulation zeigte sich jedoch eine Erhöhung der RRK in 7-17 Δ AHR-Zellen (97,37 pmol/min), jedoch keine vergleichbare Zunahme in 7-17 WT -Zellen (45,71 pmol/min). Dieser Unterschied wurde nicht in allen unabhängigen Experimenten beobachtet (Abbildung S 3)

In Abbildung 19D ist die Untersuchung der mitochondrialen Effizienz dargestellt. Für das Protonenleck ergaben sich zwischen 7-17 WT - und 7-17 Δ AHR-Zellen Unterschiede, die jedoch zwischen den unabhängigen Experimenten variierten und keine konsistente Signifikanz zeigten (Abbildung S 3). Nach TCR-Stimulation war die Kopplungseffizienz in 7-17 Δ AHR-Zellen signifikant erhöht (76,92% vs. 72,91%).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Deletion von AHR in 7-17-Zellen mit einer relativen Verschiebung des zellulären Energiemetabolismus zugunsten der OXPHOS im Vergleich zu 7-17 WT -Zellen bei gleichzeitig reduzierter glykolytischer Beteiligung einhergeht. Die Ergebnisse legen nahe, dass der AHR an der Regulation der

metabolischen Reprogrammierung und Flexibilität von 7-17-Zellen nach TCR-Stimulation beteiligt ist.

3.6.3. AHR reguliert die Expression zentraler glykolytischer Enzyme

Um zu klären, ob die beobachtete metabolische Verschiebung in 7-17^{ΔAHR}-Zellen mit Veränderungen in der Expression metabolischer Enzyme einhergeht, wurde die mRNA-Expression zentraler Glykolyse (Abbildung 20)- und OXPHOS (Abbildung 21)-assoziierter Gene von unbehandelten und αCD3/αCD28-stimulierten 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen mittels qPCR analysiert (Abbildung 22). Die RNA-Expression wurde zunächst auf das Haushaltsgen *Rps6* normalisiert und anschließend relativ zu unbehandelten 7-17^{WT}-Zellen bezogen.

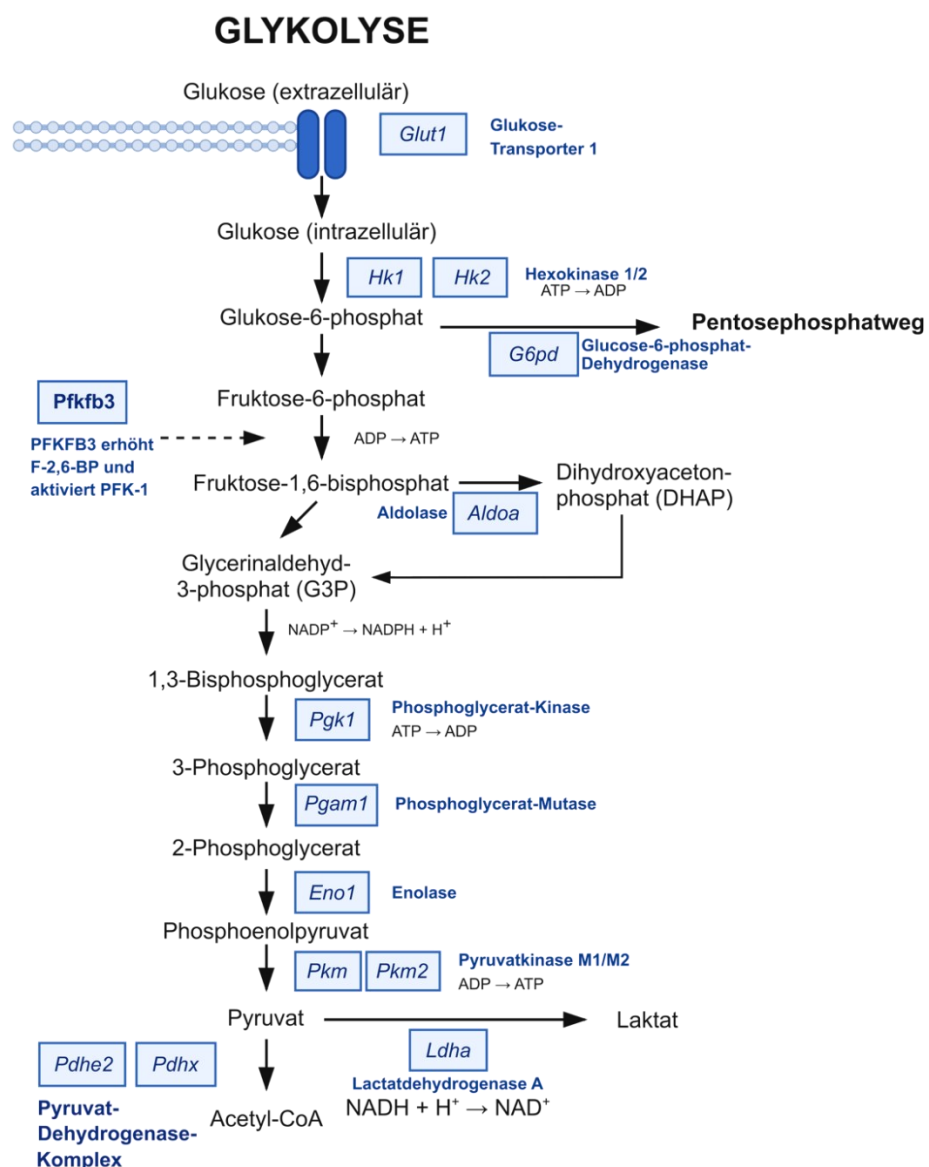


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Glykolyse und der analysierten Gene. Es wurden die Gene *Glut1*, *Hk1*, *Hk2*, *Pfkfb3*, *Aldoa*, *Pgam1*, *Eno1*, *Pgk1*, *Pkm*, *Pkm2*, *Ldha*, *Pdhe2*, *Pdhx*, *G6pd*.

OXPHOS

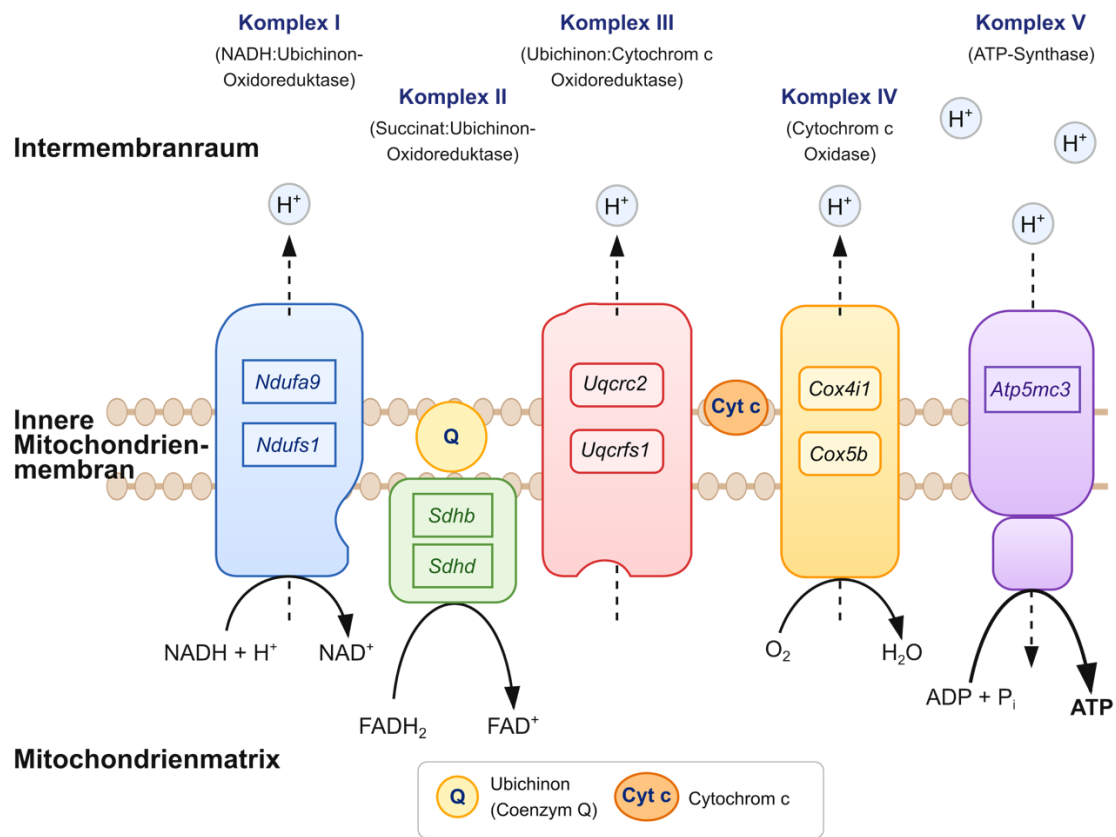


Abbildung 21: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) und der analysierten Gene. Es wurden die Gene *Ndufa9*, *Ndufs1*, *Sdhb*, *Sdhc*, *Uqcrc2*, *Uqcrcs1*, *Cox4i1*, *Cox5b*, *Atp5mc3*.

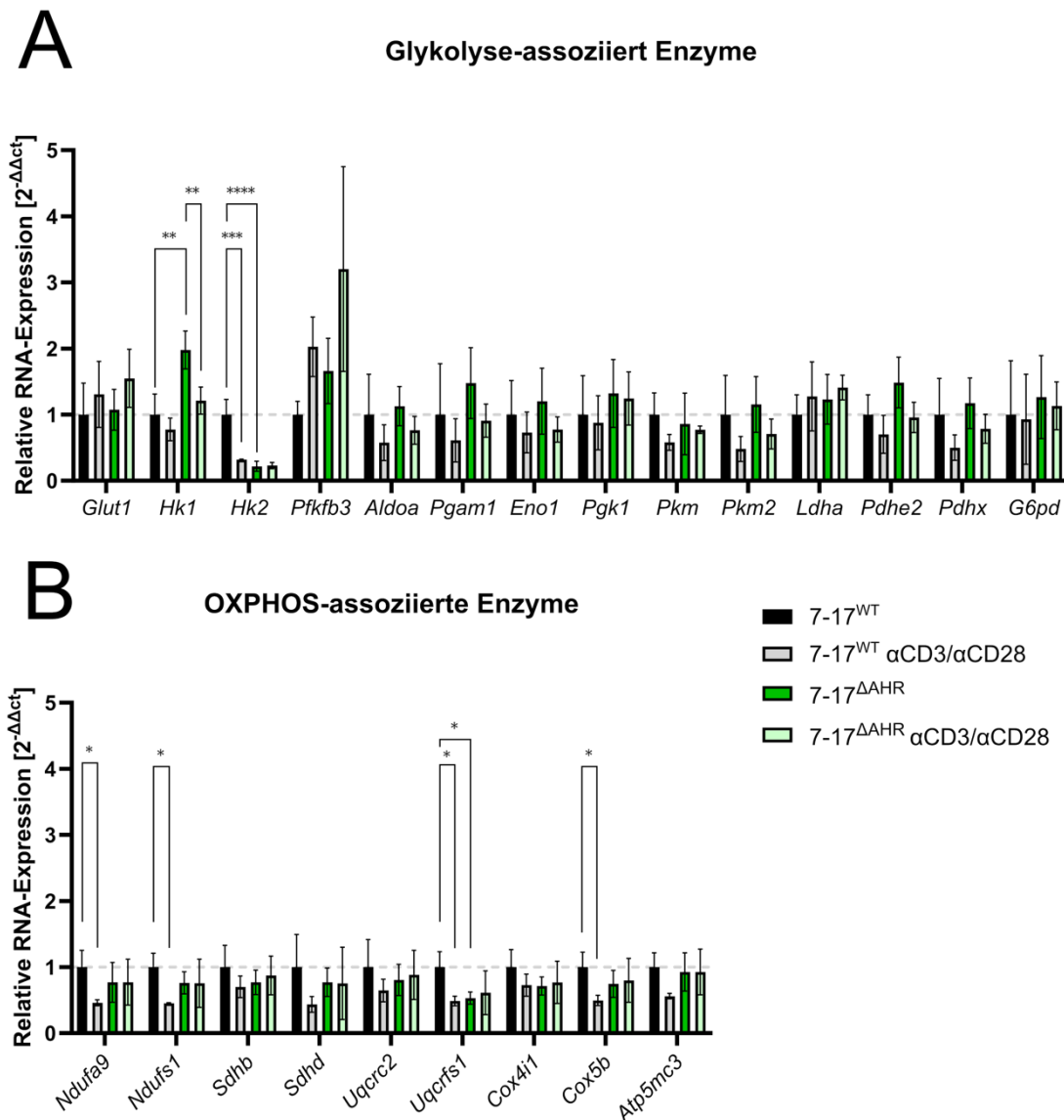


Abbildung 22: Analyse der Expression von Glykolyse- und OXPHOS-assoziierten Genen in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen. Relative mRNA-Expression von Glykolyse-assoziierten (A) und OXPHOS-assoziierten (B) Enzymen in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen im unbehandelten Zustand und nach αCD3/αCD28-Stimulation. Die Gene sind nach ihrer Stoffwechselfunktion gruppiert. Die relative Expression des jeweiligen Gens wurde auf *Rps6* als Haushaltsgen normalisiert und auf 7-17^{WT}-Zellen ohne Stimulation bezogen ($2^{-\Delta\Delta ct}$). Die Daten stellen den Mittelwert $\pm$ SD aus $n=3$ unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Analyse wurde mit einer Two-way ANOVA (Fisher-LSD-Post-hoc Test) durchgeführt. Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

Die Mehrheit der untersuchten Glykolyse-assoziierten Enzyme zeigten keine Unterschiede zwischen 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen, wie in Abbildung 22A zu erkennen ist. Wichtig zu erwähnen ist, dass der Glukosetransporter GLUT1, welcher für den Import von Glukose in die Zelle verantwortlich ist, zwischen beiden Genotypen unverändert blieb. Dies galt sowohl im unbehandelten Zustand als auch nach TCR-Stimulation mit αCD3/αCD28.

Interessanterweise zeigte sich jedoch eine veränderte Expression der Hexokinase-Isoformen 1 (*Hk1*) und 2 (*Hk2*). Diese katalysieren die irreversible Phosphorylierung von

Glukose zu Glukose-6-Phosphat, dem ersten Schritt der Glykolyse. HK1 kommt in den meisten Zellen vor und ist primär für die basale Glykolyse verantwortlich. Währenddessen wird HK2 bei Aktivierung von T-Zellen induziert und unterstützt die erhöhte glykolytische Aktivität (68,151). Die Expression von *Hk1* war in 7-17^{ΔAHR}-Zellen im unbehandelten Zustand fast doppelt so hoch wie in 7-17^{WT}-Zellen (1,98 FC vs. 1 FC). Nach 24 h TCR-Stimulation zeigte sich eine signifikante Reduzierung der *Hk1*-Expression in 7-17^{ΔAHR}-Zellen, sodass keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden konnten.

Für HK2 zeigte sich ein anderes Bild. Im unbehandelten Zustand war die Expression von *Hk2* in 7-17^{ΔAHR}-Zellen um 78,3% reduziert im Vergleich zu 7-17^{WT}-Zellen. Während die 7-17^{ΔAHR}-Zellen nach αCD3/αCD28-Stimulation eine gleichbleibende *Hk2*-Expression auswiesen, reduzierte sich diese auch in 7-17^{WT}-Zellen auf das Niveau der 7-17^{ΔAHR}-Zellen.

Neben Glykolyse-assoziierten Enzymen wurden auch Enzyme der mitochondrialen Atmungskette (OXPHOS) untersucht (Abbildung 22B).

Für eine Untereinheit des Komplexes III der Atmungskette, *Uqcrrf1*, wurde im unbehandelten Zustand in 7-17^{ΔAHR}-Zellen eine signifikant geringere Expression als in 7-17^{WT}-Zellen beobachtet (um 47,0% reduziert).

Interessanterweise zeigte sich für drei Gene ein sehr ähnliches Muster. In 7-17^{WT}-Zellen nahm die Expression der Gene *Ndufa9* und *Ndufs1* (Komplex I), sowie *Cox5b* (Komplex IV) nach Stimulation mit αCD3/αCD28 um ca. 50% ab. Im Gegensatz dazu blieb die Expression dieser Gene in 7-17^{ΔAHR}-Zellen auch nach TCR-Stimulation konstant und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die AHR-Deletion in 7-17-Zellen die Expression einzelner Schlüsselgene der Glykolyse wie HK1 und HK2 beeinflusst. Zusätzlich waren einzelne Komponenten der Komplexe I (*Ndufa9*, *Ndufs1*), III (*Uqcrrf1*) und IV (*Cox5b*) der mitochondrialen Atmungskette von der Deletion betroffen. Da HK1 und HK2 zentrale Eingangsenzyme der Glykolyse sind, wurde anschließend untersucht, ob sich die transkriptionelle Veränderung auch auf Proteinebene widerspiegelt.

3.6.4. AHR-Deletion verändert die Proteinexpression von HK1 und HK2

Um zu untersuchen, ob die erhöhte *Hk1*-Genexpression in 7-17^{ΔAHR}-Zellen auf Proteinebene nachweisbar ist, wurde die HK1-Proteinexpression mittels Western Blot analysiert (Abbildung 23A) und anschließend relativ quantifiziert (Abbildung 23B).

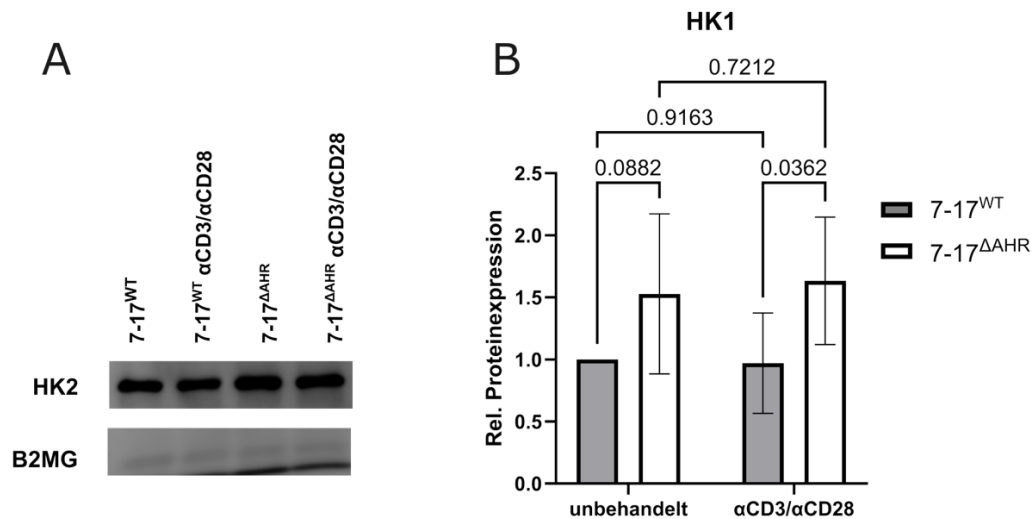


Abbildung 23: Erhöhte HK1-Proteinexpression in 7-17^{ΔAHR}-Zellen. (A) Repräsentative Darstellung der HK1-Proteinexpression in 7-17^{ΔAHR}- und 7-17^{WT}-Zellen mittels Western-Blot aus n=5 unabhängigen Experimenten. Die Proteine wurden im unbehandelten und im αCD3/αCD28-stimulierten Zustand untersucht. Zur Kontrolle wurde das Haushaltsgen β2-Mikroglobulin (b2MG) verwendet. (B) Quantifizierung der HK1-Proteinexpression aus (A). Die Daten stellen den Mittelwert ± SD aus n=5 unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-way ANOVA (Fisher-LSD-Post-hoc Test) bestimmt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Bereits im unbehandelten Zustand zeigten die 7-17^{ΔAHR}-Zellen eine tendenziell erhöhte HK1-Proteinexpression im Vergleich zu 7-17^{WT}-Zellen auf (Abbildung 23A, B), die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (p = 0,0882). Nach TCR-Stimulation mit αCD3/αCD28 war die HK1-Expression in 7-17^{ΔAHR}-Zellen signifikant erhöht. Innerhalb der jeweiligen Genotypen wurden zwischen unbehandelten und stimulierten Bedingungen keine signifikanten Veränderungen der HK1-Proteinexpression beobachtet.

Zur Überprüfung, ob auch die reduzierte *Hk2*-Genexpression in 7-17^{ΔAHR}-Zellen auf Proteinebene zu beobachten ist, wurde die HK2-Expression ebenfalls mittels Western Blot untersucht (Abbildung 24A) und anschließend relativ quantifiziert (Abbildung 24B). Als Haushaltspotein wurde β2-Mikroglobulin (b2MG) verwendet.

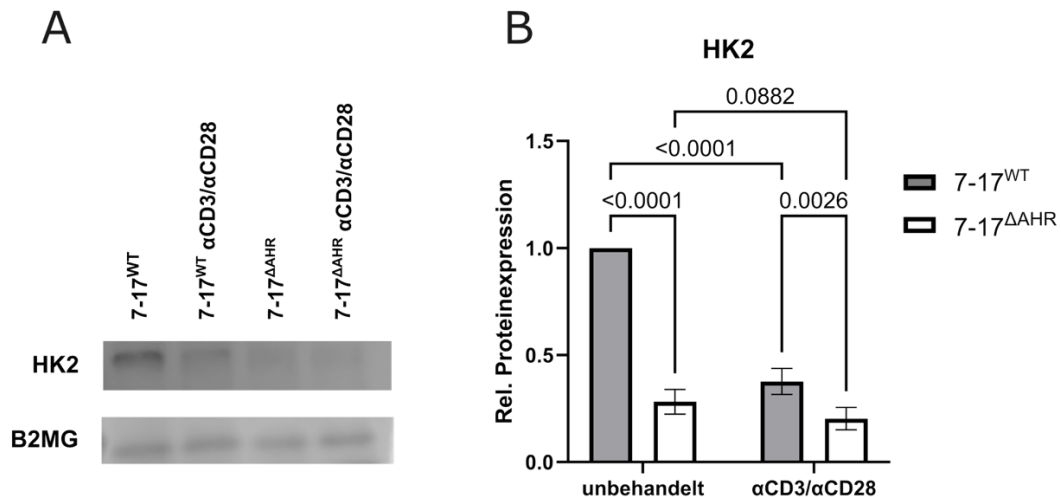


Abbildung 24: Reduzierte HK2-Proteinexpression in 7-17^{ΔAHR}-Zellen. (A) Repräsentative Darstellung der HK2-Proteinexpression in 7-17^{ΔAHR}- und 7-17^{WT}-Zellen mittels Western-Blot aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die Proteine wurden im unbehandelten und αCD3/αCD28-stimulierten Zustand untersucht. Zur Kontrolle wurde das Haushaltsgen β2-Mikroglobulin (b2MG) verwendet. (B) Quantifizierung der HK2-Proteinexpression aus (A). Die Daten stellen den Mittelwert ± SD aus n=3 unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-way ANOVA (Fisher-LSD-Post-hoc-Test). Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Wie Abbildung 24A entnommen werden kann, zeigt sich im unbehandelten Zustand eine deutlich geringere HK2-Proteinexpression in 7-17^{ΔAHR}-Zellen im Vergleich zum WT. Die relative Quantifizierung der Bandenintensität bestätigte diese Beobachtung und ergab eine Reduktion der HK2-Expression um 70,8% in 7-17^{ΔAHR}-Zellen im Vergleich zu 7-17^{WT}-Zellen (Abbildung 24B).

Nach TCR-Stimulation mit αCD3/αCD28 zeigt sich eine deutliche Abnahme der HK2-Expression in 7-17^{WT}-Zellen, sodass die Proteinlevel in beiden Genotypen auf ein vergleichbares Niveau absanken. Im stimulierten Zustand konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen 7-17^{ΔAHR}- und 7-17^{WT}-Zellen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der zuvor beobachteten erhöhten *Hk1*-Genexpression in 7-17^{ΔAHR}-Zellen. Damit bestätigt die Untersuchung der HK1- und HK2-Proteinexpression, dass die AHR-Deletion die Quantität zentraler Eingangsenzyme der Glykolyse verändert. Die erhöhte HK1-Expression könnte dabei für eine kompensatorische Anpassung an die reduzierte HK2-Expression sprechen (152).

3.6.5. AHR-Deletion verändert die Expression zentraler Regulatoren der metabolischen Reprogrammierung

Nachdem funktionelle und enzymatische Veränderungen des Energiemetabolismus nachgewiesen wurden, wurde untersucht, ob auch zentrale Regulatoren der

mitochondrialen Funktion (Abbildung 25A), der Energiesensorik (Abbildung 25B) und der metabolischen Reprogrammierung (Abbildung 25C) durch die AHR-Deletion beeinflusst werden.

Dafür wurde die Expression entsprechender Gene in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen mittels qPCR analysiert. Die RNA-Expression wurde zunächst auf das Haushaltsgen *Rps6* normalisiert und anschließend relativ zu unbehandelten 7-17^{WT}-Zellen bezogen.

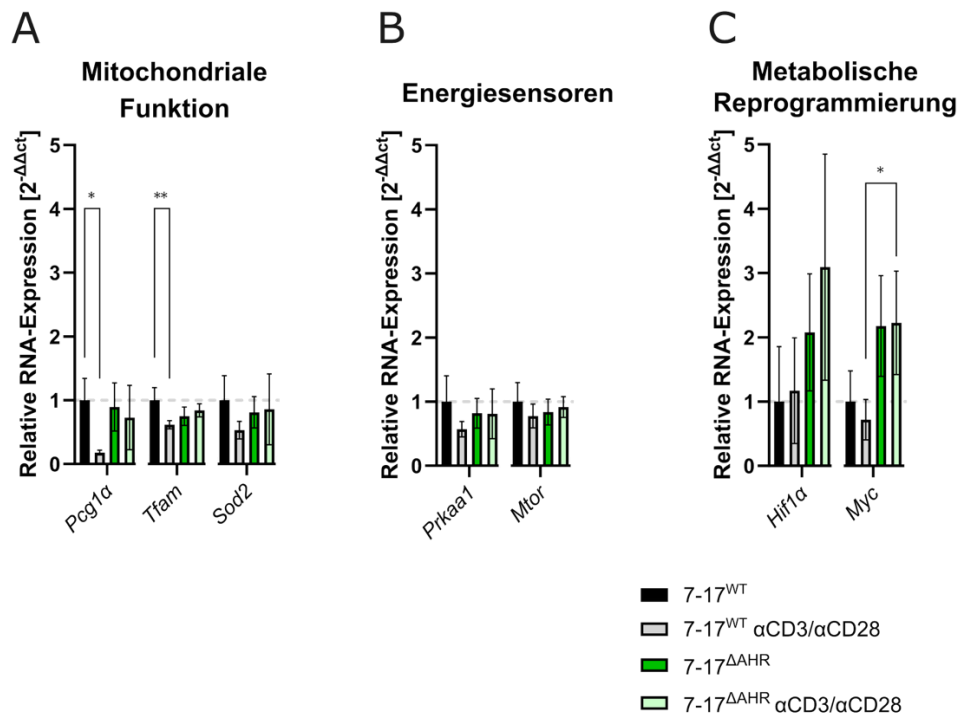


Abbildung 25: Analyse der Expression Metabolismus-assoziierter Gene in 7-17^{ΔAHR}-Zellen. Relative mRNA-Expression von Genen der mitochondrialen Funktion (A) und Energiesensorik (B) und metabolische Reprogrammierung (C) in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen unter unbehandelten Bedingungen und nach αCD3/αCD28-Stimulation. Die Gene sind nach ihrer Stoffwechselfunktion gruppiert. Die relative Expression des jeweiligen Gens wurde auf *Rps6* als Haushaltsgen normalisiert und auf 7-17^{WT}-Zellen ohne Stimulation bezogen ($2^{-\Delta\Delta ct}$). Die Daten stellen den Mittelwert $\pm$ SD aus n=3 unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Analyse wurde mit einer zweiseitigen ANOVA (Fisher-LSD-Post-hoc Test) durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

Wie in Abbildung 25A zu erkennen ist, zeigten Gene, die mit der mitochondrialen Funktion und Biogenese assoziiert sind, nur geringe Unterschiede zwischen 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen. Für PGC-1α, einen zentralen Regulator der mitochondrialen Biogenese, zeigte sich nach αCD3/αCD28-Stimulation in 7-17^{WT}-Zellen eine Abnahme der Expression im Vergleich zum unbehandelten Zustand. Im Gegensatz dazu wiesen 7-17^{ΔAHR}-Zellen nach Stimulation weitgehend konstante *Pgc1α*-Expressionswerte auf (0,89 FC vs. 0,72 FC).

Ein ähnliches Muster wurde auch bei TFAM, einem Schlüsselregulator der mitochondrialen DNA-Replikation und -Transkription, beobachtet. In 7-17^{WT}-Zellen sank die Expression um 38,4%, während 7-17^{ΔAHR}-Zellen keine vergleichbare signifikante Veränderung aufwiesen. Insgesamt zeigten die meisten analysierten Gene keine ausgeprägten genotypischen Unterschiede.

Gene, die mit der zellulären Energiesensorik assoziiert sind, wie *Prkaa1* und *Mtor*, wurden in 7-17^{ΔAHR}- und 7-17^{WT}-Zellen in vergleichbaren Mengen exprimiert, ohne nennenswerte, signifikante Unterschiede (Abbildung 25B). Dies deutet darauf hin, dass die zellulären Energiesensor-Systeme nicht durch die AHR-Deletion beeinflusst wurden.

Im Gegensatz dazu zeigten Gene, die an der metabolischen Reprogrammierung beteiligt sind, deutlichere Unterschiede (Abbildung 25C). Der Transkriptionsfaktor HIF-1α, ein wichtiger Regulator der glykolytischen Genexpression und außerdem ein Konkurrent des AHR um den gemeinsamen Bindungspartner ARNT (HIF-1β), war in 7-17^{ΔAHR}-Zellen sowohl unter basalen Bedingungen (1 FC vs. 2,08 FC) als auch nach Stimulation mit αCD3/αCD28 (1,17 FC vs. 3,09 FC) erhöht, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Ein ähnlicher Trend wurde auch für MYC, einen weiteren Transkriptionsfaktor, der an der metabolischen Umprogrammierung und der Glykolyse beteiligt ist, beobachtet. In 7-17^{ΔAHR}-Zellen war die *Myc*-Expression im Vergleich zu 7-17^{WT}-Zellen nach αCD3/αCD28-Stimulation etwa dreifach erhöht.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die AHR-Deletion mit einer verstärkten Expression von Transkriptionsfaktoren der metabolischen Reprogrammierung einhergeht, während klassische Energiesensoren weitgehend unverändert blieben. Dies spricht dafür, dass die veränderte metabolische Flexibilität von 7-17^{ΔAHR}-Zellen nicht primär durch eine globale Veränderung der Energiesensorik, sondern vielmehr durch die veränderte Regulation spezifischer metabolischer Transkriptionsprogramme verursacht wird.

3.6.6. AHR-Deletion erhöht das mitochondriale Membranpotenzial in 7-17^{ΔAHR}-Zellen

Da die *Seahorse*-Analyse auf eine verstärkte Nutzung mitochondrialer ATP-Produktion in 7-17^{ΔAHR}-Zellen hinwies, wurde untersucht, ob dieser Phänotyp mit Veränderungen

der mitochondrialen Masse oder Funktion zusammenhängt. Hierfür wurden die mitochondriale Superoxidproduktion (Abbildung 26A), die mitochondriale Masse (Abbildung 26B) und das mitochondriale Membranpotenzial (Abbildung 26C) durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentative Histogramme (n=3) der Analyse von unbehandelten und α CD3/ α CD28-stimulierten 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen sind in Abbildung 26 dargestellt.

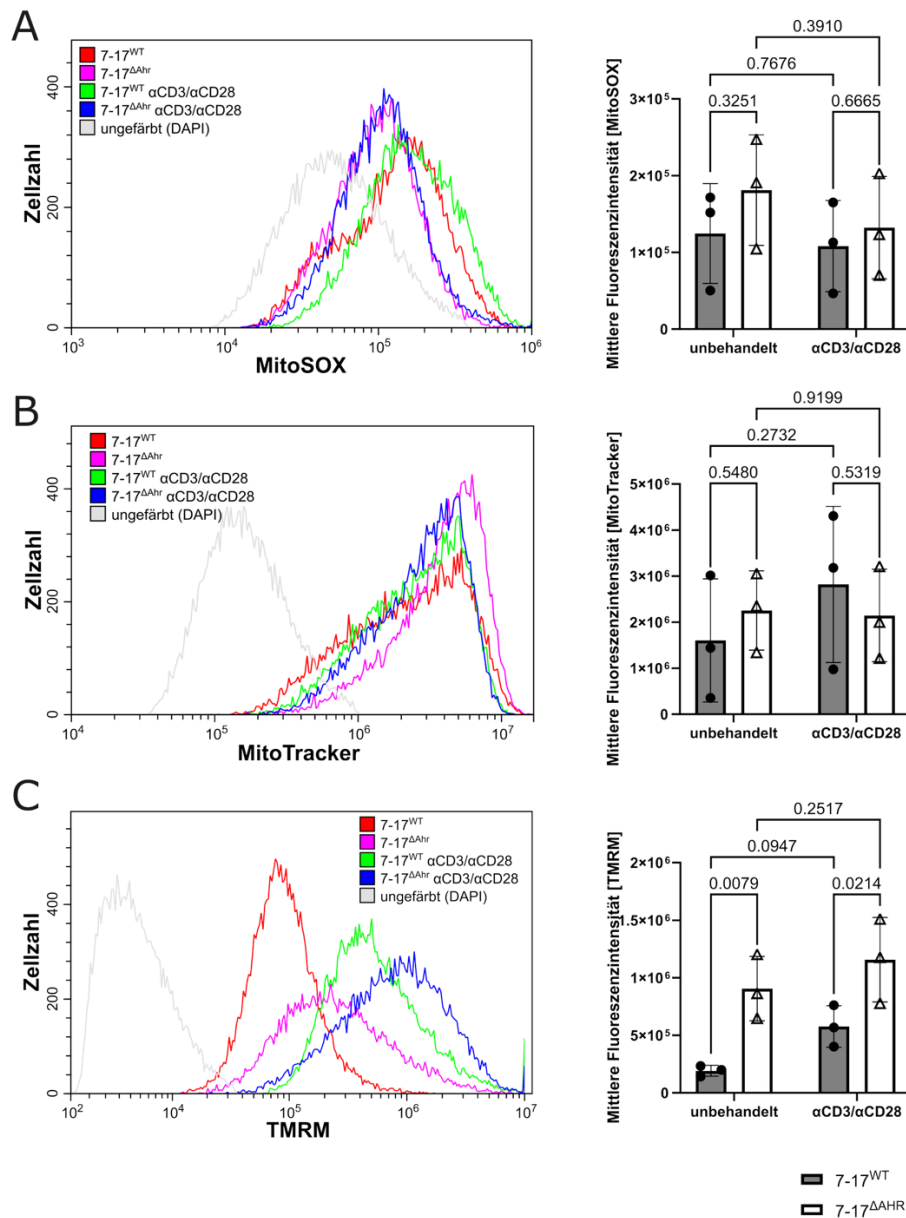


Abbildung 26: Untersuchung mitochondrialer Funktionen in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen. Durchflusszytometrische Analysen mitochondrialer Parameter in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen sowie die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI). (A) Mitochondriale Superoxidkonzentrationen, gemessen mittels MitoSOX™-Färbung. (B) Mitochondriale Masse, gemessen mittels MitoTracker™-Färbung. (C) Mitochondriales Membranpotenzial ($\Delta\psi_m$), gemessen mittels TMRM-Färbung. Gezeigt sind repräsentative Histogramme sowie die Quantifizierung der MFI aus n=3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitiger ANOVA (Fisher-LSD-Post-hoc Test). Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Durch die Farbstoffe MitoSOX™ und MitoTracker™ können sowohl das an der mitochondrialen Membran gebildete Superoxid (Abbildung 26A) als auch die mitochondriale Masse (Abbildung 26B) bestimmt werden. Weder im unbehandelten Zustand noch nach α CD3/ α CD28-Stimulation wurden Unterschiede zwischen 7-17^{WT}- und 7-17 ^{Δ AHR}-Zellen festgestellt. Der Verlust des AHR in 7-17-Zellen beeinflusst somit weder die Anzahl der Mitochondrien noch die mitochondriale Superoxid-Produktion. Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der Färbung des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) mittels Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM) (Abbildung 26C) eine deutliche Erhöhung in 7-17 ^{Δ AHR}-Zellen im Vergleich zu 7-17^{WT}-Zellen. Dieser Unterschied war bereits im unbehandelten Zellzustand zu beobachten. Nach TCR-Stimulation mit α CD3/ α CD28 stieg das Membranpotenzial in beiden Genotypen an, jedoch blieb die erhöhte Ausprägung in 7-17 ^{Δ AHR}-Zellen weiterhin bestehen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte mitochondriale ATP-Produktion in 7-17 ^{Δ AHR}-Zellen nicht durch eine erhöhte mitochondriale Masse erklärt werden kann und nicht oxidativen Stress in 7-17 ^{Δ AHR}-Zellen verursacht. Das erhöhte Membranpotenzial in Kombination mit der zuvor beschriebenen veränderten Kopplungseffizienz (Abbildung 19D) spricht vielmehr für eine veränderte Kopplung der mitochondrialen Atmung. Unter stimulierten Bedingungen spiegelt sich diese veränderte Kopplung in einer effizienteren Nutzung des Protonengradienten und dadurch in einer erhöhten ATP-Synthese aus der OXPHOS wider (Abbildung 19A, D).

3.6.7. Die AHR-Deletion beeinflusst nicht die Apoptoserate von 7-17 ^{Δ AHR}-Zellen

Da Veränderungen des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\psi_m$) mit Apoptose assoziiert sein können, wurde untersucht, ob das erhöhte $\Delta\psi_m$ in 7-17 ^{Δ AHR}-Zellen das Zellüberleben beeinflusst. Die Apoptoseraten wurden mittels Durchflusszytometrie nach dem Protokoll von Ildo Nicoletti (122) gemessen. In diesem Protokoll erscheinen apoptotische Zellen als Sub-G1-Population, da die DNA-Fragmentierung während der Apoptose den zellulären DNA-Gehalt reduziert und PI proportional zur vorhandenen DNA-Menge bindet.

Repräsentative *Gating*-Strategien und Histogramme sind in Abbildung 27 dargestellt.

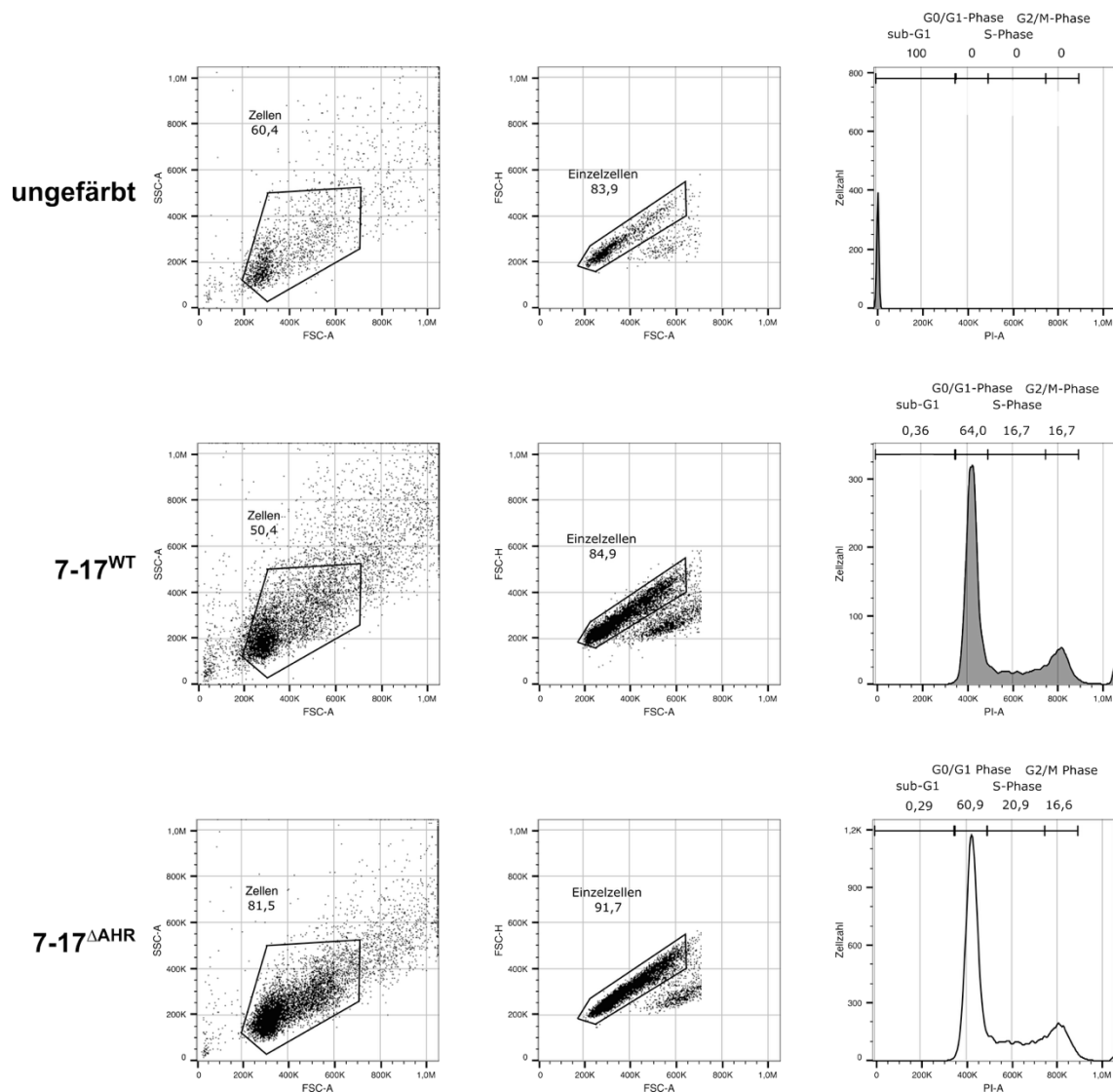


Abbildung 27: Analyse der Apoptose in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen. Die Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie nach dem Protokoll von Ildo Nicoletti (122) analysiert. Die repräsentative *Gating*-Strategie selektierte Zellen (FSC-A/SSC-A), schloss Dubletten (FSC-A/FSC-H) aus und bestimmte den DNA-Gehalt mittels Propidiumiodid-Färbung. Apoptotische Zellen wurden als Sub-G1-Population identifiziert. Es werden repräsentative Histogramme aus n=3 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Im unbehandelten Zustand der 7-17^{ΔAHR}-Zellen wurde kein Unterschied im Anteil apoptotischer Zellen zu 7-17^{WT}-Zellen beobachtet. Beide Genotypen zeigten eine vergleichbare Verteilung der Zellen in Sub-G1-, G0/G1-, S- und G2/M-Phasen. Dies deutet darauf hin, dass das erhöhte $\Delta\psi_m$ in 7-17^{ΔAHR}-Zellen kein Hinweis auf eine erhöhte basale Apoptose in den Zellen ist.

3.7. Einfluss des AHR auf homöostatische und Effektor-Funktionen von 7-17^{ΔAHR}-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass der AHR die $\gamma\delta$ TCR-Oberflächenausprägung, Aktivierung und metabolische Reprogrammierung von 7-17-Zellen beeinflusst, wurde

anschließend untersucht, ob auch homöostatische oder Effektor-Funktionen betroffen sind. Hierzu wurden zunächst Rezeptoren untersucht, die für die Homöostase dieser Zellen relevant sind. Anschließend wurden zentrale Zytokine und Chemokine überprüft.

3.7.1. AHR beeinflusst die Expression homöostatischer Zytokinrezeptoren in 7-17-Zellen

Die Signalübertragung über den IL-7R spielt während der Differenzierung der DETC im Thymus eine wichtige Rolle und ist unter anderem an der V(D)J-Rekombination der γ TCR-Gene beteiligt (22–24).

Im Gegensatz dazu wird die Homöostase der DETC primär durch IL-15 reguliert, das von benachbarten Epithelzellen produziert wird. Der Verlust von IL-15 oder seines Rezeptors führt zum vollständigen Verschwinden der DETC aus der Epidermis und unterstreicht die zentrale Rolle dieses Zytokins für den Erhalt der DETC-Population (27–29)

Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob die AHR-Deletion in 7-17-Zellen die Expression der Rezeptoren IL-15R α und IL-7R beeinflusst. Sowohl die Proteinexpression (Abbildung 28A,B) als auch die mRNA-Transkription (Abbildung 28C,D) wurden im basalen Zustand und nach α CD3/ α CD28-vermittelter TCR-Stimulation in 7-17^{WT}- und 7-17 ^{Δ AHR}-Zellen untersucht.

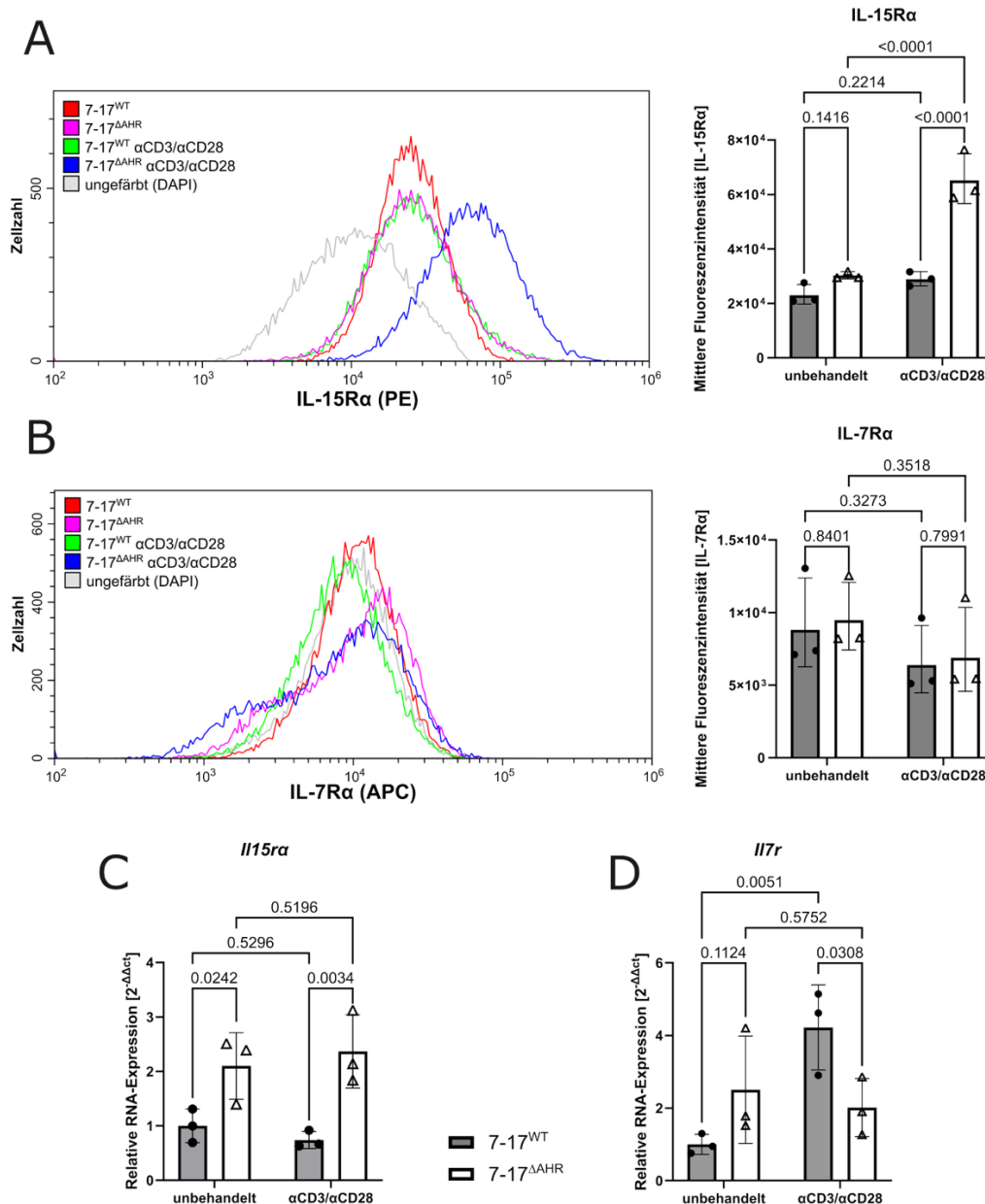


Abbildung 28: Analyse der IL-15Rα- und IL-7Rα-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene in AHR-defizienten 7-17-Zellen (A) Links: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der IL-15Rα-Oberflächenpräsenz (n=3) von 7-17^{WT} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen nach Färbung mit einem PE-konjugierten Anti-Maus IL-15Rα Antikörper. Rechts: Quantitative Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der durchflusszytometrischen Analyse. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von n=3 biologischen Replikaten. Die statistische Analyse wurde mittels Two-way ANOVA (Fisher-LSD post-hoc Test) durchgeführt. (B) Links: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der IL-7Rα-Oberflächenpräsenz (n=3) von 7-17^{WT} und 7-17^{ΔAHR}-Zellen nach Färbung mit einem APC-konjugierten Anti-Maus IL-7Rα Antikörper. Rechts: Quantitative Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität der durchflusszytometrischen Analyse. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von n=3 biologischen Replikaten. Die statistische Analyse wurde mittels Two-way ANOVA (Fisher-LSD post-hoc Test) durchgeführt. (C) Relative mRNA-Expression von *Il15ra* und (D) *Il7r* in 7-17^{WT} (grau) und 7-17^{ΔAHR} (weiß) Zellen unter unbehandelten Bedingungen und nach αCD3/αCD28-Stimulation. Die Expression wurde mittels des Haushaltsgens *Rps6* und unbehandelte 7-17^{WT}-Zellen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) normalisiert. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD aus n=3 unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Analyse wurde mit einer Two-way ANOVA (Fisher-LSD Post-hoc Test) durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Zunächst wurde die Oberflächenexpression von IL-15Rα mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 28A). Dabei zeigte sich im unbehandelten Zustand kein

signifikanter Unterschied zwischen 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen. Nach TCR-Stimulation war die Oberflächenexpression von IL-15Rα jedoch in 7-17^{ΔAHR}-Zellen erhöht. Die quantitative Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensität bestätigte diese Beobachtung.

Für IL-7Rα blieb die Oberflächenfärbung unter allen Versuchsbedingungen im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle sehr gering bis kaum nachweisbar und es konnten keine belastbaren Unterschiede zwischen 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen festgestellt werden (Abbildung 28B).

Auf Proteinebene wurde eine erhöhte Oberflächendichte von IL-15Rα nach TCR-Stimulation nachgewiesen, jedoch nicht im unbehandelten Zustand.

Die Analyse der *Il15ra*-Transkription zeigte in 7-17^{ΔAHR}-Zellen im Vergleich zu 7-17^{WT}-Zellen eine erhöhte Expression, sowohl im unbehandelten Zustand (2,84 FC vs. 1,35 FC) als auch nach Stimulation mit αCD3/αCD28 (3,20 FC vs. 1 FC) (Abbildung 28C). Weder in 7-17^{WT}- noch in 7-17^{ΔAHR}-Zellen zeigten sich Unterschiede in der *Il15ra*-Expression zwischen unbehandelten und αCD3/αCD28-stimulierten Bedingungen.

Die Analyse der *Il7r*-Transkription (Abbildung 28D) ergab im unbehandelten Zustand keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Nach Stimulation mit αCD3/αCD28 zeigte sich jedoch im Vergleich zu 7-17^{WT}-Zellen eine signifikante Reduktion der *Il7r*-Expression in 7-17^{ΔAHR}-Zellen um etwa 50%.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die AHR-Deletion vorwiegend mit einer erhöhten Expression von IL-15Rα auf Transkript- und teilweise auch auf Proteinebene einhergeht, während der IL-7Rα nur geringfügig beeinflusst wird. Die erhöhte IL-15Rα-Expression könnte die Sensitivität AHR-defizienter Zellen gegenüber homöostatischen IL-15-Signalen verstärken und damit insbesondere nach TCR-Stimulation zur Wiederherstellung der DETC^{ΔAHR}-Zellzahl in der Epidermis nach Verletzung beitragen.

3.7.2. AHR reguliert die Zytokin-Expression von CCL3 und CCL4 in 7-17-Zellen

Um zu beurteilen, ob der AHR neben homöostatischen Rezeptoren auch das Effektor-Profil von 7-17-Zellen reguliert, wurde die Expression wichtiger proinflammatorischer Zytokine und Chemokine unter basalen Bedingungen und nach αCD3/αCD28-

Stimulation in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen analysiert und die Sekretion von IFN-γ quantifiziert (Abbildung 29).

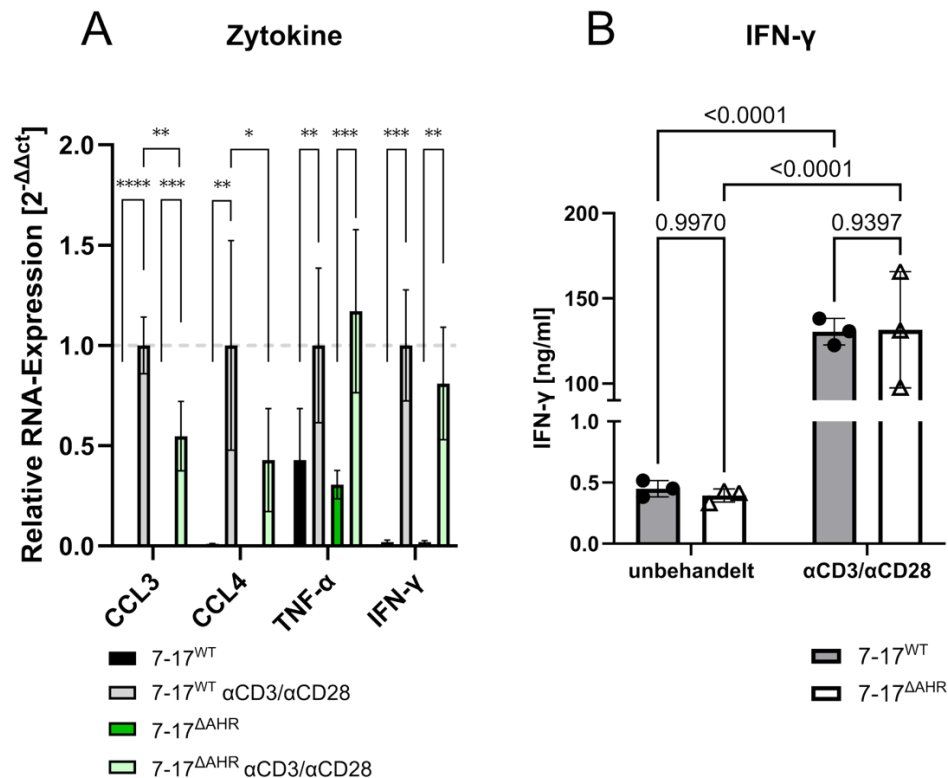


Abbildung 29: Einfluss von AHR auf die Zytokin- und Chemokinexpression in 7-17-Zellen nach TCR-Stimulation. (A) Relative mRNA-Expression von Zytokinen und Chemokinen in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen unter unbehandelten Bedingungen und nach αCD3/αCD28-Stimulation. Die relative Expression wurde auf *Rps6* als Haushaltsgen normalisiert und relativ zu 7-17^{WT}-Zellen nach αCD3/αCD28-Stimulation berechnet ($2^{-\Delta\Delta ct}$). Die Daten stellen den Mittelwert ± SD aus n=3 unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Analyse wurde mit einer Two-way ANOVA (Fisher-LSD-Post-hoc Test) innerhalb jedes Gens durchgeführt. (B) Quantifizierung der IFN-γ Proteinexpression in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen im unbehandelten Zustand und nach αCD3/αCD28-Stimulation mittels ELISA. Die Daten stellen den Mittelwert ± SD aus n=3 unabhängigen Experimenten dar. Die statistische Analyse wurde mit einer Two-way ANOVA (Fisher-LSD-Post-hoc Test) durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.

Unter unbehandelten Bedingungen zeigte sich für *Ccl3*, *Ccl4* und *Ifng* in beiden Genotypen nur eine sehr geringe, kaum nachweisbare Expression (Abbildung 29A). IFN-γ wurde mit einer Konzentration von 0,45 ng/ml in 7-17^{WT}- und 0,39 ng/ml in 7-17^{ΔAHR}-Zellen sekretiert (Abbildung 29B). Es konnte zwar die Expression von *Tnfa* gemessen werden, jedoch wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Nach der Stimulation mit αCD3/αCD28 konnte in beiden Genotypen eine starke Induktion dieser Gene beobachtet werden. Während die *Tnfa*- und *Ifng*-Expression zwischen 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen vergleichbar war, zeigte sich in AHR-defizienten Zellen eine signifikante Reduktion der *Ccl3*-Expression um 45,3% und der *Ccl4*-Expression um 57,2%.

Die Ergebnisse deuten auf einen Effekt der AHR-Deletion auf die Chemokin-Expression hin, während die Induktion wichtiger Effektor-Zytokine unbeeinflusst bleibt. Diese reduzierte Expression von *Ccl3* und *Ccl4* spricht für eine eingeschränkte Fähigkeit AHR-defizienter 7-17-Zellen, Chemokin-vermittelte Kommunikation und Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. Makrophagen) zu unterstützen (51).

4. Diskussion

Dendritische epidermale T-Zellen (DETC) sind gewebsresidente $\gamma\delta$ T-Zellen der murinen Epidermis und wichtig für die Immunüberwachung (z.B. von kanzerogenen Zellen), die Wundheilung und die Gewebekomöostase. In AHR-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR) essenziell für die postnatale Expansion und Persistenz neonataler DETC ist. AHR-defiziente DETC können zwar in die Epidermis einwandern, expandieren dort jedoch nicht ausreichend und gehen innerhalb weniger Wochen nahezu vollständig verloren (34). Zudem wurden Veränderungen in inflammatorischen Signalwegen, der Zytoskelett-Organisation und der Immunaktivierung beobachtet (118).

Auch adulte DETC prägen den AHR aus, aber bislang konnte nicht geklärt werden, ob der AHR neben den gerade beschriebenen Funktionen in der sehr jungen Epidermis relevant ist oder ob er auch in bereits etablierten adulten DETC für die immunologische Kompetenz nötig ist oder dazu beiträgt. Um entwicklungsbedingte Effekte von zellintrinsic Funktionen in adulten Zellen zu unterscheiden, wurde in der vorliegenden Arbeit ein induzierbares, DETC-spezifisches AHR-*Knockout*-Modell verwendet. Dadurch konnte erstmals untersucht werden, ob der AHR auch nach abgeschlossener Etablierung der DETC in der Haut weiterhin zu deren funktionellen Kompetenzen beiträgt.

Zunächst wurden von direkt aus der Haut isolierten DETC die Genexpressionsprofile AHR-profizienter und –defizienter DETC erhoben und bioinformatisch die veränderten Genmuster analysiert. Dabei zeigte sich, dass bei Fehlen des AHR insbesondere immunassoziierte Signalwege und Signalwege der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS), der Glykolyse und der T-Zell-Aktivierung betroffen waren. Weitere Untersuchungen mit einer DETC-Zelllinie (7-17 Zellen) zeigten, dass die Deletion des AHR mit reduzierter glykolytischer ATP-Produktion, erhöhter mitochondrialer ATP-Produktion, verminderter $\gamma\delta$ TCR-Expression sowie abgeschwächter Aktivierungsantwort assoziiert ist.

Diese Beobachtungen erweitern das bisherige Verständnis der Funktionen des AHR um eine wichtige immunmetabolische Komponente. Während aus Untersuchungen an CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen hinlänglich bekannt ist, dass aktivierte Lymphozyten ihre metabolische Maschinerie auf die Glykolyse umstellen müssen, um ihren

ansteigenden Energie- und Biosynthesebedarf zu decken (153,154), war die metabolische Regulation in geweberesidenten $\gamma\delta$ T-Zellen bislang kaum untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten, die im Folgenden im Detail diskutiert werden, schließen diese Lücke. Sie zeigen, dass der AHR nach der postnatalen Entwicklungsphase eine fortlaufende, zellintrinsische Rolle als metabolischer Regulator übernimmt, der die energetische Anpassung und damit die effiziente Aktivierungsfähigkeit adulter epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen mitsteuert.

4.1. Der Arylhydrocarbon-Rezeptor als Regulator der metabolischen Programmierung

Die metabolische Reprogrammierung ist ein grundlegendes Prinzip zellulärer Aktivierung. Ähnlich wie es für Krebszellen seit über 100 Jahren bekannt ist (149), passen auch T-Zellen ihren Stoffwechsel an den erhöhten Energie- und Biosynthesebedarf an. Während naive $CD4^+$ und $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen ihren ATP-Grundbedarf überwiegend über die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien (OXPHOS) erzeugen, nimmt nach TCR-vermittelter Aktivierung die Bedeutung der Glykolyse deutlich zu (68, 74). Neben der schnellen ATP-Bereitstellung liefert die Glykolyse essenzielle Zwischenprodukte für die Synthese von Nukleotiden, Lipiden und Aminosäuren und unterstützt dadurch die Proliferation und Effektor-Funktionen aktivierter T-Zellen (155,156). Eine erhöhte glykolytische Aktivität gilt dabei als charakteristisches Merkmal aktivierter Effektor-T-Zellen und ist eng mit der Zytokinproduktion verknüpft (74,157).

Im Vergleich zu konventionellen $\alpha\beta$ T-Zellen ist jedoch deutlich weniger bekannt, wie $\gamma\delta$ T-Zellen ihren Stoffwechsel regulieren. Die bisherigen Arbeiten deuten darauf hin, dass $\gamma\delta$ T-Zellen keine metabolisch einheitliche Zellpopulation darstellen, sondern je nach Subtyp, Entwicklungsprogramm und Effektor-Funktion unterschiedliche metabolische Profile aufweisen. So wurden für IFN- γ - und IL-17-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen charakteristische Unterschiede bei der Nutzung glykolytischer und oxidativer Stoffwechselwege beschrieben (158). Während IFN- γ -produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Glykolyse angewiesen sind, nutzen IL-17-produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen vermehrt die OXPHOS. Außerdem erhöhte die Verfügbarkeit von Glukose die anti-Tumorfunktionen von IFN- γ produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen (158). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass auch die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen mit einer

verstärkten glykolytischen Aktivität einhergeht (81,159). Damit ist metabolische Programmierung in $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl mit funktioneller Spezialisierung als auch mit akuter Aktivierung verbunden.

Für DETC ist diese Frage besonders relevant, da sie dauerhaft in der Epidermis verbleiben und dort nicht nur als klassische Effektorzellen agieren, sondern auch an der Gewebekomöostase, der Immunüberwachung und an Reparaturprozessen beteiligt sind (50). Sie müssen daher in einem metabolischen Zustand verbleiben, der einerseits langfristiges Überleben in der epidermalen Nische ermöglicht und andererseits eine schnelle Reaktion auf Stress- oder Verletzungssignale erlaubt.

Diese metabolische Ausgangslage adulter DETC wurde kürzlich auch funktionell beschrieben. Ibusuki et al. zeigten, dass adulte DETC im Ruhezustand eine vergleichsweise geringe Glykolyse aufweisen, während nach TCR-Stimulation adulter DETC in der späten Aktivierungsphase eine erhöhte Glykolyse und IFN- γ -Produktion aufwiesen. Zudem reduzierte die Hemmung der Glykolyse mittels 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) die IFN- γ -Produktion, jedoch nicht die IL-13-Produktion im späteren Verlauf der Aktivierungsphase (83). Damit konnte gezeigt werden, dass der metabolische Zustand adulter DETC eng mit der zeitlichen Regulation ihrer Zytokinantwort verbunden ist. Meine Ergebnisse erweitern diese Beobachtungen entscheidend, indem sie zeigen, dass der AHR an der Regulation dieser metabolischen Programme in epidermalen $\gamma\delta$ T-Zellen beteiligt ist und damit zur metabolischen Anpassung adulter DETC beitragen könnte.

Die bioinformatische Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten zeigte deutliche Veränderungen metabolischer Signalwege nach induzierter AHR-Deletion in DETC. Besonders auffällig waren eine verstärkte OXPHOS-Signatur und eine verminderte Anreicherung Glykolyse-assoziiierter Signalwege. Ergänzend dazu zeigten AHR-defiziente 7-17-Zellen funktionelle Veränderungen des Metabolismus mit reduzierter glykolytischer ATP-Produktion bei gleichzeitig erhöhter mitochondrialer ATP-Produktion. Diese Kombination spricht nicht für einen allgemeinen Verlust der Energiegewinnung aus der Glykolyse, sondern vielmehr für eine Verschiebung der metabolischen Gewichtung zugunsten mitochondrialer Stoffwechselwege. Gerade im Kontext einer T-Zell-Aktivierung könnte diese Verschiebung daher funktionell relevant sein. Die reduzierte glykolytische ATP-Produktion könnte epidermale $\gamma\delta$ T-Zellen somit

daran hindern, schnell und effizient auf Aktivierungs- und Stresssignale in der epidermalen Mikroumgebung zu reagieren.

Die metabolischen Veränderungen AHR-defizienter DETC gingen zusätzlich mit einer veränderten Expression zentraler glykolytischer Enzyme einher. Insbesondere HK2 war in AHR-defizienten 7-17-Zellen geringer exprimiert. HK2 ist eng mit der glykolytischen Aktivität und den Effektor-Funktionen aktivierter T-Zellen verknüpft und unterstützt die metabolische Anpassung während der Aktivierung (160,161). Die reduzierte HK2-Expression in AHR-defizienten 7-17-Zellen könnte daher zur verminderten glykolytischen ATP-Produktion beitragen. Allerdings bleibt offen, ob die veränderte HK2-Expression ursächlich für die beobachteten metabolischen Veränderungen ist oder ob sie Teil einer umfassenderen AHR-abhängigen Reprogrammierung des Zellmetabolismus darstellt. Gleichzeitig war HK1 in AHR-defizienten 7-17-Zellen erhöht exprimiert, was auf eine partielle kompensatorische Anpassung hindeuten könnte. Andere Arbeiten zeigten bereits, dass HK1 den Verlust von HK2 in T-Zellen teilweise ausgleichen kann (152).

Diese Veränderung könnte auch funktionelle Konsequenzen über die reine Energiegewinnung hinaus haben. DETC gehören zu den IFN- γ produzierenden $\gamma\delta$ T-Zellen und wie bereits erwähnt, ist eine reduzierte Expression glykolytischer Eingangsenzyme für sie besonders relevant. IFN- γ -produzierende $\gamma\delta$ T-Zellen werden in der Literatur mit antitumoralen Funktionen in Verbindung gebracht (162,163). Zudem wurde für humane, zirkulierende V γ 9V δ 2 T-Zellen gezeigt, dass eine gestörte Glukoseverwertung deren antitumorale Aktivität beeinträchtigen kann (164). Vor diesem Hintergrund könnte eine verminderte HK2-Expression in AHR-defizienten 7-17-Zellen nicht nur die glykolytische ATP-Produktion reduzieren, sondern auch die Fähigkeit dieser Zellen einschränken, Immunüberwachung und Tumorkontrolle zu betreiben.

Zusätzlich spricht die Beschreibung eines AHR-responsiven Elements in der Promotorregion von HK2 dafür, dass der AHR die HK2-Expression direkt beeinflussen könnte (165,166). Die verringerte HK2-Expression könnte daher nicht ausschließlich eine indirekte Folge veränderter Aktivierung sein, sondern direkt durch den Verlust des AHR vermittelt werden. Damit ergibt sich ein möglicher mechanistischer Zusammenhang zwischen AHR-Signalgebung, HK2-Expression und der Fähigkeit

epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen, glykolytische Stoffwechselprogramme nach Aktivierung bereitzustellen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass der AHR metabolische Prozesse in epidermalen $\gamma\delta$ T-Zellen reguliert und insbesondere die glykolytische Aktivität unterstützt. Während frühere Arbeiten vor allem die Bedeutung des AHR für die postnatale Expansion, Persistenz und Immunhomöostase neonataler DETC beschrieben haben (34,118), zeigen meine Ergebnisse, dass der AHR in adulten epidermalen $\gamma\delta$ T-Zellen benötigt wird, um den Aktivierungs-assoziierten Metabolismus zu regulieren. Die verminderte glykolytische ATP-Produktion in AHR-defizienten Zellen könnte die Fähigkeit der DETC beeinträchtigen, effizient auf Aktivierungs- und Stresssignale zu reagieren und dadurch die Balance zwischen epidermaler Homöostase und schneller Immunantwort stören (167,168).

Über die direkte Regulation einzelner Stoffwechselwege hinaus verweisen diese Daten auf eine bisher wenig verstandene Funktion des AHR in geweberesidenten T-Zellen. Da die Epidermis kontinuierlich verschiedenen diätetischen, mikrobiellen, endogenen und umweltbedingten AHR-Liganden ausgesetzt ist, bleibt zu klären, ob die metabolische Flexibilität adulter DETC durch eine tonische AHR-Aktivierung innerhalb des Gewebes unterstützt wird. Sollte dies der Fall sein, könnten qualitative oder quantitative Veränderungen der Ligandenverfügbarkeit die glykolytische Anpassung der Zellen beeinflussen. Für die epidermale Barriere wurde bereits gezeigt, dass mikrobielle Metabolite des Hautmikrobioms über den AHR auf die epidermale Homöostase und Barrierefunktion einwirken können (169).

Die Ergebnisse meiner Arbeit legen nahe, dieses Konzept auf den Metabolismus von residenten Immunzellen zu erweitern. Lokale AHR-Signale könnten nicht nur Keratinozytenprogramme, sondern auch die metabolische Ausgangslage und Aktivierung epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen beeinflussen. Veränderungen der Ligandenverfügbarkeit, etwa durch das Hautmikrobiom, Ernährung, UV-Exposition oder lokalen Entzündungen, könnten daher die Funktionen von DETC beeinflussen.

4.2. Einfluss des AHR auf TCR-Expression und Aktivierungsfähigkeit von DETC

Die metabolische Reprogrammierung in T-Zellen ist eng mit der TCR-Aktivierung verknüpft. Veränderungen glykolytischer und mitochondrialer Stoffwechselprozesse

können die Stabilität des TCR/CD3-Komplexes sowie nachgeschaltete Signalwege beeinflussen (147,170). Vor diesem Hintergrund ist es plausibel, dass die verminderte glykolytische Aktivität AHR-defizienter 7-17-Zellen mit der reduzierten $\gamma\delta$ TCR-Expression und der abgeschwächten Aktivierungsantwort zusammenhängt.

Sowohl AHR-defiziente DETC *in vivo* als auch AHR-defiziente 7-17-Zellen *in vitro* zeigten eine reduzierte $\gamma\delta$ TCR-Expression. Da der Phänotyp sowohl in der Epidermis als auch in der Zellkulturlinie ohne Kontakt zur epidermalen Mikroumgebung beobachtet wurde, spricht dies für einen überwiegend zellintrinsischen Mechanismus. Eine veränderte $\gamma\delta$ TCR-Expression ist für DETC besonders relevant, da sie ihre Gewebeüberwachungsfunktion über einen kontinuierlichen Kontakt mit Keratinozyten ausüben. Intravitalmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass DETC in der Epidermis über dendritische Fortsätze mit ihrer Umgebung verbunden sind und dynamisch auf lokale Gewebesignale reagieren (40). Außerdem zeigten Jameson et al., dass ein Keratinozyten-responsiver $\gamma\delta$ TCR für die Aktivierung von DETC nach Verletzung und deren Erhalt in der Epidermis erforderlich ist (44). Damit könnte eine verringerte $\gamma\delta$ TCR-Oberflächenexpression AHR-defizienter DETC nicht nur Aktivierungssignale, sondern auch die tonische Kommunikation mit den epidermalen Zellen beeinflussen.

Zusätzlich ging die reduzierte TCR-Expression mit einer abgeschwächten Induktion Aktivierungs-assoziiierter Chemokine, wie CCL3 und CCL4, sowie weiterer Aktivierungsmarker einher. Diese verminderte Chemokinantwort könnte weitreichende Konsequenzen für die lokale Immunantwort der Haut haben. DETC fungieren in der Epidermis als frühe Sensoren von Gewebestress. CCL3 und CCL4 sind funktionell in die Organisation der frühen Gewebeantwort eingebunden. Neben Wachstumsfaktoren produzieren DETC auch Chemokine nach Gewebeschädigung, wodurch myeloide Zellen in verletzte oder entzündete Hautareale rekrutiert werden (48). Ein Defizit in dieser Signalkaskade würde daher nicht nur eine verminderte Reaktivität der DETC selbst bedeuten, sondern könnte auch den zellulären *Cross-talk* innerhalb der Haut beeinträchtigen. Dadurch ergibt sich die Hypothese, dass der Verlust des AHR in DETC die periphere Immunüberwachung beeinflusst, indem er die koordinierte Rekrutierung weiterer Immunzellen nach Gewebestress verzögert oder abschwächt.

Bei der TCR-Expression handelt es sich nicht um einen statischen Vorgang, sondern um einen dynamisch regulierten Prozess, der vom Aktivierungszustand der Zelle abhängt. Um die Stärke des Signals zu begrenzen und eine Überaktivierung zu verhindern wird der TCR/CD3-Komplex nach Antigenerkennung internalisiert (171). Nach der Internalisierung wird dieser entweder abgebaut oder wieder zur Zelloberfläche transportiert (147,172).

Eine verringerte $\gamma\delta$ TCR-Oberflächenexpression muss daher nicht zwangsläufig einen einfachen Verlust des Rezeptors anzeigen, sondern kann durch vorangegangene oder laufende Signalregulation beeinflusst sein. Im Falle meiner Ergebnisse ist jedoch entscheidend, dass die reduzierte $\gamma\delta$ TCR-Expression AHR-defizienter Zellen mit einer abgeschwächten Induktion von Aktivierungsmarkern und Chemokinen einherging. Damit spricht dies eher für eine verminderte Signalqualität oder Aktivierung und nicht für eine aktivierungsbedingte TCR-Internalisierung.

Die Diskrepanz zwischen meiner histologischen Analyse und den RNA-Sequenzierungsdaten spricht dafür, dass die verminderte TCR-Expression zeitabhängig reguliert wird. Während die Epidermis für die histologischen Untersuchungen bereits kurz nach Stimulation fixiert wurde, erforderte die Isolation der DETC für die RNA-Sequenzierung eine verlängerte *ex vivo* Prozessierung von etwa 24 h. Da die Zellen während dieser Zeit weiterhin vital und metabolisch aktiv waren, könnte sich die TCR-Expression teilweise wieder angepasst haben. Dies wird durch die histologischen Daten gestützt, in denen sich die reduzierte $\gamma\delta$ TCR-Oberflächendichte AHR-defizienter DETC im Verlauf der Stressantwort wieder an das Niveau der WT-Zellen angepasst hatte. Gleichzeitig durchliefen WT- und AHR-defiziente DETC denselben Isolations- und Sequenzierungsprozess, sodass die beobachteten Unterschiede zwischen den Gruppen weiterhin biologisch relevant sind.

Zusätzlich ist zu beachten, dass die Aktivierung der DETC *in vivo* sich von der konventionellen TCR-Stimulation der 7-17-Zellen *in vitro* unterscheidet. Nach Verletzung des Epithels erkennen DETC Stress-induzierte Liganden über Rezeptoren wie NKG2D und CD100, wodurch zusätzliche TCR-unabhängige und/oder TCR-kostimulierende Aktivierungssignale genutzt werden können (50,173).

Insbesondere NKG2D wird auf DETC konstitutiv exprimiert und NKG2D-Liganden auf gestressten oder geschädigten Keratinozyten können zur Aktivierung von DETC

beitragen. Zu diesen Haut-assoziierten NKG2D-Stressliganden zählen unter anderem Rae-1 oder H60c (58,59,174), die AHR-defiziente DETC *in vivo* trotz reduzierter $\gamma\delta$ TCR-Oberflächendichte aktivieren können.

Diese zusätzlichen Aktivierungssignale könnten dazu beitragen, dass sich die reduzierte $\gamma\delta$ TCR-Oberflächenexpression AHR-defizienter DETC *in vivo* wieder auf das Niveau der WT-Zellen annähert. Eine vergleichbare Wiederherstellung der $\gamma\delta$ TCR-Expression wurde *in vitro* in den 7-17-Zellen nicht beobachtet. Die Stimulation mit α CD3/ α CD28 stellt dagegen ein typisches TCR-Aktivierungssignal dar, das eine schnelle Internalisierung und Herunterregulierung des TCR/CD3-Komplexes induzieren kann, wie es in 7-17-Zellen beobachtet wurde (170,172).

Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse dafür, dass der Verlust des AHR mit einer veränderten TCR-abhängigen Aktivierungsfähigkeit epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen verbunden ist. Insbesondere die Induktion von Effektor-Funktionen, wie die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, könnte beeinträchtigt sein, ebenso die initiale Wundheilungsreaktion (61,175). Darüber hinaus könnten Veränderungen auch für die Tumorummunüberwachung der Haut relevant sein. Da maligne oder gestresste Epithelzellen häufig Stressliganden exprimieren, könnte eine Kombination aus metabolischer Einschränkung, verminderter TCR-Expression und abgeschwächter CCL3/CCL4-vermittelter Zellkommunikation die Fähigkeit AHR-defizienter DETC beeinträchtigen, Veränderungen im Gewebe effizient zu kontrollieren. Ob dies tatsächlich die Entstehung kutaner Malignome beeinflusst, müsste jedoch in geeigneten Tumormodellen untersucht werden. Alternative Aktivierungsmechanismen durch Stresssignale oder Zytokine könnten dabei teilweise kompensatorisch wirken (174).

4.3. Zusammenhang zwischen metabolischer Regulation und TCR-Signaltransduktion

Die Aktivierung von T-Zellen geht mit einer metabolischen Umprogrammierung einher, bei der insbesondere die Glykolyse eine unterstützende Rolle spielt (74,157). Gleichzeitig beeinflusst die metabolische Ausgangslage ruhender T-Zellen, wie effizient sie nach Aktivierung den erhöhten Energie- und Biosynthesebedarf decken und eine stabile Aktivierungsantwort aufrechterhalten können (176,177). Vor diesem Hintergrund könnten AHR-defiziente DETC von einem metabolisch ungünstigeren

Ausgangszustand heraus aktiviert werden, wodurch nicht nur der metabolische *Output*, sondern auch die Effizienz der initialen TCR-abhängigen Signalweiterleitung beeinträchtigt werden könnte. In diesem Abschnitt steht daher die Frage im Vordergrund, wie eine AHR-abhängige Veränderung der Glykolyse die TCR-Signalqualität und -weiterleitung beeinflussen könnte.

Die AHR-defizienten 7-17-Zellen zeigten eine reduzierte glykolytische ATP-Produktion, während gleichzeitig nach TCR-Stimulation eine erhöhte glykolytische Reservekapazität beobachtet werden konnte. Dieses Ergebnis spricht gegen einen generellen Verlust der glykolytischen Funktion und zeigt, dass die Glykolyse grundsätzlich in den 7-17^{ΔAHR}-Zellen funktionell erhalten bleibt. Stattdessen könnte die metabolische Umprogrammierung während der Aktivierung zeitlich verzögert oder unzureichend koordiniert erfolgen.

Die T-Zell-Aktivierung ist nicht allein von der maximal möglichen glykolytischen Kapazität abhängig, sondern auch davon, ob diese Kapazität zum richtigen Zeitpunkt verfügbar ist. Gerade unmittelbar nach TCR-Aktivierung werden innerhalb kurzer Zeit Kalziumflüsse, ROS-Signale und Transkriptionsprogramme ausgelöst. Mitochondrien sind dabei nicht nur Energielieferanten, sondern unterstützen die T-Zell-Aktivierung auch über die mitochondriale ROS-Produktion, die für die NFAT (engl. *Nuclear factor of activated T-cells*)-Aktivierung und IL-2-Induktion erforderlich ist (178). Eine erhöhte mitochondriale ATP-Produktion AHR-defizienter 7-17-Zellen muss daher nicht per se nachteilig sein. Entscheidend könnte vielmehr sein, ob mitochondriale und glykolytische Programme während der Aktivierung korrekt koordiniert werden.

Für die Differenzierung aktivierter T-Zellen zu Effektor-Zellen ist eine schnelle Induktion der Glykolyse essenziell, wobei die Bedeutung einer anhaltenden glykolytischen Aktivität mit fortschreitender Aktivierung zunimmt (65). Die beobachteten Veränderungen sprechen daher eher für Defekte in der Dynamik der metabolischen Anpassung als für einen vollständigen Verlust der glykolytischen Aktivität.

In diesem Zusammenhang könnte auch die funktionelle Wechselwirkung zwischen AHR und HIF-1α eine Rolle spielen. Beide Transkriptionsfaktoren nutzen ARNT/HIF-1β als gemeinsamen Bindungspartner und können dadurch regulatorisch miteinander interagieren (179). Kürzlich wurde in CD8⁺ T-Zellen gezeigt, dass HIF-1α und AHR um ARNT/HIF-1β konkurrieren können und dass diese Konkurrenz mit der Balance

zwischen Effektor- und Gedächtnisprogrammen verbunden ist (180). Obwohl die genaue Bedeutung dieser Interaktion in $\gamma\delta$ T-Zellen bislang nicht geklärt ist, legt dies nahe, dass AHR-Signal und HIF-1 α -abhängige Stoffwechselprogramme auch in T-Zellen funktionell miteinander verschaltet sein können. In AHR-defizienten 7-17-Zellen könnte der Verlust dieser Abstimmung dazu beitragen, dass glykolytische Programme zwar teilweise induzierbar bleiben, aber zeitlich oder funktionell nicht optimal in die TCR-Aktivierung eingebunden werden.

Zusätzlich ging der veränderte Metabolismus AHR-defizienter 7-17-Zellen mit einer verminderten HK2- und $\gamma\delta$ TCR-Expression einher. Da HK2 den Eintritt von Glukose in die Glykolyse unterstützt, könnte eine verringerte HK2-Expression nicht nur die glykolytische ATP-Produktion, sondern auch die Bereitstellung glykolytischer Zwischenprodukte während der Aktivierungsphase begrenzen. So regulieren zum Beispiel glykolytische Zwischenprodukte wie Phosphoenolpyruvat (PEP) direkt TCR-abhängige Signalwege. Ho et al. zeigten, dass PEP in T-Zellen die TCR-vermittelte Kalzium-abhängige NFAT (engl. *Nuclear factor of activated T-cells*)-Signalgebung unterstützt. PEP hemmt dabei die Aktivität der Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA) und begünstigt dadurch eine anhaltende zytosolische Kalzium-Signalgebung (181). Diese Kalzium-Signale führen durch die Aktivierung von Calcineurin zur Dephosphorylierung von NFAT, wodurch dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht wird. Eine verminderte Glykolyse AHR-defizienter Zellen könnte daher die Verfügbarkeit glykolytischer Zwischenprodukte wie PEP reduzieren und dadurch TCR-abhängige Kalzium- und NFAT-Signalwege abschwächen. Funktionell könnte dies dazu führen, dass AHR-defiziente DETC nach TCR-Stimulation weniger effizient ein transkriptionelles Aktivierungsprogramm einleiten, und stellt eine mechanistische Erklärung für die reduzierte Expression von Aktivierungsmarkern und Effektormolekülen dar.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass der AHR an der Koordination metabolischer Anpassungsprozesse während der Aktivierung epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen beteiligt ist. Um diesen Zusammenhang experimentell weiter zu untersuchen, wären zeitaufgelöste Analysen der frühen Aktivierungsphase besonders relevant. Eine gezielte Metabolomanalyse könnte klären, ob AHR-defiziente 7-17-Zellen nach TCR-Stimulation eine verminderte oder verzögerte Anreicherung glykolytischer

Zwischenprodukte wie PEP aufweisen. Ergänzend könnten Kalzium-Flux-Messungen sowie Analysen der NFAT-Dephosphorylierung und nukleären Translokation zeigen, ob die TCR-abhängige Kalzium-NFAT-Signalgebung in AHR-defizienten Zellen tatsächlich abgeschwächt ist. Des Weiteren könnte eine pharmakologische Hemmung der Glykolyse in 7-17^{WT}-Zellen zeigen, ob eine reduzierte Glykolyse ausreicht, um den in AHR-defizienten 7-17-Zellen beobachteten Phänotyp teilweise nachzuahmen.

4.4. Bedeutung der AHR-abhängigen Regulation für DETC-Homöostase und Wundantwort

DETC reichern sich als Teil der frühen Immunantwort nach einer Verletzung des Gewebes am Wundrand an (50). In der vorliegenden Arbeit wurde bei Mäusen mit AHR-defizienten DETC unmittelbar nach Verletzung eine reduzierte Anzahl dieser Zellen in der aurikulären Epidermis beschrieben. Das anfängliche Defizit wurde jedoch innerhalb von 48 h kompensiert, sodass die Anzahl der DETC mit den Wildtyp-Kontrollen vergleichbar war. Gleichzeitig wurde eine geringere $\gamma\delta$ TCR-Expression in AHR-defizienten DETC im Gewebe nachgewiesen, die sich mit der Zeit ebenfalls anglich. Dies spricht dafür, dass der AHR die frühe Gewebeantwort von DETC beeinflusst, ohne deren grundsätzliche Fähigkeit zur Reaktion auf Verletzungen vollständig aufzuheben.

Die reduzierte DETC-Zahl unmittelbar nach Gewebeschädigung deutet auf eine Störung der frühen Wundrand-Reaktion hin, während die Normalisierung nach 48 h für eine kompensatorische Aktivierung durch das Gewebemilieu spricht. Damit unterscheidet sich der adulte induzierte AHR-Verlust deutlich von der neonatalen AHR-Defizienz, bei der DETC aufgrund gestörter postnataler Expansion langfristig aus der Epidermis verschwinden (34). Meine Ergebnisse und die beobachtete Dynamik sprechen daher weniger für einen Verlust der Gewebepersistenz als für eine veränderte Anpassung etablierter DETC an lokale Verletzungs- und Stresssignale.

Um dieses *in vivo* Verhalten zu verstehen, sollte die DETC-Biologie im Kontext ihrer direkten zellulären Nachbarschaft, insbesondere der Keratinozyten, betrachtet werden. Wie bereits erwähnt, tragen tonische $\gamma\delta$ TCR-Signale im Kontakt mit Keratinozyten zur DETC-Homöostase bei. (40,57). Dadurch kann eine veränderte Reaktion der DETC nach Gewebeschädigung nicht nur aus zellintrinsischen

Veränderungen entstehen, sondern auch aus einer veränderten Verarbeitung lokaler Gewebesignale.

Auch wenn frühere Arbeiten eine AHR-abhängige Regulation von Zytoskelett- und Aktivierungsprogrammen in neonatalen DETC beschrieben (118), zeigten adulte AHR-defiziente DETC *in vivo* keine offensichtlich veränderte Morphologie. Daher spricht die initial geringere Anzahl AHR-defizienter DETC weniger für eine primär gestörte strukturelle Einbettung in die Epidermis, sondern eher für eine veränderte funktionelle Kommunikation zwischen Keratinozyten und DETC. Obwohl der physiologische Ligand des kanonischen V γ 5V δ 1 TCR bislang nicht eindeutig identifiziert wurde, gehört SKINT-1 zu den bereits identifizierten Ligandenkandidaten, welcher die Entwicklung und Funktion von DETC reguliert (18). Neuere Arbeiten zeigen zudem, dass SKINT-1-abhängige Interaktionen zwischen Keratinozyten und dem $\gamma\delta$ TCR auch im adulten Gewebe relevant bleiben. Eine Störung dieser Interaktion verändert nicht unmittelbar die DETC-Zellzahl, beeinträchtigt aber den *steady-state* Phänotypen der DETC, die epidermale Barrierefunktion und die Bereitschaft der Zellen, auf Gewebestörung zu reagieren (182).

Die Normalisierung der DETC-Zahlen innerhalb von 48 h deutet jedoch darauf hin, dass die AHR-Defizienz die Fähigkeit der Zellen, auf Gewebeschädigung zu reagieren, nicht vollständig aufhebt. Stattdessen könnten alternative Aktivierungsmechanismen die reduzierte TCR-Signalgebung teilweise kompensieren. Nach Gewebeschädigung exprimieren Keratinozyten verschiedene Stress-induzierte Liganden, die von aktivierenden Rezeptoren auf DETC erkannt werden. Insbesondere der CD100/Plexin-B2-Signalweg ist für die Wundantwort wichtig. Witherden et al. zeigten, dass Plexin-B2 auf Keratinozyten nach Gewebeverletzung als Ligand für CD100 auf DETC wirkt und dadurch die Aktivierung der DETC und die epitheliale Reparatur unterstützt. CD100-defiziente Mäuse zeigten entsprechend eine verzögerte kutane Wundheilung (57). Damit stellt CD100/Plexin-B2 ein TCR-unabhängiges beziehungsweise $\gamma\delta$ TCR-kostimulierendes Gewebesignalweg dar, welches AHR-defizienten DETC trotzdem erlauben könnte, trotz reduzierter $\gamma\delta$ TCR-Expression auf Verletzungsstress zu reagieren.

Neben Stress-induzierten Liganden spielen auch Zytokine wie IL-15 und IL-7 eine zentrale Rolle bei der Zellaktivierung, der Homöostase und der Proliferation von DETC

(24,27,183). Während der Wundheilung produzieren Keratinozyten IL-15, was die Expansion von DETC sowie deren Überleben und Aktivierung fördert (184,185). Dieser Signalweg ist besonders wichtig für die Wundheilung, da IL-15 die Aktivierung von DETC und deren Produktion von IGF-1 fördern kann, wodurch die Reparatur des geschädigten Gewebes unterstützt wird (183). Auf der anderen Seite wurde in diabetischer Haut eine verminderte epidermale IL-15-Produktion mit einer abgeschwächten mTOR-Aktivierung in DETC und reduzierter IGF-1-Produktion in Verbindung gebracht und könnte die Wundheilung stören (186). Die in meiner Arbeit beobachtete erhöhte IL-15R-Expression in AHR-defizienten 7-17-Zellen könnte in diesem Zusammenhang auf einen kompensatorischen Mechanismus hindeuten. AHR-defiziente epidermale $\gamma\delta$ T-Zellen könnten dadurch stärker auf Überlebens- und Aktivierungssignale angewiesen sein, um Einschränkungen der TCR-abhängigen Aktivierung teilweise auszugleichen. Da diese Beobachtung bisher in der 7-17-Zelllinie gemacht wurde, sollte sie zukünftig auch direkt in primären DETC überprüft werden. Interessanterweise erreichte der transepidermale Wasserverlust (TEWL) nach mechanischer Reizung in AHR-defizienten Mäusen, ähnlich wie bei den Wildtyp-Kontrollen, wieder das Ausgangsniveau. Dies zeigt, dass die initial reduzierte Anzahl der DETC am Wundrand die funktionelle Wiederherstellung der epidermalen Barriere, zumindest im untersuchten Zeitraum, nicht wesentlich verzögerte. Daraus lässt sich schließen, dass die verbliebenen DETC oder alternative epidermale Reparaturmechanismen ausreichen, um den Wasserverlust zu normalisieren. Gleichzeitig bleibt aber offen, ob Veränderungen der lokalen Entzündungsantwort, der Zellkommunikation oder der Gewebeorganisation bestehen, die durch TEWL-Messungen nicht erfasst werden. Eine normalisierte Barrierefunktion schließt daher nicht aus, dass sich die immunologische oder strukturelle Qualität der Wundantwort zwischen WT- und AHR-defizienten DETC unterscheidet. Zusammenfassend sprechen die reduzierte $\gamma\delta$ TCR-Expression sowie die initial verminderte Anzahl der DETC am Wundrand dafür, dass die frühe Reaktion epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen auf Gewebeschädigung durch AHR-Defizienz abgeschwächt oder verzögert wird. Die schnelle Normalisierung der DETC-Zahlen sowie die erhöhte Expression des IL-15-Rezeptors in 7-17^{AHR}-Zellen sprechen jedoch dagegen, dass die generelle Reaktionsfähigkeit der Zellen vollständig aufgehoben ist. Stattdessen könnte

die Aktivierung AHR-defizienter DETC weniger stark durch tonische $\gamma\delta$ TCR-Signale und möglicherweise stärker durch Stress- und Zytokin-abhängige Mechanismen gesteuert werden. Diese Interpretation wird zusätzlich durch die erhöhte Expression von *Klrd1* und *Klrb1c* in DETC^{ΔAHR} unterstützt, die auf eine verstärkte Beteiligung NK-assoziiierter Aktivierungssignalwege hinweisen könnte. Damit entsteht ein Modell, in dem der AHR die TCR-abhängige und metabolisch flexible Reaktion von DETC im Gewebe stabilisiert. Fehlt der AHR, geht diese Funktion nicht vollständig verloren, sondern verschiebt sich möglicherweise hin zu einer stärker von extrinsischem Gewebestress, Zytokinen und NK-assoziierten Programmen getragenen Reaktion.

Um diese Mechanismen weiter aufzuklären, wären funktionelle Untersuchungen der Aktivierung nach Gewebeschädigung sinnvoll. Hierbei könnte unter anderem analysiert werden, ob AHR-defiziente DETC eine erhöhte Sensitivität gegenüber IL-15 aufweisen. Zusätzlich könnten Inhibitionsexperimente für IL-15-, NKG2D- und CD100/Plexin-B2-Signalwege dazu beitragen, zu klären, welche Achsen die beobachtete Kompensation der DETC-Zahlen vermitteln. Besonders aufschlussreich wäre dabei, ob die Blockade einzelner Stress- und Zytokinsignalwege die schnelle Normalisierung der DETC-Zahlen verhindert und dadurch die vermutete kompensatorische Reaktionsweise AHR-defizienter DETC sichtbar macht.

4.5. Einordnung der Ergebnisse in die AHR-vermittelte Regulation der Hautimmunität

Der AHR ist in allen bisher untersuchten Hautzelltypen stark exprimiert und hat je nach Zelltyp unterschiedliche, zellspezifische Funktionen. So ist er für die Ausbildung der Hautbarriere in Keratinozyten wichtig, für lokale Immunzellen wie Langerhanszellen reguliert er Reifungsprozesse nach Antigenaufnahme (187), für Melanozyten ist er für die Melaninbildung nach UV-Bestrahlung wichtig (187,188). Weiterhin spielt der AHR eine Doppelrolle bei entzündlichen Prozessen. Einerseits vermittelt er umweltbedingte, pathologische Hautveränderungen, andererseits bildet er die Basis für anti-inflammatorische Therapien (146,189,190). Dies zeigt beispielsweise die klinische Nutzung von AHR-ligandenreichem Kohlenteer oder dem topischen AHR-Liganden Tapinarof in der Therapie der Schuppenflechte und der atopischen Dermatitis (89,146,191). Insofern gilt der AHR als Modulator, der das Gleichgewicht zwischen protektiver Immunität und überschießender Inflammation beeinflusst.

Inwiefern das Mikromilieu in der Haut (z.B. Vorliegen einer Entzündung) über die Wirkung von AHR-Liganden entscheidet, ist eine ungelöste Frage, die unter dem Stichwort „Janusköpfigkeit des AHR“ derzeit intensiv erforscht wird (192).

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern dieses Konzept um die Perspektive einer zellintrinsischen, immunmetabolischen Regulation von $\gamma\delta$ T-Zellen. Gerade die reduzierte glykolytische ATP-Produktion, die verminderte HK2-Expression sowie die veränderte Aktivierungsantwort sprechen dafür, dass der AHR an der immunmetabolischen Regulation epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen beteiligt ist (165,166). Damit ist der AHR in DETC nicht nur als Sensor äußerer oder lokaler Liganden relevant, sondern auch als Faktor, der metabolische Flexibilität, TCR-abhängige Aktivierung und Gewebeüberwachung miteinander verbindet.

Da der AHR auf eine Vielzahl exogener und endogener Liganden reagiert, könnte er Umweltreize direkt mit gewebespezifischen Immunreaktionen verknüpfen. Ernährungsbestandteile, UV-induzierte Metabolite und Mikrobiom-abhängige Stoffwechselprodukte können als AHR-Liganden wirken und dadurch lokale Immunreaktionen beeinflussen (94,116,146). Die Verfügbarkeit solcher Liganden könnte somit direkt beeinflussen, wie epidermale $\gamma\delta$ T-Zellen auf lokale Stresssignale reagieren und langfristig Auswirkungen auf die Gewebekomöostase, die Barrierefunktion und die Wundheilung haben.

Innerhalb der Epidermis sind DETC wichtige Mediatoren und Regulatoren der Immunüberwachung, der Wundheilung und der Stressreaktion (50,193). Meine Ergebnisse zeigen, dass der AHR metabolische Anpassungsprozesse in epidermalen $\gamma\delta$ T-Zellen steuert und dadurch deren Reaktivität gegenüber Stress- und Aktivierungssignalen beeinflusst. Damit reguliert der AHR nicht nur die Entwicklung epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen, sondern auch deren funktionelle Anpassung an Gewebeveränderungen im adulten Organismus.

Diese Beobachtungen könnten auch für andere Situationen relevant sein, in denen $\gamma\delta$ T-Zellen unter metabolisch anspruchsvollen Bedingungen agieren müssen. Dazu zählen entzündliche, hypoxische oder Tumor-assoziierte Mikromilieus, in denen Nährstoffverfügbarkeit, Sauerstoffmangel und lokale Stresssignale die Funktion von Immunzellen wesentlich prägen. Überträgt man meine Ergebnisse auf solche

Gewebesituationen, ergibt sich die Hypothese, dass eine intakte AHR-Signalgebung zur metabolischen Belastbarkeit von $\gamma\delta$ T-Zellen beitragen könnte.

Um den Zusammenhang zwischen AHR-Signal, metabolischer Anpassung und der Aktivierung epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen weiter aufzuklären, wäre eine funktionelle Untersuchung der Aktivierungsphase von DETC sinnvoll. Dabei könnte analysiert werden, wie sich exogene und endogene AHR-Liganden auf die metabolische Aktivität, die $\gamma\delta$ TCR-Expression sowie die Reaktivität von DETC nach Gewebeschädigung auswirken. Zusätzlich könnten zeitliche Analysen der Wundheilung und der frühen DETC-Aktivierung dabei helfen, zu erklären, wie stark der AHR die Anpassung epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen an lokale Stresssignale beeinflusst. Darüber hinaus wäre langfristig interessant, ob AHR-abhängige metabolische Programme auch in anderen $\gamma\delta$ T-Zellpopulationen zur funktionellen Stabilität unter Stressbedingungen beitragen.

5. Schlussfolgerung

Der AHR ist als Transkriptionsfaktor für seine vielfältigen und ausgeprägten zellspezifischen Funktionen bekannt, und derzeit werden immer wieder neue Funktionen dieses Rezeptors beschrieben. Gleichzeitig ist der AHR als therapeutischer Angriffspunkt interessant, und mit dem AHR-Liganden Tapinarof wurde erstmals ein Medikament entwickelt, das für entzündliche Hauterkrankungen zugelassen ist. In meiner Dissertation standen Haut-residente Immunzellen der Maus im Fokus, deren Aufgabe die Immunüberwachung, die Kontrolle maligner Zellen sowie die Unterstützung der Wundheilung ist.

Ich konnte zeigen, dass der AHR für den aktivierungsbedingten, metabolischen Wechsel hin zur Glykolyse von zentraler Bedeutung ist, ein für konventionelle T-Zellen bekanntes Aktivierungsmerkmal. Damit erweitert diese Arbeit das bisherige Verständnis des AHR in DETC. Nicht nur für die postnatale Entwicklung und Persistenz dieser Zellen ist der AHR relevant, sondern er trägt in adulten, bereits etablierten DETC zur zellulären Funktion und metabolischen Flexibilität bei. Meine Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass eine AHR-Defizienz die funktionelle Stressantwort auf Hautschäden beeinträchtigt. Hier müssen weitere Untersuchungen zeigen, inwiefern dies auch für spätere Phasen der Wundheilung und die anderen Immunüberwachungsaufgaben der DETC relevant ist.

Auch Untersuchungen zum Einfluss des Niveaus der AHR-Liganden in der Nahrung oder im Mikrobiom könnten sinnvoll sein. Da die Haut kontinuierlich mit endogenen, mikrobiellen, diätischen und umweltbedingten AHR-Liganden konfrontiert ist, könnte die Verfügbarkeit dieser Liganden die metabolische Ausgangslage und damit die Reaktionsfähigkeit epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen beeinflussen. Auch wäre noch mechanistisch zu klären, ob die veränderte glykolytische Aktivität ursächlich zur reduzierten $\gamma\delta$ TCR-Expression und zur eingeschränkten Aktivierungsfähigkeit beiträgt oder ob metabolische und funktionelle Veränderungen parallel durch gemeinsame AHR-abhängige Regulationsmechanismen kontrolliert werden.

In Bezug auf das therapeutische Potenzial meiner Befunde wäre es sinnvoll, zu analysieren, ob eine pharmakologische Hemmung der Glykolyse in epidermalen $\gamma\delta$ T-Zellen zu vergleichbaren Veränderungen der $\gamma\delta$ TCR-Expression, der metabolischen Aktivität und der Aktivierungsantwort führt, wie sie in AHR-defizienten

Zellen beobachtet wurden, und inwiefern sich daraus therapeutisch nutzbare Ansatzpunkte ableiten lassen.

Über das murine Hautsystem hinaus eröffnet diese Arbeit zudem eine weiterführende Perspektive für die Tumormunologie. Nichtresidente $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut, insbesondere humane V γ 9V δ 2 T-Zellen, werden derzeit stark als therapeutisches Mittel zur Tumorabwehr und für adoptive Zelltherapien diskutiert (194). Ein zentrales Problem solcher Ansätze ist, dass therapeutisch eingesetzte T-Zellen im Tumormikromilieu häufig auf metabolisch ungünstige Bedingungen treffen, darunter Nährstoffkonkurrenz, Hypoxie, Laktatakkumulation und immunsuppressive Signale (195,196). Vor dem Hintergrund meiner Ergebnisse stellt sich daher die Frage, ob ein intaktes AHR-Signal auch in humanen $\gamma\delta$ T-Zellen zur metabolischen Belastbarkeit und Flexibilität beitragen könnte.

Sollte der AHR auch in therapeutisch genutzten $\gamma\delta$ T-Zellen die metabolische Anpassung und Aktivierung unterstützen, könnte dieser Signalweg einen Ansatzpunkt darstellen, um $\gamma\delta$ T-Zellen für anspruchsvolle Tumormikromilieus funktionell zu stärken. Denkbar wäre beispielsweise, zukünftig zu prüfen, ob eine gezielte Modulation des AHR-Signalwegs oder ein *ex vivo Priming* mit definierten AHR-Liganden die metabolische Fitness und Effektor-Funktion humaner $\gamma\delta$ T-Zellen verbessern. Da meine Untersuchungen an murinen epidermalen $\gamma\delta$ T-Zellen durchgeführt wurden, muss eine Übertragung humaner zirkulierender $\gamma\delta$ T-Zellen erst noch experimentell untersucht werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse meiner Arbeit, dass der AHR ein zentraler Regulator der funktionellen Anpassung adulter epidermaler $\gamma\delta$ T-Zellen ist. Er verbindet metabolische Programmierung, $\gamma\delta$ TCR-abhängige Aktivierung und Stressantwort in der Haut und trägt damit zur immunologischen Kompetenz von DETC bei. Diese Erkenntnisse erweitern das Verständnis der AHR-vermittelten Hautimmunität und eröffnen zugleich die Hypothese, dass AHR-abhängige Stoffwechselprogramme auch für andere $\gamma\delta$ T-Zellpopulationen mit therapeutischem Potential relevant sein könnten.

6. Literatur

1. Zhang C, Merana GR, Harris-Tyron T, Scharschmidt TC. Skin immunity: dissecting the complex biology of our body ´s outer barrier. *Mucosal Immunol* (2022) 15:55–561. doi: 10.1038/s41385-022-00505-y
2. Nagao K, Kobayashi T, Moro K, Ohyama M, Adachi T, Kitashima DY, Ueha S, Horiuchi K, Tanizaki H, Kabashima K, et al. Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat Immunol* (2012) 13:744–752. doi: 10.1038/ni.2353
3. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K-I, Dowgiert RK, Kupper TS. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol* (2006) 176:4431–4439. doi: 10.4049/jimmunol.176.7.4431
4. Gebhardt T, Wakim LM, Eidsmo L, Reading PC, Heath WR, Carbone FR. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nat Immunol* (2009) 10:524–530. doi: 10.1038/ni.1718
5. MacLeod AS, Havran WL. Functions of skin-resident $\gamma\delta$ T cells. *Cell Mol Life Sci* (2011) 68:2399–2408. doi: 10.1007/s00018-011-0702-x
6. Toulon A, Breton L, Taylor KR, Tenenhaus M, Bhavsar D, Lanigan C, Rudolph R, Jameson J, Havran WL. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med* (2009) 206:743–750. doi: 10.1084/jem.20081787
7. Nielsen MM, Witherden DA, Havran WL. $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat Rev Immunol* (2017) 17:733–745. doi: 10.1038/nri.2017.101
8. Garman RD, Doherty PJ, Raulet DH. Diversity, Rearrangement, and Expression of Murine T Cell Gamma Genes. *Cell* (1986). 45:733–742. doi: 10.1016/0092-8674(86)90787-7
9. Heilig JS, Tonegawa S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature* (1986) 322:836–840. doi: 10.1038/322836a0
10. Asarnow DM, Kuziel WA, Bonyhad M, Tigelaar RE, Tucker PW, Allison JP. Limited diversity of $\gamma\delta$ antigen receptor genes of Thy-1+ dendritic epidermal cells. *Cell* (1988) 55:837–847. doi: 10.1016/0092-8674(88)90139-0

11. Itohara S, Mombaerts P, Lafaille J, Iacomini J, Nelson A, Clarke AR, Hooper ML, Farr A, Tonegawa S. T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes. *Cell* (1993) 72:337–348. doi: 10.1016/0092-8674(93)90112-4
12. Gilfillan S, Dierich A, Lemeur M, Benoist C, Mathis D. Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* (1993) 261:1175–1178. doi: 10.1126/science.8356452
13. Zhang Y, Cado D, Asarnow DM, Komori T, Alt FW, Raulet DH, Allison JP. The role of short homology repeats and TdT in generation of the invariant $\gamma\delta$ antigen receptor repertoire in the fetal thymus. *Immunity* (1995) 3:439–447. doi: 10.1016/1074-7613(95)90173-6
14. Roberts N, Horsley V. Developing stratified epithelia: lessons from the epidermis and thymus. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* (2014) 3:389–402. doi: 10.1002/wdev.146
15. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* (2009) 71:241–260. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145
16. Cheroutre H, Lambolez F, Mucida D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* (2011) 11:445–456. doi: 10.1038/nri3007
17. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* (2012) 336:1268–1273. doi: 10.1126/science.1223490
18. Boyden LM, Lewis JM, Barbee SD, Bas A, Girardi M, Hayday AC, Tigelaar RE, Lifton RP. Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat Genet* (2008) 40:656–662. doi: 10.1038/ng.108
19. Di Marco Barros R, Roberts NA, Dart RJ, Vantourout P, Jandke A, Nussbaumer O, Deban L, Cipolat S, Hart R, Iannitto ML, et al. Epithelia use butyrophilin-like molecules to shape organ-specific $\gamma\delta$ T cell compartments. *Cell* (2016) 167:203–218.e17. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.030

20. Rhodes DA, Reith W, Trowsdale J. Regulation of immunity by butyrophilins. *Annu Rev Immunol* (2016) 34:151–172. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055435
21. Havran WL, Allison JP. Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* (1988) 335:443–445. doi: 10.1038/335443a0
22. Maki K, Sunaga S, Komagata Y, Kodaira Y, Mabuchi A, Karasuyama H, Yokomuro K, Miyazaki JI, Ikuta K. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93:7172–7177. doi: 10.1073/pnas.93.14.7172
23. Maki K, Sunaga S, Ikuta K. The V-J recombination of T cell receptor-gamma genes is blocked in interleukin-7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* (1996) 184:2423–2427. doi: 10.1084/jem.184.6.2423
24. Shitara S, Hara T, Liang B, Wagatsuma K, Zuklys S, Holländer GA, Nakase H, Chiba T, Tani-ichi S, Ikuta K. IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCR $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* (2013) 190:6173–6179. doi: 10.4049/jimmunol.1202573
25. Kang J, DiBenedetto B, Narayan K, Zhao H, Der SD, Chambers CA. STAT5 is required for thymopoiesis in a development stage-specific manner. *J Immunol* (2004) 173:2307–2314. doi: 10.4049/jimmunol.173.4.2307
26. Ye SK, Agata Y, Lee HC, Kurooka H, Kitamura T, Shimizu A, Honjo T, Ikuta K. The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCRgamma locus by Stat5 and histone acetylation. *Immunity* (2001) 15:813–823. doi: 10.1016/s1074-7613(01)00230-8
27. De Creus A, Van Beneden K, Stevenaert F, Debacker V, Plum J, Leclercq G. Developmental and functional defects of thymic and epidermal V gamma 3 cells in IL-15-deficient and IFN regulatory factor-1-deficient mice. *J Immunol* (2002) 168:6486–6493. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6486
28. Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, Ma A. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* (1998) 9:669–676. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80664-0

29. Schluns KS, Nowak EC, Cabrera-Hernandez A, Puddington L, Lefrançois L, Aguila HL. Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor alpha expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101:5616–5621. doi: 10.1073/pnas.0307442101
30. Mallick-Wood CA, Lewis JM, Richie LI, Owen MJ, Tigelaar RE, Hayday AC. Conservation of T cell receptor conformation in epidermal gammadelta cells with disrupted primary Vgamma gene usage. *Science* (1998) 279:1729–1733. doi: 10.1126/science.279.5357.1729
31. Binz C, Bubke A, Sandrock I, Prinz I. $\alpha\beta$ T cells replacing dermal and epidermal $\gamma\delta$ T cells in Tcrd-/- mice express an MHC-independent TCR repertoire. *Eur J Immunol* (2021) 51:2618–2632. doi: 10.1002/eji.202149243
32. Xia M, Qi Q, Jin Y, Wiest DL, August A, Xiong N. Differential roles of IL-2-inducible T cell kinase-mediated TCR signals in tissue-specific localization and maintenance of skin intraepithelial T cells. *J Immunol* (2010) 184:6807–6814. doi: 10.4049/jimmunol.1000453
33. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* (2004) 427:355–360. doi: 10.1038/nature02284
34. Kadow S, Jux B, Zahner SP, Wingerath B, Chmill S, Clausen BE, Hengstler J, Esser C. Aryl hydrocarbon receptor is critical for homeostasis of invariant gammadelta T cells in the murine epidermis. *J Immunol* (2011) 187:3104–3110. doi: 10.4049/jimmunol.1100912
35. Jin Y, Xia M, Saylor CM, Narayan K, Kang J, Wiest DL, Wang Y, Xiong N. Cutting edge: Intrinsic programming of thymic $\gamma\delta$ T cells for specific peripheral tissue localization. *J Immunol* (2010) 185:7156–7160. doi: 10.4049/jimmunol.1002781
36. Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J, Orozco R, Copeland NG, Jenkins NA, McEvoy LM, et al. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96:14470–14475. doi: 10.1073/pnas.96.25.14470

37. Jin Y, Xia M, Sun A, Saylor CM, Xiong N. CCR10 is important for the development of skin-specific gammadeltaT cells by regulating their migration and location. *J Immunol* (2010) 185:5723–5731. doi: 10.4049/jimmunol.1001612
38. Jiang X, Campbell JJ, Kupper TS. Embryonic trafficking of gammadelta T cells to skin is dependent on E/P selectin ligands and CCR4. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:7443–7448. doi: 10.1073/pnas.0912943107
39. Austrup F, Vestweber D, Borges E, Löhning M, Bräuer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, et al. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* (1997) 385:81–83. doi: 10.1038/385081a0
40. Chodaczek G, Papanna V, Zal MA, Zal T. Body-barrier surveillance by epidermal $\gamma\delta$ TCRs. *Nat Immunol* (2012) 13:272–282. doi: 10.1038/ni.2240
41. Gray EE, Suzuki K, Cyster JG. Cutting edge: Identification of a motile IL-17-producing gammadelta T cell population in the dermis. *J Immunol* (2011) 186:6091–6095. doi: 10.4049/jimmunol.1100427
42. Willcox CR, Mohammed F, Willcox BE. The distinct MHC-unrestricted immunobiology of innate-like and adaptive-like human $\gamma\delta$ T cell subsets- Nature's CAR-T cells. *Immunol Rev* (2020) 298:25–46. doi: 10.1111/imr.12928
43. Hao J, Zhang J, Liu Y. Roles of dendritic epidermal T cells in steady and different pathological states. *Burns Trauma* (2025) 13:tkae056. doi: 10.1093/burnst/tkae056
44. Jameson JM, Cauvi G, Witherden DA, Havran WL. A Keratinocyte-Responsive $\gamma\delta$ TCR Is Necessary for Dendritic Epidermal T Cell Activation by Damaged Keratinocytes and Maintenance in the Epidermis. *J Immunol* (2004) 172:3573–3579. doi: 10.4049/jimmunol.172.6.3573
45. Sharp LL, Jameson JM, Cauvi G, Havran WL. Dendritic epidermal T cells regulate skin homeostasis through local production of insulin-like growth factor 1. *Nat Immunol* (2005) 6:73–79. doi: 10.1038/ni1152
46. Havran WL, Chien Y-H, Allison JP. Recognition of Self Antigens by Skin-Derived T Cells with Invariant $\gamma\delta$ Antigen Receptors. *Science* (1991) 252:1430–1432. doi: 10.1126/science.1828619.

47. Boismenu R, Havran WL. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science* (1994) 266:1253–1255. doi: 10.1126/science.7973709
48. Boismenu R, Feng L, Xia YY, Chang JC, Havran WL. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J Immunol* (1996) 157:985–992. doi: 10.4049/jimmunol.157.3.985
49. Jameson J, Havran WL. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* (2007) 215:114–122. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00483.x
50. Jameson J, Ugarte K, Chen N, Yachi P, Fuchs E, Boismenu R, Havran WL. A Role for Skin $\gamma\delta$ T Cells in Wound Repair. *Science* (2002) 296:747–749. doi: 10.1126/science.1069639
51. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:659–702. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.
52. Jameson JM, Cauvi G, Sharp LL, Witherden DA, Havran WL. $\gamma\delta$ T cell-induced hyaluronan production by epithelial cells regulates inflammation. *J Exp Med* (2005) 201:1269–1279. doi: 10.1084/jem.20042057
53. Farooq M, Khan AW, Kim MS, Choi S. The role of fibroblast growth factor (FGF) signaling in tissue repair and regeneration. *Cells* (2021) 10:3242. doi: 10.3390/cells10113242
54. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* (2001) 2:997–1003. doi: 10.1038/ni1101-997
55. Verdino P, Witherden DA, Havran WL, Wilson IA. The molecular interaction of CAR and JAML recruits the central cell signal transducer PI3K. *Science* (2010) 329:1210–1214. doi: 10.1126/science.1187996
56. Witherden DA, Verdino P, Rieder SE, Garijo O, Mills RE, Teyton L, Fischer WH, Wilson IA, Havran WL. The junctional adhesion molecule JAML is a costimulatory receptor for epithelial $\gamma\delta$ T cell activation. *Science* (2010) 329:1205–1210. doi: 10.1126/science.1192698

-
57. Witherden DA, Watanabe M, Garijo O, Rieder SE, Sarkisyan G, Cronin SJF, Verdino P, Wilson IA, Kumanogoh A, Kikutani H, et al. The CD100 receptor interacts with Its plexin B2 ligand to regulate epidermal $\gamma\delta$ T cell function. *Immunity* (2012) 37:314–325. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.026
 58. Yoshida S, Mohamed RH, Kajikawa M, Koizumi J, Tanaka M, Fugo K, Otsuka N, Maenaka K, Yagita H, Chiba H, et al. Involvement of an NKG2D ligand H60c in epidermal dendritic T cell-mediated wound repair. *J Immunol* (2012) 188:3972–3979. doi: 10.4049/jimmunol.1102886
 59. Takada A, Yoshida S, Kajikawa M, Miyatake Y, Tomaru U, Sakai M, Chiba H, Maenaka K, Kohda D, Fugo K, et al. Two Novel NKG2D Ligands of the Mouse H60 Family with Differential Expression Patterns and Binding Affinities to NKG2D. *J Immunol* (2008) 180:1678–1685. doi: 10.4049/jimmunol.180.3.1678
 60. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* (2001) 294:605–609. doi: 10.1126/science.1063916
 61. Strid J, Roberts SJ, Filler RB, Lewis JM, Kwong BY, Schpero W, Kaplan DH, Hayday AC, Girardi M. Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis. *Nat Immunol* (2008) 9:146–154. doi: 10.1038/ni1556
 62. Park JH, Lee HK. Function of $\gamma\delta$ T cells in tumor immunology and their application to cancer therapy. *Exp Mol Med* (2021) 53:318–327. doi: 10.1038/s12276-021-00576-0
 63. Roos D, Loos JA. Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. II. Relative importance of glycolysis and oxidative phosphorylation on phytohaemagglutinin stimulation. *Exp Cell Res* (1973) 77:127–135. doi: 10.1016/0014-4827(73)90561-2
 64. Hedeskov CJ, Esmann V. Respiration and glycolysis of normal human lymphocytes. *Blood* (1966) 28:163–174. doi: 10.1182/blood.V28.2.163.163
 65. Bental M, Deutsch C. Metabolic changes in activated T cells: an NMR study of human peripheral blood lymphocytes. *Magn Reson Med* (1993) 29:317–326. doi: 10.1002/mrm.1910290307

66. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* (1927) 8:519–530. doi: 10.1085/jgp.8.6.519
67. Singer K, Kastenberger M, Gottfried E, Hammerschmied CG, Büttner M, Aigner M, Seliger B, Walter B, Schlösser H, Hartmann A, et al. Warburg phenotype in renal cell carcinoma: high expression of glucose-transporter 1 (GLUT-1) correlates with low CD8(+) T-cell infiltration in the tumor. *Int J Cancer* (2011) 128:2085–2095. doi: 10.1002/ijc.25543
68. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* (2013) 342:1242454. doi: 10.1126/science.1242454
69. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* (2009) 324:1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809
70. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:259–283. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095956
71. Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM, Boxer MB, Jiang J, Shen M, Bellinger G, Sasaki AT, Locasale JW, Auld DS, et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* (2011) 334:1278–1283. doi: 10.1126/science.1211485
72. Cho BK, Wang C, Sugawa S, Eisen HN, Chen J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1999) 96:2976–2981. doi: 10.1073/pnas.96.6.2976
73. Gudmundsdottir H, Wells AD, Turka LA. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *J Immunol* (1999) 162:5212–5223.
74. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Faubert B, Villarino AV, O’Sullivan D, Huang SCC, Van der Windt GJW, Blagih J, Qiu J, et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* (2013) 153:1239–1251. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.016

-
75. Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJ. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* (1989) 337:181–184. doi: 10.1038/337181a0
 76. Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* (2002) 111:837–851. doi: 10.1016/s0092-8674(02)01139-x
 77. Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nat Immunol* (2001) 2:415–422. doi: 10.1038/87720
 78. Gubser PM, Bantug GR, Razik L, Fischer M, Dimeloe S, Hoenger G, Durovic B, Jauch A, Hess C. Rapid effector function of memory CD8⁺ T cells requires an immediate-early glycolytic switch. *Nat Immunol* (2013) 14:1064–1072. doi: 10.1038/ni.2687
 79. MacLeod AS, Hemmers S, Garijo O, Chabod M, Mowen K, Witherden DA, Havran WL. Dendritic epidermal T cells regulate skin antimicrobial barrier function. *J Clin Invest* (2013) 123:4364–4374. doi: 10.1172/JCI70064
 80. Tokura Y, Phadungsaksawasdi P, Kurihara K, Fujiyama T, Honda T. Pathophysiology of skin resident memory T cells. *Front Immunol* (2021) 11:618897. doi: 10.3389/fimmu.2020.618897
 81. Häselbarth L, Ouwens DM, Teichweyde N, Hochrath K, Merches K, Esser C. The small chain fatty acid butyrate antagonizes the TCR-stimulation-induced metabolic shift in murine epidermal $\gamma\delta$ T cells. *EXCLI J* (2020) 19:334–350. doi: 10.17179/excli2020-1123
 82. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* (1987) 28:1221–1227. doi: 10.1136/gut.28.10.1221
 83. Ibusuki A, Kawai K, Nitahara-Takeuchi A, Argüello RJ, Kanekura T. TCR signaling and cellular metabolism regulate the capacity of murine epidermal $\gamma\delta$ T cells to rapidly produce IL-13 but not IFN- γ . *Front Immunol* (2024) 15:1361139. doi: 10.3389/fimmu.2024.1361139

84. Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: Diversity and evolution. *Chem Biol Interact* (2002) 141:131–160. doi: 10.1016/S0009-2797(02)00070-4
85. Antonsson C, Whitelaw ML, McGuire J, Gustafsson J-Å, Poellinger L. Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Mol Cell Biol* (1995) 15:756–765. doi: 10.1128/MCB.15.2.756
86. Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* (1999) 274:13519–13524. doi: 10.1074/jbc.274.19.13519
87. Tsuji N, Fukuda K, Nagata Y, Okada H, Haga A, Hatakeyama S, Yoshida S, Okamoto T, Hosaka M, Sekine K, et al. The activation mechanism of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by molecular chaperone HSP90. *FEBS Open Bio* (2014) 4:796–803. doi: 10.1016/j.fobJ.2014.09.003
88. Fujisawa-Sehara A, Sogawa K, Yamane M, Fujii-Kuriyama Y. Characterization of xenobiotic responsive elements upstream from the drug-metabolizing cytochrome P-450c gene: a similarity to glucocorticoid regulatory elements. *Nucleic Acids Res* (1987) 15:4179–4191. doi: 10.1093/nar/15.10.4179
89. Stockinger B, Meglio P Di, Gialitakis M, Duarte JH. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:403–432. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120245
90. Poland A, Glover E, Kende AS. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* (1976) 251:4936–4946. doi: 10.1007/978-3-642-69928-3_5
91. Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* (2005) 45:106–114. doi: 10.1002/em.20095
92. Rannug A, Rannug U, Rosenkranz HS, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, Grafström AK. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem* (1987) 262:15422–15427.

93. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* (2011) 478:197–203. doi: 10.1038/nature10491
94. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, DeLuca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity* (2013) 39:372–385. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.003
95. Bock KW, Köhle C. Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochem Pharmacol* (2006) 72:393–404. doi: 10.1016/j.bcp.2006.01.017
96. Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2003) 43:309–334. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828
97. Singh NP, Singh UP, Rouse M, Zhang J, Chatterjee S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Dietary indoles suppress delayed-type hypersensitivity by inducing a switch from proinflammatory Th17 cells to anti-inflammatory regulatory T cells through regulation of microRNA. *J Immunol* (2016) 196:1108–1122. doi: 10.4049/jimmunol.1501727
98. Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* (2010) 185:3190–3198. doi: 10.4049/jimmunol.0903670
99. Kerkvliet NI, Steppan LB, Vorachek W, Oda S, Farrer D, Wong CP, Pham D, Mourich DV. Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3+ T cells in pancreatic lymph nodes. *Immunotherapy* (2009) 1:539–547. doi: 10.2217/imt.09.24
100. Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105:9721–9726. doi: 10.1073/pnas.0804231105

101. Quintana FJ, Jin H, Burns EJ, Nadeau M, Yeste A, Kumar D, Rangachari M, Zhu C, Xiao S, Seavitt J, et al. Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing IL2 expression. *Nat Immunol* (2012) 13:770–777. doi: 10.1038/ni.2363
102. Gandhi R, Kumar D, Burns EJ, Nadeau M, Dake B, Laroni A, Kozoriz D, Weiner HL, Quintana FJ. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol* (2010) 11:846–853. doi: 10.1038/ni.1915
103. Apetoh L, Quintana FJ, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, Burns EJ, Sherr DH, Weiner HL, Kuchroo VK. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat Immunol* (2010) 11:854–861. doi: 10.1038/ni.1912
104. Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ. Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends Immunol* (2016) 37:427–439. doi: 10.1016/j.it.2016.04.009
105. Mascanfroni ID, Takenaka MC, Yeste A, Patel B, Wu Y, Kenison JE, Siddiqui S, Basso AS, Otterbein LE, Pardoll DM, et al. Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat Med* (2015) 21:638–646. doi: 10.1038/nm.3868
106. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* (2006) 126:1121–1133. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035
107. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* (2009) 27:485–517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710
108. Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* (2008) 453:65–71. doi: 10.1038/nature06880
109. Yeste A, Mascanfroni ID, Nadeau M, Burns EJ, Tukpah AM, Santiago A, Wu C, Patel B, Kumar D, Quintana FJ. IL-21 induces IL-22 production in CD4⁺ T cells. *Nat Commun* (2014) 5:3753. doi: 10.1038/ncomms4753

110. Veldhoen M, Hirota K, Christensen J, O'Garra A, Stockinger B. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J Exp Med* (2009) 206:43–49. doi: 10.1084/jem.20081438
111. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* (2007) 8:1390–1397. doi: 10.1038/ni1539
112. Ramirez JM, Brembilla NC, Sorg O, Chicheportiche R, Matthes T, Dayer JM, Saurat JH, Roosnek E, Chizzolini C. Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. *Eur J Immunol* (2010) 40:2450–2459. doi: 10.1002/eji.201040461
113. Lawrence BP, Roberts AD, Neumiller JJ, Cundiff JA, Woodland DL. Aryl hydrocarbon receptor activation impairs the priming but not the recall of influenza virus-specific CD8+ T cells in the lung. *J Immunol* (2006) 177:5819–5828. doi: 10.4049/jimmunol.177.9.5819
114. Winans B, Nagari A, Chae M, Post CM, Ko C-I, Puga A, Kraus WL, Lawrence BP. Linking the aryl hydrocarbon receptor with altered DNA methylation patterns and developmentally induced aberrant antiviral CD8+ T cell responses. *J Immunol* (2015) 194:4446–4457. doi: 10.4049/jimmunol.1402044
115. Zaid A, Mackay LK, Rahimpour A, Braun A, Veldhoen M, Carbone FR, Manton JH, Heath WR, Mueller SN. Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:5307–5312. doi: 10.1073/pnas.1322292111
116. Li Y, Innocentin S, Withers DR, Roberts NA, Gallagher AR, Grigorieva EF, Wilhelm C, Veldhoen M. Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. *Cell* (2011) 147:629–640. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.025
117. Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* (2009) 31:321–330. doi: 10.1016/j.immuni.2009.06.020

118. Merches K, Schiavi A, Weighardt H, Steinwachs S, Teichweyde N, Förster I, Hochrath K, Schumak B, Ventura N, Petzsch P, et al. AHR signaling dampens inflammatory signature in neonatal skin $\gamma\delta$ T cells. *Int J Mol Sci* (2020) 21:2249. doi: 10.3390/ijms21062249
119. Zhang B, Wu J, Jiao Y, Bock C, Dai M, Chen B, Chao N, Zhang W, Zhuang Y. Differential requirements of TCR signaling in homeostatic maintenance and function of dendritic epidermal T cells. *J Immunol* (2015) 195:4282–4291. doi: 10.4049/jimmunol.1501220
120. Luche H, Weber O, Rao TN, Blum C, Fehling HJ. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in “knock-in” Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur J Immunol* (2007) 37:43–53. doi: 10.1002/eji.200636745
121. Ramachandran H, Dobner J, Nguyen T, Binder S, Tolle I, Vykhyantseva I, Krutmann J, Miccio A, Staerk C, Brusson M, et al. CleanFinder: a scalable framework for comprehensive genome editing analysis. *bioRxiv* (2026) 2025.10.23.684080. doi: 10.1101/2025.10.23.684080
122. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* (2006) 1:1458–1461. doi: 10.1038/nprot.2006.238
123. Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A, Abrignani S, Addo R, Akdis M, Andrä I, Andreatta F, Annunziato F, Arranz E, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol* (2021) 51:2708–3145. doi: 10.1002/eji.202170126
124. Lund J, Ouwens DM, Wettergreen M, Bakke SS, Thoresen GH, Aas V. Increased glycolysis and higher lactate production in hyperglycemic myotubes. *Cells* (2019) 8:1101. doi: 10.3390/cells8091101
125. Van der Windt GJW, Chang CH, Pearce EL. Measuring bioenergetics in T cells using a Seahorse extracellular flux analyzer. *Curr Protoc Immunol* (2016) 113:3.16B.1–3.16B.14. doi: 10.1002/0471142735.im0316bs113
126. Xiong G, Zhang K, Ma Y, Song Y, Zhang W, Qi T, Qiu H, Shi J, Kan C, Zhang J, et al. BAM15 as a mitochondrial uncoupler: a promising therapeutic agent for diverse diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2023) 14:1252141. doi: 10.3389/fendo.2023.1252141

127. Alexopoulos SJ, Chen SY, Brandon AE, Salamoun JM, Byrne FL, Garcia CJ, Beretta M, Olzomer EM, Shah DP, Philp AM, et al. Mitochondrial uncoupler BAM15 reverses diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Nat Commun* (2020) 11:2397. doi: 10.1038/s41467-020-16298-2
128. Desousa BR, Kim KK, Jones AE, Ball AB, Hsieh WY, Swain P, Morrow DH, Brownstein AJ, Ferrick DA, Shirihai OS, et al. Calculation of ATP production rates using the Seahorse XF Analyzer. *EMBO Rep* (2023) 24:e56380. doi: 10.15252/embr.202256380
129. Dobner J, Diecke S, Krutmann J, Prigione A, Rossi A. Reassessment of marker genes in human induced pluripotent stem cells for enhanced quality control. *Nat Commun* (2024) 15:8547. doi: 10.1038/s41467-024-52922-1
130. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The molecular signatures database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* (2015) 1:417–425. doi: 10.1016/j.cels.2015.12.004
131. Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* (2003) 3:807–820. doi: 10.1038/nrc1208
132. Massagué J. TGF- β signaling in development and disease. *FEBS Lett* (2012) 586:1833. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.030
133. Ono M, Ariizumi K, Bergstresser PR, Takashima A. IL-7 upregulates T cell receptor/CD3 expression by cultured dendritic epidermal T cells. *J Dermatol Sci* (1996) 11:89–96. doi: 10.1016/0923-1811(95)00424-6
134. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* (2003) 3:609–620. doi: 10.1038/nri1148
135. Dorner BG, Dorner MB, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S, Hutloff A, Mages HW, Ranke K, Schaefer M, et al. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity* (2009) 31:823–833. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.027
136. Braud VM, Allan DSJ, O’Callaghan CA, Söderström K, D’Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* (1998) 391:795–799. doi: 10.1038/35869

137. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* (1997) 91:521–530. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80438-9
138. Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol* (1994) 153:2417–2428. doi: 10.4049/jimmunol.153.6.2417
139. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* (2008) 26:453–479. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090357
140. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* (2002) 4:E131–E136. doi: 10.1038/ncb0502-e131
141. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczek RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* (1999) 397:263–266. doi: 10.1038/16717
142. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* (2009) 27:591. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706
143. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* (2001) 19:683–765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683
144. Li Y, Wu J, Luo G, He W. Functions of V γ 4 T cells and dendritic epidermal T cells on skin wound healing. *Front Immunol* (2018) 9:1099. doi: 10.3389/fimmu.2018.01099
145. Taveirne S, De Colvenaer V, Van Den Broeck T, Van Ammel E, Bennett CL, Taghon T, Vandekerckhove B, Plum J, Clausen BE, Kaplan DH, et al. Langerhans cells are not required for epidermal V γ 3 T cell homeostasis and function. *J Leukoc Biol* (2011) 90:61–68. doi: 10.1189/jlb.1010581
146. Haas K, Weighardt H, Deenen R, Köhrer K, Clausen B, Zahner S, Boukamp P, Bloch W, Krutmann J, Esser C. Aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes is essential for murine skin barrier integrity. *J Invest Dermatol* (2016) 136:2260–2269. doi: 10.1016/j.jid.2016.06.627

147. Chapman NM, Boothby MR, Chi H. Metabolic coordination of T cell quiescence and activation. *Nat Rev Immunol* (2020) 20:55–70. doi: 10.1038/s41577-019-0203-y
148. Valitutti S, Müller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* (1995) 375:148–151. doi: 10.1038/375148a0
149. Warburg O. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* (1924) 12:1131–1137. doi: 10.1007/bf01504608
150. Siska PJ, Rathmell JC. Metabolic signaling drives IFN- γ . *Cell Metab* (2016) 24:651–652. doi: 10.1016/j.cmet.2016.10.018
151. van der Windt GJW, Pearce EL. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunol Rev* (2012) 249:27–42. doi: 10.1111/j.1600-065x.2012.01150.x
152. Mehta MM, Weinberg SE, Steinert EM, Chhiba K, Martinez CA, Gao P, Perlman HR, Bryce P, Hay N, Chandel NS. Hexokinase 2 is dispensable for T cell-dependent immunity. *Cancer Metab* (2018) 6:10. doi: 10.1186/s40170-018-0184-5
153. Geltink RIK, Kyle RL, Pearce EL. Unraveling the complex interplay between T cell metabolism and function. *Annu Rev Immunol* (2018) 36:461–488. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053019
154. Patel CH, Powell JD. Targeting T cell metabolism to regulate T cell activation, differentiation and function in disease. *Curr Opin Immunol* (2017) 46:82–88. doi: 10.1016/j.coi.2017.04.006
155. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci* (2016) 41:211–218. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.001
156. Shiratori R, Furuichi K, Yamaguchi M, Miyazaki N, Aoki H, Chibana H, Ito K, Aoki S. Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Sci Rep* (2019) 9:18699. doi: 10.1038/s41598-019-55296-3

157. Brand K, Aichinger S, Förster S, Küpper S, Neumann B, Nürnberg W, Ohrisch G. Cell-cycle-related metabolic and enzymatic events in proliferating rat thymocytes. *Eur J Biochem* (1988) 172:695–702. doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13944.x
158. Lopes N, McIntyre C, Martin S, Raverdeau M, Sumaria N, Kohlgruber AC, Fiala GJ, Agudelo LZ, Dyck L, Kane H, et al. Distinct metabolic programs established in the thymus control effector functions of $\gamma\delta$ T cell subsets in tumor microenvironments. *Nat Immunol* (2021) 22:179–192. doi: 10.1038/s41590-020-00848-3
159. Aehnlich P, Valseco Santiago M, Helweg Dam S, Fresnillo Saló S, Rahbech A, Olsen LR, Thor Straten P, Desler C, Holmen Olofsson G. Glycolysis inhibition affects proliferation and cytotoxicity of V γ 9V δ 2 T cells expanded for adoptive cell therapy. *Cytotherapy* (2024) 26:1033–1045. doi: 10.1016/j.jcyt.2024.04.072
160. Gerriets VA, Kishton RJ, Nichols AG, Macintyre AN, Inoue M, Ilkayeva O, Winter PS, Liu X, Priyadharshini B, Slawinska ME, et al. Metabolic programming and PDHK1 control CD4⁺ T cell subsets and inflammation. *J Clin Invest* (2015) 125:194–207. doi: 10.1172/jci76012
161. Cao J, Liao S, Zeng F, Liao Q, Luo G, Zhou Y. Effects of altered glycolysis levels on CD8⁺ T cell activation and function. *Cell Death Dis* (2023) 14:407. doi: 10.1038/s41419-023-05937-3
162. Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, Craft J, Yin Z. $\gamma\delta$ T cells provide an early source of interferon γ in tumor immunity. *J Exp Med* (2003) 198:433. doi: 10.1084/jem.20030584
163. Reis BS, Darcy PW, Khan IZ, Moon CS, Kornberg AE, Schneider VS, Alvarez Y, Eleso O, Zhu C, Scherthanner M, et al. TCR-V $\gamma\delta$ usage distinguishes protumor from anti-tumor intestinal $\gamma\delta$ T cell subsets. *Science* (2022) 377:276–284. doi: 10.1126/science.abj8695
164. Mu X, Xiang Z, Xu Y, He J, Lu J, Chen Y, Wang X, Tu CR, Zhang Y, Zhang W, et al. Glucose metabolism controls human $\gamma\delta$ T-cell-mediated tumor immunosurveillance in diabetes. *Cell Mol Immunol* (2022) 19:944–956. doi: 10.1038/s41423-022-00894-x

-
165. Opitz CA, Holfelder P, Prentzell MT, Trump S. The complex biology of aryl hydrocarbon receptor activation in cancer and beyond. *Biochem Pharmacol* (2023) 216:115798. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115798
166. Watzky M, Huard S, Juricek L, Dairou J, Chauvet C, Coumoul X, Letessier A, Miotto B. Hexokinase 2 is a transcriptional target and a positive modulator of AHR signalling. *Nucleic Acids Res* (2022) 50:5545–5564. doi: 10.1093/nar/gkac360
167. Trinchese G, Cimmino F, Catapano A, Cavaliere G, Mollica MP. Mitochondria: the gatekeepers between metabolism and immunity. *Front Immunol* (2024) 15:1334006. doi: 10.3389/fimmu.2024.1334006
168. Reina-Campos M, Heeg M, Kennewick K, Mathews IT, Galletti G, Luna V, Nguyen Q, Huang H, Milner JJ, Hu KH, et al. Metabolic programs of T cell tissue residency empower tumor immunity. *Nature* (2023) 621:179–187. doi: 10.1038/s41586-023-06483-w
169. Uberoi A, Bartow-McKenney C, Zheng Q, Flowers L, Campbell A, Knight SAB, Chan N, Wei M, Lovins V, Bugayev J, et al. Commensal microbiota regulates skin barrier function and repair via signaling through the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Host Microbe* (2021) 29:1235–1248.e8. doi: 10.1016/j.chom.2021.05.011
170. Schrum AG, Gil D, Turka LA, Palmer E. Physical and functional bivalency observed among TCR/CD3 complexes isolated from primary T cells. *J Immunol* (2011) 187:870–878. doi: 10.4049/jimmunol.1100538
171. Valitutti S, Müller S, Salio M, Lanzavecchia A. Degradation of T cell receptor (TCR)–CD3- ζ complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* (1997) 185:1859–1864. doi: 10.1084/jem.185.10.1859
172. Alcover A, Alarcón B. Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol* (2000) 20:325–346. doi: 10.1615/critrevimmunol.v20.i4.20
173. Komori HK, Witherden DA, Kelly R, Sendaydiego K, Jameson JM, Teyton L, Havran WL. Cutting Edge: dendritic epidermal $\gamma\delta$ T cell ligands are rapidly and locally expressed by keratinocytes following cutaneous wounding. *J Immunol* (2012) 188:2972–2976. doi: 10.4049/jimmunol.1100887

-
174. Whang MI, Guerra N, Raulet DH. Costimulation of dendritic epidermal gammadelta T cells by a new NKG2D ligand expressed specifically in the skin. *J Immunol* (2009) 182:4557–4564. doi: 10.4049/jimmunol.0802439
175. Nielsen MM, Dyring-Andersen B, Schmidt JD, Witherden D, Lovato P, Woetmann A, Ødum N, Poulsen SS, Havran WL, Geisler C, et al. NKG2D-dependent activation of dendritic epidermal T cells in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* (2015) 135:1311–1319. doi: 10.1038/jid.2015.23
176. O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:553–565. doi: 10.1038/nri.2016.70
177. Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, Michalek RD, Rudolph MC, Deoliveira D, Anderson SM, Abel ED, Chen BJ, Hale LP, et al. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab* (2014) 20:61–72. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.004
178. Sena LA, Li S, Jairaman A, Prakriya M, Ezponda T, Hildeman DA, Wang CR, Schumacker PT, Licht JD, Perlman H, et al. Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling. *Immunity* (2013) 38:225–236. doi: 10.1016/j.immuni.2012.10.020
179. Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, et al. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* (2011) 146:772–784. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.033
180. Zhang H, Yang Z, Yuan W, Liu J, Luo X, Zhang Q, Li Y, Chen J, Zhou Y, Lv J, et al. Sustained AhR activity programs memory fate of early effector CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2024) 121:e2317658121. doi: 10.1073/pnas.2317658121
181. Ho PC, Bihuniak JD, MacIntyre AN, Staron M, Liu X, Amezcua R, Tsui YC, Cui G, Micevic G, Perales JC, et al. Phosphoenolpyruvate is a metabolic checkpoint of anti-tumor T cell responses. *Cell* (2015) 162:1217–1228. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.012
182. McKenzie DR, Hart R, Bah N, Ushakov DS, Muñoz-Ruiz M, Feederle R, Hayday AC. Normality sensing licenses local T cells for innate-like tissue surveillance. *Nat Immunol* (2022) 23:411–422. doi: 10.1038/s41590-021-01124-8

183. Wang Y, Bai Y, Li Y, Liang G, Jiang Y, Liu Z, Liu M, Hao J, Zhang X, Hu X, et al. IL-15 enhances activation and IGF-1 production of dendritic epidermal T cells to promote wound healing in diabetic mice. *Front Immunol* (2017) 8:1557. doi: 10.3389/fimmu.2017.01557
184. Edelbaum D, Mohamadzadeh M, Bergstresser PR, Sugamura K, Takashima A. Interleukin (IL)-15 promotes the growth of murine epidermal gamma delta T cells by a mechanism involving the beta- and gamma c-chains of the IL-2 receptor. *J Invest Dermatol* (1995) 105:837–843. doi: 10.1111/1523-1747.ep12326630
185. Verbist KC, Cole CJ, Field MB, Klonowski KD. A role for IL-15 in the migration of effector CD8 T cells to the lung airways following influenza infection. *J Immunol* (2011) 186:174–182. doi: 10.4049/jimmunol.1002613
186. Liu Z, Liang G, Gui L, Li Y, Liu M, Bai Y, Zhang X, Hu X, Chen J, Huang C, et al. Weakened IL-15 production and impaired mTOR activation alter dendritic epidermal T cell homeostasis in diabetic mice. *Sci Rep* (2017) 7:6028. doi: 10.1038/s41598-017-05950-5
187. Jux B, Kadow S, Luecke S, Rannug A, Krutmann J, Esser C. The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *J Invest Dermatol* (2011) 131:203–210. doi: 10.1038/jid.2010.269
188. Böhm M, Wolff I, Scholzen TE, Robinson SJ, Healy E, Luger TA, Schwarz T, Schwarz A. alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *J Biol Chem* (2005) 280:5795–5802. doi: 10.1074/jbc.m406334200
189. Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ. Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. *Immunity* (2018) 48:19–33. doi: 10.1016/j.immuni.2017.12.012
190. Fernández-Gallego N, Sánchez-Madrid F, Cibrián D. Role of AHR ligands in skin homeostasis and cutaneous inflammation. *Cells* (2021) 10:3176. doi: 10.3390/cells10113176
191. van den Bogaard EH, Esser C, Perdew GH. The aryl hydrocarbon receptor at the forefront of host-microbe interactions in the skin: a perspective on current knowledge gaps and directions for future research and therapeutic applications. *Exp Dermatol* (2021) 30:1477–1483. doi: 10.1111/exd.14409

-
192. Haarmann-Stemmann T, Reichert D, Coumoul X, Lawrence BP, Perdew GH, Sherr DH, Weighardt H, Rolfes KM, Esser C. The Janus-facedness of the aryl hydrocarbon receptor pathway. Report of the 6th International AHR Meeting: Research, Prevention, Therapy. *Biochem Pharmacol* (2025) 234:116808. doi: 10.1016/j.bcp.2025.116808
193. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* (2009) 31:184–196. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.006
194. Lopes N, Silva-Santos B. Functional and metabolic dichotomy of murine $\gamma\delta$ T cell subsets in cancer immunity. *Eur J Immunol* (2021) 51:17–26. doi: 10.1002/eji.201948402
195. Davern M, Donlon NE, O’Connell F, Gaughan C, O’Donovan C, McGrath J, Sheppard AD, Hayes C, King R, Temperley H, et al. Nutrient deprivation and hypoxia alter T cell immune checkpoint expression: potential impact for immunotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* (2023) 149:5377–5395. doi: 10.1007/s00432-022-04440-0
196. Lim AR, Rathmell WK, Rathmell JC. The tumor microenvironment as a metabolic barrier to effector T cells and immunotherapy. *Elife* (2020) 9:e55185. doi: 10.7554/elifesciences.55185

7. Anhang

7.1. Validierung des AHR-Knockouts in 7-17^{ΔAHR}-Zellen

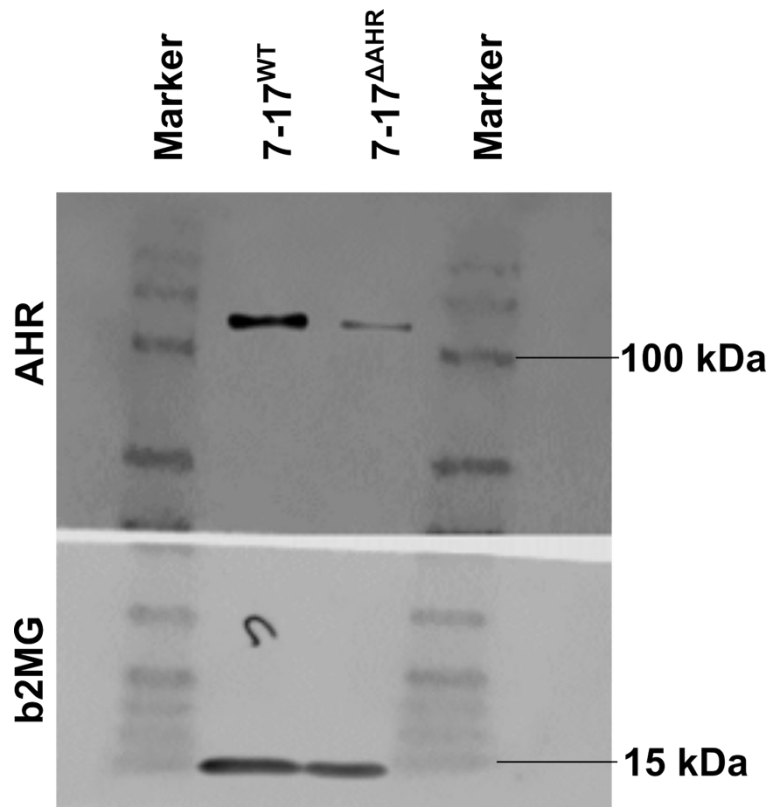


Abbildung S 1: Untersuchung der AHR-Proteinexpression in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen mittels Western-Blot-Analyse. Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde durch Normalisierung auf β 2-Mikroglobulin (β 2MG) bestätigt. Das Fehlen des AHR-Proteins in 7-17 Δ AHR-Zellen wurde mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen Anti-AHR-Antikörpers verifiziert. AHR-Protein war in WT-Zellen nachweisbar, jedoch in 7-17 Δ AHR-Zellen um 85% reduziert. β 2-Mikroglobulin (β 2MG) diente als Ladekontrolle.

7.2. Qualitätskontrolle der RNA-Sequenzierungs-Daten mittels PCA

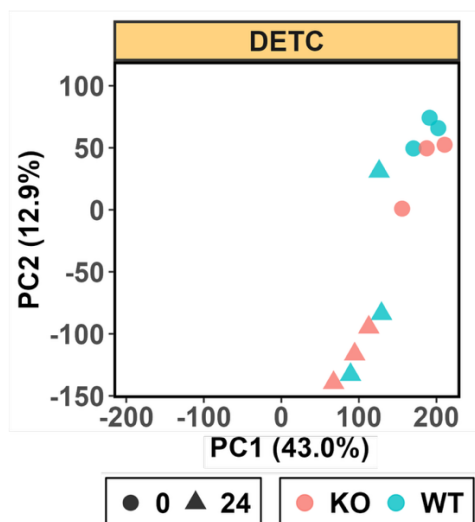
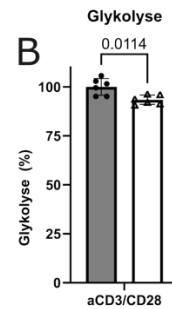
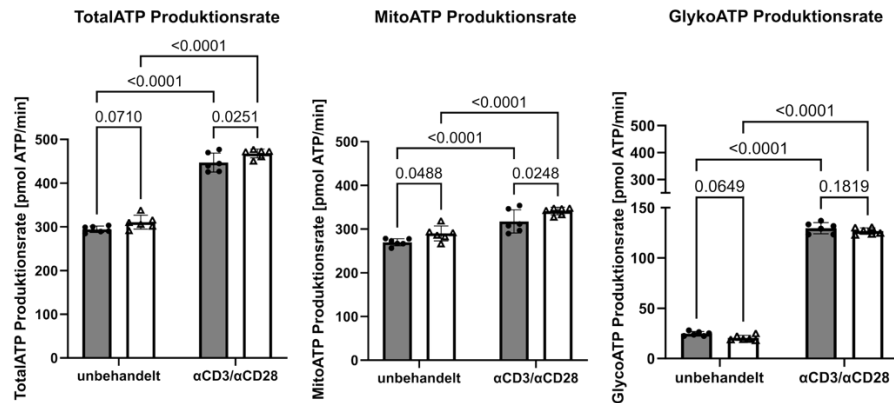


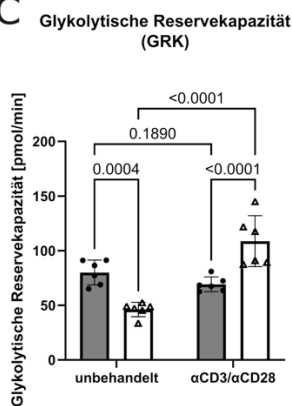
Abbildung S 2: Beurteilung der Clusterbildung und Variabilität der RNA-Sequenzierungsproben mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA). Während die meisten Proben entsprechend Genotyp und Zeitpunkt gruppiert waren, zeigte eine DETC^{WT}-Probe nach 24 h (WT ti24h) eine deutliche Trennung von den übrigen ti24h-Proben, was auf einen potenziellen Ausreißer hindeutet. Aufgrund dieser Abweichung und um eine Verfälschung nachfolgender Analysen zu vermeiden, wurde diese Probe von den weiteren Analysen der differentiellen Genexpression und der Signalwege ausgeschlossen.

7.3. Seahorse-Analyse

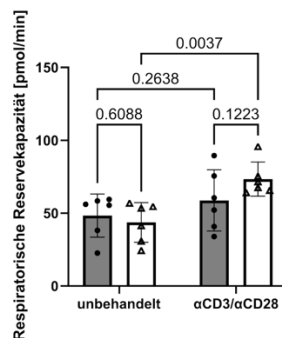
A



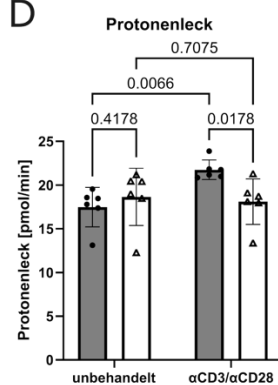
C



Respiratorische Reservekapazität (RRK)



D



Kopplungseffizienz

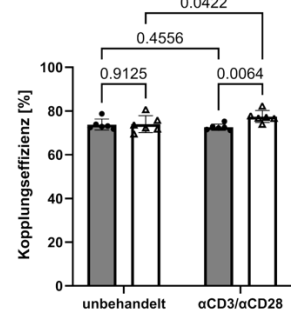


Abbildung S 3: Echtzeit-ATP-Produktionsraten, bestimmt durch den Seahorse XF ATP Rate Assay in 7-17^{WT}- und 7-17^{ΔAHR}-Zellen unter Basalbedingungen und nach 24-stündiger αCD3/αCD28-Stimulation. (A) Die TotalATP-Produktion und die ATP-Produktionsrate aus der Glykolyse (GlykoATP Produktionsrate) und der oxidativen Phosphorylierung (MitoATP Produktionsrate) wurden berechnet. (B) Die glykolytische ATP-Produktion in stimulierten 7-17^{WT}-Zellen wurde für den relativen Vergleich auf 100% festgelegt. (C–D) Respiratorische Reservekapazität (SRC) und glykolytische Reservekapazität (SGC), berechnet aus Seahorse-Messungen nach BAM15- bzw. Oligomycin-Behandlung. Alle Daten wurden auf 10.000 Zellen normiert und als Mittelwert ± SD von sechs technischen Replikaten dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte für (A), (C) und (D) mittels Two-way ANOVA (Fisher-LSD post-hoc Test), für (B) mittels zweiseitigem t-Test mit Welch-Korrektur. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant gewertet.

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

Ort, Datum

S. Leander Sollberg

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich von Herzen bei Prof. Dr. Charlotte Esser bedanken. Sie hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, an einem spannenden wissenschaftlichen Thema zu arbeiten, sondern mir auch das Vertrauen entgegengebracht, daran zu wachsen und meinen eigenen Weg zu finden. In den vergangenen Jahren durfte ich von ihrer Erfahrung, ihrer wissenschaftlichen Weitsicht und ihrer Unterstützung sehr profitieren.

Besonders dankbar bin ich ihr dafür, dass sie mir immer wieder Aufgaben anvertraut hat, die mich zunächst herausgefordert haben, an denen ich rückblickend aber besonders gewachsen bin. Sie hat mir Freiräume gegeben, mich ermutigt, Verantwortung zu übernehmen, und mir zugleich immer das Gefühl vermittelt, bei Fragen und Unsicherheiten auf ihre Unterstützung zählen zu können. Durch ihre Förderung, ihre Offenheit und die Möglichkeiten, die sie mir eröffnet hat, konnte ich nicht nur diese Arbeit verwirklichen, sondern auch einen wichtigen Schritt in die Wissenschaft machen. Dafür bin ich ihr in besonderem Maße dankbar.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Sebastian Wesselborg bedanken, der sich bereit erklärt hat, als Zweitgutachter dieser Dissertation zu fungieren. Im Rahmen der jährlichen Besprechungen hat er durch seine Anmerkungen und Anregungen wichtige Impulse gegeben und neue Perspektiven auf meine Arbeit eröffnet.

Ein besonderer Dank gilt ebenso allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Esser, die meine Zeit am IUF geprägt und bereichert haben. Ich danke Dr. Doreen Reichert, Dr. Nadine Pierchala, Babette Martiensen, Swantje Steinwachs sowie meinen Mitdoktoranden Alexander Meißner und Hafssa Fraii für die herzliche Aufnahme, die große Hilfsbereitschaft und die vielen fachlichen wie persönlichen Gespräche. Durch euer Wissen, eure Unterstützung und eure Geduld habt ihr mir immer wieder weitergeholfen, wenn ich mich in einer Sackgasse befand. Neben der wissenschaftlichen Zusammenarbeit werde ich besonders die gemeinsamen Pausen, das ein oder andere Tässchen Kaffee, die Gespräche auf der Bank und nicht zuletzt die „Seelsorge-Couch“ bei Swantje und Babette in sehr guter Erinnerung behalten.

Auch der Core Unit „Genome Engineering and Model Development“ am IUF möchte ich herzlich danken, insbesondere für die Unterstützung bei den RNA-Sequenzierungen sowie bei der Generierung der 7-17^{ΔAHR}-Zelllinie. Namentlich danke

ich Dr. Andrea Rossi, Dr. Jochen Dobner und Dr. Haribaskar Ramachandran für ihre Hilfe, Expertise und Unterstützung. Darüber hinaus danke ich Prof. Dr. Margriet Ouwens vom DDZ für ihre Unterstützung bei der Durchführung der *Seahorse*-Analyse. Des Weiteren möchte ich mich bei der AG Krutmann bedanken, deren Mitglieder mir stets hilfsbereit zur Seite standen und mich insbesondere bei Western Blots beraten haben.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitgliedern des Tierhauses, die mich während meiner Arbeit zuverlässig unterstützt und damit einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Dissertation geleistet haben.

Abschließend möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden bedanken. Ihr habt mich während der gesamten Zeit unterstützt, mich ermutigt und auch meine Launen, insbesondere in der intensiven Schlussphase, mit viel Geduld ertragen.