

Aus dem Institut für Humangenetik  
(Prof. Dr. med. B. Wollnik)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen:  
Nachweis und Charakterisierung  
in humaner und muriner Epidermis**

---

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Hanna Jill Scheile, geb. Rabe**

aus  
Hamburg

Göttingen 2020

Dekan

Prof. Dr. med. W. Brück

Referentin:

PD Dr. rer. nat. A. Uhmann

Ko-Referent/in:

Prof. Dr. Timo Buhl

Drittreferent/in:

.....

Datum der mündlichen Prüfung:

26.05.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen: Nachweis und Charakterisierung in humaner und muriner Epidermis“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise veröffentlicht:

**Becker M**, Bauer J, Pyczek J, König S, Müllen A, **Rabe H**, Schön MP, Uhmann A, Hahn H (2020): Wif1 suppresses the generation of suprabasal cells in acanthotic skin and growth of basal cell carcinomas upon forced overexpression. J Invest Dermatol

**Brandes N**, Hristomanova Mitkovska H, Botermann DS, Maurer W, Müllen A, **Scheile H**, Zabel S, Frommhold A, Hahn H, Uhmann A (2020): Spreading of Isolated Ptch Mutant Basal Cell Carcinoma Precursors Is Physiologically Suppressed and Counteracts Tumor Formation in Mice. Int J Mol Sci

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aufbau der humanen Haut .....	1
1.1.1 Aufbau der Epidermis.....	1
1.1.2 Stammzellen der Epidermis .....	4
1.1.3 Oberflächenmarker von Zellen in der Haut .....	7
1.1.4 Stammzellartige CD4 <sup>+</sup> epidermale Zellen .....	8
1.2 Mausmodelle.....	10
1.2.1 Reportermausstämme zur Visualisierung der Nachkommenschaft von CD4- exprimierenden Zellen .....	10
1.2.3 Immundefiziente Mausmodelle .....	11
1.3 Zielsetzung .....	12
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1 Software .....	13
2.2 Datenbanken .....	13
2.3 Laborgeräte .....	13
2.4 Gebrauchswaren .....	15
2.5 Chemikalien und Reagenzien .....	17
2.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme .....	18
2.7 Stammlösungen.....	19
2.8 Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	20
2.9 Biologische Materialien.....	20
2.9.1 Mauslinien.....	20
2.10 Enzyme .....	22

2.11	Antikörper .....	22
2.11.1	Immunhistochemie und Doppelimmunfluoreszenz.....	22
2.11.2	Durchflusszytometrie .....	24
2.12	Molekularbiologische Methoden .....	26
2.12.1	Isolierung von genomischer DNA aus Gewebeproben .....	26
2.12.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	26
2.12.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung von Mäusen .....	27
2.12.4	Agarosegelelektrophorese .....	28
2.13	Histologische, immunhistologische und durchflusszytometrische Methoden....	29
2.13.1	Einbettung von Geweben und Anfertigen von Gewebeschnitten .....	29
2.13.2	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Paraffinschnitten.....	29
2.13.3	Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten .....	29
2.13.4	Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten.....	30
2.13.5	Durchflusszytometrische Analysen .....	31
2.14	Zellbiologische Methoden.....	33
2.14.1	Isolierung von Keratinozyten aus muriner Haut .....	33
2.14.2	Isolierung von Thymus- und Milzzellen aus Mäusen .....	33
2.14.3	Isolierung von Keratinozyten aus humaner Haut.....	34
2.14.4	Kultivierung humaner Epidermis.....	35
2.15	Tierexperimentelle Methoden .....	35
2.15.1	Zucht und Haltung von <i>Mus musculus</i> .....	35
2.15.2	Genotypisierung.....	36
2.15.3	<i>In-vivo</i> -BrdU-Markierung muriner Zellen.....	36
2.15.4	Topische Tamoxifen- bzw. ATRA-Behandlung von Mäusen.....	36
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
3.1	Charakterisierung muriner CD4-exprimierender Zellen .....	38
3.1.1	Nachweis von CD4-exprimierenden Keratinozyten in immundefizienten Mäusen	38
3.1.2	Etablierung von <i>lineage tracing</i> -Mausmodellen zum Nachweis von CD4 <sup>+</sup> - Keratinozyten und deren Tochterzellen.....	41
3.1.3	Epidermale Proliferationsstimulation mittels topischer all- <i>trans</i> -Retinsäure- Behandlung .....	53
3.1.4	<i>In-vivo</i> -BrdU-Inkorporationsstudie zur Detektion von LRC der Haut in C57BL6/N- Mäusen .....	60

3.2	Charakterisierung humaner CD4 <sup>+</sup> epidermaler Zellen .....	61
3.2.1	Durchflusszytometrische Analyse frischer humaner Keratinozytenisolate .....	61
3.2.2	Immunhistologische Analysen zum Nachweis CD4 <sup>+</sup> epidermaler Zellen in der humanen Epidermis .....	66
3.2.3	Histologische Analyse <i>ex vivo</i> kultivierter humaner Epidermis nach ATRA- bzw. TPA-Behandlung .....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>72</b>
4.1	Charakterisierung muriner CD4-exprimierender Zellen .....	72
4.1.1	Nachweis von CD4 <sup>+</sup> epidermalen Zellen in immundefizienten Mausmodellen .....	72
4.1.2	Etablierung eines Mausmodells zur Fluoreszenzmarkierung von CD4 <sup>+</sup> -Keratinozyten .....	73
4.1.3	ATRA induziert die Proliferation von CD4 <sup>+</sup> epidermalen Zellen .....	77
4.1.4	Detektionsmethoden von LRC nach <i>In-vivo</i> -BrdU-Inkorporation .....	78
4.2	Charakterisierung humaner CD4 <sup>+</sup> epidermaler Zellen .....	79
4.2.1	Eigenschaften humaner CD4 <sup>+</sup> epidermaler Zellen .....	79
4.2.2	<i>Ex vivo</i> -Kultivierung humaner Epidermis .....	81
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der epidermalen Zellschichten und des Verlaufs der Basallamina. ....	3
Abbildung 2: Modelle zur Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase. ....	6
Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analyse von Rag2 <sup>-/-</sup> -γc <sup>-/-</sup> - und NOD-SCID-Thymi.....	40
Abbildung 4: Durchflusszytometrische Analyse von Rag2 <sup>-/-</sup> -γc <sup>-/-</sup> - und NOD-SCID-Keratinocyten. ....	41
Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse von R26-tdtomato-CD4Cre-Thymuszellen, -Milzzellen und -Keratinocyten. ....	46
Abbildung 6: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs topischer Tamoxifen-Behandlung von R26-tdtomato-CD4CreERT2-Mäusen. ....	47
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analysen der Thymocyten von topisch mit DMSO bzw. Tamoxifen behandelten R26-tdTomato- und R26-tdTomato-CD4CreERT2-Mäusen. ....	50
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analysen der Keratinocyten von topisch mit DMSO bzw. Tamoxifen behandelten R26-tdTomato- und R26-tdTomato-CD4CreERT2-Mäusen. ....	53
Abbildung 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs topischer ATRA-Behandlung von Wildtyp-C57BL6/N- und R26-tdtomato-CD4Cre-Mäusen.....	54
Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analysen von Keratinocyten aus mit ATRA behandelten C57-Mäusen sowie ihren Kontrollen.....	55
Abbildung 11: Statistische Auswertung des proliferationsinduzierenden Effekts von ATRA auf murine Epidermis.....	56
Abbildung 12: Immunhistologische und statistische Analysen von mit ATRA behandelter muriner Rückenhaut. ....	59
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von hämatopoetischen Markern durch humane Keratinocytenisolate.....	62
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse humaner epidermaler Zellen.....	64
Abbildung 15: Weiterführende durchflusszytometrische Analyse humaner epidermaler Zellen... ..	65
Abbildung 16: Doppelimmunfluoreszenzfärbungen humaner Normalhaut.....	67
Abbildung 17: Immunhistologische anti-Ki67-Färbungen ex vivo kultivierter humaner Epidermis nach ATRA- bzw. TPA-Behandlung.....	71



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Mauslinien .....	21
Tabelle 2: Auflistung der primären Antikörper (IHC und DIF) .....	23
Tabelle 3: Auflistung der sekundären Antikörper (DIF) .....	23
Tabelle 4: Auflistung der primären Antikörper (Durchflusszytometrie) .....	25
Tabelle 5: PCR-Reaktionsansatz zur Genotypisierung von Mäusen .....	27
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung .....	27
Tabelle 7: PCR-Bedingungen zur Genotypisierung von Mäusen .....	28
Tabelle 8: Auszählung der Ki67 <sup>+</sup> epidermalen Zellen .....	58

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ATRA	<i>all-trans-retinoic acid</i>
BCC	<i>basal cell carcinoma</i>
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
CP	<i>committed progenitor cells</i>
CCR5	<i>CC motive chemokine receptor type 5</i>
CXCR4	<i>CXC motive chemokine receptor type 4</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIF	Doppelimmunfluoreszenz
DMBA	7,12-Dimethylbenzo[a]anthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPU	<i>epidermal proliferative unit</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FSC/SSC	<i>forward scatter/side scatter</i>
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Haarfollikel

HF-SZ	Haarfollikel-Stammzellen
Hh	<i>Hedgehog</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HKGS	<i>Human Keratinocyte Growth Supplement</i>
IFE	Interfollikuläre Epidermis
IFE-SZ	Stammzellen der interfollikulären Epidermis
Ig	Immunglobuline
IHC	Immunhistochemie
ILC	<i>innate lymphoid cells</i>
IRS	<i>inner rooth sheath</i>
LH	Langerhanszellen
LRC	<i>label retaining cells</i>
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i>
NK	Natürliche Killerzellen
ORS	<i>outer rooth sheath</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit 0,1 % Tween-20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
P/S	Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml)
Rag	<i>recombination activating gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
R26	<i>Rosa26</i>
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SZ	Stammzellen
TA	<i>transit amplifying cells</i>

TBS	Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
TBST	TBS mit 0,1 % Triton-X-100
TCR	<i>T cell receptor</i>
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoyophorbol-13-acetat
ÜN	Über Nacht
$\gamma$ c	<i>common gamma chain</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der humanen Haut

Die menschliche Haut ist das größte Organ des Körpers und bedeckt beim Erwachsenen eine Fläche von etwa 1,5 m<sup>2</sup>. Ausgestattet mit zahlreichen Rezeptoren ist sie somit ein wichtiger Teil der Interaktion, aber auch der Abgrenzung des Organismus von der Umwelt. So dient sie dem Schutz vor Wasserverlust, Infektionen und Verletzungen sowie der Regulierung der Körpertemperatur. Sie ist aus drei Schichten aufgebaut: Der fett- und bindegewebigen Subcutis (Unterhaut), der Dermis (Lederhaut) sowie der deutlich dünneren Epidermis (Oberhaut), welche ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel darstellt. Epidermis und Dermis bilden zusammen die *Cutis*. Die zuunterst liegende Subcutis bildet die Unterlage für die *Cutis* und beinhaltet größere Blutgefäße, Nerven und Sinneszellen. Die Dermis (*Corium*) liegt unter der untersten Schicht der Epidermis und stützt diese durch ihre feste Struktur, welche sie durch Proteine wie Kollagen und Elastin erhält. Des Weiteren verankert sie die Haarfollikel, die Haarbalgmuskeln sowie Talg- und Schweißdrüsen und beherbergt Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, Lymphozyten). Außerdem ist die Dermis mit zahlreichen Blutgefäßen durchzogen und versorgt über Diffusion die gefäßlose Epidermis (Montagna und Parakkal 1974; Moll 2016).

### 1.1.1 Aufbau der Epidermis

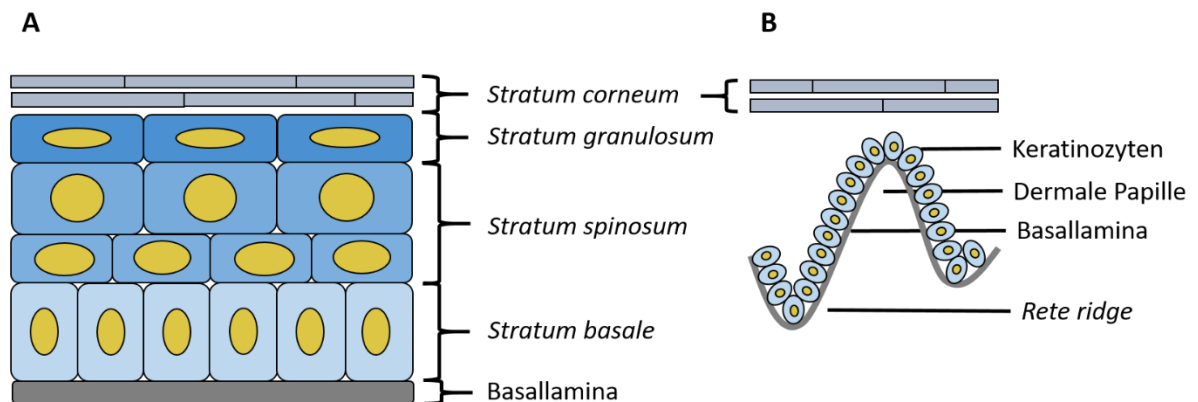
Die Epidermis steht im direkten Kontakt zur Außenwelt. Trotz ihrer Dicke von lediglich 0,04 bis 1,2 mm muss sie somit den Körper maßgeblich gegen Gefährdungen von außen wie etwa Keime, Kälte oder UV-Strahlung schützen. Sie ist hierfür aus einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel aufgebaut, das sich ständig erneuert. Der äußeren Hornschicht (*Stratum corneum*) folgen von außen nach innen die Glanzschicht (*Stratum lucidum*), die Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*), die Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) und die Basalzellschicht (*Stratum basale*). Verankert ist die Epidermis über das *Stratum basale* in der Basallamina, die überwiegend aus Bindegewebszellen

(Fibroblasten) besteht und für die Versorgung mit Nährstoffen zuständig ist (Blanpain und Fuchs 2006, 2009) (Abbildung 1 A).

Die humane Epidermis wird geprägt durch fingerförmige Einstülpungen an der Unterseite (dermale Papille, *dermal papillae*) und den Einsenkungen des Epithels zwischen diesen Papillarkörpern (Epithel- oder Retezapfen, *rete ridges*) (Abbildung 1 B). Hierdurch entstehen zwei Kompartimente, in denen die Keratinozyten teilweise unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (Lawlor und Kaur 2015; Lavker und Sun 1982).

Die hauptsächlich in der Epidermis vorkommenden Zellen sind die Keratinozyten in verschiedenen Stadien der Differenzierung. Durch die mitotische Aktivität des *Stratum basale*, welches viele epidermale Stammzellen enthält, ist die ständige Regeneration der Epidermis gewährleistet. Die Keratinozyten des *Stratum basale* exprimieren Proteine der extrazellulären Matrix wie Laminin 5 und Integrin  $\alpha 3\beta 1$  (CD49c, CD29) sowie Integrin  $\alpha 6\beta 4$  (CD49f), die sie über ein Netz aus Keratinfilamenten in der Basallamina verankern. Wenn sie Richtung *Stratum corneum* wandern, stellen sie die Integrin- und Laminin-Expression ein und beenden ihre mitotische Aktivität (Blanpain und Fuchs 2006). Im Laufe dieser Migration vom *Stratum basale* zum *Stratum corneum*, die beim Menschen ca. 28 Tage, bei Mäusen 8 bis 9,5 Tage dauert, durchlaufen die Keratinozyten alle Schichten der Epidermis mit jeweils unterschiedlichen Morphologien und Aktivitätsstadien (Potten et al. 1987). Diese Differenzierung wird durch enzymatische Proteine aus der Familie der Proteasen, den Caspasen, gesteuert. Ihre Aktivierung führt zum graduellen Zellkernverlust der Keratinozyten sowie zur Expression verschiedener Proteine in den unterschiedlichen Zellschichten (Shalini et al. 2015). Im *Stratum spinosum* sind die Keratinozyten noch rund bis polygonal, sie zeigen transkriptionelle Aktivität und die Caspasen 3 und 14 können bereits nachgewiesen werden. Im *Stratum granulosum* flachen die Zellen bereits ab und beinhalten weniger Organellen. Die hier erhöhte Caspase-Aktivität führt neben den apoptotischen Signalen zur stärkeren Aktivierung des Vorläuferproteins Profilaggrin, welches nun als Filaggrin zusammen mit dem Protein Loricrin die Zellstabilität erhöht. Das durch Apoptose verhornte *Stratum corneum* bildet so einen Schutz vor UVB-Strahlen, Wasserverlust und pathogenen Erregern. Hier finden sich schließlich ausschließlich flache, tote Hornzellen, welche durch mechanische Prozesse in Form von Hautschuppen

abgetragen und durch nachkommende Zellen ersetzt werden (Shalini et al. 2015; Weil et al. 1999; Champion et al. 1998).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der epidermalen Zellschichten und des Verlaufs der Basallamina. (A)** Die Abbildung zeigt die vier epidermalen Zellschichten mit der zur dermalen Seite hin angrenzenden Basallamina. Hierauf folgen die Basalzellschicht (*Stratum basale*), die Stachel- (*Stratum spinosum*) und Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*) und die nach außen abgrenzende Hornschicht (*Stratum corneum*). **(B)** Darstellung der charakteristischen Einstülpungen der Basallamina in menschlicher Epidermis mit den dadurch entstehenden Kompartimenten der dermalen Papille und *rete ridges*. Abbildungen modifiziert nach Pommerencke et al. (2008) und Lawlor und Kaur (2015).

Die Keratinozyten der Epidermis werden immer wieder von Haarfollikeln (HF) durchzogen. Durch sie kann die Haut in molekulare Blöcke, bestehend aus einer Haarfollikel- und Talgdrüseneinheit und der darum liegenden Epidermis (interfollikuläre Epidermis, IFE) eingeteilt werden. Die HF sind Einstülpungen der Epidermis, an deren unterem Ende in der dermalen Papille aus mesenchymalen Zellen das Haar gebildet wird. Sie werden von einer inneren Haarwurzelscheide (*inner root sheath, IRS*), die den Haarschaft umgibt, und einer äußeren Haarwurzelscheide (*outer root sheath, ORS*) gebildet. Im Laufe des Haarzyklus degenerieren Teile der Zellen der IRS im unteren Haarfollikelbereich. Im oberen Bereich jedoch wird der Haarschaft weiterhin von der IRS umgeben. Dieser Bereich wird als Wulstregion bezeichnet und beinhaltet Haarfollikel-

Stammzellen (HF-SZ), die zur Ausbildung eines neuen Haarschafts benötigt werden. Ihre Proliferation wird durch Signale aus der dermalen Papille angeregt (Rahmani et al. 2014; Blanpain und Fuchs 2009). Neben ihrer Funktion als Reservoir für die HF-Regeneration können die HF-SZ auch zur Regeneration der Epidermis beitragen, etwa bei Verwundung der Haut. Außerdem können murine Holoklone von Zellen der Wulstregion nach Transplantation vollständig funktionsfähige IFE, HF, Talgdrüsen und HF-SC generieren (Blanpain und Fuchs 2006).

Weitere Zelltypen in der Epidermis sind die Melanozyten, die Langerhanszellen und die Merkelzellen. Sie sind überwiegend im *Stratum basale* und im *Stratum spinosum* lokalisiert. Melanozyten schützen durch Melaninsynthese vor Zellschäden durch UV-Licht. Langerhanszellen sind Immunzellen, die nach Antigen-Kontakt zu dendritischen Zellen in die regionalen Lymphknoten wandern. Bei den Merkelzellen handelt es sich um Sinneszellen, die am Tastsinn beteiligt sind (Boulais und Misery 2008).

### 1.1.2 Stammzellen der Epidermis

Die wie in 1.1.1 beschriebene ständige Regeneration der Epidermis sowie die Erneuerung der Haut nach Verletzungen erfordern Stammzellen (SZ) und Vorläuferpopulationen, aus denen neue Keratinozyten entstehen können. Diese sind neben der Wulstregion des Haarfollikels, wo aus bipotenten SZ sowohl Zellen des Haarfollikels als auch der Epidermis entstehen, auch in der Basalzellschicht der Epidermis lokalisiert (Taylor et al. 2000; Ghazizadeh und Taichman 2005). Obwohl die Bezeichnung als SZ nicht genau definiert ist, werden darunter allgemein Zellen verstanden, die selber nicht differenzieren, deren Tochterzellen aber schrittweise differenzierte Zellen eines Organ- oder Gewebetyps ausbilden. Sie zeichnen sich entsprechend durch fehlende Marker der terminalen Differenzierung aus und weisen ein hohes Proliferationspotenzial auf, wobei sie sich nur langsam teilen (Bickenbach 1981; Hall und Watt 1989). Die niedrige Teilungsfrequenz macht es möglich, die SZ über eine DNA-Markierung, etwa mit 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU), zu kennzeichnen. Die sich sehr langsam teilenden SZ sind über einen sehr langen Zeitraum zu identifizieren, was zum Begriff der *label-retaining cells* (LRC) geführt hat, während sich differenzierende und schnell proliferierende Zellen durch ständige



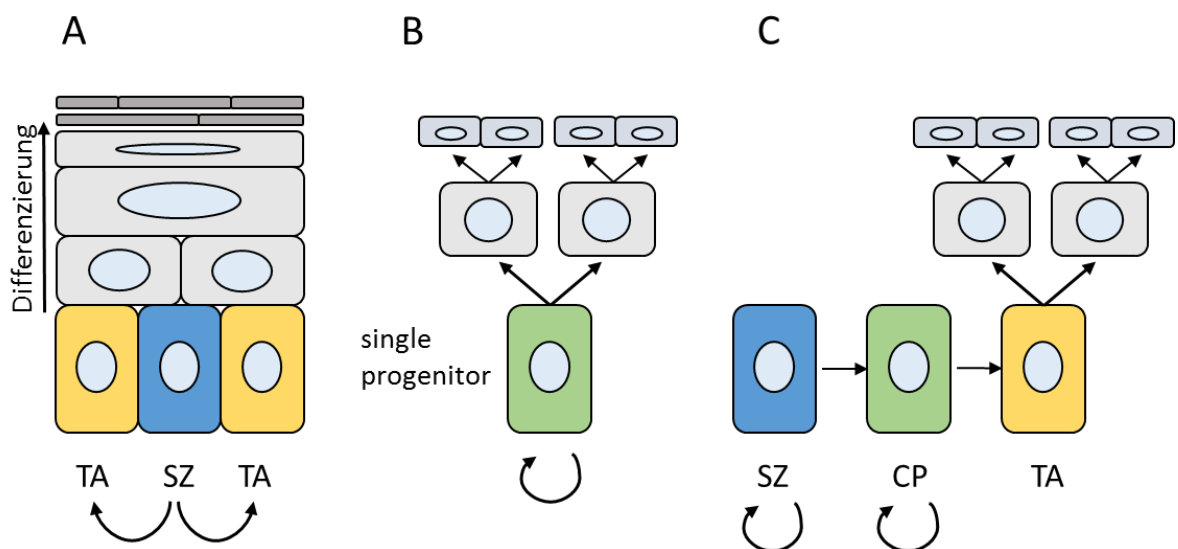
Zellteilungen ihre BrdU-Markierung verlieren (Bickenbach 1981; Bickenbach und Chism 1998; Braun et al. 2003). Zur Lokalisation und Funktionsweise epidermaler SZ gibt es verschiedene Modelle, die aber auch nebeneinander existieren können:

Zum einen weisen Studien zur Morphologie und Proliferation epidermaler Zellen auf die Existenz von SZ der IFE (IFE-SZ) hin, welche in sogenannten epidermalen Proliferationseinheiten (*epidermal proliferative unit*, EPU) organisiert sind. Diese EPU sollen aus einer zentral liegenden, sich langsam teilenden (*slow-cycling*) SZ mit ca. zehn sie umgebenden Progenitorzellen (*transit-amplifying* (TA) *cells* bzw. *committed progenitor* (CP) *cells*) bestehen, welche nach mehreren Zellteilungen schließlich differenzieren. Die von der *slow-cycling*-SZ abstammenden Zellen erstrecken sich in einer Reihe bis in die Hornschicht (Potten 1974) (Abbildung 2 A). Dieses Modell wird durch Studien, in denen markierte IFE-Zellen in allen Schichten der Epidermis nachgewiesen wurden, unterstützt (Kolodka et al. 1998; Ro und Rannala 2004). Die IFE-SZ sind in Form von Clustern in der Basalzellschicht lokalisiert, wo sie über ihre hohe Integrin  $\beta 1$  (CD29)-Expression, die bei humanen Keratinozyten auf starkes Proliferationspotential *in vitro* hinweist, detektiert werden konnten. In humaner Epidermis werden sie genauer in den *rete ridges* vermutet, wo sie besonders geschützt lägen (Blanpain und Fuchs 2006; Jones et al. 1995). Des Weiteren können in geringer Dichte kultivierte Keratinozyten der IFE unter anderem sogenannte Holoklone bilden, welche undifferenziert sind und ein hohes Proliferationspotenzial aufweisen. Die Tochterzellen eines IFE-Holoklons können *in vivo* eine funktionale und regenerative Epidermis bilden, was schließen lässt, dass in der IFE Zellen mit stammzellartigem Charakter vorliegen (Blanpain und Fuchs 2006).

Zum anderen weisen neuere Studien auf die Existenz von einzeln gelegenen, equipotenten Vorläuferzellen hin (*single committed progenitor* (CP) *cells*), welche hauptsächlich für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Epidermis verantwortlich sind. Die Proliferation und Differenzierung der daraus folgenden Tochterzellen folgt scheinbar zufälligen Regeln. Sie sind in der Basalzellschicht lokalisiert und weisen, im Gegensatz zu IFE-SZ, eine schnelle Teilungsfrequenz auf (*fast cycling*), weshalb sie auch ohne Beteiligung der IFE-SZ die Homöostase der Epidermis erhalten können (Abbildung 2 B). Trotzdem erklärt dieses Modell nicht, wie etwa im Falle von Verletzungen das

Gewebe schnell und bedarfsangepasst regenerieren kann (Clayton et al. 2007; Mascré et al. 2012; Doupé et al. 2010).

Aufgrund der Diskrepanzen zwischen beiden Modellen scheint es am wahrscheinlichsten, dass in der IFE *slow cycling* SZ und *fast cycling* CP nebeneinander existieren und sich in einem hierarchischen System gegenseitig ergänzen (Mascré et al. 2012; Senoo 2013). Demnach würden IFE-SZ über asymmetrische Teilungen eine neue SZ und eine CP bilden. Die *fast cycling* CP wiederum kann sich dann in eine weitere CP und eine Tochterzelle teilen, welche anschließend differenziert (Abbildung 2 C). Ebenfalls hinweisend auf die Koexistenz von IFE-SZ und IFE-CP sind Untersuchungen, die sowohl Unterschiede in der Expression mehrerer Zellproteine als auch verschiedene Funktionen der beiden Zelltypen bei der Regeneration und Erhaltung der Epidermis zeigen. Demnach können die stark CD29, jedoch kein CD34 oder CD71 exprimierenden IFE-SZ schnell und bedarfsgerecht aktiviert werden, was vor allem bei der Wundheilung von Nutzen ist, während IFE-CP durch scheinbar willkürliche Zellteilungen die Homöostase der Epidermis aufrecht erhalten (Blanpain und Fuchs 2009; Mascré et al. 2012).



**Abbildung 2: Modelle zur Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase.** Vergleich der verschiedenen Modelle zur Organisation von SZ in der IFE. **(A)** Schema einer *epidermal proliferative unit* (EPU) mit der zentral gelegenen *slow cycling* Stammzelle (SZ, blau), umgeben von *transit-amplifying* (TA) cells (gelb), von welchen die sich differenzierenden Zellen der Epidermis abstammen. **(B)** Schematische Abbildung des *single progenitor* Modells, in dem eine

unbegrenzt teilungsfähige *fast cycling* Vorläuferzelle (*single progenitor*, grün) durch scheinbar zufällige Zellteilung die epidermale Homöostase aufrechterhält. **(C)** Schema der hierarchischen Organisation der IFE-SZ/CP. Eine *slow cycling* SZ bildet über asymmetrische Teilung *fast cycling committed progenitor* (CP) cells, welche sich wiederum asymmetrisch in zu den TA Zellen aus (A) equipotenten Tochterzellen teilt. Abbildung modifiziert nach Senoo (2013).

### 1.1.3 Oberflächenmarker von Zellen in der Haut

Zur Identifizierung und Charakterisierung der verschiedenen in der Haut befindlichen Zellen sind viele Oberflächenproteine bekannt, die die jeweiligen Zellpopulationen spezifisch markieren. So können Keratinozyten aufgrund ihrer Expression des Zelladhäsionsrezeptors CD49f (Integrin  $\alpha 6$ ) identifiziert werden (Li et al. 1998). Unterschiedliche Keratinozytenpopulationen können außerdem über den Nachweis weiterer Markerproteine detektiert werden. So sind humane epidermale SZ durch ihre Expression des Stammzellmarkers CD29 (Integrin  $\beta 1$ ) charakterisiert, ein Rezeptor für Kollagene und Laminine, der vor allem in der dermalen Papille nachweisbar ist (Jones et al. 1995). Zellen der Wulstregion und in den Retezapfen exprimieren zusätzlich Keratin 15 (K15) (Lyle et al. 1998; Solanas und Benitah 2013). Ähnlich der humanen Haut wird auch von murinen Keratinozyten CD49f exprimiert, jedoch fungieren hier CD34 als SZ-Marker der Wulstregion (Ohyama et al. 2006) und Sca-1 als Marker für Zellen, welche das SZ-Kompartiment bereits verlassen haben, aber noch nicht differenziert sind (Triel et al. 2004). Ein weiterer Oberflächenmarker der murinen Haut ist CD200, das sich in Keratinozyten der ORS und Langerhanszellen nachweisen lässt (Rosenblum et al. 2004). Des Weiteren können SZ der Epidermis bzw. des HF über die fehlende Expression des Transferrinrezeptors CD71 (TfR1) (Tani et al. 2000) identifiziert werden. In der humanen Haut ist außerdem der Nachweis der Transkriptionsfaktoren Sox2, der auch für die Erhaltung der Pluripotenz von embryonalen neuronalen SZ verantwortlich und an der Spitze der Retezapfen zu finden ist (Laga et al. 2010), sowie des die Zellproliferation kontrollierenden Sox9 (SRY-Box9) in der Basalzellschicht (Shi et al. 2013) zum Nachweis von IFE-SZ möglich.

Neben den Keratinozyten können auch Immunzellen über den Nachweis von Markerproteinen in der Haut detektiert werden. So wird bspw. CD3 spezifisch von T-Zellen (Fais et al. 2004), CD14 von Makrophagen (Jersmann 2005) und CD1a von Langerhans'- sowie dendritischen Zellen (DZ) (Mizumoto und Takashima 2004) exprimiert. In murinem Gewebe werden B-Zellen über B220, eine spezifische Isoform von CD45 (Coffman und Weissman 1981), nachgewiesen.

#### 1.1.4 Stammzellartige CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen

Eine ubiquitäre Überaktivierung des Hedgehog (Hh)-Signalweges im adulten Organismus (*Ptch<sup>flox/flox</sup>-Rosa26-CreERT2*-Mäuse) führt neben einer Hyperproliferation der Haut, des Gastrointestinaltrakts und des Mesenteriums auch zu schweren Immundefekten und einer defekten T-Zellentwicklung (Uhmann et al. 2007; 2011). Dahingegen zeigten Mäuse mit einer alleinigen Überaktivierung des Hh-Signalweges in CD4-exprimierenden Zellen (*Ptch<sup>flox/flox</sup>-CD4Cre*-Mäuse) keinerlei Immundefizite (Uhmann et al. 2011; Michel et al. 2013). Allerdings wurde in *Ptch<sup>flox/flox</sup>-CD4Cre*-Mäusen durch die chemisch-induzierte Karzinogenese mit 7,12-Dimethylbenzo[a]anthracen/12-O-tetradecanoyophorbol-13-acetat (DMBA/TPA) die Entwicklung von Basalzellkarzinomen (*basal cell carcinoma*, BCC) induziert, einer Tumorentität, die sich häufig aufgrund einer Überaktivität der Hh-Signalkaskade entwickelt (Uhmann et al. 2014). Diese Beobachtung war von besonderem Interesse, da das DMBA/TPA-Protokoll normalerweise zur Induktion von Papillomen und Plattenepithelkarzinomen (SCC) führt, die typischerweise aufgrund von *Hras* Mutationen entstehen (Uhmann et al. 2014; DiGiovanni 1992). Die Analyse der DMBA/TPA-induzierten BCC von *Ptch<sup>flox/flox</sup>-CD4Cre*-Mäusen zeigte, dass diese Tumore weder die typische DMBA-induzierte *HRas* Mutation aufweisen noch hämatopoetischen Ursprungs sind (Uhmann et al. 2014) oder durch eine Deregulation der T-Zell-Funktion induziert werden (Michel et al. 2013). Vielmehr legten diese Befunde nahe, dass in der murinen Haut eine CD4-exprimierende Keratinozytenpopulation existiert, aus welcher sich aufgrund der hyperaktiven Hh-Signalkaskade und anschließender DMBA/TPA-Behandlung BCC entwickeln. Tatsächlich konnte anhand weiterer Untersuchungen die bisher nicht beschriebene Existenz von CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten nachgewiesen werden. Diese

Zellpopulation exprimiert neben dem CD4-Protein den Keratinozytenmarker CD49f sowie die epidermalen SZ-Marker CD34 und Sca-1, woraus geschlossen werden kann, dass CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-CD34<sup>int</sup>-Zellen der murinen Epidermis eine stammzellartige Population der Zellen der Basalzellschicht darstellen und es sich nicht um HF-SZ (CD49f<sup>high</sup>-CD34<sup>+</sup>-Sca-1<sup>-</sup>) oder suprabasale HF-SZ (CD49f<sup>low</sup>-CD34<sup>+</sup>-Sca-1<sup>-</sup>) handelt (Uhmann et al. 2014).

Das Wissen über die Existenz von CD4<sup>+</sup>-Nicht-Immunzellen ist völlig neu. Somit kann zum bisherigen Zeitpunkt nur vermutet werden, dass das CD4-Protein auf Keratinozyten eine ähnliche Funktion wie auf Immunzellen besitzt.

Das CD4-Protein wird typischerweise neben anderen Immunzellen wie Granulozyten, DZ und Makrophagen vor allem von T-Zellen exprimiert. Es ist auf dem humanen CD4- bzw. dem murinen CD4 (L3T4)-Gen kodiert, welche auf dem Chromosom 12 bzw. 6 lokalisiert sind und je 10 Exone umfassen (ensembl.org, 16.01.2020). Auf T-Zellen setzt sich das Protein aus vier Immunglobulin (Ig)-Domänen (D1 bis D4) zusammen, die zwischen humanem und murinem Protein zu 52-57 % homolog sind (Maddon et al. 1987). Seine Funktion besteht hier in einer Verstärkung der T-Zell-Aktivierung durch MHC-II-Moleküle (*major histocompatibility complex II*) nach Bindung antigenpräsentierender Zellen sowie als Korezeptor des T-Zell-Rezeptor (*T cell receptor*, TCR)/CD3-Komplexes, wodurch die CD3-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion stimuliert wird (Maddon et al. 1987; Weiss und Littman 1994). Tatsächlich erfolgte der Nachweis von CD4 auf murinen Keratinozyten mithilfe von Antikörpern zur Detektion der *full length*-Proteinvariante (Uhmann et al. 2014). Daher kann davon ausgegangen werden, dass CD4<sup>+</sup>-epidermale Zellen ein *full length*-Protein exprimieren, wie es auf T-Zellen zu finden ist.

Außerdem ist das CD4-Protein in die Infektion von Zellen mit dem Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV) involviert, indem es mit dem viralen Glykoprotein gp120 interagiert. Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung von gp120 bewirkt dessen Bindung an die zellulären Chemokinrezeptoren CCR5 (*CC motive chemokine receptor type 5*) oder CXCR4 (*CXC motive chemokine receptor type 4*), woraufhin das virale Genom in die Wirtszelle transportiert und die virale einzelsträngige RNA in das Wirtsgenom integriert werden kann (Chan und Kim 1998). Bei der hochaktiven antiretroviralen Therapie

(HAART) einer HIV-Infektion wird bei Unterbrechung der Behandlung ein Wiederanstieg der Viruslast beobachtet, nachdem diese unter HAART unter die derzeitige Nachweisgrenze von 40-50 Kopien/ml Plasma gefallen war. Neben langlebigen Zellen, die trotz HAART Viren produzieren, könnten hier auch mit dem Wirkstoff schlecht erreichbare Nischen wie der Gastrointestinaltrakt oder auch latente HIV-Reservoirs, in denen das Virus zunächst in inaktivierter Form vorliegt, eine Rolle spielen (Palmer et al. 2011). Neben CD4<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen, Knochenmark-SZ, dem zentralen Nervensystem und dem Urogenitaltrakt könnten somit auch humane CD4<sup>+</sup>-epidermale Zellen solch ein latentes Reservoir für HIV darstellen. Tatsächlich konnten in unveröffentlichten Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>+</sup>-CD29<sup>+</sup>-Keratinozyten in humaner Epidermis nachgewiesen werden, die vermutlich das Äquivalent zu murinen CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-CD34<sup>int</sup>-Keratinozyten darstellen.

## 1.2 Mausmodelle

### 1.2.1 Reportermausstämme zur Visualisierung der Nachkommenschaft von CD4-exprimierenden Zellen

Um CD4<sup>+</sup> Zellen und deren Nachkommenschaft *in vivo* zu markieren sowie deren Differenzierung und Verhalten verfolgen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Reportermausstämme generiert: 1. Die konditionelle Reportermauslinie *Rosa26-tdTomato-CD4Cre* (*R26-tdTomato-CD4Cre*) und 2. die konditionelle Tamoxifen-induzierbare Mauslinie *Rosa26-tdTomato-CD4CreERT2* (*R26-tdTomato-CD4CreERT2*). Dazu wurden *R26-tdTomato*-Mäuse (Gt(ROSA)26Sor<sup>tm9(CAG-tdTomato)Hze</sup>) mit *CD4Cre* (Tg(Cd4-cre)1Cwi) bzw. *CD4CreERT2*-Mäusen (Tg(Cd4-cre/ERT2)11Gnri) gekreuzt. *R26-tdTomato*-Mäuse sind gentechnisch so manipuliert, dass nach Cre-Rekombinase vermittelter Deletion einer Stoppkassette das rotfluoreszierende tdTomato-Protein unter Kontrolle des ubiquitär aktiven *Rosa26* (*R26*)-Promoters exprimiert wird (Shaner et al. 2004). Durch Kreuzung mit *CD4Cre*-Mäusen, die eine Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CD4-Promoter/Enhancer/Silencer exprimieren, wird in *R26-tdTomato-CD4Cre*-Mäusen eine Rekombination am *R26-tdTomato*-Lokus in allen CD4-

exprimierenden Zellen induziert. Infolge dessen sind in *R26-tdTomato-CD4Cre* Mäusen alle Zellen, die von CD4-exprimierenden Zellen abstammen, durch Expression des rotfluoreszierenden tdTomato-Proteins nachweisbar.

Durch Kreuzung von *R26-tdTomato*-mit *CD4CreERT2*-Mäusen, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CD4-Promoter/Enhancer/Silencer exprimieren, wird hingegen in *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mäusen lediglich zum Zeitpunkt der Tamoxifenapplikation eine Rekombination am *R26-tdTomato*-Lokus in CD4-exprimierenden Zellen induziert. Demzufolge ist die tdTomato-Expression in Tamoxifen-behandelten *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mäusen auf die Tochterzellen der zum Zeitpunkt der Tamoxifengabe existierenden, CD4-exprimierenden Zellen beschränkt.

### 1.2.3 Immundefiziente Mausmodelle

Aufgrund von Knochenmarkstransplantationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen nicht hämatopoetischen Ursprungs sind (Uhmann et al. 2014). Demzufolge sollten sich auch in immundefizienten Mäusen, ähnlich wie in der immunkompetenten Mauslinie C57BL/6N, CD4-exprimierende Keratinozyten nachweisen lassen. Um dies zu untersuchen, erfolgten im Rahmen dieser Arbeit durchflusszytometrische Analysen von Keratinozytenisolaten aus *NOD-SCID*-(*NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>*) und *Rag2<sup>-/-</sup>- $\gamma$ C<sup>-/-</sup>*-Mäusen (*Rag2<sup>tm1.1Flv</sup> Il2rg<sup>tm1.1Flv</sup>*). *NOD-SCID*-Mäuse weisen eine Defizienz aller funktionellen T- und B-Lymphozyten auf, hervorgerufen durch fehlende V(D)J-Rekombination von Antigen-Rezeptorgenen während der T- und B-Zellreifung (Blunt et al. 1995). Gleichzeitig zeigen diese Mäuse eine normale Funktion der restlichen hämatopoetischen Zellreihen, also der myeloischen Reihe (Bosma und Carroll 1991). *Rag2<sup>-/-</sup>- $\gamma$ C<sup>-/-</sup>*-Mäuse besitzen weder ein funktionsfähiges *Rag2*-Gen (*recombination activating gene*), was in fehlender V(D)J-Rekombination und damit unreifen T- und B-Lymphozyten resultiert (Oettinger et al. 1990; Mombaerts et al. 1992), noch ein  $\gamma$ C-Gen (*common gamma chain*). Dadurch weisen diese Tiere auch keine *innate lymphoid cells* (ILC) auf, die den T-Zellen ähneln und zu denen unter anderem die Natürlichen Killer (NK)-Zellen gehören (Bando und Colonna 2016).

### 1.3 Zielsetzung

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war weder die Funktion noch der potentiell stammzellartige Charakter von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen untersucht worden. Ziel war es daher einerseits, mittels (z. T. neu zu etablierenden) Mausmodellen zur Visualisierung von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen und deren Nachkommenschaft erste Untersuchungen zum Nachweis des potentiellen Stammzellcharakters durchzuführen. Andererseits sollte immunhistologisch und durchflusszytometrisch untersucht werden, ob auch CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen der humanen Haut Marker für stammzellartige Zellen der Epidermis exprimieren und ob bzw. unter welchen Bedingungen eine *in-vitro*-Kultivierung dieser mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) isolierten Zellen möglich ist.

Daher sollten zunächst die beiden Reportermauslinien *R26-tdTomato-CD4Cre* und *R26-tdTomato-CD4CreERT2* generiert und anschließend mittels immunhistologischer und durchflusszytometrischer Analysen untersucht werden, ob rotfluoreszierende Tochterzellen von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen in diesen Mausmodellen nachweisbar sind sowie welche weiteren Zellmarker sie exprimieren. Parallel dazu sollte mittels einer *In-vivo*-BrdU-Inkorporationsstudie analysiert werden, ob CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen langfristig mit BrdU markiert werden können und somit Ähnlichkeiten mit LRC der Epidermis aufweisen. Um zusätzlich das Proliferationsverhalten von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen zu untersuchen, sollte außerdem der Effekt der proliferationsfördernden *all-trans*-Retinsäure (*all-trans-retinoic acid*, ATRA) auf IFE-SZ bzw. der CD4<sup>+</sup>-Zellen der murinen (*in vivo*) und der humanen Epidermis (*ex vivo* an *epidermal sheets*) analysiert werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Software

<b>Software</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Adobe Acrobat 9 Pro	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
BD FACSDiva™	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
CellSens Dimension	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Citavi 5	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Endnote X5	Thomson ISI ResearchSoft, CA, USA
EXCEL	Microsoft Co., Redmond, USA
Flowing Software 2.5.1	<a href="http://www.flowingsoftware.com">www.flowingsoftware.com</a>
FlowJo 7.6.5	Tree Star Inc., Oregon, USA
Free Hand MX	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Photoshop 6.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Microsoft Office	Microsoft Co., Redmond, USA

### 2.2 Datenbanken

<b>Datenbank</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>

### 2.3 Laborgeräte

<b>Laborgeräte</b>	<b>Bezugsquelle</b>
-80 °C Schrank (MDF-U71 V)	Sanyo Electric CO., Ltd., Japan

<b>Laborgeräte</b>	<b>Bezugsquelle</b>
-20 °C Schrank	SEG Hausgeräte GmbH, München
4 °C Schrank	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Agarosegelelektrophorese-Kammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Autoklav (Systec CX-150)	Systec GmbH & Co. KG, Linden
Brutschränke; Begasungsbrutschränke (6000, BBD 6220)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Color View II (Farbkamera für Mikroskop)	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
Digitalkamera (PowerShot G2)	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Durchflusszytometer BD™ LSR II	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Einkanal-Pipette (Multipette)	Eppendorf AG, Hamburg
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
FACS (Calibur)	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Feinwaagen (Sartorius Basic plus)	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 60)	Olympus Optical CO. Ltd., Japan
Flüssigstickstofftank	Air liquid S.A, Paris, Frankreich
Gewebeeinbett- und – entwässerungsautomat (TP 1020)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Heizbad	Medax GmbH & Co. KG, Kiel
Heizrührer (MR3000/3001)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Hybridisierungsöfen (HB-1000 Hybridizer)	UVP, Inc., Upland, USA
Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Inverses Mikroskop mit Fluoreszenzfilter (Axiovert 25)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Inverses Mikroskop Olympus (IX71 mit U-LH 100L-3)	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Isofluranbegasungsanlage	Drägerwerk AG, Lübeck
Kamera für Mikroskope (ColorView Soft Imaging System)	Soft Imaging System GmbH, Münster
Kryostat (CM 1900)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kühlplatte (EG 1150 C)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

<b>Laborgeräte</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Mikrowelle (Dimension 4)	Panasonic Corporation, Hamburg
MilliQ-Anlage	Sartorius AG, Göttingen
Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Rendburg
Multifuge (Heraeus 3LR)	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Paraffinspender (Dispenser PAG 12)	Medite GmbH, Burgdorf
pH-Meter (inoLab pH Level 1)	WTW GmbH, Wien, Österreich
Photometer (Biophotometer 6131)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe (Accu-jet)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Präparierbesteck	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Reinstwasseranlage (Arium® 611VF)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Schlittenmikrotom (HN 40)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Sterilbank (Euroflow Klasse IIA)	Clean Air Technik bv, Woerden, Niederlande
UV-Transilluminator/Software	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Vakuum-Pumpe	Schütt Labortechnik, Göttingen
Vortexer (Vortexer-Genie 2)	Scientific Industries, inc., Wobum, USA
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wasserbad	Medax GmbH & Co. KG, Rendsburg
Zählkammer nach Neubauer (Assistent)	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zellsortier-Gerät ARIA II	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.4 Gebrauchswaren

<b>Gebrauchswaren</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
Reaktionsgefäß, safe-lock (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

<b>Gebrauchswaren</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Reaktionsgefäß (13 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäß (15 ml, 50 ml) Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatte ( <i>tissue culture plate 6-well, 24-well, 96-well</i> )	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Deckgläser	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Durchflusszytometrie-Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
EDTA-Probenröhrchen 1,3 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einbettkassette	Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht
Einwegspritzen (BD Plastipak)	BD GmbH, Heidelberg
Faltenfilter	Sartorius AG, Göttingen
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Hämatokrit-Kapillaren (Na-Heparin)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Insulin-Einmalspritzen U-100	BD Biosciences, Bedford, USA
Kanüle (Microlance 3, 0,9 mm x 40 mm)	BD Biosciences, Bedford, USA
Langhaarschneider (GT 104)	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Mikrotom-Klingen A35	Pfm Medical AG, Köln
Objektträger (Super Frost Plus)	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Parafilm® M Verschlussfolie	<a href="http://www.schuett24.de">www.schuett24.de</a>
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Petrischale (Ø 100 mm)	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
Pipettenspitzen, mit Filter (10 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen, mit Filter (100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Pipettenspitzen, ohne Filter (10 µl, 200 µl)	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
Pipettenspitzen, ohne Filter (20 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Präparierbesteck	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Schlittenbahnöl interLock	Interlock Medizintechnik GmbH, Lensahn
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Skalpellschneiden (10 mm, 24 mm)	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen

<b>Gebrauchswaren</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Spritzen (10 ml, 30 ml)	Terumo Medical Corp., Elkton, MD, USA
Sterilfilter	Omnilab-Krannich, Göttingen
Urinbecher (100 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturschalen, Nunclon Surface (Ø 35 mm)	Nunc GmbH & Co. KG, Roskilde, Dänemark
Zellsieb 40 µm, 70 µm, 100 µm (BD Falcon™)	BD Biosciences, Bedford, USA

## 2.5 Chemikalien und Reagenzien

Die im Folgenden nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, bezogen.

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chelex® 100 Resin	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
4',6,-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	Life Technologies Corp., OR, USA
Montagemedium	
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dTNP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
DNA Längenstandard (1kb)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	ICN Biochemicals Inc., Aurora, USA
Ethanol (EtOH, 99 %), unvergällt	J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande
Ethanol (EtOH, 99 %) vergällt	CVH Chemie-Vertreib GmbH & Co. Hannover KG, Hannover
Ethidiumbromid (0,07 %)	Inna-TRAIN-Diagnostics, Kronberg
Fötiales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

<b>Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Glycergel Montagemedium	Dako GmbH, Hamburg
Hämatoxylin	Merck Millipore, Merck KgaA, Darmstadt
Isofluran (FORENE®)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )-Tabletten	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pertex Montagemedium	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Roti® Liquid Barrier Marker	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (37 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfat, SDS</i> )	ICN Biochemicals Inc., Irvine, CA, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan ( <i>Tris-Puffer</i> )	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
TRizol® Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (35 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Xylol	J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande
Zitronensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

## 2.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Soweit im Text nicht anders erwähnt, wurde bei der Verwendung nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

<b>Gebrauchsfertiges Reaktionssystem</b>	<b>Bezugsquelle</b>
APC BrdU Flow-Kit	BD Biosciences, Bedford, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dako REAL™ EnVision™ Detection System	Agilent, Santa Clara, CA, USA

## 2.7 Stammlösungen

Soweit im Text nicht anders erwähnt, wurde für alle Stammlösungen doppelt destilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aus der MilliQ®-Anlage (Sartorius AG, Göttingen) verwendet.

Stammlösung	Zusammensetzung	pH
Borsäure-Puffer	0,2 M Borsäure	pH 5,1
Casein	0,2 % (w/v) I-Block 0,1 % (v/v) Tween 20 1x PBS	
Citratpuffer	10 mM Natriumcitrat	pH 6,0
Eosin (0,1 %)	80 % (v/v) EtOH 1 % (w/v) Eosin-Y (wasserlöslich)	
Hämalaunlösung nach Meyer	5 % (w/v) Trichloroacetaldehydhydrat 5 % (w/v) Aluminiumammoniumsulfat 1 % (w/v) Zitronensäure 0,1 % (w/v) Hämatoxylin 0,015 % (w/v) Natriumjodat	
Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerol 0,02 % (w/v) Xylencyanol 0,02 % Bromphenolblau 0,02 % (w/v) SDS	
4 %iges Paraformaldehyd (PFA)	4 % (w/v) Paraformaldehyd 1x PBS	
PBS-Tween (PBST)	0,1 % Tween-20 1x PBS	
Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung, 10x (PBS)	1,4 M Natriumchlorid 65 mM Natriumdihydrogenphosphat 27 mM Kaliumchlorid 15 mM Kaliumhydrogenphosphat	pH 7,4
TBS-Triton-X-100 (TBST)	0,1 % (v/v) Triton X-100 1x PBS	
Tris-EDTA (TE)-Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA	pH 9,0
Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung, 10x (TBS)	1,5 M Natriumchlorid 0,5 M Tris/Salzsäure	pH 7,4

## 2.8 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Für die zwischenzeitliche Aufbewahrung und Aufbereitung von muriner Haut bzw. Zellisolaten sowie für die Aufbereitung und Isolierung humaner Keratinozyten wurden verschiedene Medien verwendet. Die Medien und verwendete Antibiotika bzw. Bestandteile sind im Folgenden aufgelistet.

Medium	Bezugsquelle
154CF Medium	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Amphotericin B	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Chelex 100 Resin Chelating Ion Exchanger Resin	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
EpiLife Medium	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS) Medium	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Human Keratinocyte Growth Supplement</i> (HKGS)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml) (P/S)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Promocell Keratinocyte Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg
TrypLE Express	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## 2.9 Biologische Materialien

### 2.9.1 Mauslinien

Die verwendeten Mauslinien sind in Tabelle 1 aufgeführt, die Zucht und Haltungsbedingungen werden in 2.15.1 beschrieben. Für neu gekreuzte Mauslinien wurden die Inzuchtlinien auf dem genetischen C57BL/6-Hintergrund (Charles River Laboratories Inc., Wilmington, NC, USA) verwendet.

Zur Generierung der Reportermauslinien *R26-tdtomato-CD4Cre* bzw. *R26-tdtomato-CD4CreERT2* wurden *R26-tdtomato*-Mäuse mit *CD4Cre*- bzw. *CD4CreERT2*-Tieren gekreuzt. *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäuse exprimieren in allen Tochterzellen von CD4<sup>+</sup>-



Zellen (bspw. T-Zellen) das rotfluoreszierende tdTomato-Protein (s. Kapitel 1.2.1, Absatz 1). In *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen dagegen wird tdTomato nur in Zellen exprimiert, deren Vorfahren zum Zeitpunkt der zur Aktivierung der Cre-Rekombinase notwendigen Tamoxifenapplikation CD4 exprimierten (s. Kapitel 1.2.1, Absatz 2).

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Mauslinien**

<b>Offizielle Bezeichnung</b>	<b>Genetischer Hintergrund</b>	<b>Bezeichnung in dieser Arbeit</b>	<b>Genetische Veränderung</b>
Gt(ROSA)26Sor <sup>tm14</sup> (CAG-tdTomato)Hz <sub>e</sub>	C57BL/6J	<i>R26-tdtomato</i>	Konditionelle Expression des Fluoreszenzproteins <i>tdtomato</i>
Tg(Cd4-cre)1Cwi/BfluJ	C57BL/6N	<i>CD4Cre</i>	<i>Cre-Rekombinase</i> unter Kontrolle des CD4-Promotors
Tg(Cd4-cre/ERT2)11Gnri	C57BL/6N	<i>CD4CreERT2</i>	Tamoxifen-induzierbare <i>Cre-Rekombinase</i> unter Kontrolle des CD4-Promotors
Rag2 <sup>tm1.1Flv</sup>   2rg <sup>tm1.1Flv</sup>	C57BL/6J	<i>Rag2</i> <sup>-/-</sup> <i>γc</i> <sup>-/-</sup>	Doppelter Homozygoten-Knockout für das <i>recombination activating gene 2</i> und die <i>common gamma chain</i>
NOD.CB17- <i>Prkdc</i> <sup>scid</sup>	NOD/ShiLtSz	<i>NOD SCID</i>	<i>severe combined immune deficiency</i> , Spontanmutation <i>Prkdc</i> <sup>scid</sup>
NOD.CB17	NOD/ShiLtSz	<i>CB17</i>	Kontrollen ohne <i>Prkdc</i> <sup>scid</sup> -Mutation
C57BL/6N	C57BL/6N	<i>C57</i>	Wildtyp-Kontrollen

## 2.10 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Dispase	Corning Inc., NY, USA
Proteinase (Alkaline Protease)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Proteinase K	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Molzym GmbH & Co. KG, Bremen
Thermolysin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Polymerase-Puffer	Molzym GmbH & Co. KG, Bremen

## 2.11 Antikörper

### 2.11.1 Immunhistochemie und Doppelimmunfluoreszenz

Die zur Immunhistochemie (IHC) und Doppelimmunfluoreszenz (DIF) verwendeten primären Antikörper (AK) sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die IHC Färbungen wurden mit dem Dako REAL™ EnVision™ Detection System (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) nach Herstellerangaben entwickelt. Die zur DIF verwendeten sekundären AK sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 2: Auflistung der primären Antikörper (IHC und DIF)**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>
anti-BrdU	1:100	Ratte, monoklonal	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-CD29/Integrin $\beta$ 1 (ABIN119209)	1:35	Maus, monoklonal	antikörper-online.de
anti-CD4 (MA 1-80223)	1:20	Maus, monoklonal	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
anti-CD4 (C1851 R06)	1:50	Kaninchen, monoklonal	DCS Diagnostics, Hamburg
anti-Ki67 (556003)	1:50	Maus, monoklonal	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA
anti-K15 (LHK15)	1:10	Maus, monoklonal	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
anti-Sox2 (ab92494)	1:100	Kaninchen, polyklonal	Abcam PLC, Cambridge, UK
anti-Sox9 (AB5535)	1:2500	Kaninchen, polyklonal	Merck Millipore KGaA, Darmstadt

**Tabelle 3: Auflistung der sekundären Antikörper (DIF)**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Maus/FITC	1:200	Ziege, polyklonal	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
anti-Kaninchen/Cy3	1:400	Ziege, polyklonal	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK
anti-Kaninchen/HRP	unverdünnt	Maus, polyklonal	Dako/Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
anti-Ratte/Biotin	1:200	Kaninchen, polyklonal	Dako/Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

### 2.11.2 Durchflusszytometrie

Für durchflusszytometrische Analysen wurden die in Tabelle 4 aufgeführten primären Antikörper bzw. Immunkonjugate verwendet. Sämtliche Antikörper wurden von BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA hergestellt, mit Ausnahme des anti-hK15 Antikörpers (Hersteller: Thermofisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Der verwendete Antikörper gegen das humane CD49f-Antigen ist kreuzreaktiv zu dem murinen CD49f-Antigen (Jensen et al. 2010).

Zur Detektion der BrdU-Markierung wurde das gebrauchsfertige BD-Pharmingen™-BrdU-Flow Kit (s. AK: anti-BrdU-APC) nach Herstellerangaben verwendet.

**Tabelle 4: Auflistung der primären Antikörper (Durchflusszytometrie)**

<b>Antikörper</b>	<b>Emissions- spektrum</b>	<b>Menge für Färbung</b>	<b>Herkunft</b>
anti-mB220	PE-Cy7	1 µl	Ratte
anti-mBrdU	APC	1 µl	
anti-hCCR5	FITC	2 µl	Maus
anti-hCXCR4	APC	2 µl	Maus
anti-mCD3	AlexaFluo 647	2 µl	Ratte
anti-mCD4	FITC	2 µl	Ratte
anti-hCD4	PE-Cy7	2 µl	Maus
anti-mCD8a	PE-Cy7	2 µl	Ratte
anti-hCD29	PE	2 µl	Maus
anti-mCD34	PE	2 µl	Ratte
anti-hCD49f	PE-Cy5	10 µl	Ratte
anti-hCD71	FITC	2 µl	Maus
anti-hK15	Über sekundären AK anti-m FITC	2 µl	Maus
anti-mSca-1	Biotin	2 µl	
anti-hSox2	Über sekundären AK	2 µl	Maus
anti- mStreptavidin	PE-Cy7	2 µl	Ratte

anti-h: Antikörper gegen humane Antigene; anti-m: Antikörper gegen murine Antigene

## 2.12 Molekularbiologische Methoden

### 2.12.1 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebeproben

Um genomische DNA aus den Schwanzbiopsien der Mäuse zu isolieren, wurden die Biopsien in 500 µl 1x STE Puffer und 25 µl Proteinase K aufgenommen und über Nacht (ÜN) bei 55 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die genomische DNA durch EtOH-Fällung präzipitiert. Dazu wurden die Proben zunächst 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand in 1 ml EtOH (99 %) überführt und bei 13000 rpm für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl EtOH (70 %) gewaschen. Die Probe wurde erneut für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und dann 10 min bei 55 °C getrocknet. Das Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen Ampuwa® aufgenommen und 15 min bei 14000 rpm und 42 °C geschüttelt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration wie unter 2.12.2 beschrieben bestimmt und 10-100 ng DNA für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Kapitel 2.12.3) weiterverwendet.

### 2.12.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit einem Photometer bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Hierzu wurde jeweils die Extinktion von 100 µl einer 1:100 Verdünnung gegen einen Leerwert (H<sub>2</sub>O) gemessen. Nach Bestimmung der Verunreinigungen durch Schwebstoffe (Absorptionsmaximum 320 nm) wurde die DNA-Konzentration mit Formel 1 berechnet.

$$c = (E_{260} - E_{320}) \cdot f \cdot C$$

**Formel 1: Formel zur Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration**

Abkürzungen: c, gemessene Konzentration in µg/µl; E<sub>260</sub>, gemessene Extinktion bei 260 nm; E<sub>320</sub>, gemessene Extinktion bei 320 nm; f, Verdünnungsfaktor; C, nukleinsäurespezifischer Koeffizient (0,05 µg/µl für DNA).

Verunreinigungen durch Proteine und Salze wurden durch Messung der Extinktion bei 280 nm (Absorptionsmaxima für Proteine) bzw. 230 nm (Absorptionsmaxima Salze) bestimmt, wobei das Verhältnis von Salze: DNA-Konzentration: Proteinanteil im Idealfall bei 1,0 : 1,8 : 1,0 liegt.

### 2.12.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung von Mäusen

Die aus den Schwanzbiopsien isolierte genomische DNA (Kapitel 2.12.1) wurde zur Genotypisierung der Mäuse mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden 10 µl des in Tabelle 5 gelisteten Reaktionsansatzes und die in Tabelle 6 aufgeführten, von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bezogenen DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet.

**Tabelle 5: PCR-Reaktionsansatz zur Genotypisierung von Mäusen**

Konzentration	Reagenz
10-100 ng	Matrizen-DNA
0,5 µM	Primer
0,2 mM	dNTP-Mix
10 % (v/v)	Cresol
1x	Polymerasepuffer (10x Puffer)
0,5 U	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung**

Getestete Mauslinie	DNA-Oligonukleotid	Fragmentgröße	DNA-Oligonukleotid-Sequenz (5' - 3')	Referenz
<i>CD4Cre</i>	<i>CD4CreF</i>	420 bp <sup>T</sup>	GGT TAT CAA GGT CCT GAG GAA G	Wolfer et al. 2001
	<i>CD4CreR</i>		CTC GTG ATC GAC CGG TAA TGC	
<i>R26-tdtomato</i>	<i>RosaTomato wtF</i>	297 bp <sup>wt</sup>	AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
	<i>RosaTomato wtR</i>		CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC	
	<i>RosaTomato mutF</i>	196 bp <sup>mut</sup>	GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC	
	<i>RosaTomato mutR</i>		CTG TTC CTG TAC GGC ATG G	
<i>CD4-Cre-ERT2</i>	<i>CD4 CreERT2-F1</i>	100 bp	GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
	<i>CD4 CreERT2-R1</i>		GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT	

Abkürzungen: <sup>wt</sup> Amplifikatlänge des Wildtyp-Allels; <sup>mut</sup> Amplifikatlänge des mutanten Allels; <sup>T</sup> Amplifikatlänge des transgenen Allels.

Die jeweiligen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Länge der PCR-Amplifikate wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.12.4) bestimmt.

**Tabelle 7: PCR-Bedingungen zur Genotypisierung von Mäusen**

	<i>CD4Cre</i>			<i>R26-tdtomato</i>		
Initialer Denaturierungsschritt	4 min		94 °C	5 min		95 °C
Zyklisch	30x	Denaturierung	1 min 94 °C	35x	20 s	95 °C
		Anlagerung	1 min 59 °C		20 s	63 °C
		Elongation	1 min 72 °C		45 s	72 °C
Finaler Elongationsschritt	5 min		72 °C	5 min		72 °C
Kühlung	16 °C			15 °C		

	<i>CD4CreERT2</i>			
Initialer Denaturierungsschritt	5 min		94 °C	
Zyklisch	10x	Denaturierung	20 s	94 °C
		Anlagerung	15 s	65 °C
		Elongation	10 s	72 °C
Zyklisch	28x	Denaturierung	15 s	94 °C
		Anlagerung	15 s	60 °C
		Elongation	10 s	72 °C
Finaler Elongationsschritt	2 min		72 °C	
Kühlung	16 °C			

#### 2.12.4 Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese wurden die amplifizierten DNA-Fragmente (Kapitel 2.12.3) aufgetrennt. Dabei wurden DNA-Proben zusammen mit 0,2 Vol Ladebuffer (Kapitel 2.7) auf ein Gel mit 0,7-2,5 %igem (w/v) Agaroseanteil in 1x TBE geladen. Das Gel enthielt zusätzlich Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) zur späteren Visualisierung der DNA-Banden. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde parallel ein Längenstandard (*DNA-Ladder*) mitgeführt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente bei konstanter Spannung von 30-120 V in einer mit 1x TBE befüllten Gelelektrophorese-Kammer aufgetrennt und mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei 590 nm visualisiert.



## 2.13 Histologische, immunhistologische und durchflusszytometrische Methoden

### 2.13.1 Einbettung von Geweben und Anfertigen von Gewebeschnitten

Die zu analysierenden Proben wurden für 48 h bei Raumtemperatur in 4 %igem PFA fixiert und anschließend bei 4 °C in 1x PBS aufbewahrt. Zur Einbettung in Paraffin wurde das Gewebe zunächst mit einem Gewebeeinbett- und Entwässerungsautomaten entwässert und dann per Hand in Paraffin eingegossen. Von diesen Paraffinblöcken wurden am Schlittenmikrotom ca. 3 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Superfrost-Objektträger aufgezogen und ÜN bei 37 °C getrocknet.

### 2.13.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von Paraffinschnitten

Zur Entparaffinierung wurden die Objektträger 2x 10 min in Xylol getaucht und anschließend in absteigender EtOH-Reihe (EtOH 99 %, 90 %, 85 % und 70 %, je 1 min) rehydriert und mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Die Präparate wurden nun 15 min in Hämalun inkubiert und danach in fließendem, warmem Leitungswasser gebläut. Im Anschluss wurden die Schnitte 20 s in 1 %iger Eosin-Lösung inkubiert, kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und in aufsteigender EtOH-Reihe dehydriert und in Xylol überführt. Die gefärbten Präparate wurden mit Deckglas und Pertex-Montagemedium versiegelt und für 15 min bei 55 °C gehärtet. Die gefärbten Schnitte wurden mit einem inversen Mikroskop auf ihre Auswertbarkeit hin untersucht (Axiovert 25, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) und ggf. fotografisch dokumentiert (Olympus BX60F5 und CellSens Dimension Software, Olympus Corporation, Tokyo, Japan; ColorView Soft Imaging System, Soft Imaging System GmbH, Münster).

### 2.13.3 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Für die immunhistologischen Färbungen wurden auf Objektträger aufgezogene Paraffinschnitte 2x 10 min in Xylol entparaffiniert, in absteigender EtOH-Reihe (EtOH 99 %, 90 %, 85 % und 70 %, je 1 min) rehydriert und dann mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Vorbehandlung zur Demaskierung der Oberflächenantigene erfolgte durch Kochen in

Citratpuffer (pH 6,0) für 1x 4 min und 4x 3 min in der Mikrowelle bei 600 W. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem ddH<sub>2</sub>O langsam abgekühlt und 10 min in TBST inkubiert. Nun wurde ein Barrieremarker aufgetragen, um eine spätere Färbung der Negativkontrolle durch primäre AK zu verhindern. Zur Inhibierung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate dann 20 min bei Raumtemperatur (RT) in 3 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, danach die Reaktion mit TBST abgestoppt und 10 min mit 0,2 % Casein geblockt. Die hiernach verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die primären Antikörper wurden in 1x TBS verdünnt und die Schnitte ÜN bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden sie mit TBST 3 Mal gespült, mit dem in 1x TBS verdünnten sekundären Antikörper für 1 h in der feuchten Kammer bei RT gefärbt und erneut mit 1x TBS gespült. Für mit Biotin-gelabelten Antikörpern behandelte Präparate erfolgte nun zusätzlich die Inkubation mit Streptavidin/HRP (Verdünnung 1:1000 in 1x TBS) und erneute Spülung mit TBST. Danach erfolgte für alle Präparate die Entwicklung mit AEC-Färbelösung für ca. 30 min bei RT erfolgte. Hierbei wurde die Färbereaktion lichtmikroskopisch (Inverses Mikroskop Axiovert 25, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) kontrolliert und durch Überführen in ddH<sub>2</sub>O abgestoppt. Nach kurzer Gegenfärbung mit Hämalaun zur farblichen Hervorhebung der Zellkerne wurden die Präparate 2x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen, unter warmem Leitungswasser gebläut und mit Glycergel-Montagemedium eingedeckt. Anschließend erfolgte die fotografische Dokumentation und ggf. die Auszählung der gefärbten Zellen am Mikroskop (Olympus BX60F5 und CellSens Dimension Software, Olympus Corporation, Tokyo Japan; ColorView Soft Imaging System, Soft Imaging System GmbH, Münster).

#### 2.13.4 Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten

Zum Färben mit Immunfluoreszenz-Antikörpern wurden die Paraffinschnitte 2x 10 min mit Xylol entparaffiniert, in absteigender EtOH-Reihe rehydriert und mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend erfolgte die Vorbehandlung durch Kochen in der Mikrowelle bei 600 W für 1x 4 min und 4x 3 min mit Citratpuffer (pH 6,0; für Färbungen mit anti-CD4 und anti-K15/anti-Ki67) bzw. mit TE-Puffer (pH 9,0; für Färbungen mit anti-CD4 und anti-CD29/anti-Sox2/anti-Sox9) und Abkühlen unter fließendem ddH<sub>2</sub>O. Danach wurden die

Schnitte mit PBST gewaschen und in 1x PBS mit 0,1 % Triton-X-100 für 5 min permeabilisiert. Nach Auftragen eines Barrieremarkers, um eine Färbung der Negativkontrolle zu verhindern, erfolgte das Blockieren unspezifischer Färbungen mit 0,2 % Casein in feuchter Kammer für 10 min bei RT. Die hiernach verwendeten AK und ihre Verdünnungen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die primären Antikörper wurden in ihrer jeweiligen Konzentration in 1x PBS verdünnt, ÜN bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und die Präparate am Folgetag 3 Mal in PBST gespült. Anschließend erfolgte die Färbung mit den in 1x PBS verdünnten fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern (Tabelle 3) für 1 h bei RT. Nach erneutem Spülen mit PBST wurden die Präparate mit DAPI Montagemedium eingedeckt und versiegelt. Die Färbungen wurden fotografisch dokumentiert (Olympus BX60F5 und CellSens Dimension Software, Olympus Corporation, Tokyo Japan; ColorView Soft Imaging System, Soft Imaging System GmbH, Münster).

### 2.13.5 Durchflusszytometrische Analysen

#### 2.13.5.1 Durchflusszytometrische Analysen muriner Zellen

Für durchflusszytometrische Analysen wurden wie im Kapitel 2.14.1/2.14.2 beschrieben murine Zellen isoliert, 7 min bei 200x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl Medium mit 1 % BSA (154CF/1 % BSA) und den entsprechenden Mengen der durchflusszytometrischen AK (Tabelle 4) resuspendiert und 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 ml 154CF/1 % BSA gewaschen und 7 min bei 200x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300-600 µl 154CF/1 % BSA resuspendiert und am BD-LSR-II-Durchflusszytometer mit der Software BD-FACSDiva analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software FlowJo 7.6.5, Tree Star Inc., Oregon, USA.

#### 2.13.5.2 Intrazelluläre BrdU-Antikörperfärbung

Zur Analyse von LRC wurden *in vivo* BrdU-markierte Keratinozyten (Kapitel 2.14.1) isoliert und zur Identifizierung der Zielzellen mit Antikörpern gegen CD4, Sca-1 und CD49f gefärbt (Kapitel 2.13.5.1). Anschließend wurden die Zellen mittels intrazellulärer BrdU-Antikörperfärbung nach Herstellerangaben gefärbt. Dazu wurden die Zellen 7 min bei 200x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100 µl BD-

Cytofix/Cytoperm™-Puffer resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis zur Fixierung und Permeabilisierung erfolgte das Waschen mit 1 ml BD-Perm/Wash-Puffer und zentrifugieren 7 min bei 200x g. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 100 µl BD-Cytoperm-Permabilization-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 1 ml BD-Perm/Wash-Puffer, Zentrifugation für 7 min bei 200x g und Verwerfen des Überstands. Zur Re-Fixierung wurde das Zellpellet in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 1 ml BD-Perm/Wash-Puffer, Zentrifugation für 7 min bei 200x g und Verwerfen des Überstands. Danach wurden die Keratinozyten in 100 µl DNase (300 µg/ml) resuspendiert und bei 37 °C für 60 min inkubiert. Nach Waschen mit 1x BD-Perm/Wash-Puffer, Zentrifugieren für 7 min bei 200x g und Verwerfen des Überstands wurden die Zellen zum Färben in 50 µl BD-Perm/Wash-Puffer mit 1 µl anti-BrdU-APC-AK für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Keratinozyten erneut mit 1x BD-Perm/Wash-Puffer gewaschen und für 7 min bei 200x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 µl 154CF/1 %-BSA resuspendiert und am BD-LSR-II-Durchflusszytometer mit der Software BD-FACSDiva analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software FlowJo 7.6.5, Tree Star Inc., Oregon, USA.

#### 2.13.5.3 Durchflusszytometrische Analysen humaner Keratinozyten

Für durchflusszytometrische Analysen und Zellsortierung von isolierten humanen Keratinozyten (Kapitel 2.14.3) wurden diese 4 min bei 200x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml HBSS-Medium mit Antibiotikum (1 % P/S, 0,1 % Amphotericin B) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit den entsprechenden Mengen der AK (Tabelle 4) auf Eis gefärbt. Das Zellpellet wurde alle 5 min vorsichtig aufgeschüttelt. Bei zusätzlicher intrazellulärer Färbung mit anti-hK15 wurden nach Färbung mit den restlichen AK die Zellen für 10 min bei 37 °C in 100 µl Puffer fixiert, dann 8 min bei 300x g zentrifugiert und das Zellpellet in 400 µl 1x BD-Perm/Wash-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation für 20 min im Dunkeln bei RT wurden die Zellen erneut für 8 min bei 300x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl 1x BD-Perm/Wash resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 8 min bei 300x g wurden die Zellen mit anti-hK15-AK (Verdünnung 1:300) und anti-mF1TC-AK

(Verdünnung 1:300, Tabelle 3) gefärbt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie mit 1 ml 1x BD-Perm/Wash gewaschen, 8 min bei 300x g zentrifugiert und in 400 µl 1x BD-Perm/Wash resuspendiert. Schließlich wurden alle gefärbten Keratinozyten am BD-LSR-II-Durchflusszytometer analysiert oder mittels eines FACS-Sortiergeräts Typ BD ARIA II sortiert.

## 2.14 Zellbiologische Methoden

### 2.14.1 Isolierung von Keratinozyten aus muriner Haut

Die Mäuse wurden schmerzfrei mittels zervikaler Dislokation in tiefer CO<sub>2</sub>-Narkose getötet. Falls nötig wurden die Tiere am Rücken mit einem Tierhaarschneider rasiert, die Rückenhaut mit 70 %igem EtOH desinfiziert und in einer Fläche von ca. 12 cm<sup>2</sup> präpariert. Anschließend wurde die Haut mit einem Skalpell in ca. 0,5 cm breite, 2 cm lange Streifen geteilt und in HBSS-Medium mit Antibiotika (1 % P/S, 0,1 % Amphotericin B) überführt. Nun wurde die Haut je Maus in 3 ml HBSS-Medium mit 1 mg Thermolysin bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Epidermis mit einem Skalpell abgekratzt und in eine Petrischale mit 10 ml HBSS-Medium mit Antibiotika (1 % P/S, 0,1 % Amphotericin B) überführt, 10 ml 154F/1 % BSA hinzugefügt und die Isolate für 20 min bei 100-150 rpm bei RT auf einem Magnetrührer gerührt. Die Keratinozyten wurden anschließend durch 70 µm Zellsiebe filtriert, für 7 min bei 200x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml 154CF/1 % BSA resuspendiert. Nun wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit den Antikörpern in Tabelle 4 (Kapitel 2.13.5.1, 2.13.5.2) gefärbt.

### 2.14.2 Isolierung von Thymus- und Milzzellen aus Mäusen

Nach der schmerzfreien Tötung durch zervikale Dislokation in tiefer CO<sub>2</sub>-Narkose wurden die Mäuse auf dem Präparationstisch fixiert und mit 70 %igem EtOH desinfiziert. Für die Entnahme der jeweiligen Organe wurde die Bauchdecke mit einer Präparationsschere bis in Höhe des Halses aufgeschnitten, Thymus und Milz entnommen und in 10 ml HBSS-Medium mit Antibiotika (1 % P/S, 0,1 % Amphotericin B) überführt. Zur Gewinnung der

Zellen wurde das jeweilige Organ mit dem Stempel einer 20 ml-Einwegspritze durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt, sodass die Zellen in das HBSS-Medium übergangen. Anschließend wurde die Zellsuspension in 15 ml-Reaktionsgefäße gefüllt, für 7 min bei 200x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension in 1x PBS wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend mit den in Tabelle 4 aufgeführten Antikörpern gefärbt (Kapitel 2.13.5.1).

### 2.14.3 Isolierung von Keratinozyten aus humaner Haut

Die humanen Keratinozyten entstammten frischen Hautproben aus Mammareduktionsplastiken (Kollaboration mit Frau Dr. med. Claudia Choi-Jacobshagen, Klinik für Plastische, Ästhetische und Rekonstruktive Chirurgie, Operatives Brustzentrum; Evangelisches Krankenhaus, Göttingen-Weende). Noch am Tag der Operation wurde die Haut mit einem Skalpell in ca. 0,5 x 0,5 cm große Stücke geschnitten und in HBSS-Medium mit Antibiotika (1 % P/S, 0,1 % Amphotericin B) überführt. Die Hautstücke wurden mit der epidermalen Seite nach oben in eine unbeschichtete Petrischale (Ø 100 mm) mit 5 ml Dispase-Lösung (10 % (v/v) Dispase; 1 % P/S, 0,1 % Amphotericin B in HBSS-Medium) überführt und ÜN bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnte die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis gelöst und in eine Petrischale mit HBSS-Medium mit Antibiotikum (1 % P/S, 0,1 % Amphotericin B) überführt werden. Die Epidermisstücke wurden mit einem Skalpell in ca. 1 mm<sup>2</sup> große Stücke zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß (50 ml) mit 20 ml vorgewärmten HBSS-Medium mit Antibiotikum (1 % P/S, 0,1 % Amphotericin B) und 0,25 mg/ml Thermolysin überführt. Die Zellsuspension wurde für 45 min bei 37 °C inkubiert und dabei alle 10 min vorsichtig durchmischt. Die Thermolysin-Reaktion wurde durch Zugabe von 20 ml HBSS-Medium mit 10 % FCS in einer Petrischale (Ø 100 mm) abgestoppt und 20 min mit dem Magnetrührer bei 150 rpm und RT durchmischt. Anschließend wurde die Zellsuspension durch 70 µm-Zellsiebe filtriert und 5 min bei 200x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 5 ml HBSS-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und für durchflusszytometrische Analysen verwendet (Kapitel 2.13.5.3). Das beschriebene Verfahren wurde modifiziert nach Aasen und Izpisúa Belmonte (2010).

#### 2.14.4 Kultivierung humaner Epidermis

Um die Proliferationseigenschaften humaner Epidermis *in vitro* zu analysieren, wurde Epidermis von frischer humaner Haut nach Mammareduktionsplastik isoliert und in verschiedenen Kulturmedien *ex vivo* kultiviert (*epidermal sheets*). Hierfür wurde die Epidermis wie unter 2.14.3 beschrieben mittels Dispase-Behandlung isoliert. Anschließend wurden die Epidermisproben von ca. 0,5 x 0,5 cm Größe in eine Petrischale (Ø 100 mm) mit 154CF-Kulturmedium mit Antibiotika (1 % P/S, 0,1 % Amphotericin B) und 2 % chelexed FCS gelegt und 20 min inkubiert. Danach wurden mit Hilfe von zwei Pinzetten immer zwei Epidermisproben auf einen sterilen Milliporefilter gezogen und dieser dann in ein *well* einer 24-*well*-Zellkulturplatte gelegt, sodass der Filter auf der Oberfläche des jeweiligen Mediums schwamm. Die *wells* enthielten jeweils 1 ml eines der Zellkulturmedien 154CF, Promocell und EpiLife, versetzt mit Antibiotika (1 % P/S, 0,1 % Amphotericin B) und den jeweiligen Zusätzen zum Zellwachstum nach Herstellerangaben. Außerdem waren die Medien angereichert mit entweder 50 ng/ml TPA, 100 ng/ml TPA, 10 µm ATRA oder dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei konstanten 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach 24, 48, 72, 96 und 144 h wurden aus jeder Kombination von Medium und Zusatz jeweils zwei Epidermisproben entnommen, über zwei Tage bei RT in 4 % PFA fixiert und in Paraffin eingebettet (Kapitel 2.13.1). Anschließend wurden histologische Schnitte angefertigt und auf Wachstumsmarker hin untersucht.

### 2.15 Tierexperimentelle Methoden

#### 2.15.1 Zucht und Haltung von *Mus musculus*

Die verwendeten Mauslinien (Tabelle 1) wurden im Tierstall des Instituts für Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen (Gentechnischer Arbeitsbereich S1) gezüchtet. Die Tiere wurden einzeln oder maximal zu viert in Käfigen unter pathogenfreien Bedingungen (*individually ventilated cages, IVC*) bei einem zwölfstündigen Hell-/Dunkel-Zyklus (Lichtperiode von 6:00 Uhr bis 18:00 Uhr), einer relativen Luftfeuchte von 50±10 % und einer RT von 20±2 °C gehalten. Den Mäusen

wurde Leitungswasser und eine pelletierte Zuchtdiät (Alleinfutter für Mäuse-Zucht, Ssniff Spezialdiäten, GmbH, Soest) *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

Die Tiere wurden zur Identifizierung im Alter von 4 Wochen vom tierstalleigenen Personal nummeriert (Ohrlochmarkierungen) und über gleichzeitig durchgeführte Schwanzbiopsien (ca. 0,2 cm der Schwanzspitze) genotypisiert (Kapitel 2.15.2).

### 2.15.2 Genotypisierung

Die Mäuse wurden mittels PCR (Kapitel 2.12.3) von isolierter genomischer DNA aus Schwanzbiopsien (Kapitel 2.12.1) genotypisiert. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 5 aufgeführt.

### 2.15.3 *In-vivo*-BrdU-Markierung muriner Zellen

Zur *In-vivo*-BrdU-Markierung wurden 10 Tage alte Mäuse intraperitoneal mit 50 mg BrdU/kg Körpergewicht in 1x PBS (Roche Diagnostics) gespritzt. Dazu wurden die Mäuse gewogen, anschließend im Genick und am Rücken fixiert und die BrdU-Lösung mit Hilfe einer Insulin-Einmalspritze intraperitoneal injiziert. Die Behandlung wurde vier Mal im Abstand von jeweils 12 h durchgeführt. Nach 20, 50 und 70 Tagen wurden die Keratinozyten aus der Rückenhaut isoliert, mit AK gefärbt (Kapitel 2.13.5.1, 2.13.5.2) und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Zusätzlich wurden Hautproben für immunhistologische Untersuchungen asserviert (Kapitel 2.13.1).

### 2.15.4 Topische Tamoxifen- bzw. ATRA-Behandlung von Mäusen

Zur Behandlung der Rückenhaut mit Tamoxifen oder ATRA wurden die Mäuse mit Hilfe einer Isofluran-Begasungsanlage narkotisiert. Die Narkose wurde mit einem 4 %igen Isoflurananteil und einer O<sub>2</sub>-Anflutungsgeschwindigkeit von 2 l/min eingeleitet. Nach Überprüfen der ausreichenden Tiefe der Narkose über ausbleibenden Zwischenzehreflex wurde die Narkose mit einem 2 %igen Isoflurananteil und einer O<sub>2</sub>-Anflutungsgeschwindigkeit von ca. 1,4 l/min erhalten. Dies geschah unter Beachtung einer gleichmäßigen Atmung des jeweiligen Tieres. Anschließend wurde die



Rückenbehaarung auf einer ca. 12 cm<sup>2</sup> großen Fläche mit dem Tierhaarschneider rasiert. Für die Behandlung mit in DMSO gelöstem Tamoxifen wurden je nach Behandlungsdosis 10 µg Tamoxifen in 602 µl DMSO (Behandlung mit 166 µg/cm<sup>2</sup>), 15 µg in 500 µl DMSO (Behandlung mit 300 µg/cm<sup>2</sup>) oder 30 µg Tamoxifen in 600 µl DMSO (Behandlung mit 500 µg/cm<sup>2</sup>) gelöst. Anschließend wurde die Lösung in Dosen von 10 µl auf 1 cm<sup>2</sup> Haut aufgebracht und mit der Pipettenspitze verteilt. Kontrollmäusen wurde analog nur DMSO appliziert. Dies wurde wiederholt, bis das gesamte rasierte Hautareal behandelt war. Nach einer Einwirkzeit von 10 min wurde die verbleibende Lösung mit Seife und warmem Wasser abgespült und die Maus anschließend vorsichtig mit Papierhandtüchern getrocknet. Danach wurde das Tier aus der Narkose erweckt und bei Wiedererlangen des Bewusstseins zurück in den Käfig überführt und mit Papierhandtüchern abgedeckt. Die Behandlung wurde nach 12 h wiederholt. Die so behandelten Tiere wurden 5 oder 25 Tage nach Behandlung abgetötet, die Keratinozyten der behandelten Rückenhaut isoliert und durchflusszytometrisch untersucht (Kapitel 2.13.5.1, 2.14.1).

Für die Behandlung mit ATRA wurden die Mäuse nach Einleiten der Narkose mit 0,5 mM ATRA/100 µl Aceton behandelt. Hierbei wurden 10 µl 0,5 mM ATRA auf je ein Hautareal von 1 cm<sup>2</sup> aufgetragen. Kontrollmäusen wurde analog nur Aceton als Lösungsmittel appliziert. Nach 3 min, nach Verdunstung des Lösungsmittels, wurde die Maus aus der Narkose erweckt und zurück in den Käfig überführt. Die Behandlung wurde vier Mal im Abstand von jeweils 24 h durchgeführt. Die so behandelten Tiere wurden 7 oder 14 Tage nach Behandlung abgetötet und Hautproben für immunhistologische und durchflusszytometrische Untersuchungen asserviert (Kapitel 2.13.1).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung muriner CD4-exprimierender Zellen

#### 3.1.1 Nachweis von CD4-exprimierenden Keratinozyten in immundefizienten Mäusen

Wie von Uhmann et al. (2014) gezeigt, existieren in der murinen Epidermis CD4-exprimierende Zellen (CD4<sup>+</sup>), die den Keratinozytenmarker CD49f, den Wulststammzellmarker CD34 sowie Sca-1 exprimieren. Darüber hinaus wurde über Knochenmarkstransplantationsexperimente bereits gezeigt, dass es sich bei CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um Zellen hämatopoetischen Ursprungs, sondern um eine eigene stammzellähnliche Population der Epidermis handelt (Uhmann et al. 2014). Wäre dies zutreffend, so sollten CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen auch in der Epidermis von immundefizienten Mäusen nachweisbar sein. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Keratinozyten und Thymozyten von jeweils zwei ca. sechs Monate alten Tieren der folgenden immundefizienten Mauslinien untersucht:

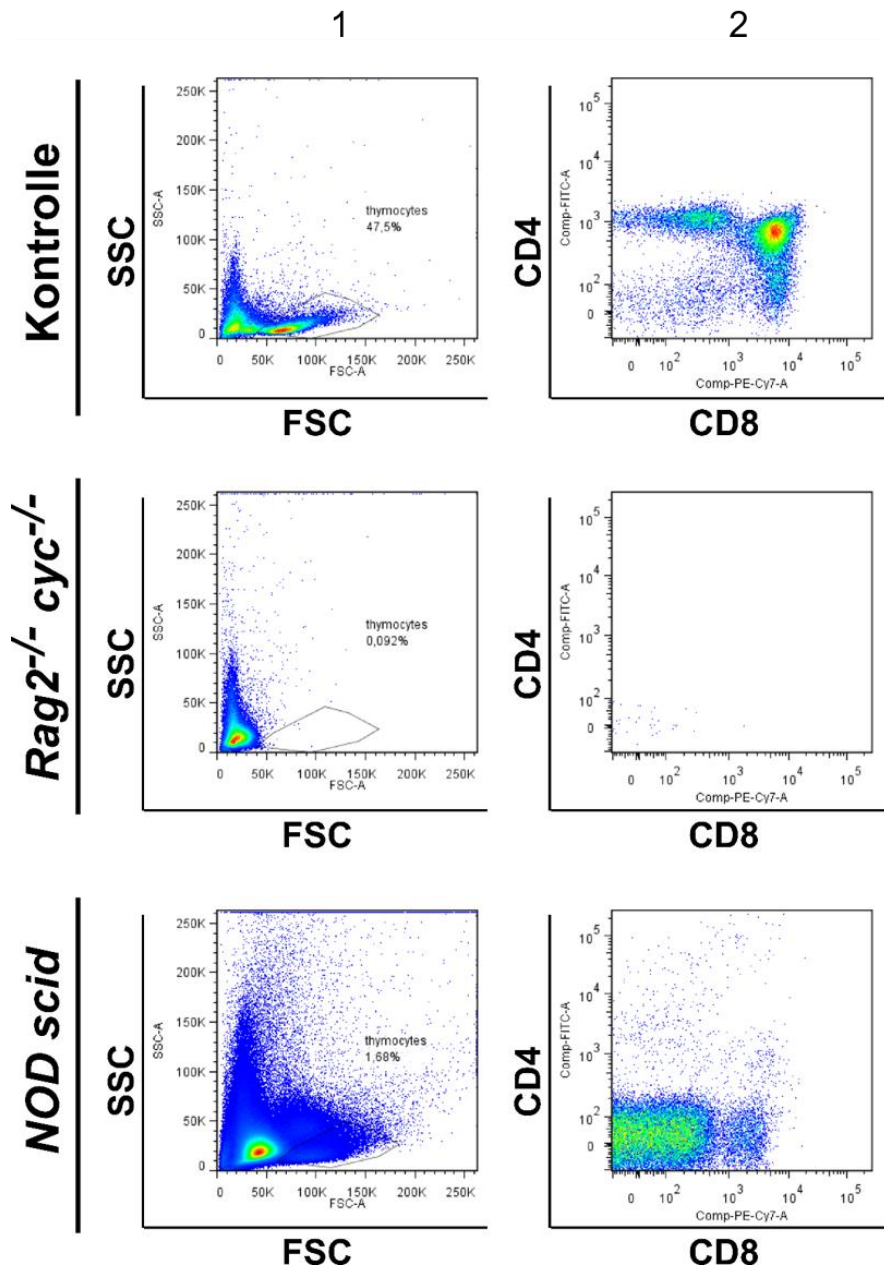
1. *NOD-SCID*-Mäuse (Defizienz aller funktionellen T- und B-Lymphozyten (Bosma und Carroll 1991), stark reduzierte NK-Zell-Aktivität (Shultz et al. 1995) sowie Makrophagen-Defekte (Serreze et al. 1993; Shultz et al. 1995)), 2. *Rag2*<sup>-/-</sup>-*γc*<sup>-/-</sup>-Mäuse (unreife T- und B-Lymphozyten (Mombaerts et al. 1992; Oettinger et al. 1990), keine DZ (Edelbaum et al. 1995), ILC (Halim et al. 2012) oder NK-Zellen (Bando und Colonna 2016)) und nur wenige Langerhanszellen (LH) (Shreedhar et al. 1999), s. Kapitel 1.2.3).

Die isolierten Keratinozyten und Thymozyten wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD49f, Sca-1 und CD8 bzw. CD4 und CD8 gefärbt. Als Kontrolle wurden immunkompetente *CB17* Mäuse verwendet, von welchen ebenfalls die Keratinozyten und Thymuszellen isoliert und wie oben angegeben gefärbt wurden. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch untersucht.

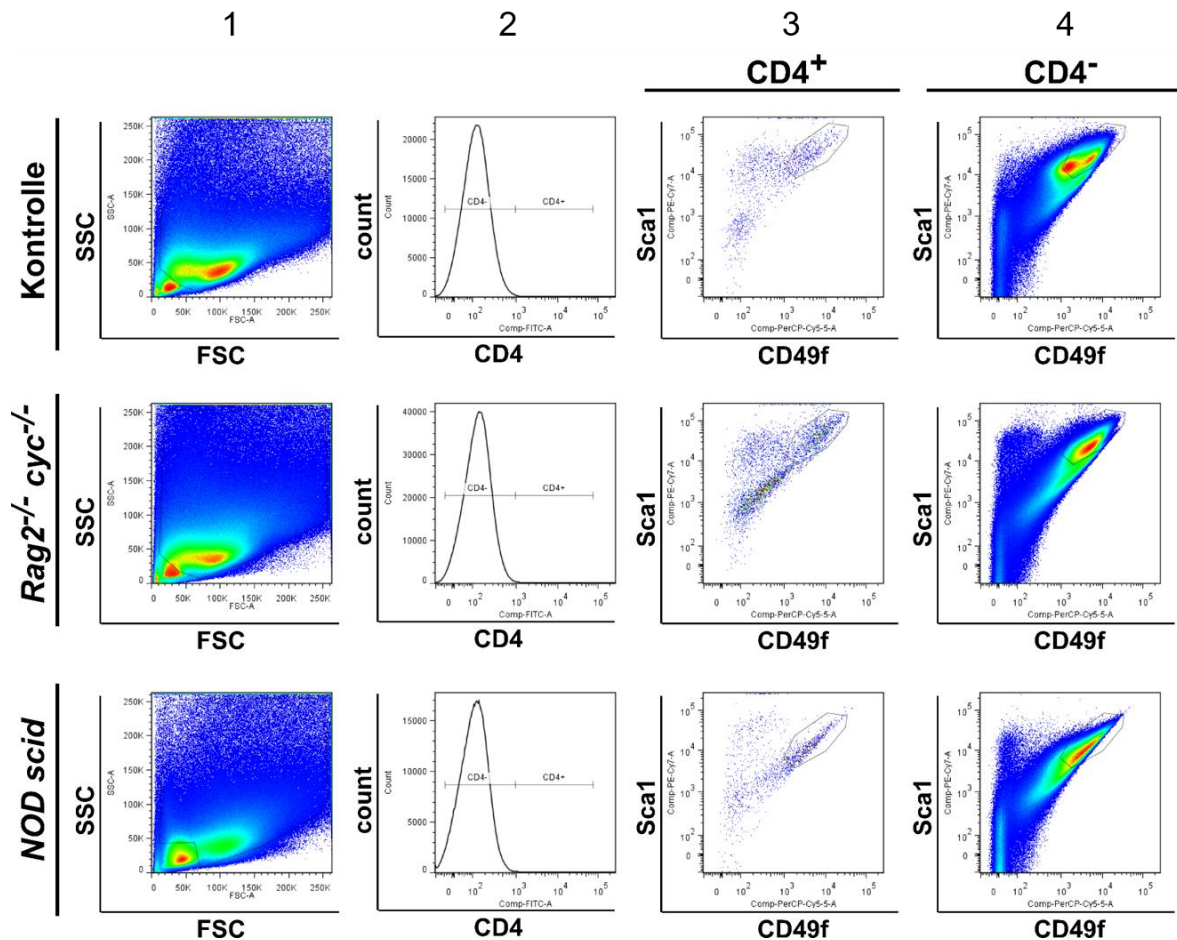
Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten zeigte, dass Thymi von *CB17*-Kontrollmäusen wie erwartet CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen sowie CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Thymozyten, die im typischen Thymozyten *forward scatter/side scatter* (FSC/SSC)-Gate lagen, besitzen, während in *Rag2*<sup>-/-</sup>-*γc*<sup>-/-</sup>-Thymi keine T-Zellen nachweisbar waren (Abb. 3). Im Gegensatz

zu *Rag2*<sup>-/-</sup>-*γc*<sup>-/-</sup>-Thymi wurden jedoch in *NOD-SCID*-Thymi Zellen im typischen Thymozyten-FSC/SSC-Gate detektiert. Diese Zellen exprimierten kein CD4, jedoch CD8 (Abb. 3). Dieses Phänomen kann mit der Entwicklung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen erklärt werden, da T-Zellen bereits in unreifen Differenzierungsstadien CD8 exprimieren, während CD4 unterdrückt wird (Bosselut 2004). Somit kann die Existenz von funktionellen T-Zellen auch in *NOD-SCID*-Mäusen ausgeschlossen werden.

Die anschließende durchflusszytometrische Untersuchung der Keratinozyten ergab, dass ähnlich wie Wildtyp-Kontrollmäuse auch *NOD-SCID*- und *Rag2*<sup>-/-</sup>-*γc*<sup>-/-</sup>-Mäuse CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermale Zellen aufweisen (Abb. 4). Der Nachweis dieser Zellen in *NOD-SCID* und *Rag2*<sup>-/-</sup>-*γc*<sup>-/-</sup>-Mäusen lässt daher schlussfolgern, dass CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Zellen der murinen Haut weder T-Zellen, ILC noch NK-Zellen darstellen, sondern am ehesten epidermalen Ursprungs sind.



**Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analyse von  $Rag2^{-/-}\gamma C^{-/-}$  und NOD-SCID-Thymi.** Analyse von anti-CD4-FITC und anti-CD8-PE-Cy7 gefärbten Thymuszellen von *CB17* (Wildtyp-Kontrolle),  $Rag2^{-/-}\gamma C^{-/-}$  und *NOD-SCID*-Mäusen. Spalte 1: *forward scatter/side scatter* (FSC/SSC) mit *gating* der Lymphozyten. Spalte 2: CD8/CD4-Plot der Lymphozyten. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten am BD-LSR-II mit der Software BD-FacsDiva™ (BD BioScience, Heidelberg), die Auswertung mit der Software FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR, USA).



**Abbildung 4: Durchflusszytometrische Analyse von *Rag2<sup>-/-</sup> γc<sup>-/-</sup>* und *NOD-SCID*-Keratinocyten.** Analyse von anti-CD4-FITC, anti-CD49f-PE-Cy5 und anti-Sca1/Biotin-PE-Cy7 gefärbten Keratinocyten der Rückenhaut von *CB17* (Wildtyp-Kontrolle), *Rag2<sup>-/-</sup> γc<sup>-/-</sup>* und *NOD-SCID*-Mäusen. Spalte 1: FSC/SSC mit *gating* der Keratinocyten. Spalte 2: CD4-Plot und *gating* nach CD4<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>. Spalte 3: CD49f/Sca-1-Plot der CD4<sup>+</sup> Keratinocyten mit Markierung der CD4<sup>+</sup> CD49f<sup>high</sup> Sca<sup>+</sup> Zellen. Spalte 4: CD49f/Sca-1-Plot der CD4<sup>-</sup> Keratinocyten. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten am BD-LSR-II mit der Software BD-FacsDiva™ (BD BioScience, Heidelberg), die Auswertung mit der Software FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR, USA).

### 3.1.2 Etablierung von *lineage tracing*-Mausmodellen zum Nachweis von CD4<sup>+</sup>-Keratinocyten und deren Tochterzellen

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Aktivierung des Hh Signalweges in CD4<sup>+</sup>-Zellen und anschließende chemische Karzinogenese mit DMBA/TPA zur Entwicklung von BCC führen kann. Da die Ursprungszellen dieser BCC mit höchster Wahrscheinlichkeit

epidermalen Ursprungs sind sowie epidermale Stammzellmarker exprimieren (siehe oben, Uhmann et al. 2014), kann vermutet werden, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen einen stammzellartigen Charakter aufweisen und zur physiologischen Homöostase der Haut beitragen. Unter dieser Annahme sollte es möglich sein, ein klonales Wachstum von Tochterzellen der CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen nachzuweisen (*lineage tracing*). Um dies zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei *lineage-tracing*-Mausmodelle etabliert, die es ermöglichen sollten, Tochterzellen der CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen durch Expression des Fluoreszenzproteins tdTomato zu visualisieren (siehe Einleitung). Zum einen wurden *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäuse, in denen alle von CD4-exprimierenden Zellen abstammenden Zellen tdTomato exprimieren, und zum anderen Tamoxifen-induzierbare *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäuse, in denen nur die Tochterzellen der zum Zeitpunkt der Tamoxifengabe CD4-exprimierenden Zellen tdTomato exprimieren, generiert (siehe Einleitung sowie Material und Methoden, Kapitel 2.9.1).

Da CD4 ein typisches Oberflächenprotein von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist, sollten in lymphatischen Organen von *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäusen tdTomato<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-Zellen nachweisbar sein. Daher wurden neben Keratinozyten auch Thymus- und Milzzellen von *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäusen isoliert und mit Antikörpern gegen CD4, CD49f und Sca-1 bzw. CD4 und CD8 bzw. CD4 und B220 gefärbt.

Tatsächlich bestätigte die durchflusszytometrische Analyse von *R26-tdtomato-CD4Cre*-Thymi die Expression von tdTomato<sup>+</sup> in allen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Abb. 5A, Histogramm, rote Linie). Daneben exprimiert aber auch ein großer Teil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen tdTomato (Abb. 5 A, Histogramm, rote gestrichelte Linie). Diese Beobachtung ist auf die Entwicklung der T-Zellen im Thymus und der damit verbundenen kurzzeitigen CD4-Expression aller Thymozyten zurückzuführen. So exprimieren frühe T-Zellvorläufer weder CD4 noch CD8 (doppelt negativ). Während ihrer weiteren Reifung beginnen jedoch alle T-Zellen sowohl CD4 als auch CD8 (doppelt positiv) zu exprimieren (Abb. 5 A; CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) und differenzieren anschließend zu CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> einzeln positiven T-Zellen aus (Schmitt und Zúñiga-Pflücker 2002). Demzufolge exprimierten auch reife CD8<sup>+</sup>-T-Zellen während ihrer Differenzierung kurzzeitig CD4 und weisen daher zu einem gewissen Prozentsatz auch eine tdTomato-Expression auf. Im Gegensatz dazu wurde bei den unreifen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Thymozyten nur eine sehr geringe bis keine tdTomato-Expression

nachgewiesen (Abb. 5 A, schwarze Linie). Dies weist darauf hin, dass der Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination am *R26-tdTomato*-Lokus mittels der Expression von tdTomato zeitlich verzögert zur frühen CD4-Expression erfolgt. Darüber hinaus zeigen diese Daten, dass alle reifen CD4<sup>+</sup>- und ca. 60 % aller reifen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Thymus von *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäusen tdTomato exprimieren.

Die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten aus der Milz von *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäusen bestätigten diese Schlussfolgerungen. So exprimieren nahezu alle CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der Milz tdTomato (Abb. 5 B, rote Linie). Dagegen zeigten B220<sup>+</sup>-B-Zellen, die weder während ihrer Entwicklung noch im reifen Stadium CD4 exprimieren, keine tdTomato-Expression (Abb. 5 B, schwarze Linie). Daneben wurden in der Milz von *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäusen CD4-negative (CD4<sup>-</sup>), B220<sup>-</sup>-Zellen nachgewiesen, von denen ca. 60 % tdTomato exprimieren (Abb. 5 B, rote gestrichelte Linie). Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei diesen Zellen um CD8<sup>+</sup>-T-Zellen.

Zusammengefasst wurde anhand dieser Analysen nachgewiesen, dass das *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mausmodell für *lineage-tracing*-Experimente zur Verfolgung von Tochterzellen von CD4-exprimierenden Zellen sehr gut geeignet ist und mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit auch zum Nachweis des potentiell klonalen Wachstums von Tochterzellen von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen verwendet werden kann. Daher wurden im Anschluss Keratinozyten von bis zu drei Monate alten *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäusen isoliert und auf die Expression von tdTomato, CD4, CD49f und Sca-1 hin durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 5 C zeigt, dass ca. 1,1 % tdTomato<sup>+</sup>-CD49f<sup>low</sup>- und ca. 0,16 % tdTomato<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Zellen in den Keratinozytenisolaten nachgewiesen werden konnten. Diese beiden Populationen unterschieden sich nicht nur in der Stärke ihrer CD49f-Expression, sondern wiesen auch unterschiedlich starke Sca-1-Expressionsniveaus auf. Während tdTomato<sup>+</sup>-CD49f<sup>low</sup>-Zellen mäßig bis wenig Sca-1 exprimierten (Abb. 5 C, graue Zellpopulation), zeigten tdTomato<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Zellen eine sehr starke Sca-1-Expression (Abb. 5 C, rote Zellpopulation). Die starke Expression des Keratinozytenmarkers CD49f sowie von Sca-1 wiesen darauf hin, dass es sich bei der tdTomato<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>high</sup>-Population um die Nachkommenschaft von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen handelt. Tatsächlich konnte eine Zellpopulation mit ähnlichem Expressionsprofil und wie bei Uhmann et al. (2014) bereits beschrieben über ein CD4-

*gating* nachgewiesen werden (Abb. 5 C). Dabei ist zu beachten, dass durch das *gating* CD4-exprimierender Zellen sowohl CD4<sup>+</sup>-Immunzellen mit geringer CD49f-Expression als auch CD4<sup>+</sup>-Keratinocyten mit starker CD49f- und Sca-1-Expression geplottet werden (Abb. 5 C).

Diese Daten zeigten, dass das *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mausmodell für *lineage-tracing* Experimente zur Analyse der Nachkommenschaft von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen verwendet werden kann, da eine Abgrenzung von Immunzellen sehr gut möglich ist.



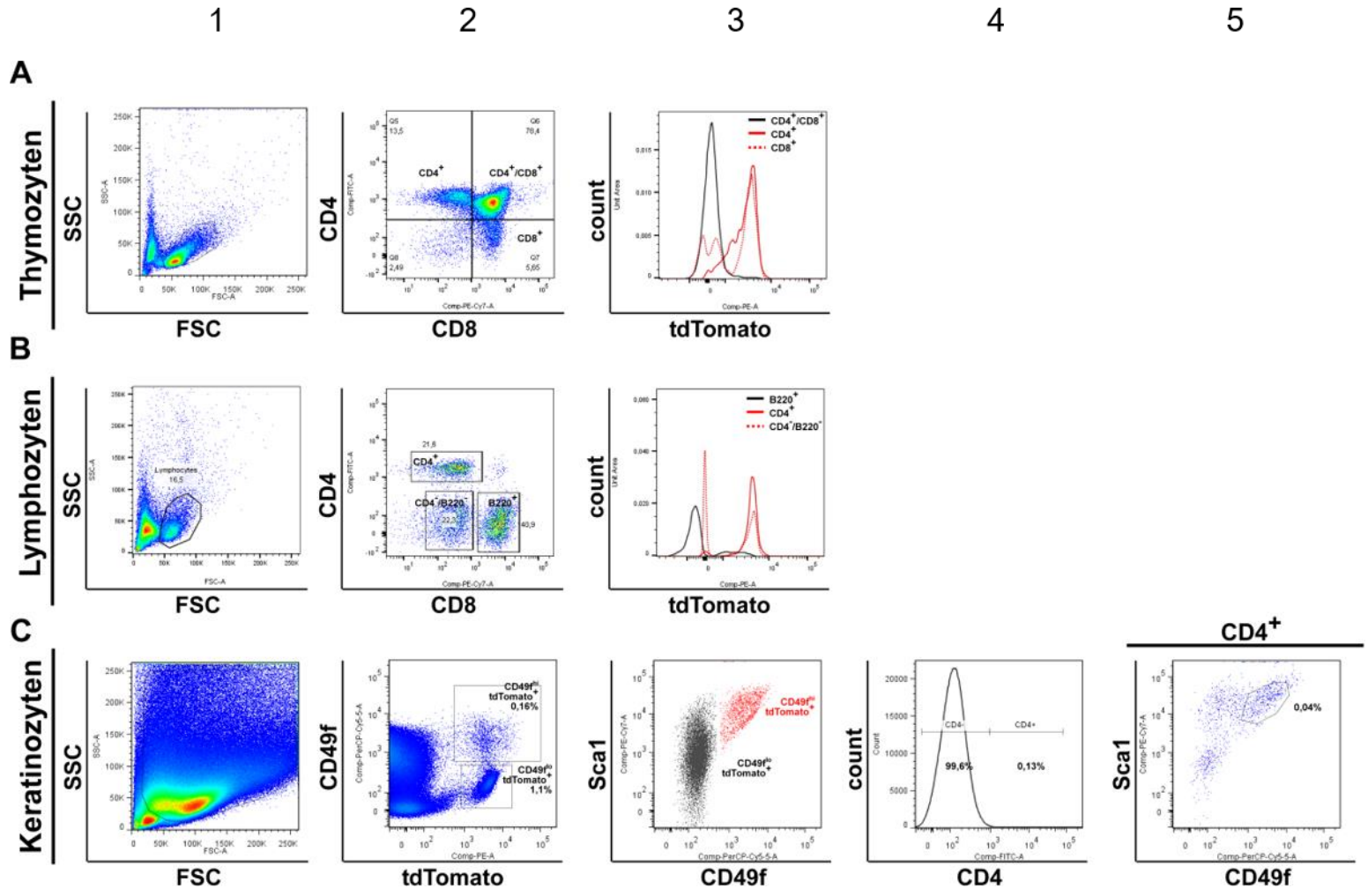
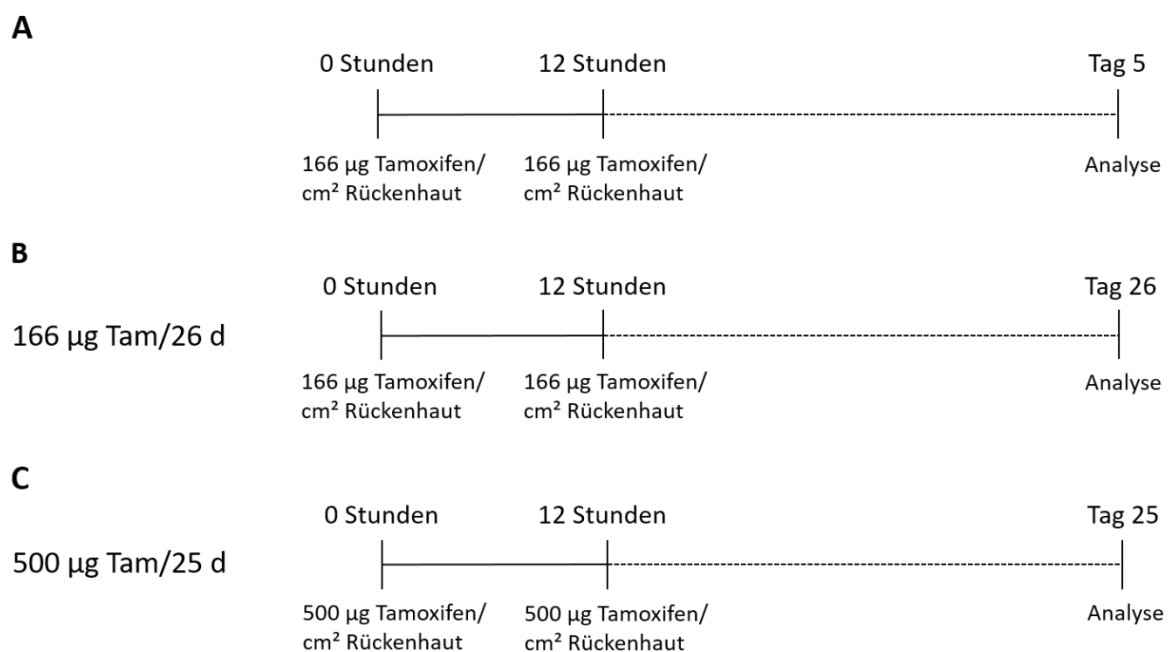


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse von *R26-tdtomato-CD4Cre*-Thymuszellen, -Milzzellen und -Keratinozyten.

**Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse von *R26-tdtomato-CD4Cre*-Thymuszellen, -Milzzellen und -Keratinozyten.** Analyse von anti-CD4-FITC und anti-CD8-PE-Cy7 gefärbten Thymozyten (**A**), anti-CD4-FITC und anti-B220-PE-Cy7 gefärbten Milzzellen (**B**) sowie von anti-CD4-FITC, anti-CD49f-PE-Cy5 und anti-Sca1/Biotin-PE-Cy7 gefärbten Keratinozyten der Rückenhaut von *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäusen (**C**). Das rotfluoreszierende tdtomato-Protein wurde im PE-Kanal detektiert. **A:** Analyse der Thymozyten. Spalte 1: FSC/SSC mit *gating* der T-Zellen. Spalte 2: CD8/CD4-Plot der T-Zellen. Spalte 3: Overlay-Histogramm der tdTomato-Expression von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup> (schwarz), CD4<sup>-</sup> (rot, durchgezogen) und CD8<sup>-</sup>(rot, gestrichelt) T-Zellen. **B:** Analyse der Milzzellen. Spalte 1: FSC/SSC mit Lymphozyten *gate*. Spalte 2: CD8/CD4-Plot der Lymphozyten und *gating* der Populationen nach CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup> B220<sup>-</sup> und B220<sup>+</sup>. Spalte 3: Overlay-Histogramm der tdTomato-Expression von B220<sup>+</sup> (schwarz), CD4<sup>-</sup> (rot, durchgezogen) und CD4<sup>-</sup>/B220<sup>-</sup>(rot, gestrichelt) Lymphozyten. **C:** Analyse der Keratinozyten. Spalte 1: FSC/SSC. Spalte 2: tdTomato/CD49f-Plot mit *gating* von CD49f<sup>high</sup>-tdTomato<sup>-</sup> sowie CD49f<sup>low</sup>-tdTomato<sup>+</sup>-Keratinozyten. Spalte 3: CD49f/Sca-1-Plot der CD49f<sup>high</sup>-tdTomato<sup>-</sup> sowie CD49f<sup>low</sup>-tdTomato<sup>+</sup>-Populationen. Spalte 4: CD4-Histogramm mit *gating* nach CD4<sup>+</sup> und CD4<sup>-</sup>. Spalte 5: CD49f/Sca-1-Plot der CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten mit Markierung der CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>high</sup>-Zellen. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten am BD-LSR-II mit der Software BD-FacsDiva™ (BD BioScience, Heidelberg), die Auswertung mit der Software FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR, USA).

Da in *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäusen stetig neue tdTomato<sup>+</sup>-Zellen entstehen, wurde parallel ein Tamoxifen-induzierbares *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mausmodell generiert. Dieses Modell ermöglicht es, den Zeitpunkt der tdTomato-Markierung zu bestimmen und so einzelne tdTomato<sup>+</sup>-Klone, deren Entstehungszeitpunkt definiert ist, zu untersuchen. Um solche Experimente durchführen zu können musste jedoch initial eruiert werden, welche Tamoxifendosierung bzw. welche Behandlungsdauer zu einer nachweisbaren tdTomato-Expression führt. Außerdem war von Interesse, ob durch eine topische Tamoxifenbehandlung die Aktivierung der CreERT2-Rekombinase im Thymus und in systemischen Immunzellen vermieden werden könnte. Dazu wurde die Rückenhaut von maximal sechs Monate alten *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen rasiert und zweimalig im Abstand von zwölf Stunden 166 µg, 300 µg (Höchstdosierung für Thymozytenanalyse) bzw. 500 µg Tamoxifen (Höchstdosierung für Keratinozytenanalyse) pro cm<sup>2</sup> Rückenhaut

topisch appliziert (Abb. 6). Als Kontrolle dienten mit Tamoxifen behandelte *R26-tdtomato*-Mäuse ohne Cre-Rekombinase, im gleichen Behandlungsschema mit Lösungsmittel (DMSO) behandelte *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäuse sowie unbehandelte *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäuse. Die Mäuse wurden fünf oder 25 Tage nach der ersten Behandlung abgetötet, die Keratinozyten sowie die Thymuszellen isoliert und mit Antikörpern gegen CD4, CD49f, Sca-1 bzw. CD4 und CD8 gefärbt.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs topischer Tamoxifen-Behandlung von *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen.** Maximal sechs Monate alten *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen wurde im Abstand von zwölf Stunden zwei Mal wie folgt Tamoxifen topisch appliziert: **A:** 166 µg Tamoxifen/cm<sup>2</sup> Rückenhaut, Analyse fünf Tage nach der ersten Behandlung. **B:** 166 µg Tamoxifen/cm<sup>2</sup> Rückenhaut, Analyse 26 Tage nach der ersten Behandlung (Bezeichnung in dieser Arbeit als 166 µg Tam/26 d). **C:** 500 µg Tamoxifen/cm<sup>2</sup> Rückenhaut, Analyse 25 Tage nach der ersten Behandlung (Bezeichnung in dieser Arbeit als 500 µg Tam/25 d).

Mittels der topischen Behandlung von *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen mit 2x 166 µg Tamoxifen pro cm<sup>2</sup> Haut konnten fünf Tage nach der ersten Tamoxifengabe (Abb. 6 A) keine tdTomato<sup>+</sup>-Keratinocyten oder -Thymocyten nachgewiesen werden (Daten nicht

gezeigt). Da möglicherweise der Zeitraum zwischen Tamoxifenapplikation und Analyse zu kurz gewählt war, wurde Tamoxifen im gleichen Behandlungsschema auf die Rückenhaut von *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen appliziert. Die Analyse erfolgte jedoch 26 Tage nach der ersten Tamoxifenapplikation (Abb. 6 B). Diese Proben werden nachfolgend als 166 µg Tam/26 d bezeichnet. Die durchflusszytometrische Analyse der Thymi von 166 µg Tam/26 d behandelten *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen zeigte, dass durch topische Applikation von 166 µg Tamoxifen weder nach fünf (Daten nicht gezeigt) noch nach 26 Tagen Thymozyten tdTomato<sup>+</sup> exprimieren (Abbildung 7 C, obere Reihe). Da die Transitzeit von T-Zellen im Thymus ca. zwei Wochen beträgt (Petrie und Zuniga-Pflucker 2007) weisen diese Daten darauf hin, dass mittels der gewählten Applikationsart und der Dosierung keine Cre-vermittelte Rekombination am *R26-tdTomato*-Lokus in Thymozyten induziert wird.

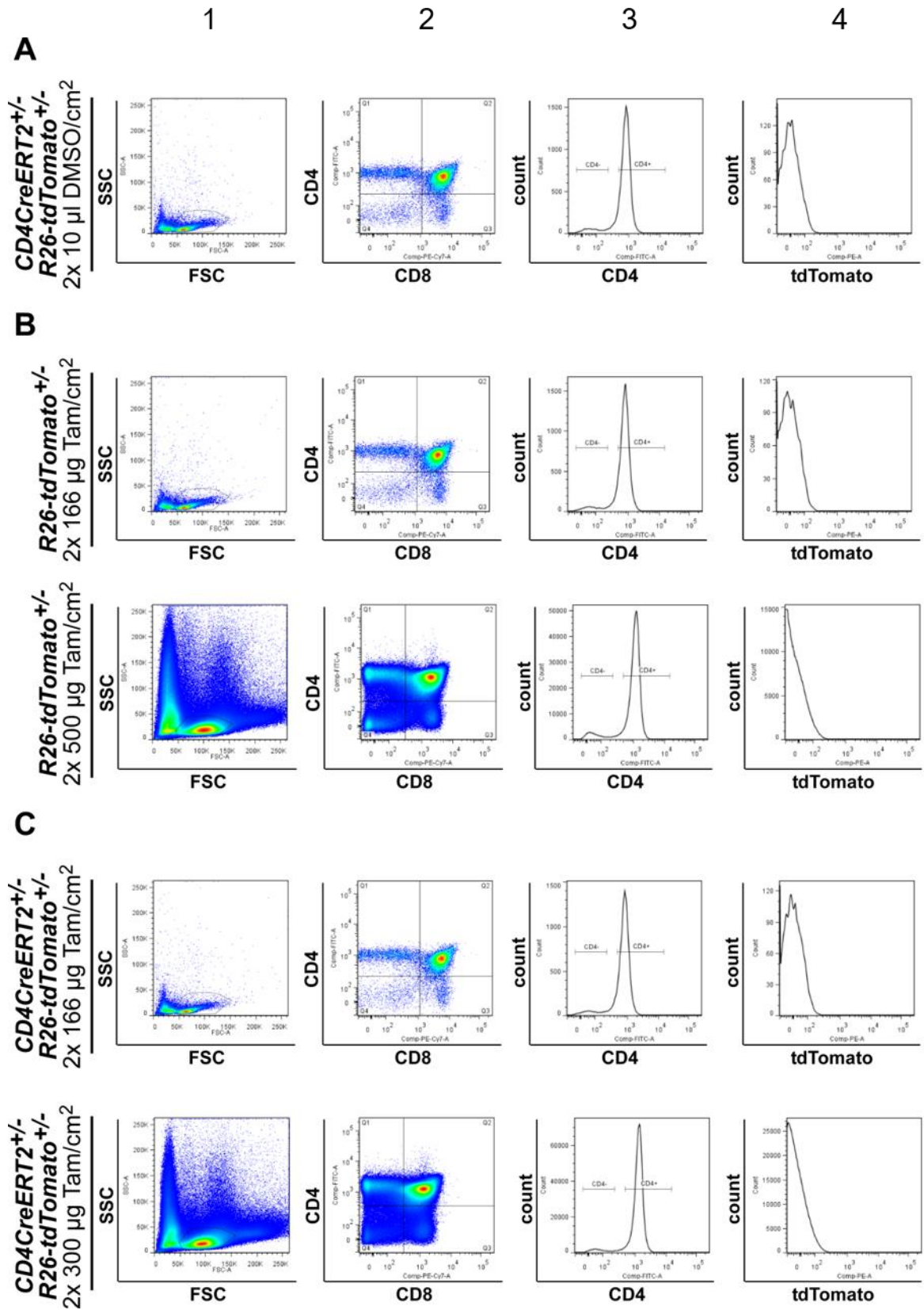
Im Gegensatz dazu wurden in den 166 µg Tam/26 d Keratinozytenisolaten von *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen (Abb. 8 C, obere Reihe) im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 8 A, B) ein erhöhter Anteil tdTomato<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen. So stieg der Anteil an tdTomato<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Zellen von 0,004-0,005 % in den Kontrollen (Abb. 8 A, B) auf 0,01 % in den 166 µg Tam/26 d *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen an (Abb. 8 C, obere Reihe). Der Anteil tdTomato<sup>+</sup>-CD49<sup>low</sup>-Zellen stieg von 0,005-0,01 % (Abb. 8 A, B) auf 0,03 % (Abb. 8 C, obere Reihe) an. Ähnlich der Analyse der *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäuse (siehe Abb. 7 C) sind die epidermalen tdTomato<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Zellen durch eine hohe Sca-1-Expression charakterisiert, wohingegen tdTomato<sup>+</sup>-CD49<sup>low</sup>-Zellen nur eine mittlere bis geringe Sca-1-Expression aufweisen (Abb. 8 C, zweite Reihe).

Da diese Daten vermuten ließen, dass eine topische Applikation von Tamoxifen tatsächlich zu einer Aktivierung der CreERT2-Rekombinase in der Haut führen könne, wurden anschließend *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäuse mit einer erhöhten Dosis Tamoxifen (2x 500 µg Tamoxifen/cm<sup>2</sup> Haut) behandelt und die Thymozyten und Keratinozyten 25 Tage nach der ersten Tamoxifenapplikation analysiert (Abb. 7 C). Dieses Behandlungsschema wird im Folgenden als 500 µg Tam/25 d bezeichnet. Ähnlich dem 166 µg Tam/26 d-Applikationsschemata wurde auch bei keiner der 500 µg Tam/25 d-Behandlungen eine tdTomato-Expression in Thymozyten nachgewiesen (Abb. 7 C, unterste Reihe). Dahingegen führte die erhöhte Tamoxifendosierung in den

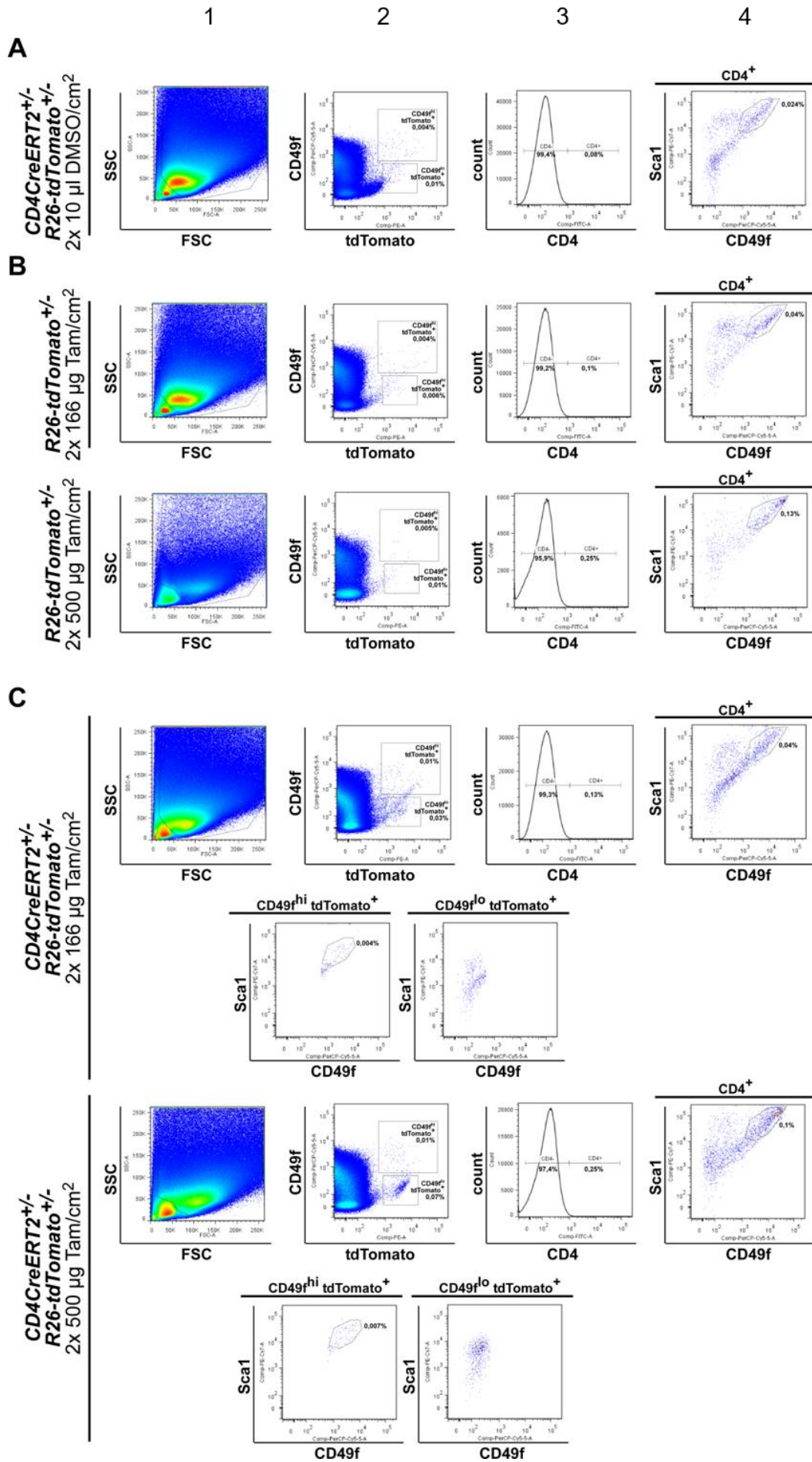
Keratinocytenisolaten zu einer erhöhten Anzahl tdTomato<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 8 C, dritte Reihe). Zwar stieg der Anteil tdTomato<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Zellen im Vergleich zu 166 µg Tam/26 d nicht an (vgl. Abb. 8 C, erste Reihe und dritte Reihe). Jedoch erhöhte sich der Anteil von tdTomato<sup>+</sup>-CD49<sup>low</sup>-Zellen von 0,03 % in den 166 µg Tam/26 d auf 0,07 % in den 500 µg Tam/25 d-*R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen (vgl. Abb. 8 C, erste Reihe und dritte Reihe).

In allen analysierten Proben wurde auch die CD4-Expression in den Keratinocytenisolaten untersucht. Wie Abbildung 8 (vorletzte und letzte Spalte) zeigt, änderte sich der Anteil an CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Zellen aufgrund der Tamoxifenbehandlung nicht.

Insgesamt lassen diese Daten schließen, dass die topische Applikation von Tamoxifen auf die Haut keinen Einfluss auf die Aktivität der CreERT2-Rekombinase im Thymus hat und somit eine tdTomato-Markierung von CD8<sup>+</sup>-Thymozyten und möglicherweise auch der meisten zirkulierenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ausgeschlossen werden kann. Zusätzlich dazu zeigen die Analysen, dass bei Behandlung mit hohen Tamoxifendosierungen ein höherer Anteil epidermaler Zellen durch tdTomato markiert wird. Leider reicht der Anteil der tdTomato<sup>+</sup>-Zellen in 166 µg Tam/26 d- und 500 µg Tam/25 d-*R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen (Abb. 8 C, 0,01 %) aber weder an jenen in *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäuse (siehe Abb. 5 C, 0,16 %) noch an die Gesamtzahl der CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Keratinocyten (siehe Abb. 5 C, 0,04 %; Abb. 8 A-C, 0,02-0,13 %) heran. Zusätzlich dazu scheint eine Erhöhung der topisch applizierten Tamoxifendosis eher die Anzahl tdTomato<sup>+</sup>-epidermaler-Immunzellen zu erhöhen (Abb. 8 C, 0,03 % auf 0,07 %), aber die Anzahl der tdTomato<sup>+</sup>-Keratinocyten nicht wesentlich weiter zu steigern.



**Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analysen der Thymozyten von topisch mit DMSO bzw. Tamoxifen behandelten *R26-tdTomato*- und *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mäusen.** Analyse von anti-CD4-FITC und anti-CD8-PE-Cy7 gefärbten Thymozyten der Rückenhaut von *R26-tdTomato*- und *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mäusen. Das rotfluoreszierende tdTomato-Protein wurde im PE-Kanal detektiert. Die durchflusszytometrischen Daten der DMSO-Kontrolle (**A**), Tamoxifen-behandelten *R26-tdTomato*-Kontrolle (**B**) und mit Tamoxifen behandelten *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Tiere (**C**) wurden wie folgt analysiert: Spalte 1: FSC/SSC. Spalte 2: CD8/CD4-Plot mit *gating* der Zellen nach CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> sowie CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>. Spalte 3: CD4-Plot und *gating* nach CD4<sup>+</sup> und CD4<sup>-</sup>. Spalte 4: tdTomato-Plot. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten am BD-LSR-II mit der Software BD-FacsDiva™ (BD BioScience, Heidelberg), die Auswertung mit der Software FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR, USA).





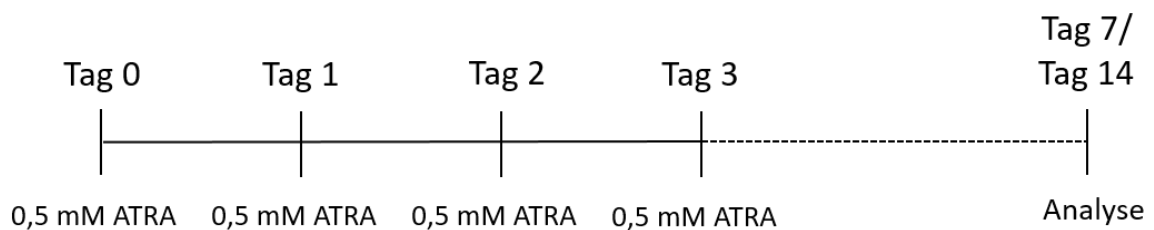
**Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analysen der Keratinozyten von topisch mit DMSO bzw. Tamoxifen behandelten *R26-tdTomato*- und *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mäusen.** Analyse von anti-CD4-FITC, anti-CD49f-PE-Cy5 und anti-Sca1/Biotin-PE-Cy7 gefärbten Keratinozyten der Rückenhaut von *R26-tdTomato*- und *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen. Das rotfluoreszierende tdTomato-Protein wurde im PE-Kanal detektiert. Die durchflusszytometrischen Daten der DMSO-Kontrolle (A), Tamoxifen-behandelten *R26-tdTomato*-Kontrolle (B) und Tamoxifen-behandelten *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Tiere (C) wurden wie folgt analysiert: Spalte 1: FSC/SSC mit Markierung der Keratinozyten. Spalte 2: tdTomato/CD49f-Plot der Keratinozyten mit *gating* der CD49f<sup>high</sup>-tdTomato<sup>+</sup>- und CD49f<sup>low</sup>-tdTomato<sup>+</sup>-Zellen. Spalte 3: CD4-Plot der Keratinozyten mit *gating* nach CD4<sup>+</sup> und CD4<sup>-</sup>. Spalte 4: CD49f/Sca-1-Plot der CD4<sup>+</sup> Zellen. Für C wurden zusätzlich die CD49f<sup>high</sup>-tdTomato<sup>+</sup>- und CD49f<sup>low</sup>-tdTomato<sup>+</sup>-Zellen jeweils in einem CD49f/Sca-1-Plot analysiert. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten am BD-LSR-II mit der Software BD-FacsDiva™ (BD BioScience, Heidelberg), die Auswertung mit der Software FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR, USA).

### 3.1.3 Epidermale Proliferationsstimulation mittels topischer all-*trans*-Retinsäure-Behandlung

Es ist bekannt, dass ATRA bei *in-vivo*-Behandlung die Proliferation von epidermalen SZ der IFE sowie von HF-Zellen oberhalb der Talgdrüse anregt (Jensen et al. 2009; Collins und Watt 2008). Da nun vermutet wurde, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen stammzellähnliche Eigenschaften besitzen, sollte überprüft werden, ob eine topische ATRA-Behandlung zu einer verstärkten Proliferation einhergehend mit einer erhöhten Anzahl von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen führt.

Um dies zu untersuchen wurden sechs Wildtyp-C57BL/6N-Mäuse vier Mal im Abstand von je 24 Stunden mit 0,5 mM ATRA behandelt. Jeweils drei der mit ATRA behandelten Mäuse wurden sieben bzw. 14 Tage nach der ersten Behandlung abgetötet, anschließend die Keratinozyten der Rückenhaut isoliert und durchflusszytometrisch sowie histologisch untersucht (Abb. 9). Diese zwei Kohorten werden nachfolgend als 7-d- bzw. 14-d-ATRA-Mäuse bezeichnet. Als Kontrollen wurden vier Wildtyp-C57BL/6N-Mäuse im gleichen Behandlungsschema nur mit dem Lösungsmittel Aceton behandelt und jeweils zwei Tiere

zum entsprechenden Analysezeitpunkt analysiert. Um auch die Tochterzellen von CD4-exprimierenden Zellen verfolgen zu können, wurden zusätzlich zu den Wildtyp-C57BL6/N-Mäusen drei *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäuse mit ATRA bzw. zwei *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäuse mit Aceton wie oben beschrieben behandelt und sieben Tagen nach der ersten Behandlung analysiert. Anhand dieser Analysen sollte untersucht werden, ob eine ATRA-Behandlung, sollte sie zu einer erhöhten Anzahl von CD4-exprimierenden Zellen führen, auch in einer erhöhten Anzahl von Tochterzellen von CD4<sup>+</sup>-Zellen resultiert.



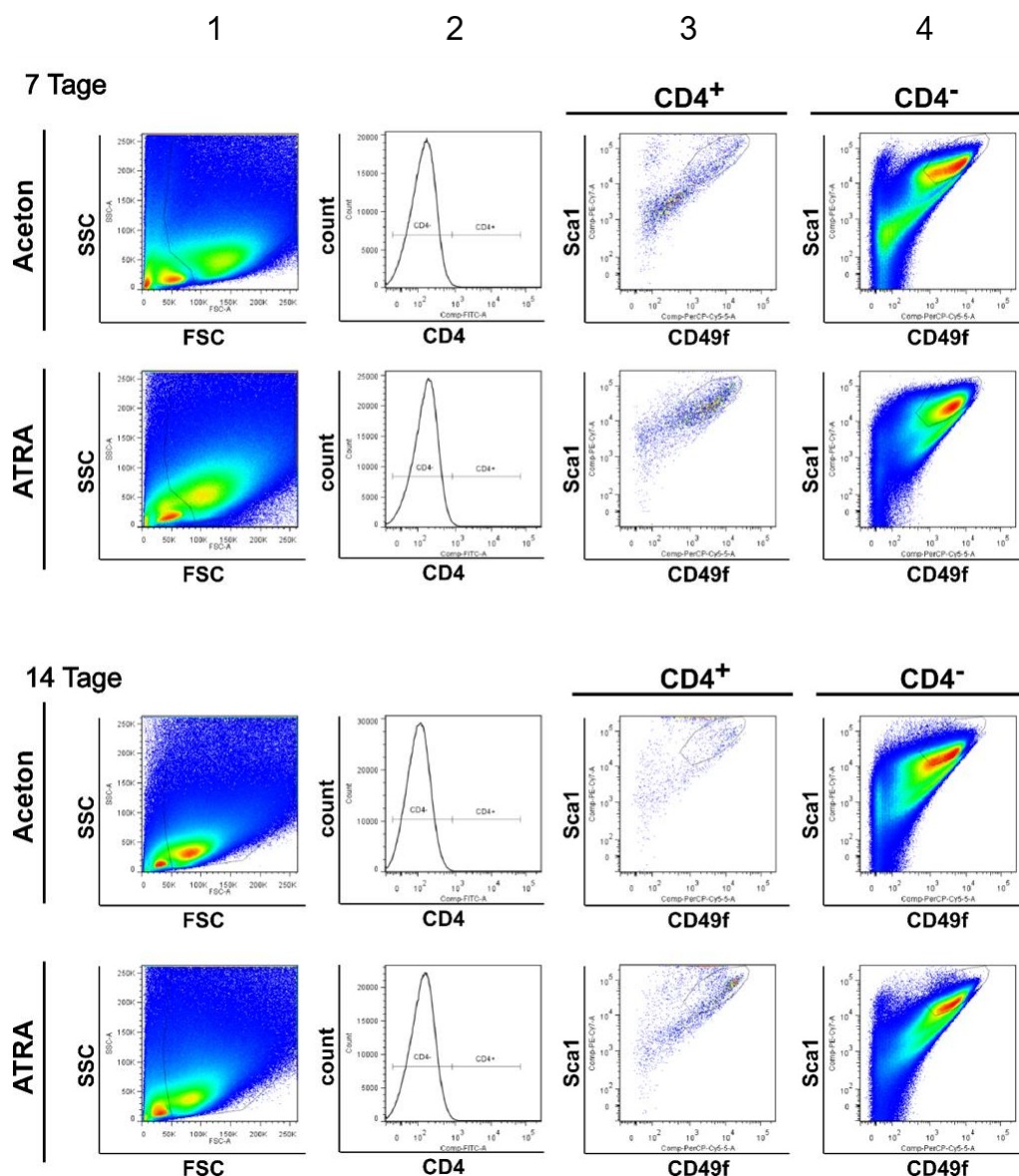
**Abbildung 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs topischer ATRA-Behandlung von Wildtyp-C57BL6/N- und *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäusen.** Drei Wildtyp-C57BL6/N- und drei *R26-tdtomato-CD4Cre*-Mäusen wurden je vier Mal im Abstand von 24 Stunden topisch mit 0,5 mM ATRA behandelt und nach sieben Tagen analysiert (7-d-ATRA-Mäuse). Drei Wildtyp-C57BL6/N-Mäuse wurden nach dem gleichen Schema behandelt und nach 14 Tagen analysiert (14-d-ATRA-Mäuse).

Die ATRA-Behandlung wurde von allen Tieren gut toleriert. Bereits drei Tage nach ATRA-Applikation wurde eine makroskopisch sichtbare Verdickung der Haut mit stellenweiser Grindbildung beobachtet, jedoch blieb die Haut weitestgehend reizlos und frei von offenen Wunden.

Die durchflusszytometrische Analyse der Proben zeigte, dass sieben Tage nach topischer ATRA-Behandlung eine signifikant erhöhte Anzahl CD4<sup>+</sup>-Keratinocyten (Abb. 10, 11 A) sowie CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermaler Zellen nachweisbar ist (Abb. 10, 11 B). Obwohl ähnliche Beobachtungen auch in einzelnen Mäusen 14 d nach ATRA-Behandlung gemacht wurden (Abb. 10) zeigt die statistische Auswertung aller untersuchter Tiere, dass 14-d-ATRA-Mäuse lediglich eine den Kontrollen vergleichbare Anzahl CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermaler Zellen aufweisen, die somit im Vergleich zu 7-d-ATRA-Mäusen wieder gesunken ist (Abb. 11 B). Interessanterweise sinkt jedoch die Anzahl CD4<sup>-</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-

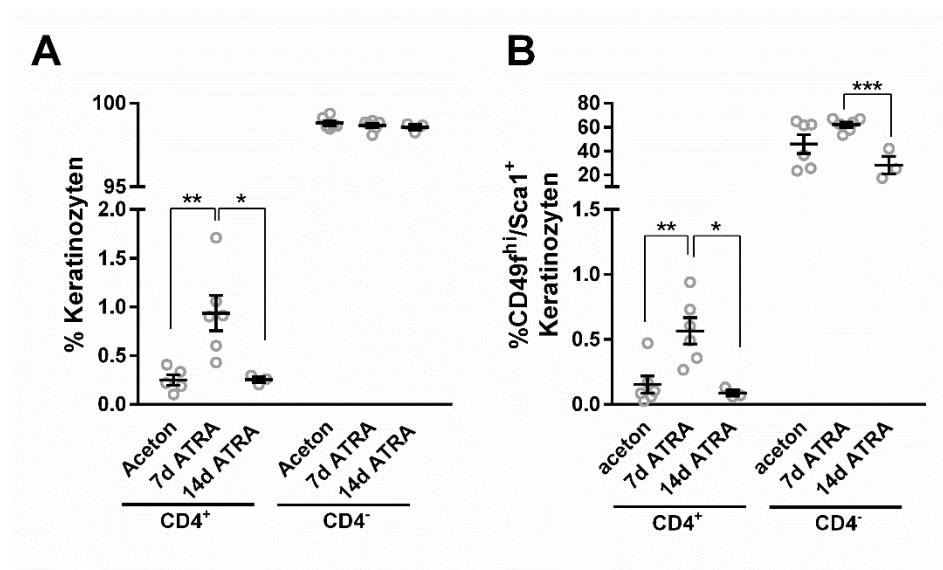
1<sup>+</sup>-Zellen von 14-d-ATRA-Mäusen im Vergleich zu den Acetonkontrollen signifikant ab (Abb. 11 B), wobei die Keratinozytenzahl gleichbleibend ist (Abb. 11 B).

Diese Daten lassen vermuten, dass es sich wie vermutet bei CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> um epidermale Zellen mit SZ-artigem Charakter handeln könnte. Sollte dies der Fall sein, sollte auch die Anzahl tdTomato<sup>+</sup> epidermaler Zellen in *R26-tdTomato-D4Cre7-d-ATRA*-Mäusen erhöht sein. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analysen von Keratinozyten aus mit ATRA behandelten C57-Mäusen sowie ihren Kontrollen. Analyse von anti-CD4-FITC, anti-CD49f-PE-Cy5 und anti-**

Sca1/Biotin-PE-Cy7 gefärbten Keratinozyten der Rückenhaut von mit Aceton bzw. 0,5 mM ATRA behandelten C57-Wildtyp-Mäusen in den Analysezeiträumen von sieben bzw. 14 Tagen. Spalte 1: FSC/SSC mit gating der Keratinozyten. Spalte 2: CD4-Plot der Keratinozyten und gating nach CD4<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>. Spalte 3: CD49f/Sca-1-Plot der CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten mit Markierung der CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca<sup>+</sup>-Zellen. Spalte 4: CD49f/Sca-1-Plot der CD4<sup>-</sup>-Keratinozyten. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten am BD-LSR-II mit der Software BD-FacsDiva™ (BD BioScience, Heidelberg), die Auswertung mit der Software FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR, USA).



**Abbildung 11: Statistische Auswertung des proliferationsinduzierenden Effekts von ATRA auf murine Epidermis.** Prozentualer Anteil von CD4<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>-Keratinozyten (**B**) bzw. CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Keratinozyten (**C**) in 7-d-ATRA-Mäusen (n=3) und 14-d-ATRA-Mäusen (n=3) im Vergleich zu mit Aceton behandelten Mäusen (n=4). Daten aus durchflusszytometrischer Analyse. Signifikante Zunahmen sind mit einem Stern, sehr signifikante Zunahmen mit zwei Sternen und hoch signifikante Zunahmen mit drei Sternen über dem jeweiligen Balken markiert. Die statistische Analyse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 6 (ungepaarter t-Test, Holm-Sidak-Methode). Mittelwert +/- Standardfehler. \*P≤0,05; \*\*P≤0,01; \*\*\*P≤0,001; \*\*\*\*P≤0,0001

Um die durchflusszytometrischen Daten zu untermauern, wurden im Anschluss immunhistologische Antikörperfärbungen an den asservierten Proben durchgeführt.

Dazu wurden Hautproben von insgesamt sechs 7-d-ATRA-Mäusen ( $N_{C57BL6/N}=3$ ;  $N_{R26-tdTomato-CD4Cre}=3$ ), drei 14-d-ATRA-Mäusen und sechs Aceton-Kontrollmäusen ( $N_{C57BL6/N}=3$ ;  $N_{CD4Cre-R26-tdTomato}=3$ ) immunhistologisch auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht (Tabelle 6). Ki67 wird während der Synthese (S-), Mitose (M-), Gap (G)<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase proliferierender Zellen im Zellkern exprimiert und eignet sich daher gut zur Untersuchung gerade proliferierender Zellen (Gerdes et al. 1984). Als Negativkontrollen wurden Paraffinschnitte der Hautproben nur mit dem Sekundärantikörper behandelt.

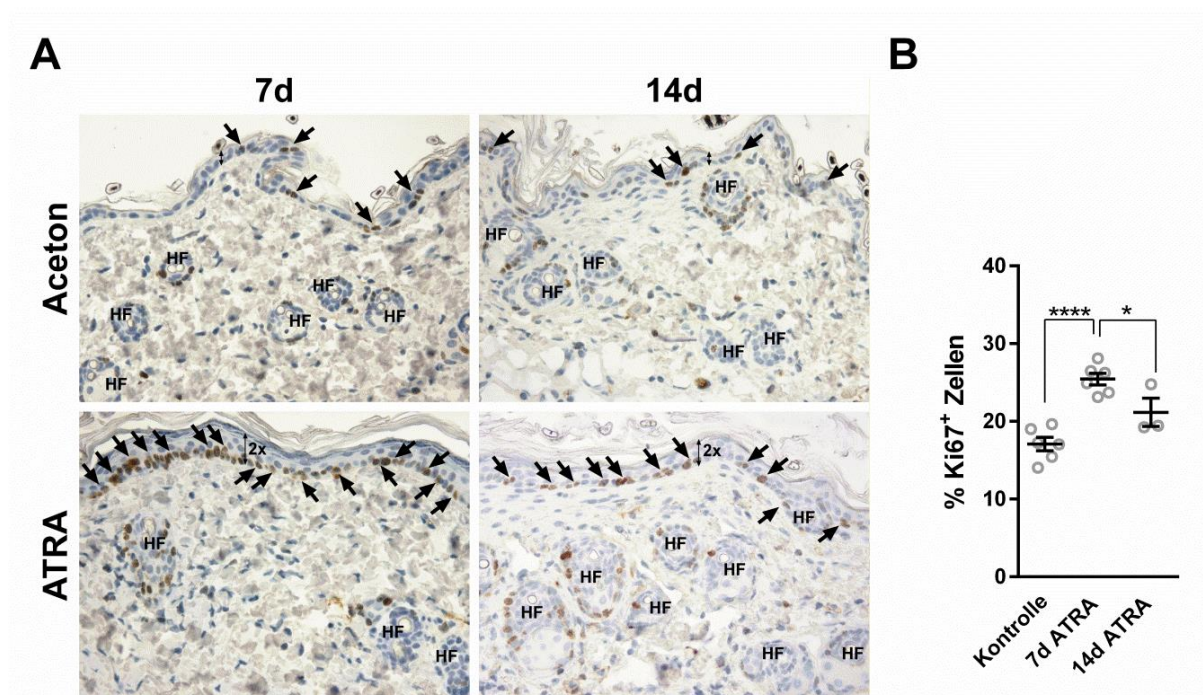
Mikroskopisch zeigten Epidermis und Dermis der Aceton-behandelten Kontrollen keine Auffälligkeiten. Erwartungsgemäß wurden proliferierende Zellen (Ki67<sup>+</sup>-Zellen) in der Basalzellschicht der Epidermis und am HF detektiert (Abb. 12, Aceton). Im Gegensatz dazu führte die ATRA Behandlung von 7-d-ATRA- und 14-d-ATRA-Mäusen zu einer verstärkten Proliferation und Hyperplasie der Epidermis (Abb. 12). Um den prozentualen Anteil proliferierender Zellen in den Hautproben zu bestimmen, wurden alle kernhaltigen Zellen der Epidermis und die Ki67<sup>+</sup> epidermalen Zellen ausgezählt (Tabelle 6). Tatsächlich wurde so eine signifikant verstärkte Proliferation von 7-d-ATRA- und 14-d-ATRA-Epidermis einhergehend mit einer erhöhten Gesamtzellzahl der Epidermis nachgewiesen (Tabelle 6 und Grafik). Dabei ist vor allem in 7-d-ATRA-Mäusen der prozentuale Anteil der Ki67<sup>+</sup>-Basalzellen stark erhöht, während sich in 14-d-ATRA-Mäusen der proliferierende Anteil der Epidermiszellen wieder zu regulieren scheint (Tabelle 6, Abb. 12 B). Diese Beobachtung wird auch durch die absoluten Zahlen Ki67<sup>+</sup> epidermaler Zellen gestützt (Tabelle 6). Interessanterweise wurde jedoch keine erhöhte Anzahl Ki67<sup>+</sup>-HF-Zellen in 7-d-ATRA-Mäusen oder 14-d-ATRA-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen (Abbildung 12, HF).

Zusammengefasst weisen diese Ergebnissen darauf hin, dass ATRA eine erhöhte Proliferation von epidermalen Zellen, möglicherweise der CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Keratinocyten bewirkt. Wenn es sich bei den durch ATRA-stimulierten Zellen tatsächlich um CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Keratinocyten handeln sollte, müsste in *R26-tdTomato-CD4Cre*-7-d-ATRA-Haut der Nachweis von klonal wachsenden tdTomato<sup>+</sup>-Zellen möglich sein.

Immunhistologische Färbungen zum Nachweis von tdTomato (anti-RFP-Antikörper) konnten dies jedoch nicht bestätigen (Daten nicht gezeigt). Demzufolge muss geschlossen werden, dass ATRA zwar zu einer generell verstärkten Proliferation der Epidermis (bspw. IFE-SZ), jedoch nicht zum klonalen Wachstum von tdTomato<sup>+</sup> epidermalen Zellen im *R26-tdTomato-CD4Cre*-Mausmodell führt. Tatsächlich wurde nach Abschluss der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen und deren Tochterzellen hauptsächlich an HF lokalisiert sind und nur recht selten in der Epidermis nachweisbar sind. Zusätzlich dazu lässt sich das klonale Wachstum und die erhöhte Anzahl von tdTomato<sup>+</sup>-HF-Zellen innerhalb der Haarzyklusphasen nachverfolgen.

**Tabelle 8: Auszählung der Ki67<sup>+</sup> epidermalen Zellen**

Genotyp	Behandlung	Anzahl epidermale Zellen	Anzahl Ki67 <sup>+</sup> epidermale Zellen	% Ki67 <sup>+</sup> epidermale Zellen
C57BL6/N	7d Kontrolle	2441	416	17,04
C57BL6/N	7d Kontrolle	2868	495	17,26
<i>R26-tdTomato CD4Cre</i>	7d Kontrolle	2668	412	15,44
<i>R26-tdTomato CD4Cre</i>	7d Kontrolle	2419	340	14,06
C57BL6/N	14d Kontrolle	2744	539	19,64
C57BL6/N	14d Kontrolle	3117	593	19,02
C57BL6/N	7d ATRA	4010	1127	28,10
C57BL6/N	7d ATRA	4769	1131	23,72
C57BL6/N	7d ATRA	4214	1106	26,25
<i>R26-tdTomato-CD4Cre</i>	7d ATRA	4708	1090	23,15
<i>R26-tdTomato-CD4Cre</i>	7d ATRA	3585	893	24,91
<i>R26-tdTomato-CD4Cre</i>	7d ATRA	3118	826	26,49
C57BL6/N	14d ATRA	4708	915	19,44
C57BL6/N	14d ATRA	2734	678	24,80
C57BL6/N	14d ATRA	2188	421	19,24



**Abbildung 12: Immunhistologische und statistische Analysen von mit ATRA behandelter muriner Rückenhaut.** Mit 0,5 mM ATRA bzw. Aceton (Lösungsmittel) *in vivo* behandelte murine Rückenhaut wurde nach sieben (**7 d**) und 14 Tagen (**14 d**) isoliert und im IHC-Verfahren mit anti-Ki67-Antikörper gefärbt. **A:** Immunhistologische Abbildung der Analysen. Große Einzelpfeile markieren Ki67<sup>+</sup> epidermale Zellen (bräunlich angefärbt), kleinere Doppelpfeile die variierende Dicke der Epidermis. 2x bezeichnet die Verdickung der mit ATRA behandelten Epidermis im Vergleich zur Aceton-Kontrolle. Haarfollikel sind mit HF markiert. Die Dokumentation erfolgte mit dem BX60F5-Mikroskop (CellSens Dimension Software; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) und dem ColorView Soft Imaging System (Soft Imaging System GmbH, Münster) in 200facher Vergrößerung. **B:** Graphische Darstellung des prozentualen Anteils Ki67<sup>+</sup> epidermaler Zellen in 7-d-ATRA-Mäusen (n=6) und 14-d-ATRA-Mäusen (n=3) im Vergleich zu mit Aceton behandelten Mäusen (n=6, Kontrolle=Aceton) aus der Auszählung von Ki67<sup>+</sup> epidermalen Zellen (Tabelle 6). Signifikante Zunahmen sind mit einem Stern, sehr signifikante Zunahmen mit zwei Sternen und hoch signifikante Zunahmen mit drei Sternen über dem jeweiligen Balken markiert. Die statistische Analyse erfolgte mittels der Software GraphPad Prism 6 (ungepaarter t-Test, Holm-Sidak-Methode). Mittelwert +/- Standardfehler. \*P≤0,05; \*\*P≤0,01; \*\*\*P≤0,001; \*\*\*\*P≤0,0001.

### 3.1.4 *In-vivo*-BrdU-Inkorporationsstudie zur Detektion von LRC der Haut in C57BL6/N-Mäusen

Ein Charakteristikum von adulten SZ ist, dass aufgrund ihrer niedrigen Teilungsrate eine BrdU-Markierung dieser Zellen länger erhalten bleibt als bei sich schnell teilenden Zellen (Braun et al. 2003) (siehe Kapitel 1.1.2). Da nun angenommen wird, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen SZ-ähnliche Eigenschaften besitzen (siehe Einleitung), sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen Charakteristika von LRC aufweisen.

Um zu Beginn des Experiments eine möglichst hohe BrdU-Markierungsrate aller Körperzellen zu erreichen, wurde zehn Tagen alten C57BL6/N-Mäusen vier Mal im Abstand von je zwölf Stunden jeweils 50 mg/kg Körpergewicht BrdU intraperitoneal injiziert (Braun et al. 2003). Anschließend wurden 20, 50 und 70 Tage nach BrdU-Applikation die Keratinozyten von je zwei Mäusen isoliert und mittels anti-CD4-, anti-CD49f- und anti-Sca-1- sowie intrazellulärer anti-BrdU-Antikörperfärbung durchflusszytometrisch analysiert. Zusätzlich dazu wurden Hautproben der Mäuse entnommen. Die histologische Aufarbeitung erfolgte im Anschluss an die vorliegende Arbeit durch Anna Müllen (Müllen 2016).

Nach der Behandlung der Mäuse konnten in der durchflusszytometrischen Analyse aufgrund starker Signale im *BrdU-Gate* keine einzelnen BrdU<sup>+</sup>-Keratinozyten detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Um die Effektivität der BrdU-Behandlung zu zeigen blieben daher nur die von Anna Müllen durchgeführten Analysen der histologischen Proben. Hierbei wurden Hautproben von 21, 50, 71 und 90 Tagen nach BrdU-Behandlung abgetöteten *R26-tdTomato-CD4Cre*-Mäusen mittels DIF gegen anti-BrdU/anti-tdTomato gefärbt. Durch diese Analysen konnten bis zu 50 Tage nach Behandlung doppelt positive BrdU<sup>+</sup>-tdTomato<sup>+</sup>-Zellen in der murinen Epidermis nachgewiesen werden. Einfach positive BrdU<sup>+</sup>-Zellen ließen sich noch nach 90 Tagen nachweisen, wobei ihre Zahl kontinuierlich abnahm (Müllen 2016). Hiermit ließ sich trotz fehlgeschlagener durchflusszytometrischer Analysen zeigen, dass eine Langzeit-Markierung mit BrdU in tdTomato<sup>+</sup>-Zellen möglich ist.

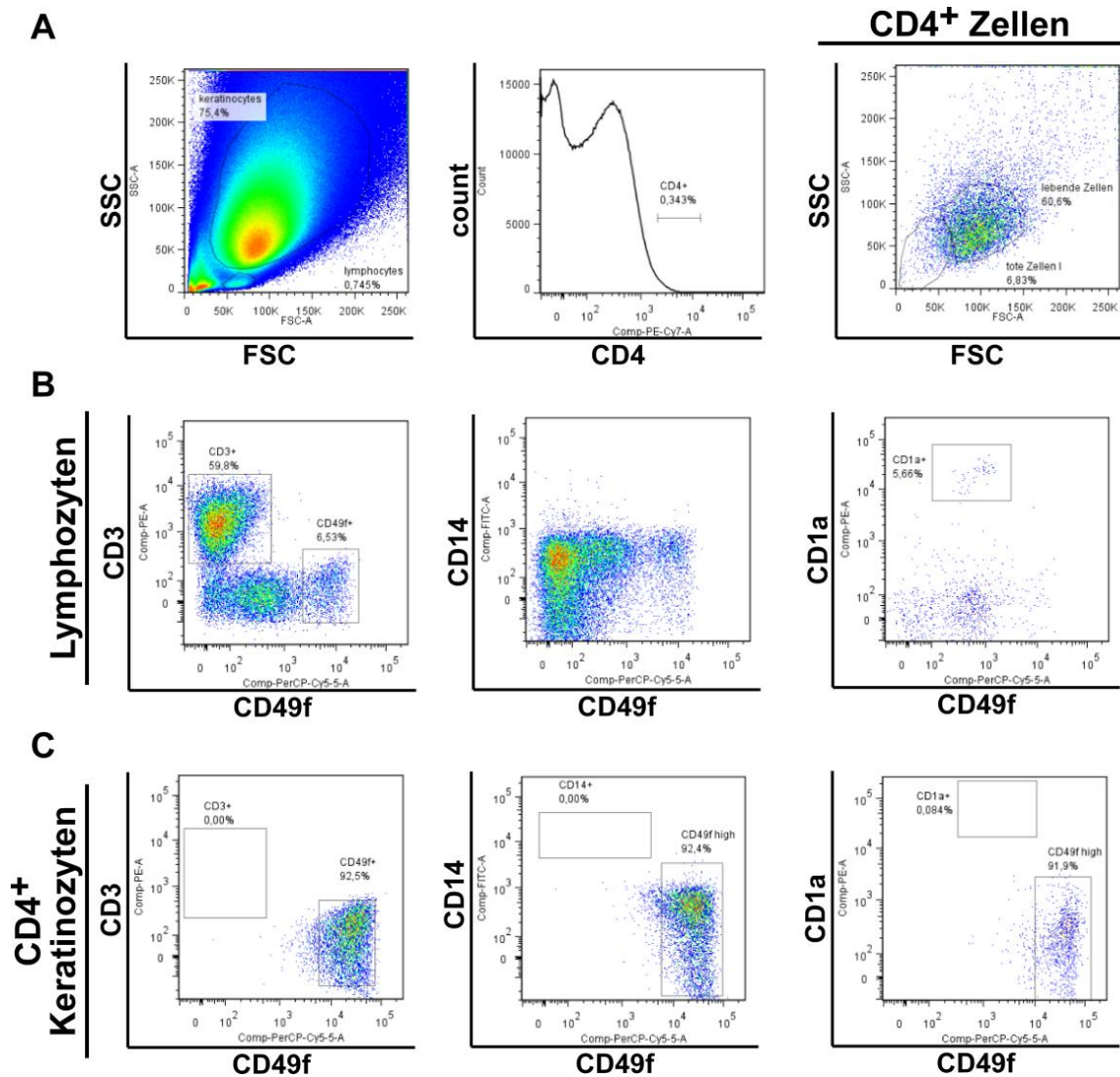


## 3.2 Charakterisierung humaner CD4<sup>+</sup> epidermaler Zellen

Um zu untersuchen, ob CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten nicht nur in muriner, sondern auch in humaner Haut zu finden sind, wurde frische Brusthaut aus Mammareduktionsplastiken (Kollaboration mit Frau Dr. med. Claudia Choi-Jacobshagen, Klinik für Plastische, Ästhetische und Rekonstruktive Chirurgie, Operatives Brustzentrum; Evangelisches Krankenhaus, Göttingen-Weende) analysiert. Die Haut entstammte dabei zehn gesunden Patientinnen (Patientinnen #2 – #11) im Alter zwischen 17 und 68 Jahren. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Durchflusszytometrie, immunhistologischen Analysen und *in-vitro*-Kultivierung isolierter Keratinozyten.

### 3.2.1 Durchflusszytometrische Analyse frischer humaner Keratinozytenisolate

Vorarbeiten zeigten bereits, dass auch in der humanen Epidermis CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>+</sup>-CD29<sup>+</sup>-Keratinozyten nachweisbar sind (siehe Einleitung). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit aber war aufgrund durchflusszytometrischer Analysen lediglich bekannt, dass in der humanen Epidermis CD4<sup>+</sup>-Zellen existieren, die den Keratinozytenmarker CD49f sowie den Stammzellmarker CD29 exprimieren (unveröffentlichte Daten von Anja Uhmann, zur durchflusszytometrischen Analyse CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>+</sup>-CD29<sup>+</sup>-humaner epidermaler Zellen s. auch Abb. 14). Um nun ähnlich der Analyse von murinen Keratinozyten auch einen hämatopoetischen Ursprung humaner CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten auszuschließen, wurden zunächst humane Keratinozyten durchflusszytometrisch auf die Expression der Immunzellmarker CD3 (T-Zellen), CD14 (Monozyten, Makrophagen) und CD1a (DC, Langerhans Zellen) sowie des Keratinozytenmarkers CD49f untersucht. Abbildung 13 zeigt, dass Immunzellen der Haut durchaus geringe Mengen CD49f exprimieren können (Abb. 13 B), jedoch weisen CD4<sup>+</sup>-Zellen eine sehr starke, deutlich von Immunzellen abgrenzbare CD49f-Expression auf (Abb. 13 C). Zusätzlich dazu exprimieren CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen keinen der analysierten hämatopoetischen Marker (Abb. 13 C). Diese Daten zeigen, dass humane CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen weder T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, DC noch Langerhans-Zellen sind und somit angenommen werden kann, dass sie nicht hämatopoetischen Ursprungs sind, sondern vielmehr eine Keratinozytenpopulation darstellen.



**Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von hämatopoetischen Markern durch humane Keratinozytenisolate.** Abgebildet sind Analysen von anti-CD4-PE-Cy7, anti-CD49f-PE-Cy5, anti-CD3-PE, anti-CD14-FITC und anti-CD1a-PE gefärbten humanen epidermalen Zellen von Patientin # 2, Alter zum Operationszeitpunkt: 17 Jahre. **A:** FSC/SSC mit *gating* der Keratinozyten und Leukozyten und Determinierung von CD4<sup>+</sup> Keratinozyten. **B, C:** CD49f/CD3-, CD49f/CD14- und CD49f/CD1a-Plot der Lymphozyten (**B**) und CD4<sup>+</sup> Keratinozyten (**C**). Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten am BD-LSR-II mit der Software BD-FacsDiva™ (BD BioScience, Heidelberg), die Auswertung mit der Software FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR, USA).

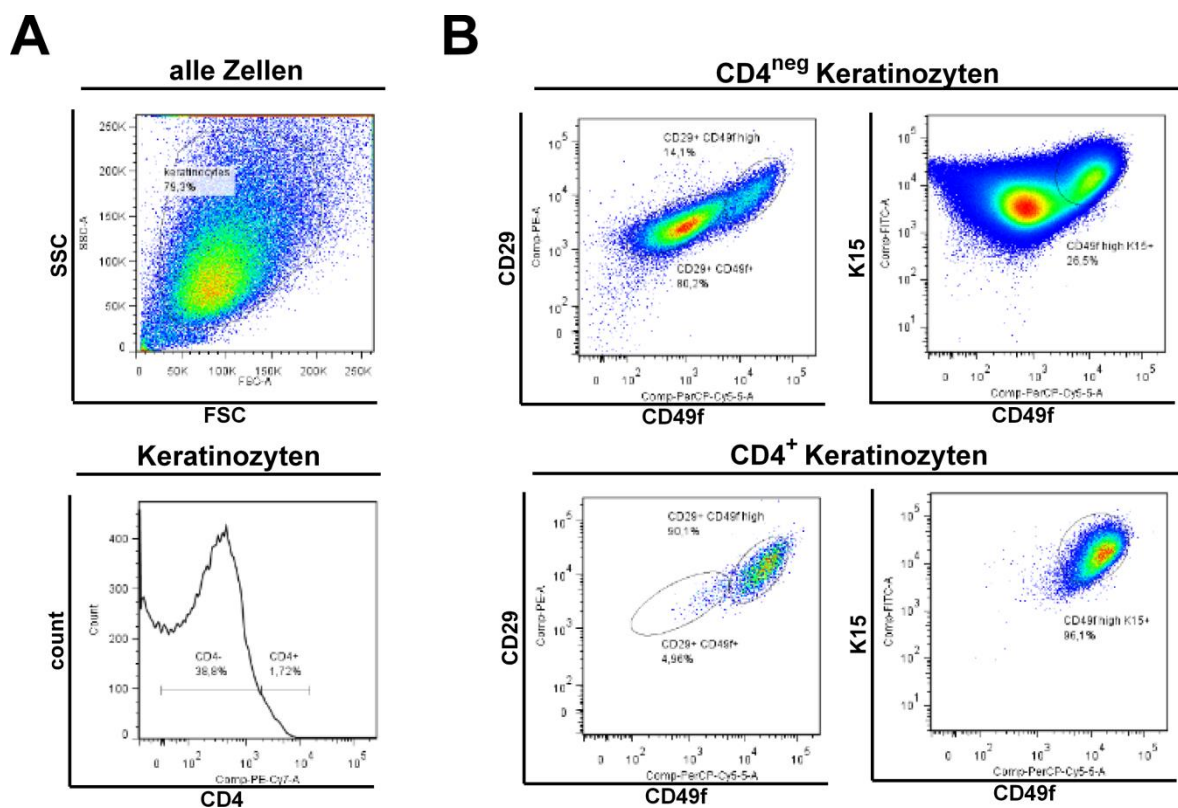
Neben dem Ausschluss des hämatopoetischen Ursprungs wurde auch der potentiell stammzellartige Charakter humaner CD4<sup>+</sup> epidermaler Zellen analysiert. Hierzu wurden

humane epidermale Zellisolate mit Antikörpern gegen CD4 und den Keratinozytenmarker CD49f gefärbt sowie zusätzlich die Expression von CD29, K15, CD34, CD200, CD90 bzw. CD71 analysiert. Daneben wurde untersucht, ob humane CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen die Chemokinrezeptoren CCR5 oder CXCR4 exprimieren, da diese Proteine essentiell für eine Infektion mit dem HI-Virus sind (siehe Kapitel 1.1.4).

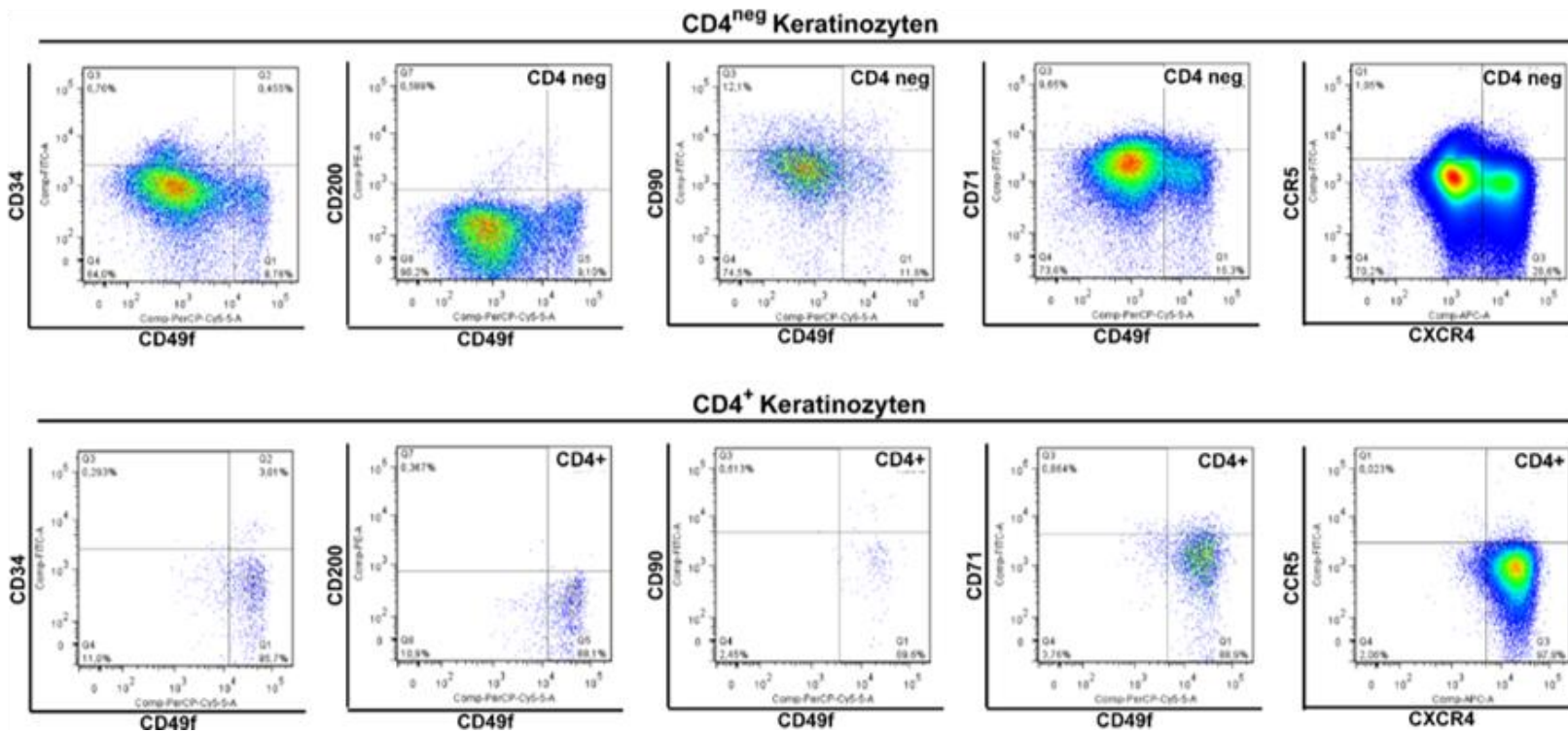
Für die Auswertung dieser Analysen wurden zu nächst, wie in Abb. 14 A gezeigt, alle CD4<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup> Keratinozyten gegatet und anschließend getrennt auf ihre Expression der untersuchten Markerproteine untersucht (Abb. 14 B und Abb. 15). Die Ergebnisse zeigen, dass humane CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen, ähnlich den murinen Zellen, eine hohe Expression des Keratinozytenmarker CD49f aufweisen (Abb. 14 B und Abb. 15, jeweils Zeile 1). Darüber hinaus exprimieren humane CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen den SZ-Marker CD29 sowie den Basalzell- und Wulst-SZ-Marker K15 (Abb. 14 B). Im Vergleich zu CD4<sup>-</sup>-Keratinozyten exprimieren alle CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen in hohem Maße CD29, K15 und CD49f und sind damit wesentlich weniger heterogen als CD4<sup>-</sup>-Keratinozyten (Abb. 14 B). Sie stellen damit eine gut abzugrenzende Gruppe von epidermalen Zellen mit SZ-ähnlichen Eigenschaften dar, während in der Gesamtzahl der CD4<sup>-</sup>-Zellen verschiedene Zellgruppen mit unterschiedlichen Expressionsmustern enthalten sind. So exprimieren manche CD4<sup>-</sup>-Zellen viel CD29, K15 oder CD34, während gleichzeitig auch viele CD4<sup>-</sup> Zellen CD29<sup>-</sup>, K15<sup>-</sup> oder CD34<sup>-</sup> sind. Auch andere Zellmarker lassen sich nur in einem Teil der CD4<sup>-</sup> epidermalen Zellen nachweisen (Abb. 14 B und Abb. 15). Dies spricht dafür, dass CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten eine eigene Population innerhalb der epidermalen Zellen ausmachen. Abb. 15 zeigt darüber hinaus, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen weder den ORS-Marker CD34, den Marker der Wulstregion CD200, den epidermalen SZ-Marker CD90 noch den Negativmarker für epidermale SZ CD71 exprimieren, jedoch positiv für den Chemokinrezeptor CXCR4 sind (Abb. 15 Zeile 2). CCR5 wird hingegen nicht in CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten exprimiert (Abb. 15 Zeile 2).

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass in der humanen Epidermis eine homogene Population CD4<sup>-</sup>exprimierender Zellen existiert, deren Ursprung höchstwahrscheinlich nicht das hämatopoetische System ist, da sie keine immunologischen Zellmarker exprimieren. Die Tatsache, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen eine hohe Expression der SZ-Marker CD29 und K15 aufweisen, jedoch nicht den generellen ORS-Marker CD34

exprimieren, lässt darüber hinaus schließen, dass diese Zellen einen stammzellartigen Charakter besitzen. Da sie jedoch einerseits K15 (Basalzell- und Wulst-SZ-Marker) aber nicht CD200 (Wulst-SZ-Marker) exprimieren und andererseits keine Expression von CD71 (Negativmarker für epidermale SZ) oder CD90 (IFE-SZ-Marker) zeigen, ist eine eindeutige Zuordnung der Zellen zu einem epidermalen SZ-Kompartiment (IFE oder HF) auf Grundlage der bisherigen Daten nicht möglich. Schließlich weist die Expression von CXCR4 darauf hin, dass  $CD4^+CD49f^+CD29^+K15^+$  humane epidermale Zellen einen möglichen Angriffspunkt einer HIV-Infektion darstellen könnten.



**Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse humaner epidermaler Zellen.** Analysen von anti-CD4-FITC, anti-CD49f-PE-Cy5, anti-CD29-PE und anti-K15-FITC gefärbten humanen Keratinozytenisolaten aus frischer Brusthaut. **A:** FSC/SSC der Keratinozytenisolate mit *gating* der Keratinozyten (Zeile 1) und Einteilung dieser in CD4<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup> (Zeile 2). **B:** CD49f/CD29- und CD49f/K15-Plot der in **A** determinierten CD4<sup>-</sup> (Zeile 1) und CD4<sup>+</sup> (Zeile 2) Keratinozyten. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten am BD-LSR-II mit der Software BD FACS Diva™ (BD BioScience, Heidelberg), die Auswertung mit der Software FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR, USA).

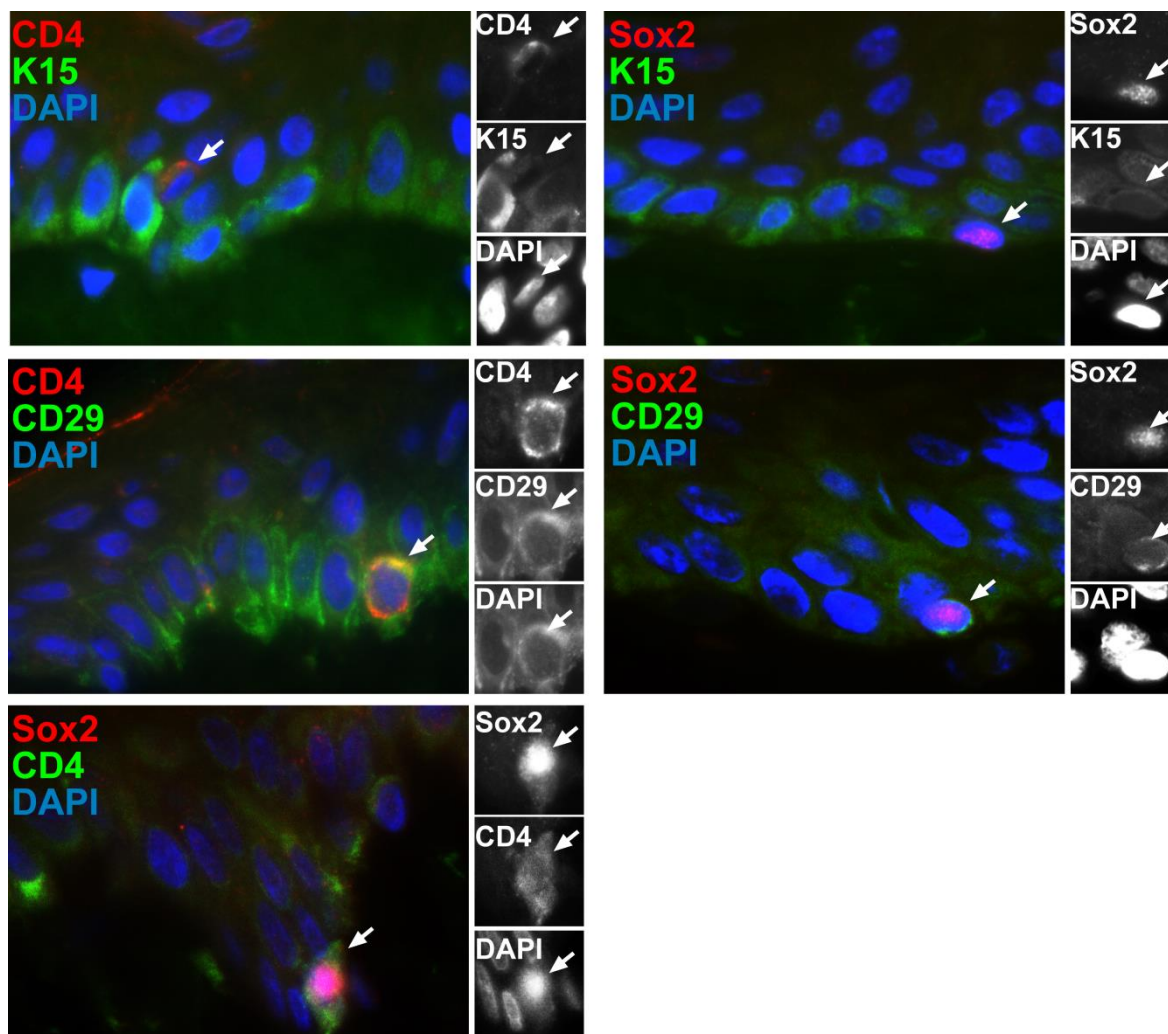


**Abbildung 15: Weiterführende durchflusszytometrische Analyse humaner epidermaler Zellen.** Analysen von anti-CD49f-PE-Cy5, anti-CD34-FITC, anti-CD200-PE, anti-CD90-FITC, anti-CD71-FITC (Patientin #3, Alter zum Operationszeitpunkt: 46 Jahre), anti-CXCR4-APC und anti-CCR5-FITC (Patientin #7, Alter zum Operationszeitpunkt: 49 Jahre), gefärbten humanen Keratinozytenisolaten aus frischer Brusthaut. Die Abbildung zeigt CD49f/CD34-, CD49f/CD200-, CD49f/CD90-, CD49f/CD71- sowie CXCR4/CCR5-Plots der in **Abb. 14 A** determinierten CD4<sup>-</sup> (Zeile 1) und CD4<sup>+</sup> (Zeile 2) Keratinozyten. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten am BD-LSR-II mit der Software BD FACS Diva™ (BD BioScience, Heidelberg), die Auswertung mit der Software FlowJo (Treestar, Inc., Ashland, OR, USA).

### 3.2.2 Immunhistologische Analysen zum Nachweis CD4<sup>+</sup> epidermaler Zellen in der humanen Epidermis

Um einerseits die über Durchflusszytometrie nachgewiesene Expression verschiedener Marker durch humane CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen zu verifizieren und andererseits die Lokalisation dieser Zellen zu analysieren, wurden im Anschluss histologische Analysen an Paraffinschnitten humaner Haut durchgeführt.

Abbildung 16 zeigt exemplarisch die Doppelimmunfluoreszenzanalysen an Hautproben von Patientin #3 (Alter zum Zeitpunkt der Operation: 46 Jahre). Dafür wurden die Paraffinschnitte mit Antikörpern gegen CD4 sowie K15 (Abb. 16 oben links), CD29 (Abb. 16 Mitte links) oder Sox2 (SZ-Marker der Basalzellschicht, Abb. 16 unten links) gefärbt und die Zellkerne durch Gegenfärbung mit DAPI sichtbar gemacht. Die Analyse dieser Färbungen zeigte, dass in der humanen Epidermis vereinzelt CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Basalzellschicht lokalisiert sind, die sowohl K15, CD29 als auch Sox2 exprimieren (Abb. 16 linke Spalte). Um sicherzustellen, dass Sox2 exprimierende Zellen der Basalzellschicht Keratinozyten darstellen, wurden die Proben zusätzlich mit Antikörpern gegen Sox2 sowie K15 (rechts oben) oder CD29 (Mitte rechts) gefärbt. Diese Analyse verifizierte Sox2<sup>+</sup> Zellen der Basalzellschicht als Keratinozyten, da sie sowohl K15 als auch CD29 exprimieren (Abb. 16, rechte Spalte). Demzufolge kann anhand der Immunfluoreszenzanalysen geschlossen werden, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen neben den in den durchflusszytometrischen Analysen identifizierten Marker K15 und CD29 auch Sox2 exprimieren. Darüber hinaus zeigen diese Daten, dass in der humanen Basalzellschicht CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten lokalisiert sind.



**Abbildung 16: Doppelimmunfluoreszenzfärbungen humaner Normalhaut.**

Doppelimmunfluoreszenzanalysen mit anti-CD4-, anti-K15-, anti-CD29- und/oder anti-Sox-2-Antikörpern gefärbten Paraffinschnitten humaner Haut. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Linke Spalte: CD4<sup>+</sup> Zellen der humanen Basalzellschicht exprimieren K15, CD29 und/oder Sox2. Rechte Spalte: Sox2<sup>+</sup> Zellen der humanen Basalzellschicht exprimieren K15 und CD29. Overlays: 600-fache Vergrößerung, Insets: 1200-fache Vergrößerung. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit der CellSens Dimension Software und einem inversen Mikroskop des Typs Olympus IX71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Die Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mittels der Software Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

### 3.2.3 Histologische Analyse *ex vivo* kultivierter humaner Epidermis nach ATRA- bzw. TPA-Behandlung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Proliferationsinduzierende Effekt von ATRA auf die Haut von Mäusen untersucht (Kapitel 3.1.3). Um ähnliche Analysen auch an humaner Haut durchzuführen, wurde humane Epidermis (Patientin #8, Alter zum Zeitpunkt der Operation: 54 Jahre) im Zellverband isoliert (*epidermal sheets*) und in Anwesenheit von ATRA oder TPA *ex vivo* kultiviert. TPA bewirkt ähnlich wie ATRA proliferationsinduzierend, jedoch resultiert eine TPA-Behandlung in einer generell höheren Proliferation aller Hautzellen inklusive der IFE und der HF (Braun et al. 2003; Mascré et al. 2012). Für die Analyse wurden die *epidermal sheets* mit 1  $\mu$ M ATRA oder 50 ng bzw. 100 ng TPA über einen Zeitraum von 24 h, 48 h, 72 h bzw. 96 h kultiviert. Als Kontrollen wurden *epidermal sheets* über die gleichen Zeiträume mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Pro Behandlungsart und -zeitraum wurden je zwei Proben behandelt. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Anna Müllen wurden diese in Paraffin eingebettet und die Schnitte immunhistologisch analysiert (Müllen 2016). Da die *ex-vivo*-Kultivierung im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgte, werden im Folgenden Teile der Ergebnisse aus den immunhistologischen Analysen dargestellt.

Zunächst wurde die Beschaffenheit des Gewebes nach Kultivierung mittels HE-Färbung beurteilt (Untersuchungen von Anna Müllen, Daten nicht gezeigt). Durch diese Färbung werden die Zellkerne mit Hämatoxylin blau und das Zytoplasma mit Eosin rötlich angefärbt, sodass sich die Zellen am Lichtmikroskop gut beurteilen lassen. Anhand dieser Analyse wurde beobachtet, dass eine *ex-vivo*-Kultivierung humaner Epidermis bis zu 48 h möglich ist, ohne eine Verschlechterung der Gewebeintegrität zu induzieren. Bei einer Kultivierung über diesen Zeitraum hinaus ging die Integrität des Gewebes verloren. Dabei zeigte die Epidermis, die über 24 h mit dem Lösungsmittel DMSO kultiviert wurde, die beste Gewebeintegrität mit ca. fünf epidermalen Zellschichten, einer anliegenden Hornschicht, einer intakten Basalzellschicht, nicht vakuolisierten Zellen und keiner Abkuglung der Zellen (vgl. Abb. 17). Bereits ab einer Kultivierung von über 24 h wurde eine beginnende Auflösung des Gewebeverbands beobachtet, die sich durch nachlassende Adhäsion von Nachbarzellen zeigte und mit längeren Kultivierungszeiträumen verstärkte (vgl. Abb. 17). Die Kultivierung von über 48 h



verschlechterte die Gewebeintegrität unabhängig von der Art der Behandlung sehr stark (vgl. Abb. 17), sodass diese Proben nicht in die weitere Analyse einbezogen wurden.

Der Verlust der Gewebeintegrität wurde vor allem in den mit ATRA behandelten *epidermal sheets* beobachtet und trat bereits nach einer Kultivierungsdauer von 24 h auf. Die Epidermis zeigte eine unregelmäßige Struktur mit Ablösung der Körnerzellschicht, Reduktion der Zelladhäsion und Abspaltung der Basalzellen aus dem Gewebeverband (vgl. Abb. 17). Im Gegensatz hierzu wurde die Gewebeintegrität durch die Behandlung mit TPA weniger stark geschädigt (bessere Zelladhäsion und weniger Abspaltung von Zellen der Basalzellschicht) (vgl. Abb. 17). Darüber hinaus führte die TPA-Behandlung zu einer deutlichen Verdickung der Epidermis (bis zu zehn Zellschichten). Dieser Effekt zeigte sich insbesondere für kurze Kultivierungszeiträume bis zu 48 h, die sich somit als insgesamt weniger schädlich für die Epidermis erwiesen.

Um anschließend die proliferationsinduzierenden Effekte von ATRA und TPA zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte der kultivierten humanen Epidermis immunhistologisch mit Antikörpern gegen den Proliferationsmarker Ki67 gefärbt (Müllen 2016). Als Kontrolle diente unbehandelte humane Haut derselben Patientin (Patientin #8), die direkt nach der Mammareduktionsplastik asserviert wurde. Für die Negativkontrollen wurden Paraffinschnitte nur mit Sekundärantikörper behandelt.

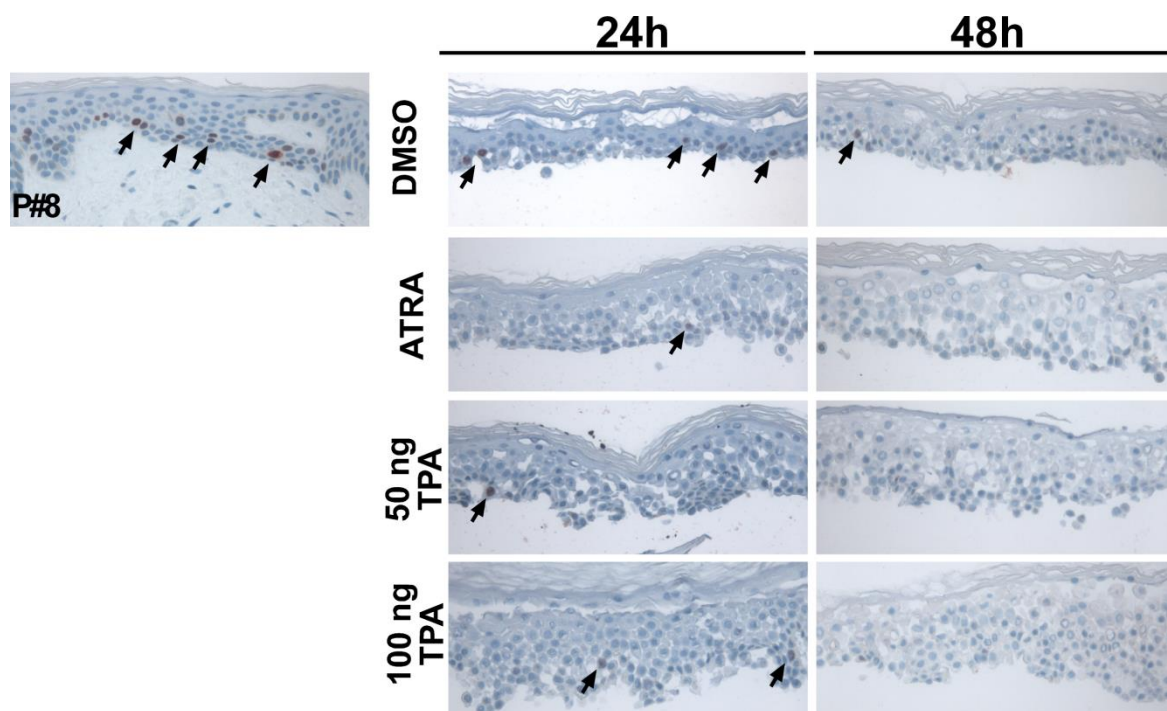
Wie Abbildung 17 zeigt, sind in der Basalzellschicht humaner Haut proliferativ-aktive Zellen lokalisiert (P#8). Die Kultivierung der Epidermis über 24 h resultierte in einer stark verminderten Anzahl der Ki67<sup>+</sup>-Basalzellen in den DMSO behandelten Kontrollen (Abb. 17; Pfeile in DMSO, 24 h). Die Behandlung mit ATRA oder TPA verstärkte diesen Effekt sogar noch drastisch, sodass 24 h nach Kultivierungsbeginn nahezu keine Ki67<sup>+</sup>-Basalzellen mehr detektiert werden konnten (Abb. 17, Pfeile in ATRA, 50 ng TPA, 100 ng TPA, 24 h).

Nach Kultivierung über 24 h hinaus wurden in der DMSO-Kontrolle nur noch sehr wenige (Abb. 17; Pfeil in DMSO, 48 h), in den mit ATRA bzw. TPA behandelten Proben keine proliferierenden Zellen mehr detektiert werden (Abb. 17, ATRA, 50 ng TPA, 100 ng TPA, 48 h).

Diese Daten zeigen, dass die in der Literatur beschriebenen proliferationsanregenden Effekte von ATRA und TPA in diesem *ex-vivo*-Experiment nicht nachgewiesen werden

konnten, vielmehr sank die Proliferation durch die Kultivierung bzw. Behandlung sehr stark.

Neben diesen Analysen untersuchte Anna Müllen den Differenzierungsstatus der *ex vivo* kultivierten *epidermal sheets* mittels immunhistologischer Färbungen gegen den Apoptosemarker Caspase 3 (Kumar 2007) und die epidermalen Differenzierungsmarker Involucrin (Murphy et al. 1984), Loricrin und K10 (Blanpain und Fuchs 2009; Murphy et al. 1984). Dabei konnte sie zeigen, dass weder die Kultivierung von bis zu 72 h noch die Behandlung mit ATRA oder TPA die Expression von Caspase 3 erhöht (Müllen 2016). Außerdem wurde vor allem nach ATRA- oder TPA-Behandlung eine leicht verminderte Expression der Differenzierungsmarker beobachtet (Müllen 2016). Schließlich modifizierte Anna Müllen in einem weiteren Experiment die Kultivierung der *epidermal sheets*, um optimalere Kultivierungsbedingungen zu schaffen.



**Abbildung 17: Immunhistologische anti-Ki67-Färbungen *ex vivo* kultivierter humaner Epidermis nach ATRA- bzw. TPA-Behandlung.** Humane Epidermis einer Mammareduktionsplastik (Patientin #8, Alter zum Zeitpunkt der Operation: 54 Jahre) wurde isoliert und für 24 h oder 48 h mit DMSO (Lösungsmittel), ATRA (1  $\mu$ M) bzw. TPA (50 ng, 100 ng) kultiviert. Paraffinschnitte der kultivierten Epidermis wurden immunhistologisch mit anti-Ki67-Antikörpern gefärbt. Als Positivkontrolle diente Haut derselben Patientin, die direkt nach der Mammareduktionsplastik asserviert wurde (P #8). Pfeile: Ki67<sup>+</sup> Zellen. Die Dokumentation erfolgte mit dem BX60F5-Mikroskop (CellSens Dimension Software; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) und dem ColorView Soft Imaging System (Soft Imaging System GmbH, Münster) in 200-facher Vergrößerung.

## 4 Diskussion

Uhmann et al. (2014) zeigten, dass DMBA/TPA-behandelte *Ptch<sup>flox/flox</sup>-CD4Cre*-Mäuse neben, wie von DiGiovanni (1992) beschrieben, SCC und Papillomen auch BCC entwickeln. Mittels Knochenmarkstransplantationen wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass der Ursprung dieser BCC nicht im hämatopoetischen System, sondern höchstwahrscheinlich in einer neu entdeckten stammzellartigen, CD4-exprimierenden Keratinozytenpopulation liegt. Diese Zellen exprimieren neben CD4 den Keratinozytenmarker CD49f sowie die Stammzellmarker Sca-1 und CD34 und werden daher nachfolgend als CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-CD34<sup>int</sup> bezeichnet (Uhmann et al. 2014).

Die Entdeckung von CD4<sup>+</sup>-Zellen in muriner Haut führte zu der Frage, welche Charakteristika diese Zellen besitzen. Um die potentielle Stammzellartigkeit, die Lokalisation und den Ursprung von murinen CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit murine Epidermis durchflusszytometrisch und immunhistologisch auf die Expression von CD4 und Markerproteinen für epidermale Zellen hin untersucht. Zudem wurde ein Mausmodell zur *in-vivo*-Fluoreszenzmarkierung von CD4<sup>+</sup>-Zellen und deren Nachkommenschaft etabliert. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob ähnlich der murinen Epidermis auch in humaner Haut CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten existieren und welche Charakteristika diese Zellen aufweisen. Dazu wurden epidermale Zellen aus frischer, aus Mammareduktionsplastiken stammender Humanhaut isoliert, durchflusszytometrisch untersucht bzw. *in vitro* kultiviert sowie Paraffinschnitte von fixierten Hautproben immunhistologisch analysiert. Hierbei war auch von Interesse, ob CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten wie CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ein Infektionsziel von HIV darstellen können.

### 4.1 Charakterisierung muriner CD4-exprimierender Zellen

#### 4.1.1 Nachweis von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen in immundefizienten Mausmodellen

Bisherige Analysen von Uhmann et al. (2014) zeigten, dass CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-CD34<sup>int</sup>-Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs sind. Demzufolge sollten diese Zellen auch in immundefizienten Mäusen, wie bspw. *NOD-SCID*- und *Rag2<sup>-/-</sup>-γC<sup>-/-</sup>*-Mäusen, nachweisbar

sein. Aufgrund einer fehlenden V(D)J-Rekombination besitzen *NOD-SCID*- und *Rag2<sup>-/-</sup>-γc<sup>-/-</sup>*-Mäuse weder B- noch T-Zellen (Blunt et al. 1995; Mombaerts et al. 1992). Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit verifiziert werden, da die durchflusszytometrische Untersuchung zeigte, dass weder CD4 noch CD8, die typischerweise T-Zellen markieren (Koretzky 2010), auf Thymozyten von *NOD-SCID*- und *Rag2<sup>-/-</sup>-γc<sup>-/-</sup>*-Mäusen exprimiert werden. Interessanterweise konnten aber in den *NOD-SCID*- und *Rag2<sup>-/-</sup>-γc<sup>-/-</sup>*-Keratinocytenisolaten, ähnlich wie zuvor in Wildtyp-Mäusen, trotzdem CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Keratinocyten nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Existenz von CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermalen Zellen unabhängig vom Immunzellstatus ist und nicht in Zusammenhang mit dem Vorhandensein von T- oder B-Lymphozyten steht. Darüber hinaus schließen diese Daten aus, dass es sich bei CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermalen Zellen um die CD4-exprimierende, T-Zell-ähnliche Untergruppe der ILC, ILC1 handelt (Roan et al. 2016), da *Rag2<sup>-/-</sup>-γc<sup>-/-</sup>*-Mäuse keine ILC besitzen (Halim et al. 2012; Moro et al. 2010). Somit ist insgesamt von einer Zellpopulation nicht-hämatopoetischen Ursprungs auszugehen, die unabhängig von den verschiedenen Gruppen der Immunzellen steht.

#### 4.1.2 Etablierung eines Mausmodells zur Fluoreszenzmarkierung von CD4<sup>+</sup>-Keratinocyten

Um die Tochterzellen von CD4-exprimierenden Zellen in der Haut sichtbar zu machen und gleichzeitig eine möglichst geringe tdTomato-Fluoreszenzmarkierung von Immunzellen zu erreichen, wurde die Rückenhaut von *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mäusen topisch mit unterschiedlichen Konzentrationen Tamoxifen behandelt, um eine Aktivierung der Cre-Rekombinase in der Haut zu induzieren. Dabei wurde die Dosierung von anfänglich 2x 166 µg Tamoxifen auf 2x 300 µg und schließlich 2x 500 µg gesteigert, der Analysezeitpunkt betrug anfangs fünf und später 26 bzw. 25 Tage nach der ersten Tamoxifen-Applikation. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten, dass weder CD4/CD8 doppelt positive, noch CD4 oder CD8 einzel positive Thymozyten der Negativkontrollen und der Tamoxifen-behandelten Tiere tdTomato exprimierten (vgl. Abb. 7). Im Gegensatz dazu bewirkte die topische Tamoxifen-Applikation in Abhängigkeit der applizierten Dosierung in Zellen der Epidermis eine Rekombination am *R26-tdTomato*-Lokus. So stieg

die Anzahl tdTomato<sup>+</sup>-Zellen in den Keratinozytenisolaten mit erhöhter Tamoxifen-Dosierung und verlängertem Analysezeitraum an. Dabei stieg jedoch hauptsächlich die Anzahl epidermaler tdTomato<sup>+</sup>-Immunzellen an (siehe Abb. 7 C), während sich die Anzahl tdTomato<sup>+</sup>-Keratinozyten, die ein ähnliches CD49<sup>fhi</sup>-Sca-1-Expressionsmuster wie CD4<sup>+</sup>CD49<sup>fhi</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermale Zellen aufweisen, auch mit steigender Tamoxifendosis nicht erhöhte (siehe Abb. 8 C). Diese Daten zeigen, dass durch eine topische Tamoxifen-Behandlung der Rückenhaut von *CD4CreERT2-R26-tdTomato*-Mäusen eine Rekombination in T-Zellen im Thymus vermieden wird, jedoch mit steigender Tamoxifendosis ein erhöhter Anteil epidermaler Immunzellen tdTomato-markiert wird. Gleichzeitig wird aber auch eine Rekombination des tdTomato-Lokus in CD4<sup>+</sup>CD49<sup>fhi</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Keratinozyten bewirkt. Daher muss angenommen werden, dass eine Tamoxifendosierung von 2x 166 µg optimal für weiterführende Analysen ist, da mit einer erhöhten Dosis lediglich eine vermehrte Anzahl tdTomato-markierter epidermaler Immunzellen bewirkt wird, während die Anzahl an tdTomato<sup>+</sup>CD49<sup>fhi</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Keratinozyten stabil bleibt.

Allerdings stellt sich die Frage, warum der Anteil der tdTomato<sup>+</sup>-Keratinozyten in topisch Tamoxifen-behandelten *CD4CreERT2-R26-tdTomato*-Mäusen nur einem Zehntel der CD4<sup>+</sup>CD49<sup>fhi</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 5 C) bzw. der tdTomato<sup>+</sup>-Keratinozyten aus *R26-tdtomato-CD4Cre*-Kontrollmäusen entspricht (Abb. 5 C). Die Antwort hierauf könnte in der Lokalisation der gesuchten Zellen begründet sein. Zu Beginn der Analysen wurde vermutet, dass CD4<sup>+</sup>-Zellen SZ-ähnliche Keratinozyten sind und daher zum SZ-Reservoir der epidermalen Basalmembran gehören. Dieses ist in der IFE lokalisiert und besteht nach neueren Erkenntnissen aus interagierenden IFE-SZ und IFE-CP, die gemeinsam für die epidermale Homöostase und Wundheilung zuständig sind (Levy et al. 2005; Mascré et al. 2012). Für eine Lokalisation in der IFE sprachen die Expression von typischen Markern wie dem in der dermalen Papille zu findenden CD29 (Solanas und Benitah 2013) und den Retezapfen-spezifischen K15 (Webb et al. 2004) (siehe Abb. 14) und Sox2 (Laga et al. 2010) (siehe Abb. 15) in humaner Haut (siehe Kapitel 3.2.1, 3.2.2) sowie die geringe Expression des ORS-Markers CD34 in muriner Haut (Uhmann et al. 2014). Unterstützt wurde diese Vermutung durch DIF Analysen, in denen CD4<sup>+</sup>-K15<sup>+</sup>-CD29<sup>+</sup>-Sox2<sup>+</sup>-Zellen in der Basalmembran humaner Normalhautproben zu sehen waren (siehe Abb. 15).

Außerdem führte die topische Behandlung muriner Haut mit ATRA, welches für eine proliferative Wirkung auf IFE-SZ bekannt ist (Collins und Watt 2008; Jensen et al. 2009) tatsächlich zu einer erhöhten Anzahl CD4<sup>+</sup> epidermaler Zellen (siehe Abb. 10). Mit dem Proliferationsmarker Ki67 (Gerdes et al. 1984) markierte Zellen waren hiernach in IHC Analysen in der Basalmembran nachweisbar (siehe Abb. 12).

Die Theorie einer Lokalisation in der IFE bietet jedoch wenig Erklärungsmöglichkeiten für den in topisch Tamoxifen-behandelten *CD4CreERT2-R26-tdTomato*-Mäusen beobachteten geringeren Anteil von tdTomato<sup>+</sup>-Keratinocyten. Möglicherweise deutet dies darauf hin, dass zum Zeitpunkt der Tamoxifengabe weniger CD4-exprimierende epidermale Zellen vorliegen als zum Zeitpunkt der Analyse. Dies könnte bspw. dann der Fall sein, wenn die gesuchte Zellpopulation im HF lokalisiert ist und in Abhängigkeit von der Haarzyklusphase CD4 exprimieren würde. Die analysierten *CD4CreERT2-R26-tdTomato*-Mäuse waren zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Applikation 8-10 Wochen alt, so dass sich die Haare der Rückenhaut in der 2. telogenen Haarzyklusphase befanden (Müller-Röver et al. 2001). Abhängig vom Analysezeitpunkt nach der Tamoxifen-Behandlung (5 oder 25 bzw. 26 Tage) befanden sich die Haare also entweder noch in der telogenen Phase (5 Tage nach Tamoxifen) oder hatten die 3. anagene Phase erreicht (25 bzw. 26 Tage nach Tamoxifen). Tatsächlich wurden nur in den Mäusen, die 26 Tage nach Tamoxifen-Applikation analysiert wurden, tdTomato<sup>+</sup>-Keratinocyten nachgewiesen (2x 166 µg Tam, Abb. 8 C). In den Tieren, die bereits 5 Tage nach gleicher Tamoxifen-Behandlung (2x 166 µg Tam) untersucht wurden, wurden keine tdTomato<sup>+</sup> epidermalen Zellen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Einerseits könnte diese Beobachtung darauf zurückzuführen sein, dass der Zeitpunkt nach Tamoxifen-Applikation zu kurz gewählt war, um eine erfolgte Rekombination zu beobachten. Jedoch ist diese Vermutung eher unwahrscheinlich, da Untersuchungen unseres Labors zeigen, dass bereits nach weniger als 48 h *in vivo* nach Tamoxifengabe eine Rekombination am *R26-tdTomato*-Lokus nachgewiesen werden kann (unveröffentlichte Daten). Daher ist es wahrscheinlicher, dass sich die Anzahl der gesuchten Zellen bzw. deren Tochterzellen in der proliferativen anagenen Haarzyklusphase bzw. dem Übergang zwischen telogener und anagener Phase erhöht und damit nachweisbar wird. Da außerdem der natürliche Haarzyklus der Rückenhaut in den untersuchten Tieren nicht gänzlich synchron abläuft, sich also die

Haare in unterschiedlich weit fortgeschrittenen Phasen des Haarzyklus befunden haben, ist anzunehmen, dass, sollte eine CD4-Expression zeitlich begrenzt sein, nur ein geringer Prozentsatz der Zielpopulation zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Gabe CD4 exprimiert. Dementsprechend wird der Anteil später nachweisbarer tdTomato<sup>+</sup>-Keratinocyten von der Anzahl der zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Gabe CD4-exprimierender Ausgangszellen und deren anschließender Proliferationsrate bestimmt. Tatsächlich zeigen neuere Analysen von Anja Uhmann, dass tdTomato<sup>+</sup>-Keratinocyten aus *CD4Cre-R26-tdTomato*-Mäusen im HF lokalisiert sind und deren Anzahl während der anagenen Haarzyklusphasen zunehmen. Jedoch muss bei der Interpretation der hier dargestellten Resultate berücksichtigt werden, dass die oben genannten geschätzten Haarzyklusphasen der *CD4CreERT2-R26-tdTomato*-Mäuse nicht überprüft wurden und in zukünftigen Experimenten genau bestimmt werden sollten. Dazu würde sich eine histologische Begutachtung von Hautproben zum Zeitpunkt der Analyse oder eine Synchronisation des Haarzyklus mittels Epilation eignen. Bei letzter Methode müsste jedoch beachtet werden, dass aufgrund einer Epilations-bedingten Haarzyklussynchronisation der Eintritt in die anagene Phase induziert wird (Silver und Chase 1970; Ito et al. 2002). Da aber die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hinweisen, dass die Zielzellen entweder vor Eintritt in die anagene Phase – also am Ende der telogenen Phase – oder beim Übergang zwischen telogener und anagen Phase CD4 exprimieren bzw. proliferieren, müsste der Zeitpunkt der Tamoxifen-Gabe vor der Synchronisation liegen oder aber am Ende eines synchronisierten Haarzyklus durchgeführt werden (ca. 7-8 Wochen nach Synchronisation).

Eine mögliche Alternative zum *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mausmodell wäre die Verwendung des *R26-tdTomato-CD4Cre*-Mausmodells, wobei in Kauf genommen werden müsste, dass sich eine Fluoreszenzmarkierung von CD4<sup>+</sup>-Immunzellen nicht vermeiden lässt (Lee et al. 2001). Außerdem werden in diesem Modell kontinuierlich Zellen mit dem *tdtomato*-Protein markiert, wodurch keine zeitlichen Abgrenzungen möglich sind. Vielmehr scheint es sinnvoll, *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mäusen Tamoxifen auf anderem Wege zu applizieren. Die Induktion der *CreERT2* konnte bereits durch i.m. und i.p. Tamoxifen-Applikation erreicht werden (Uhmann et al. 2007; Nitzki 2008). Zwar würden auch hier durch die bessere Verteilung des Tamoxifens im Organismus CD4<sup>+</sup>-Immunzellen



fluoreszenzmarkiert werden, dafür ließe sich evtl. eine erhöhte Markierungsrate von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt erreichen.

Letztlich können nur immunhistologische Färbungen oder eine Isolation von tdTomato<sup>+</sup>-Zellen aus *R26-tdtomato-CD4Cre-* und/oder Tamoxifen-induzierten *R26-tdtomato-CD4CreERT2*-Mäusen mit anschließender *in-vitro*-Kultivierung den Nachweis erbringen, dass es sich bei diesen Zellen um Keratinozyten handelt.

#### 4.1.3 ATRA induziert die Proliferation von CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen

Die mit dem Vitamin A verwandten Retinoide sind dafür bekannt, einen modulierenden Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten zu haben (Lee et al. 2009). Sie werden daher u.a. in der Behandlung dermatologischer Krankheiten verwendet (Buchanan und Gilman 2016). Auch für die *all-trans*-Retinsäure (ATRA) konnte gezeigt werden, dass es bei Anwendung *in vivo* die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten induziert. Dies gilt vor allem für die SZ der IFE (Jensen et al. 2009), womit jener Bereich der Epidermis bezeichnet wird, der zwischen den HF und dazugehörigen Talgdrüsen liegt (Blanpain und Fuchs 2009). Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit angenommen wurde, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen in der IFE lokalisiert sind, sollte untersucht werden, ob ATRA auch auf diese Zellpopulation proliferationsinduzierend wirkt.

Tatsächlich zeigten die durchflusszytometrischen Analysen von mit 0,5 mM ATRA behandelte Rücken haut von C57BL6/N-Mäusen, dass eine topische Applikation von ATRA zu einer deutlich erhöhten Anzahl CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermalen Zellen führt. Dabei wurden 7 d nach Behandlung signifikant mehr CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermalen Zellen im Vergleich zu den Kontrollen detektiert während 14 d nach Behandlung der Anteil der CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermalen Zellen bereits wieder sank. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Analyse der CD4<sup>-</sup>-CD49<sup>+</sup>-Keratinozyten nicht gemacht. Da diese Daten vermuten ließen, dass ATRA Proliferation-induzierend auf CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Zellen wirkt, wurden die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 immunhistologisch untersucht. Tatsächlich zeigen auch diese Analysen, dass 7 d nach ATRA-Behandlung signifikant mehr proliferierende Ki67<sup>+</sup> epidermale Zellen im Vergleich zu den Kontrollen

bzw. den 14 d nach ATRA-Behandlung untersuchten Proben aufweisen. Diese Resultate weisen auf eine Korrelation zwischen der Applikation von ATRA und der Proliferation von CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermalen Zellen hin. Da zur Erhaltung der Epidermis hauptsächlich SZ der Basalzellschicht proliferativ aktiv sind (Blanpain und Fuchs 2006), untermauern diese Ergebnisse die Annahme, dass es sich bei CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup> epidermalen Zellen um eine stammzellartige Population handelt. Die abnehmende Proliferationsrate 14 d nach ATRA-Behandlung ist dabei mit nachlassender Wirkung des ATRA zu erklären. Schließlich könnten diese Analysen als Grundlage dafür verwendet werden, durch topische Behandlung mit ATRA die CD4<sup>+</sup>-Keratinozytenpopulation bzw. deren Tochterzellen *in vivo* für anschließende Analysen anzureichern.

Insgesamt konnte somit der proliferative Effekt von ATRA vor allem auf Zellen der IFE bestätigt werden (Collins und Watt 2008; Jensen et al. 2009). Nicht eindeutig nachweisen ließ sich hingegen, dass die CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Keratinozyten zu den ATRA-stimulierten Zellen der IFE gehören. In diesem Fall müsste auch in *R26-tdTomato-CD4Cre-7-d-ATRA*-Haut der Nachweis von klonal wachsenden tdTomato<sup>+</sup>-Zellen gelingen. Da dies allerdings nicht möglich war (siehe Kap. 3.1.3) ist eine Lokalisation der CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Keratinozyten in der Basalmembran der IFE fraglich. Auch andere Experimente lieferten Hinweise auf Lokalisation der CD4<sup>+</sup>-CD49<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Keratinozyten in einem anderen Kompartiment der Haut (Abb. 5 C). So konnte in weiterführenden Analysen nachgewiesen werden, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen überwiegend im HF lokalisiert sind und ihre Anzahl Schwankungen während des Haarzyklus unterliegt (siehe Kap. 4.1.2).

#### 4.1.4 Detektionsmethoden von LRC nach *In-vivo*-BrdU-Inkorporation

SZ können aufgrund ihrer niedrigen Teilungsrate dadurch detektiert werden, dass bei ihnen eine DNA-Markierung mit BrdU wesentlich länger nachzuweisen ist als in schnell proliferierenden Zellen, in denen die Markierung durch häufige Zellteilungen verloren geht (Bickenbach 1981). Sie werden daher als LRC bezeichnet. Üblicherweise wird der Nachweis einer BrdU-Markierung dabei mittels IHC (Braun et al. 2003) oder Durchflusszytometrie (Rothausler und Baumgarth 2006) geführt. Trotz in diesem Fall kaum möglicher durchflusszytometrischer Detektierung von BrdU<sup>+</sup>-Zellen konnten diese

doch immunhistologisch nachgewiesen werden. Die hierbei doppelt tdTomato- und BrdU-positiven Zellen im *R26tdTomato-CD4Cre*-Mausmodell zeigen, dass BrdU über einen langen Zeitraum in CD4<sup>+</sup> epidermalen Zellen nachweisbar ist. Die CD4<sup>+</sup>-Keratinocyten müssten daher zu den LRC gezählt werden. Um dieses Ergebnis durch auswertbare durchflusszytometrische Analysen zu unterstützen, sollten in weiterführenden Experimenten die Dosis der BrdU-Behandlung reduziert (Bickenbach und Chism 1998) oder der Zeitraum zwischen Behandlung und Analyse verlängert werden. Gleichwohl ist die längerfristige BrdU-Markierung von DNA als notwendiges Kriterium für Stammzellartigkeit umstritten. So konnten Jones und Klein (2013) in mindestens zwei Fällen SZ nicht als LRC identifizieren, obwohl ein Zusammenhang zwischen SZ und LRC belegt ist (Bickenbach und Mackenzie 1984; Braun et al. 2003). Jones und Klein (2013) geben hierbei zu Bedenken, dass seltene oder sehr langsam teilende SZ nicht durch die BrdU-Markierung erfasst werden könnten. In den hier durchgeführten Experimenten erfolgte eine BrdU-Injektion lediglich über zwei Tage. Gleichzeitig stellen die zu untersuchenden Zellen mit nur 0,23 % aller Keratinocyten (Uhmann et al. 2014) eine seltene Population der Epidermis dar, welche sich, wie vermutet, als *slow-cycling*-IFE-SZ sehr langsam teilen. Die fehlende durchflusszytometrische Detektierbarkeit von BrdU<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-Keratinocyten ließe sich somit erklären, könnte aber eventuell durch einen verlängerten Behandlungszeitraum mit BrdU verbessert werden.

## 4.2 Charakterisierung humaner CD4<sup>+</sup> epidermaler Zellen

### 4.2.1 Eigenschaften humaner CD4<sup>+</sup> epidermaler Zellen

CD4-exprimierende epidermale Zellen wurden erstmalig durch Uhmann et al. (2014) in muriner Haut beschrieben. Darüber hinaus konnten in Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit CD4<sup>+</sup>-Zellen auch in frischer humaner Brusthaut nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun anhand durchflusszytometrischer Analysen gezeigt, dass diese Zellen keine hämatopoetischen Marker exprimieren und somit wie murine CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs sind. Zusätzlich dazu wurde die Stammzellartigkeit humaner CD4<sup>+</sup>-Keratinocyten durch den Expressionsnachweis der SZ-Marker CD29 und K15 und die Abwesenheit des Negativmarkers CD71 sowie des

Keratinocytenmarkers CD49f erbracht (siehe Abb. 14). Unklar hingegen ist, in welchem SZ-Kompartiment sie lokalisiert sind, da im Gegensatz zum Basalzell- und Wulst-SZ-Marker K15 der reine Wulst-Marker CD200 und der IFE-Marker CD34 durchflusszytometrisch nicht nachgewiesen werden konnten. Mittels immunhistologischer Untersuchungen wurden außerdem vereinzelte CD4<sup>+</sup>-Zellen in der Basalzellschicht, die neben K15 und CD29 auch den für die Retezapfen typischen Marker Sox2 exprimieren, nachgewiesen (siehe Abb. 15). Dieses Ergebnis ließe auf eine Lokalisation der CD4<sup>+</sup>-Zellen in der IFE schließen, allerdings müssten dann immunhistologisch deutlich mehr CD4<sup>+</sup>-K15<sup>+</sup>-CD29<sup>+</sup>-Sox2<sup>+</sup>-Zellen in der Basalzellschicht zu finden sein. Aufgrund neuerer, noch unveröffentlichter Analysen von Anja Uhmann an *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mäusen ist auch zu erwägen, dass CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen ähnlich wie in der murinen Haut auch in der humanen Haut am HF lokalisiert sind. Weitere Experimente zur gezielten immunhistologischen Untersuchung des HF-Kompartiments sowie die Entwicklung einer Methode zur *ex-vivo*-Induktion der SZ-Proliferation könnten Aufschluss über die Lokalisation humaner CD4<sup>+</sup> stammzellähnlicher Keratinocyten geben.

Zusätzlich zu den Erkenntnissen zu Ursprung und Stammzellartigkeit wurde untersucht, ob CD4<sup>+</sup>-Keratinocyten auch ein mögliches Infektionsziel von HIV darstellen, da das u.a. am Eindringen von HI-Viren in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen beteiligte CD4-Protein bisher nur in hämatopoetischen Zellen bekannt ist (Cicala et al. 2011). Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass humane CD4<sup>+</sup> epidermale Zellen CXCR4 exprimieren (siehe Abb. 14 B). Dieses Protein dient als Co-Rezeptor bei der Invasion des HI-Virus in menschliche Wirtszellen, indem es mit dem HIV-Hüllprotein gp120 interagiert. Die darauf folgende Konformitätsänderung führt zur Fusion der Viruszelle mit der Zellmembran der Wirtszelle (Vicenzi et al. 2013; Chan und Kim 1998). Aufgrund des Nachweises von CXCR4 auf CD4<sup>+</sup>-Keratinocyten ist wahrscheinlich, dass diese Zellen, ähnlich wie sonst CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, vom HI-Virus befallen werden können und somit ein bisher unbekanntes Reservoir für das Virus darstellen. In weiteren Experimenten sollten nun CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>+</sup>-CD29<sup>+</sup> epidermale Zellen *in vitro* kultiviert und expandiert werden. Im Anschluss könnte dann untersucht werden, ob eine HIV-Infektion und anschließende Virusvermehrung in diesen kultivierten Zellen möglich ist.

Insgesamt zeigen die Analysen, dass humane CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>+</sup>-CD29<sup>+</sup>-K15<sup>+</sup> epidermale Zellen sowohl in ihrem nicht-hämatopoetischen Ursprung als auch ihrer Stammzellartigkeit ähnliche Eigenschaften aufweisen wie murine CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Zellen. Somit ist davon auszugehen, dass die humanen CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten den bereits untersuchten murinen CD4<sup>+</sup>-Keratinozyten entsprechen.

#### 4.2.2 *Ex vivo*-Kultivierung humaner Epidermis

Mittels durchflusszytometrischer Methoden ließen sich viele Parallelen zwischen Eigenschaften von murinen und humanen CD4<sup>+</sup>-CD49f<sup>high</sup>-Sca-1<sup>+</sup>-Zellen aufweisen. Daher sollte untersucht werden, ob proliferationsinduzierende Substanzen auf humane Haut einen ähnlichen Effekt wie auf murine Haut haben (Kap. 4.1.3). Hierbei wurde neben ATRA das ähnlich wirkende TPA verwendet, welches neben der IFE auch proliferativ auf HF wirkt (Braun et al. 2003; Mascré et al. 2012; Pittelkow et al. 1989). Da eine *in-vivo*-Applikation auf humaner Brusthaut nicht möglich war, wurden asservierte Hautproben *ex vivo* in Form von *epidermal sheets* mit den Substanzen kultiviert. Hierbei zeigte sich jedoch, dass die Zugabe von ATRA bzw. TPA vielmehr zu einer Abnahme des Proliferationsmarkers Ki67 führte (siehe Abb. 16). Dies könnte bei mit ATRA behandelten *epidermal sheets* in einem durch Retinoide ausgelösten Stopp der epidermalen Differenzierung begründet sein (García-Serrano et al. 2011). Bei TPA-behandelten Proben wäre der Rückgang der Ki67-Expression auf die zellzyklusverlängernden Eigenschaften des TPA zurückzuführen, wodurch die Ki67-Expression auf ein nicht-detektierbares Niveau sinkt (Tsurusawa und Fujimoto 1995). Die dazu im Kontrast stehende zunehmende Verdickung der mit TPA behandelten Haut könnte durch eine Inhibierung der terminalen Differenzierung (Osborne et al. 1981) statt der erwarteten Proliferationsinduktion erklärt werden.

Da es mit fortwährender Kultivierungsdauer insgesamt zu einer Abnahme der Gewebeintegrität kam, könnte die fehlende Proliferation auch auf schlechte Kultivierungsbedingungen, wie etwa durch eine falsche Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien, zurückzuführen sein. Daher wurde im Anschluss die

Kultivierung der *epidermal sheets* von Müllen (2016) unter Anwendung eines anderen Mediums nach Gibbs et al. (1996) modifiziert, um die Gewebe besser erhalten zu können.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden  $CD4^+$ - $CD49^{\text{high}}$ - $Sca-1^+$ - $CD34^{\text{int}}$ -Zellen der murinen Epidermis und  $CD4^+$ - $CD49^{\text{high}}$ - $CD29^+$ -Zellen der humanen Epidermis erfolgreich nachgewiesen und detaillierter charakterisiert. So zeigt diese Arbeit, dass  $CD4^+$ - $CD49^{\text{high}}$ -Zellen Teil der Keratinozytenpopulation der Haut sind und nicht von hämatopoetischen Zellen abstammen. Zusätzlich bestätigten Analysen zur Expression verschiedener stammzellspezifischer Marker den vermuteten stammzellartigen Charakter der Zellen. Daneben wurde der für das Eindringen des HI-Virus in die Zelle notwendige Rezeptor CXCR4 auf humanen  $CD4^+$ - $CD49^{\text{high}}$ - $CD29^+$  epidermalen Zellen nachgewiesen, sodass eine mögliche Reservoirfunktion von  $CD4^+$ -Keratinozyten für HI-Viren denkbar wäre. Erste Versuche zur für weitere Untersuchungen notwendige Kultivierung der Zellen sowohl in Form von Keratinozytenisolaten als auch humaner *epidermal sheets* im Gewebeverband zeigten jedoch, dass entsprechende Kultivierungsbedingungen für zukünftige Experimente optimiert werden müssen. Um für weiterführende Experimente ein geeignetes Mausmodell zur Verfügung zu stellen, wurden außerdem initiale Untersuchungen an *R26-tdTomato-CD4Cre*- und *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mäusen durchgeführt. Diese zeigten, dass zwar eine topische Tamoxifen-Applikation im *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mausmodell nicht zu einer hinreichenden *in-vivo*-Markierung der Zielzellen führt, sich jedoch alternativ *R26-tdTomato-CD4Cre*-Mäuse sehr gut für diese Untersuchungen eignen. Schließlich wurde die zunächst vermutete Lokalisation der  $CD4^+$ - $CD49^{\text{high}}$  epidermalen Zellen in der Interfollikulären Epidermis durch den geringen Anteil von  $tdTomato^+$ -Keratinozyten in Tamoxifen-behandelten *R26-tdTomato-CD4CreERT2*-Mäusen sowie die nicht eindeutig nachweisbare Zugehörigkeit der  $CD4^+$ - $CD49^{\text{high}}$ - $Sca-1^+$ -Keratinozyten zu den durch ATRA stimulierten Zellen der Interfollikulären Epidermis in Frage gestellt. Tatsächlich zeigten neuere, bislang unveröffentlichte Untersuchungen, dass  $CD4^+$ -Keratinozyten in der murinen Epidermis eine Stammzell-Population am Haarfollikel darstellen.

Zusammengefasst bilden die Resultate dieser Arbeit wichtige Grundlagen für die weitere Charakterisierung von  $CD4^+$ -Keratinozyten mittels geeigneter Mausmodelle und

Kultivierungsmethoden. Erste Erkenntnisse zu ihrem Ursprung, ihrer Funktion und Lokalisation lassen sich so weiter vertiefen und ergänzen.



## 6 Literaturverzeichnis

- Aasen T, Izpisua Belmonte JC (2010): Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 5, 371–382
- Bando JK, Colonna M (2016): Innate lymphoid cell function in the context of adaptive immunity. *Nat Immunol* 17, 783–789
- Bickenbach JR (1981): Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res* 60, Spec No C, 1611–1620
- Bickenbach JR, Chism E (1998): Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. *Exp Cell Res* 244, 184–195
- Bickenbach JR, Mackenzie IC (1984): Identification and localization of label-retaining cells in hamster epithelia. *J Invest Dermatol* 82, 618–622
- Blanpain C, Fuchs E (2006): Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 339–373
- Blanpain C, Fuchs E (2009): Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 207–217
- Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, Smith GC, Demengeot J, Gottlieb TM, Mizuta R, Varghese AJ, Alt FW, Jeggo PA et al. (1995): Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 80, 813–823
- Bosma MJ, Carroll AM (1991): The SCID mouse mutant: Definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9, 323–350
- Bosselut R (2004): CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: From nuclear effectors to membrane signals. *Nat Rev Immunol* 4, 529–540
- Boulais N, Misery L (2008): The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol* 18, 119–127
- Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V, Watt FM (2003): Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: Visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development* 130, 5241–5255
- Buchanan PJ, Gilman RH (2016): Retinoids: Literature Review and Suggested Algorithm for Use Prior to Facial Resurfacing Procedures. *J Cutan Aesthet Surg* 9, 139–144
- Champion RH, Rook GA, Wilkinson DS, Ebling FJG (Hrsg.): *Textbook of dermatology*: In four volumes. 6. Auflage; Blackwell, Oxford 1998
- Chan DC, Kim PS (1998): HIV entry and its inhibition. *Cell* 93, 681–684
- Cicala C, Arthos J, Fauci AS (2011): HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *J Transl Med* 9, Suppl 1, S2
- Clayton E, Doupé DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH (2007): A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* 446, 185–189
- Coffman RL, Weissman IL (1981): B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* 289, 681–683

- Collins CA, Watt FM (2008): Dynamic regulation of retinoic acid-binding proteins in developing, adult and neoplastic skin reveals roles for beta-catenin and Notch signalling. *Dev Biol* 324, 55–67
- DiGiovanni J (1992): Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther* 54, 63–128
- Doupé DP, Klein AM, Simons BD, Jones PH (2010): The ordered architecture of murine ear epidermis is maintained by progenitor cells with random fate. *Dev Cell* 18, 317–323
- Edelbaum D, Mohamadzadeh M, Bergstresser PR, Sugamura K, Takashima A (1995): 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* 105, 837–843
- Fais F, Morabito F, Stelitano C, Callea V, Zanardi S, Scudeletti M, Varese P, Ciccone E, Grossi CE (2004): CD1d is expressed on B-chronic lymphocytic leukemia cells and mediates alpha-galactosylceramide presentation to natural killer T lymphocytes. *Int J Cancer* 109, 402–411
- García-Serrano L, Gomez-Ferrería MA, Contreras-Jurado C, Segrelles C, Paramio JM, Aranda A (2011): The thyroid hormone receptors modulate the skin response to retinoids. *PLoS ONE* 6, e23825
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133, 1710–1715
- Ghazizadeh S, Taichman LB (2005): Organization of stem cells and their progeny in human epidermis. *J Invest Dermatol* 124, 367–372
- Gibbs S, Backendorf C, Ponec M (1996): Regulation of keratinocyte proliferation and differentiation by all-trans-retinoic acid, 9-cis-retinoic acid and 1,25-dihydroxy vitamin D3. *Arch Dermatol Res* 288, 729–738
- Halim TYF, Krauss RH, Sun AC, Takei F (2012): Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* 36, 451–463
- Hall PA, Watt FM (1989): Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106, 619–633
- Ito M, Kizawa K, Toyoda M, Morohashi M (2002): Label-retaining cells in the bulge region are directed to cell death after plucking, followed by healing from the surviving hair germ. *J Invest Dermatol* 119, 1310–1316
- Jensen KB, Collins CA, Nascimento E, Tan DW, Frye M, Itami S, Watt FM (2009): Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell Stem Cell* 4, 427–439
- Jensen KB, Driskell RR, Watt FM (2010): Assaying proliferation and differentiation capacity of stem cells using disaggregated adult mouse epidermis. *Nat Protoc* 5, 898–911
- Jersmann HPA (2005): Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunol Cell Biol* 83, 462–467
- Jones KB, Klein OD (2013): Oral epithelial stem cells in tissue maintenance and disease: the first steps in a long journey. *Int J Oral Sci* 5, 121–129

- Jones PH, Harper S, Watt FM (1995): Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 80, 83–93
- Kolodka TM, Garlick JA, Taichman LB (1998): Evidence for keratinocyte stem cells in vitro: long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4356–4361
- Koretzky GA (2010): Multiple roles of CD4 and CD8 in T cell activation. *J Immunol* 185, 2643–2644
- Kumar S (2007): Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14, 32–43
- Laga AC, Lai C-Y, Zhan Q, Huang SJ, Velazquez EF, Yang Q, Hsu M-Y, Murphy GF (2010): Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: Relevance to melanocyte and merkel cell biology. *Am J Pathol* 176, 903–913
- Lavker RM, Sun TT (1982): Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science* 215, 1239–1241
- Lawlor KT, Kaur P (2015): Dermal Contributions to Human Interfollicular Epidermal Architecture and Self-Renewal. *Int J Mol Sci* 16, 28098–28107
- Lee D-D, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Vouthounis C, Blumenberg M, Tomic-Canic M (2009): Retinoid-responsive transcriptional changes in epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol* 220, 427–439
- Lee PP, Fitzpatrick DR, Beard C, Jessup HK, Lehar S, Makar KW, Pérez-Melgosa M, Sweetser MT, Schlissel MS, Nguyen S et al. (2001): A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. *Immunity* 15, 763–774
- Levy V, Lindon C, Harfe BD, Morgan BA (2005): Distinct stem cell populations regenerate the follicle and interfollicular epidermis. *Dev Cell* 9, 855–861
- Li A, Simmons PJ, Kaur P (1998): Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3902–3907
- Lyle S, Christofidou-Solomidou M, Liu Y, Elder DE, Albelda S, Cotsarelis G (1998): The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3179–3188
- Maddon PJ, Molineaux SM, Maddon DE, Zimmerman KA, Godfrey M, Alt FW, Chess L, Axel R (1987): Structure and expression of the human and mouse T4 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9155–9159
- Mascre G, Dekoninck S, Drogat B, Youssef KK, Broheé S, Sotiropoulou PA, Simons BD, Blanpain C (2012): Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature* 489, 257–262
- Michel KD, Uhmman A, Dressel R, van den Brandt J, Hahn H, Reichardt HM (2013): The hedgehog receptor patched1 in T cells is dispensable for adaptive immunity in mice. *PLoS ONE* 8, e61034
- Mizumoto N, Takashima A (2004): CD1a and langerin: Acting as more than Langerhans cell markers. *J. Clin. Invest.* 113, 658–660

- Moll, I. (Hrsg.): Dermatologie (Duale Reihe), 8. vollständig überarbeitete Auflage; Thieme, Stuttgart 2016
- Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE (1992): RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869–877
- Montagna W, Parakkal PF (Hrsg.): The structure and function of skin. 3. Auflage; Academic Press, New York 1974
- Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J-I, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S (2010): Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463, 540–544
- Müllen A: Charakterisierung von CD4 exprimierenden Zellen der murinen und humanen Epidermis. Biol. Bachelorarbeit Göttingen 2016
- Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R (2001): A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol* 117, 3–15
- Murphy GF, Flynn TC, Rice RH, Pinkus GS (1984): Involucrin expression in normal and neoplastic human skin: a marker for keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol* 82, 453–457
- Nitzki F: Patched-assoziierte Tumoren: Modifikatorgene und Pathogenese. Biol. Diss. Göttingen 2008
- Oettinger M, Schatz D, Gorka C, Baltimore D (1990): RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517–1523
- Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, Radonovich MF, Pise-Masison CA, Hopping SB, Brady JN, Udey MC, Vogel JC (2006): Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest* 116, 249–260
- Osborne CK, Hamilton B, Nover M, Ziegler J (1981): Antagonism between epidermal growth factor and phorbol ester tumor promoters in human breast cancer cells. *J Clin Invest* 67, 943–951
- Palmer S, Josefsson L, Coffin JM (2011): HIV reservoirs and the possibility of a cure for HIV infection. *J Intern Med* 270, 550–560
- Petrie HT, Zuniga-Pflucker JC (2007): Zoned out: Functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol* 25, 649–679
- Pittelkow MR, Lindquist PB, Abraham RT, Graves-Deal R, Derynck R, Coffey RJ (1989): Induction of transforming growth factor-alpha expression in human keratinocytes by phorbol esters. *J Biol Chem* 264, 5164–5171
- Pommerencke T, Steinberg T, Dickhaus H, Tomakidi P, Grabe N (2008): Nuclear staining and relative distance for quantifying epidermal differentiation in biomarker expression profiling. *BMC Bioinformatics* 9, 473
- Potten CS (1974): The epidermal proliferative unit: The possible role of the central basal cell. *Cell Prolif* 7, 77–88

- Potten CS, Saffhill R, Maibach HI (1987): Measurement of the transit time for cells through the epidermis and stratum corneum of the mouse and guinea-pig. *Cell Tissue Kinet* 20, 461–472
- Rahmani W, Abbasi S, Hagner A, Raharjo E, Kumar R, Hotta A, Magness S, Metzger D, Biernaskie J (2014): Hair follicle dermal stem cells regenerate the dermal sheath, repopulate the dermal papilla, and modulate hair type. *Dev Cell* 31, 543–558
- Ro S, Rannala B (2004): A stop-EGFP transgenic mouse to detect clonal cell lineages generated by mutation. *EMBO Rep* 5, 914–920
- Roan F, Stoklasek TA, Whalen E, Molitor JA, Bluestone JA, Buckner JH, Ziegler SF (2016): CD4+ Group 1 Innate Lymphoid Cells (ILC) Form a Functionally Distinct ILC Subset That Is Increased in Systemic Sclerosis. *J Immunol* 196, 2051–2062
- Rosenblum MD, Olasz EB, Yancey KB, Woodliff JE, Lazarova Z, Gerber KA, Truitt RL (2004): Expression of CD200 on epithelial cells of the murine hair follicle: A role in tissue-specific immune tolerance? *J Invest Dermatol* 123, 880–887
- Rothaeusler K, Baumgarth N (2006): Evaluation of intranuclear BrdU detection procedures for use in multicolor flow cytometry. *Cytometry A* 69, 249–259
- Schmitt TM, Zúñiga-Pflücker JC (2002): Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17, 749–756
- Senoo M (2013): Epidermal Stem Cells in Homeostasis and Wound Repair of the Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2, 273–282
- Serreze DV, Gaedeke JW, Leiter EH (1993): Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: Defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9625–9629
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S (2015): Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 22, 526–539
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY (2004): Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22, 1567–1572
- Shi G, Sohn K-C, Li Z, Choi D-K, Park YM, Kim J-H, Fan Y-M, Nam YH, Kim S, Im M et al. (2013): Expression and functional role of Sox9 in human epidermal keratinocytes. *PLoS ONE* 8, e54355
- Shreedhar V, Moodycliffe AM, Ullrich SE, Bucana C, Kripke ML, Flores-Romo L (1999): Dendritic Cells Require T Cells for Functional Maturation In Vivo. *Immunity* 11, 625–636
- Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan TV, Greiner DL (1995): Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154, 180–191
- Silver AF, Chase HB (1970): DNA synthesis in the adult hair germ during dormancy (telogen) and activation (early anagen). *Dev Biol* 21, 440–451
- Solanas G, Benitah SA (2013): Regenerating the skin: A task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 737–748

- Tani H, Morris RJ, Kaur P (2000): Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10960–10965
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun T-T, Lavker RM (2000): Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. *Cell* 102, 451–461
- Triel C, Vestergaard ME, Bolund L, Jensen TG, Jensen UB (2004): Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp Cell Res* 295, 79–90
- Tsurusawa M, Fujimoto T (1995): Cell cycle progression and phenotypic modification of Ki67 antigen-negative G1- and G2-phase cells in phorbol ester-treated Molt-4 human leukemia cells. *Cytometry* 20, 146–153
- Uhmann A, Dittmann K, Nitzki F, Dressel R, Koleva M, Frommhold A, Zibat A, Binder C, Adham I, Nitsche M et al. (2007): The Hedgehog receptor Patched controls lymphoid lineage commitment. *Blood* 110, 1814–1823
- Uhmann A, Heß I, Frommhold A, König S, Zabel S, Nitzki F, Dittmann K, Lühder F, Christiansen H, Reifenberger J et al. (2014): DMBA/TPA treatment is necessary for BCC formation from patched deficient epidermal cells in Ptch(flox/flox)CD4Cre(+/-) mice. *J Invest Dermatol* 134, 2620–2629
- Uhmann A, van den Brandt J, Dittmann K, Hess I, Dressel R, Binder C, Lühder F, Christiansen H, Fassnacht M, Bhandoola A et al. (2011): T cell development critically depends on prethymic stromal patched expression. *J Immunol* 186, 3383–3391
- Vicenzi E, Liò P, Poli G (2013): The puzzling role of CXCR4 in human immunodeficiency virus infection. *Theranostics* 3, 18–25
- Webb A, Li A, Kaur P (2004): Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation* 72, 387–395
- Weil M, Raff MC, Braga VM (1999): Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr Biol* 9, 361–364
- Weiss A, Littman DR (1994): Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263–274
- Wolfer A, Bakker T, Wilson A, Nicolas M, Ioannidis V, Littman DR, Lee PP, Wilson CB, Held W, MacDonald HR et al. (2001): Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat Immunol* 2, 235–241

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei PD Dr. rer. nat. Anja Uhmann bedanken. Mit Dir zu arbeiten, von Dir wissenschaftliche Methoden zu lernen und mit Dir Ergebnisse immer wieder in den Kontext setzen zu können hat mir große Freude am wissenschaftlichen Arbeiten vermittelt. Nicht zuletzt Deine Geduld, Deine herzliche Art und Deine Bereitschaft, mir immer wieder unter die Arme zu greifen haben dazu beigetragen, dass diese Arbeit doch noch ein glückliches Ende findet.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Heidi Hahn, unter deren Betreuung ich zuerst diese Doktorarbeit beginnen durfte und die mir die Mitarbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglichte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Kai Dittmann für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der FACS-Analysen, immer wieder verbunden mit hilfreichen Tipps und interessanten Gesprächen.

In der Arbeitsgruppe danke ich besonders Ina Heß und Anke Frommhold für die vielen Genotypisierungen, Anfertigungen von Gewebeschnitten und ihre Hilfestellung bei zahlreichen Fragen, außerdem meinen Kolleginnen Julia Dräger, Natalie Hönig, Julia Heise und Joanna Pyczek für ein wunderbares Arbeitsklima und dafür, dass es immer etwas zu feiern gab.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Pflegern des Tierstalls für die gute Pflege der Versuchstiere.

Ein weiterer und letzter Dank geht an Frau Dr. med. Claudia Choi-Jacobshagen, Chefärztin des Operativen Brustzentrums am Evangelischen Krankenhaus Göttingen-Weende, deren Kollaboration die Untersuchung gesunder menschlicher Haut ermöglichte.