

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Prof. Dr. med. M. P. Schön)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Strukturelle und funktionelle
Charakterisierung Filaggrin/Hornerin-
defizienter (*FlgHrnr*^{-/-}) Mäuse**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Sebastian Michael Rahrig

aus

Leinefelde

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Brück

Referent: Prof. Dr. Michael P. Schön

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Lutz Walter

Drittreferent/in: Prof. Dr. Thomas Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 05.03.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Strukturelle und funktionelle Charakterisierung Filaggrin/Hornerin-defizienter (*FlgHrrr*^{-/-}) Mäuse“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 10.06.2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion der Haut	1
1.2 Der Verhornungsprozess.....	2
1.3 Der atopische Formenkreis	3
1.4 Filaggrin in der Zellverhornung.....	4
1.5 Hornerin.....	6
1.6 Mausmodelle zur Hautbarriere-Defizienz.....	7
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Mauslinien	10
2.1.2 Chemikalien.....	10
2.1.3 Reaktionssysteme	11
2.1.4 Antikörper.....	12
2.1.5 Primer	12
2.1.6 Geräte.....	13
2.1.7 Verbrauchsmaterialien	14
2.1.8 Lösungen und Puffer.....	15
2.2 Methoden	17
2.2.1 Mausgenerierung und Zucht	17
2.2.2 Zeitplanung der Verpaarungen und Alter der Tiere bei Versuchsdurchführung	18
2.2.3 Untersuchung des Phänotyps	19
2.2.4 Histologische Untersuchungen	19
2.2.5 Probengewinnung für molekularbiologische Untersuchungen.....	21
2.2.6 Nukleinsäureanalysen	22
2.2.7 Proteinanalysen.....	26
2.2.8 Messung der <i>outside-in</i> -Barriere mittels Lucifer Yellow	28
2.2.9 Bestimmung der <i>outside-in</i> -Barriere mittels Toluidinblau	29
2.2.10 Messung der <i>inside-out</i> -Barriere durch Sulfo-NHS-Biotin	29
2.2.11 Erfassung des Wasserverlustes der Haut (TEWL).....	29
2.2.12 Ultraschallbehandlung verhornter Zellhüllen	30
2.2.13 Statistik	30

3	Ergebnisse	31
3.1	Doppelter <i>Knockout</i> von Filaggrin und Hornerin führt zu <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäusen.....	31
3.2	<i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäuse entwickeln transient Hautsymptome	33
3.3	<i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäuse haben kürzere Schwänze und kleinere Ohren	35
3.4	Aberrantes <i>Stratum granulosum</i> und kompakte Hyperkeratose in <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäusen ...	36
3.5	Unveränderte Expression relevanter Proteine des Verhornungsprozesses in <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäusen	39
3.6	<i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäuse entwickeln eine funktionelle <i>outside-in</i> -Hautbarriere.....	41
3.7	Die funktionelle <i>inside-out</i> -Barriere ist in <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäusen unverändert	43
3.8	Die verhornten Zellhüllen in <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen gleichen sich in Form und mechanischer Stabilität	45
4	Diskussion.....	47
4.1	<i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäuse entwickeln einen transienten hyperkeratotischen Phänotyp, aber keine spontane Dermatitis.....	47
4.2	Die Funktion von Hornerin in der epidermalen Differenzierung	49
4.3	Kompensationsmechanismen der <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Maus und anderer <i>Knockout</i> -Stämme sind weitgehend unbekannt.....	50
4.4	Methodische Limitationen	51
5	Zusammenfassung	53
6	Anhang.....	54
6.1	Detaillierte Analysen: Involucrin.....	54
6.2	Detaillierte Analysen: Loricrin	57
6.3	Detaillierte Analysen: Keratin 6	59
6.4	Detaillierte Analysen: Keratin 10	60
6.5	Detaillierte Analysen: Keratin 14	62
7	Literaturverzeichnis	65

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Aufbau der Epidermis.....	2
Abb. 2: Filaggrin in der Zelldifferenzierung.....	6
Abb. 3: Generierung der <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Doppel-Knockout-Maus.....	18
Abb. 4: Filaggrin und Hornerin sind in <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäusen nicht nachweisbar.....	32
Abb. 5: <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäuse entwickeln transient schuppige Haut und Veränderungen an Schwanz und Pfoten.....	34
Abb. 6: <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäuse haben kleinere Ohren und kürzere Schwänze.....	36
Abb. 7: Kompakte Hyperkeratose und verminderte Granula im <i>Stratum granulosum</i> in <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäusen.....	38
Abb. 8: Die Expression relevanter Differenzierungsmarker ist in <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäusen unverändert.....	40
Abb. 9: Die funktionelle <i>outside-in</i> -Barriere in <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäusen entwickelt sich regelrecht.....	42
Abb. 10: Die Retention von Biotin und Wasser ist in <i>FlgHrrr</i> ^{-/-} -Mäusen unverändert.....	44
Abb. 11: Die verhornten Zellhüllen gleichen sich in Morphologie und Stabilität.....	46

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Mauslinien.....	10
Tab. 2: Chemikalien.....	10
Tab. 3: Reaktionssysteme.....	11
Tab. 4: Antikörper.....	12
Tab. 5: Primer.....	12
Tab. 6: Geräte.....	13
Tab. 7: Verbrauchsmaterialien.....	14
Tab. 8: Primer für die Genotypisierung der Mäuse.....	18
Tab. 9: Histologische Antikörper.....	21
Tab. 10: Allgemeine PCR-Bedingungen.....	25
Tab. 11: Primersequenzen und PCR-Bedingungen.....	25
Tab. 12: Im Western Blot verwendete Antikörper.....	28

Abkürzungsverzeichnis

AD	atopische Dermatitis
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
Bp	Basenpaar(e)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementärer DNA-Strang)
CE	<i>cornified envelope</i> (verhornte Zellhülle)
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (enzymatische Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Flg	Filaggrin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Hrnr	Hornerin
Inv	Involucrin
Krt6	Keratin 6
Krt10	Keratin 10
Krt14	Keratin 14
Lor	Loricrin
NMF	<i>natural moisturizing factor</i> (gewebeeigener Feuchtigkeitsfaktor)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCNA	<i>proliferating-cell-nuclear-antigen</i> (Zellkernantigen proliferierender Zellen)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPR	<i>small proline-rich protein</i> (kleine Prolin-reiche Proteine)
TEWL	<i>transepidermal water loss</i> (transepidermaler Wasserverlust)

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut vermittelt als äußerste Schicht des Körpers den Kontakt zur Umwelt. Sie übernimmt wesentliche Aufgaben in der Regulation des Stoff- und Energieaustausches. Dabei stellt sie eine anpassungsfähige Barriere gegenüber UV-Strahlung und Feuchtigkeit dar und ist durch ihre temperaturregulierende Funktion elementare Voraussetzung für homoiotherme Lebewesen. Als Schutz vor Austrocknung dient beispielsweise die Sekretion natürlicher Feuchtigkeitsfaktoren, NMFs (*natural moisturizing factors*) genannt, welche als Aminosäurederivate Flüssigkeit im *Stratum corneum* binden (Rawlings und Harding 2004). Physikalischer Beanspruchung wird durch ein hohes Regenerationspotential und stabile Zell-Zell-Kontakte Rechnung getragen. Chemische Noxen können durch einen gepufferten „Säuremantel“ (saurer pH-Wert) und eine interzelluläre Lipidmatrix abgeschwächt werden (Lambers et al. 2006; Fluhr und Elias 2002). Als Barriere gegenüber Krankheitserregern und potentiellen Allergenen nimmt die Haut eine wichtige Position innerhalb der Immunabwehr des Körpers ein. Sie sezerniert antimikrobielle Peptide wie beispielsweise Defensine und Cathelicidine, welche bakterielle Proteasen inhibieren und direkte antimikrobielle Wirkung entfalten (Ganz et al. 1985; Zaiou et al. 2003). Die Haut ist fester Bestandteil verschiedener Stoffwechselwege, hat ferner einen Anteil an der interindividuellen Kommunikation und fungiert als Sinnesorgan.

Der Subkutis als unterste Hautschicht, welche Fettgewebe, Gefäße und Nerven enthält, schließt sich die aus kollagenem Bindegewebe aufgebaute Dermis an. In dieser befindet sich, neben glatter Muskulatur, Nerven- und Sinneszellen, von der Oberhaut (Epidermis) ausgehenden Haarfollikeln, Talg- und Schweißdrüsen, ein feines Gefäßnetz aus Lymph- und Blutkapillaren, welches bis an die Basalmembran als Grenze zur Epidermis heranreicht. Diese äußere Schicht der Haut weist als gefäßfreies mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel sowohl morphologisch als auch funktionell eine vertikale polare Gliederung auf. Die Keratinozyten genannten Hauptzellen der Epidermis passieren in einem fein abgestimmten Differenzierungsprogramm die epidermalen Schichten von basal nach apikal (Abb. 1). Das *Stratum basale* ist die unterste Zellschicht. Hier findet (meistens) die Zellproliferation statt. Die Adhäsion der Basalzellen an der Basalmembran wird abhängig von divalenten Kationen durch Adhäsionsmoleküle, hauptsächlich Integrine, der Hemidesmosomen vermittelt (Mahan und Donaldson 1992). Nach apikal grenzt das durch die nach Fixierung stachelige Form der Keratinozyten imponierende *Stratum spinosum* an. Die Zellen des darauf folgenden

Stratum granulosum haben bereits einen höheren Grad der Differenzierung im Verhornungsprozess erreicht und enthalten zahlreiche lichtmikroskopisch sichtbare Keratohyalingranula. Im apikalen *Stratum corneum* erreichen die Keratinozyten ihre terminale Differenzierung als Korneozyten und liegen als abgestorbene, zellkernlose und in flache Form kollabierte Hüllen vor.

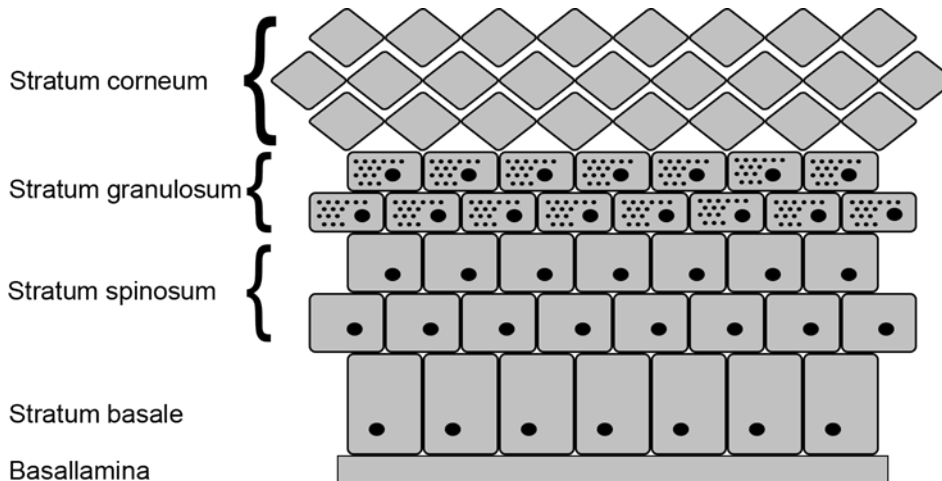


Abb. 1: Der Aufbau der Epidermis. Die Epidermis als mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel ist polar aufgebaut. Von basal nach apikal findet ein Differenzierungsprozess statt, an dessen Ende aus der zu Anfang teilungsfähigen Zelle eine abgestorbene, mit ihrer Umgebung vernetzte Struktur geworden ist.

1.2 Der Verhornungsprozess

Um den vielfältigen Anforderungen einer variablen Umwelt gerecht zu werden, bedarf es neben der fortwährenden Regenerationsfähigkeit der Hautzellen Strukturen, welche physikalische sowie chemische Robustheit ermöglichen. Viele Prozesse und regulierende Faktoren der Zellverhornung sind bisher nicht ausreichend verstanden. Die zur Regeneration notwendigen Zellen befinden sich im *Stratum basale*. Die terminale Zelldifferenzierung beginnt bei den mitotisch inaktiven Zellen des *Stratum spinosum*. So finden sich als Zeichen der Umwandlung des intrazellulären Zellskeletts vermehrt Keratin 1 und 10 als Strukturproteine, welche die Keratine 5 und 14 der basalen Schicht ersetzen (Fuchs und Cleveland 1998). Im Verlauf erfolgen der Abbau von Zellkern und Zellorganellen, Dehydratation und der Einbau von Lipiden in die Zellmembran (Fuchs und Green 1980). Im *Stratum granulosum* bilden die Zellen Keratohyalingranula, welche vor allem die Proteine Profilaggrin und Hornerin enthalten und im Verlauf freisetzen. Profilaggrin wird in Monomere gespalten, lagert sich an Keratinfilamente an und organisiert diese in Bündeln. Durch Anlagerung verschiedener Proteine wie Loricrin, Involucrin, Trichohyalin und sogenannter *small proline-rich proteins* (SPRs) und deren Vernetzung durch Transglutinasen mit dem Cytoskelett erfolgt der Umbau

der Zellmembran hin zu einer stabilen und unlöslichen verhornten Zellhülle, welche als *cornified envelope* (CE) bezeichnet wird (Lorand und Graham 2003; Steven und Steinert 1994). Im Interzellularraum befindet sich ein Komplex verschiedener Lipide wie Cholesterin, Cholesterinestern, Fettsäuren und Ceramiden. Die Aggregation der Zellen in eine flache Form markiert den Übergang in das *Stratum corneum*. Die dichte Vernetzung der Zellfilamente erstreckt sich hier über das Zellinnere und die umgebaute Hülle hinaus zu den benachbarten Zellhüllen (Simon und Green 1984). Um im Verlauf eine auf das Maß der Zellneubildung abgestimmte Schuppung zu ermöglichen, muss es zu einer kontrollierten Auflösung der Zell-verbindenden Corneodesmosomen kommen (Ishida-Yamamoto und Igawa 2015).

1.3 Der atopische Formenkreis

Atopie bezeichnet die Bereitschaft eines Organismus, auf regulär in der Umwelt vorkommende Allergene mit einer krankhaften Immunreaktion im Sinne einer allergischen Reaktion Typ-I unter Bildung und Ausschüttung von IgE-Antikörpern zu reagieren (Johansson et al. 2004).

Mit einer Prävalenz von bis zu 20% bei Kindern bis elf Jahre ist die atopische Dermatitis (AD) eine häufige chronische Hauterkrankung, welche sich durch trockene Haut, wiederkehrendes Ekzem und Juckreiz auszeichnet (Fennessy 2000). Sie beginnt häufig im frühen Kindesalter als erste Erkrankung des sogenannten atopischen Marsches, innerhalb dessen die Patienten im Verlauf zusätzlich eine allergische Rhinitis und/oder ein allergisches Asthma bronchiale entwickeln können (Bantz et al. 2014). Als Krankheitsauslöser wird eine Kombination aus Patienten- und Umweltfaktoren diskutiert. Wahrscheinlich bestehen bei vielen Patienten hereditäre Faktoren, welche allerdings bei manchen Mutationsträgern erst in Kombination aus Allergenexposition und Veränderung des Hautmilieus, beispielsweise durch geringe Luftfeuchtigkeit oder häufigen Gebrauch von Seifen, zum Ausbruch der Erkrankung führen. Mutationen in Genen, die Faktoren der Hautbarriere kodieren, sind wichtige Kandidaten bei der Suche nach Risikofaktoren. So sind bei Patienten mit AD Veränderungen in der Zusammensetzung und Barrierefunktion des *Stratum corneum* nachweisbar (Leung und Bieber 2003). Vermehrte Allergenpenetranz in tiefere Hautschichten scheint eine mögliche Folge zu sein. Als weitere wesentliche Faktoren erscheinen Stress, bakterielle Kolonisation der Haut und die verstärkte Exposition mit potentiellen Allergenen (Cardona et al. 2006; Schmid-Ott et al. 2001). Zusätzlich werden auch Veränderungen in der Reifung des Immunsystems durch zunehmend hygienisch geprägte Lebensbereiche und eine damit verbundene verringerte Exposition gegenüber heterogenen Antigenen in der Kindheit diskutiert (Ring et al. 2001; Williams et al. 1994).

Die bisherigen Therapiemöglichkeiten umfassen neben der Allergenkarenz vor allem topische oder systemische symptomatische Ansätze, um die Haut lokal zu befeuchten oder die Entzündungsreaktion durch Immunmodulation oder gar Immunsuppression zu mildern.

1.4 Filaggrin in der Zellverhornung

Die Geninformation des humanen Profilaggrin befindet sich innerhalb des Chromosoms 1 in der Region 1q21, welche auch als epidermaler Differenzierungskomplex bezeichnet wird. Dieser Bereich beherbergt die genetische Information zahlreicher weiterer Proteine der Hautdifferenzierung wie Loricrin, Involucrin, mehrerer Calcium-bindender Proteine der S100A-Familie, SPRs sowie einiger bisher wenig charakterisierter Proteine mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Filaggrin (Flg) wie Hornerin (Hrnr), Trichohyalin, Filaggrin-2, Cornulin und Repetin (Makino et al. 2001; Lee et al. 1993; Wu et al. 2009a; Contzler et al. 2005; Krieg et al. 1997). Alle diese Proteine haben wahrscheinlich in zeitlichem Zusammenhang wesentlichen Anteil am Verhornungsprozess der Haut (Mischke et al. 1996). Profilaggrin besitzt ein Molekulargewicht von rund 500 kDa und besteht aus zehn bis zwölf Wiederholungen der Filaggrinsequenz (Candi et al. 2005). Beim Menschen sind diese nicht vollkommen identisch (Gan et al. 1990). Profilaggrin findet sich innerhalb der Keratohyalingranula des *Stratum granulosum* und wird im Verlauf der Zelldifferenzierung proteolytisch in Monomere mit einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa gespalten (Candi et al. 2005). Diese aggregieren Keratinfilamente in den unteren Schichten des *Stratum corneum* (Abb. 2). Filaggrin spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Bildung der verhornenden Zelloberfläche und trägt zur Abflachung der Zellen zu Zellschuppen bei (Manabe et al. 1991; Dale et al. 1997). Die N-terminale Domäne migriert in den Zellkern und trägt möglicherweise zu dessen Auflösung bei (Ishida-Yamamoto et al. 1998). In den äußeren Schichten des *Stratum corneum* werden die Monomere des Filaggrin in kleinere Bruchstücke und einzelne Aminosäuren gespalten, welche wahrscheinlich eine Rolle bei der Flüssigkeitsbalance, dem pH-Wert und dem UV-Schutz der Haut spielen (Rawlings und Matts 2005; Rawlings et al. 1994; Scott und Harding 1986). Diese Fragmente werden als natürliche Feuchtigkeitsfaktoren (*natural moisturizing factors* oder NMFs) bezeichnet.

Defekte im Filaggrin-Gen mit der Folge des Funktionsverlustes sind bei der europäischen Bevölkerung ein wesentlicher Risikofaktor für die atopische Dermatitis (Brown et al. 2008a; Henderson et al. 2008; Greisenegger et al. 2010). Tatsächlich besteht hier eine der stärksten bekannten Assoziationen zwischen einem einzelnen Gendefekt und einer komplexen Erkrankung (Rodriguez et al. 2009). Die Prävalenz der häufigsten Mutationen scheint in Europa in Nord-Süd-Richtung abzunehmen (Thyssen et al. 2014). Abhängig von der jeweiligen Mutation kann bei heterozygoten Trägern ein

etwa vierfach erhöhtes Risiko angenommen werden, während bei homozygoten Trägern oder Compound-Heterozygotie das Risiko bis zu 86-fach erhöht sein kann (Brown et al. 2008b). Bei atopischer Dermatitis besteht auch eine höhere Wahrscheinlichkeit für allergische Rhinitis sowie allergisches Asthma bronchiale (Weidinger et al. 2008). Des Weiteren tritt die Dermatitis bei Defektträgern häufiger früh im Leben auf und hat eine geringere Tendenz zur Ausheilung (Barker et al. 2007). Populationen unterschiedlicher Ethnie zeigen Häufungen jeweils spezifischer Filaggrin-Mutationen (Chen et al. 2011; Carlsen 2011; On et al. 2017). Neben dem Verlust der Filaggrin-Expression scheint auch die Anzahl der im Genom codierten Filaggrin-Wiederholungen eine Rolle für das Morbiditätsrisiko zu spielen. Letzteres verhält sich invers zur Wiederholungszahl (Brown et al. 2012). Während bei Nordeuropäern möglicherweise die stärkste Assoziation zwischen Erkrankung und Mutationen mit Genverlust besteht, spielen bei einigen anderen ethnischen Gruppen wahrscheinlich Genvarianten mit der Folge geringerer Expression von Filaggrin-Monomeren die größere Rolle als Risikofaktor (Quiggle et al. 2015; Baurecht et al. 2007). Auch das Risiko für die Ichthyosis vulgaris, einer Hauterkrankung charakterisiert durch eine Retentionshyperkeratose, ist stark mit einem Funktionsverlust des Filaggrin-Gens assoziiert (Smith et al. 2006; Gruber et al. 2007).

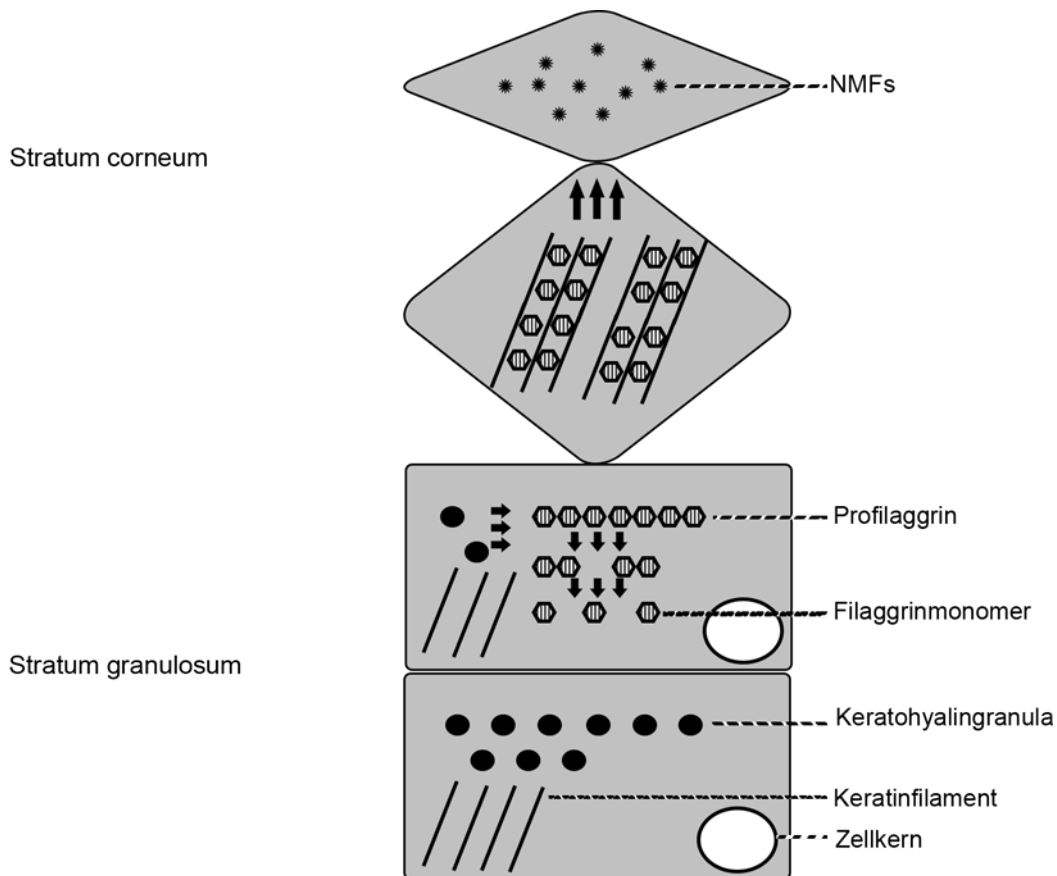


Abb. 2: Filaggrin in der Zelldifferenzierung. Im *Stratum granulosum* liegt Profilaggrin innerhalb der Keratohyalin granula vor. Im Verlauf der Zelldifferenzierung kommt es zu einem Anstieg der Calciumkonzentration, das Profilaggrin wird enzymatisch dephosphoryliert und durch Proteasen in Monomere gespalten. Die Aggregation der Filaggrinmonomere an Keratinfilamente und die folgende Abflachung der Zelloberfläche dominiert das basale *Stratum corneum*. Nach apikal kommt es unter Abnahme des vorherrschenden Feuchtigkeitsmilieus zu steigender Enzymaktivität, welche die Monomere in Bruchstücke und einzelne Aminosäuren spaltet, woraus sich der überwiegende Anteil der NMFs im *Stratum corneum* rekrutiert.

1.5 Hornerin

Beim Menschen befindet sich Hornerin genau wie Filaggrin auf Chromosom 1 innerhalb des epidermalen Differenzierungskomplexes (Makino et al. 2001; Takaishi et al. 2005). Es ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 280 kDa und besteht hauptsächlich aus einer repetitiven Aminosäuresequenz. Es hat strukturelle Ähnlichkeiten zu Filaggrin. Nachweisbar ist es in den Granula des oberen *Stratum corneum* zusammen mit Filaggrin sowie im gesamten *Stratum corneum*. Hornerin ist ein Substrat für Transglutaminasen, wird wahrscheinlich in kleinere Fragmente von etwa 45 kDa gespalten, stellt einen Teil der verhornten Zelloberfläche dar und bildet unlösliche Komplexe (Henry et al. 2011). Ferner konnte es bei Mäusen in den Epithelien der Zunge, des Ösophagus und des Proventriculus nachgewiesen werden (Makino et al. 2003). Es konnte ein humaner Genpolymorphismus im Bereich des Hornerin-Gens

identifiziert werden, welcher das Risiko, an atopischer Dermatitis zu erkranken, signifikant erhöht (Esparza-Gordillo et al. 2009). Patienten mit AD zeigen sowohl in gesunden als auch ekzematösen Hautbereichen eine geringere Expression sowohl von Filaggrin als auch Hornerin (Pellerin et al. 2013). Bisher liegt kein genetisch modifizierter Mausstamm mit Hornerin-Defizienz (Hornerin-*Knockout*) vor. Die genaue Rolle von Hornerin für die Hautbarriere, mögliche mit weiteren Proteinen überlappende Funktionen und die Relevanz für atopische Erkrankungen sind bisher weitgehend unbekannt.

1.6 Mausmodelle zur Hautbarriere-Defizienz

Mausmodelle erlauben häufig eine umfassende und detaillierte experimentelle Auseinandersetzung mit medizinischen Fragestellungen. Besonders der Einsatz von *Knockout*-Stämmen ermöglicht Rückschlüsse auf die Funktion einzelner Gene und deren Rolle in der Genese komplexer Erkrankungen. In jedem Einzelfall müssen dabei Parallelen, aber auch Unterschiede zur entsprechenden menschlichen Erkrankung genau untersucht werden.

Als Tiermodell für die Erforschung der atopischen Dermatitis wird seit langem der *flaky-tail*-Mausstamm (*Flg^{fl}*) eingesetzt. Dieser zeichnet sich durch eine Mutation im Profilaggrin-Gen mit funktionellem Verlust von Filaggrin aus. Die Tiere zeigen wenige Tage nach der Geburt eine grobe Schuppung der Haut mit Ausheilung im Verlauf, zirkuläre Einschnürungen des Schwanzes mit Verlust der Schwanzspitze, kleinere Ohren und eine lichtmikroskopische Verringerung der Anzahl der Keratohyalingranula (Presland et al. 2000). Einige Autoren berichten auch von der spontanen Entwicklung ekzematöser Läsionen ähnlich der humanen AD (histologisch mit Akanthose und Hyperkeratose) und empfehlen die Nutzung als Modell in der Atopieforschung. Der Beginn des Auftretens der Läsionen wird allerdings entweder bei jungen Tieren oder aber bei ausgewachsenen Mäusen berichtet (Kypriotou et al. 2013; Moniaga et al. 2010; Oyoshi et al. 2009). Zusätzliche Unklarheit besteht, da in einigen Arbeiten auch keinerlei spontanes Auftreten von entzündlichen Läsionen beobachtet werden konnte (Presland et al. 2000; Fallon et al. 2009; Scharschmidt et al. 2009). Zusätzlich konnte für die *flaky-tail*-Maus eine Mutation im für Mattrin codierenden *Tmem79/Matt*-Gen nachgewiesen werden. Letztere scheint eine spontane Dermatitis und eine Schwächung der Hautbarriere zur Folge zu haben und erschwert es, aus diesem Stamm direkte Rückschlüsse auf die Erkrankung beim Menschen zu ziehen, da Mutationen im humanen *TMEM79/MATT*-Gen wahrscheinlich nur sehr selten zur Entwicklung einer Dermatitis beitragen (Saunders et al. 2013).

Bereits früher wurde ein singular Filaggrin-defizienter Mausstamm (*Flg^{-/-}*) erzeugt, um die Auswirkungen des Proteinverlusts auf das Tier im Allgemeinen und die

Hautentwicklung im Speziellen untersuchen zu können. Diese Mäuse zeigten sich lebens- und uneingeschränkt entwicklungs- und fortpflanzungsfähig. Postpartal nicht vom Wildtyp unterscheidbar, entwickelten sie zwischen dem dritten und sechsten Tag ihres Lebens eine trockene und schuppige Haut, die sich mit zunehmender Behaarung normalisierte und nur am Schwanz weiter einen schuppigen Phänotyp bot. Histologisch wurden Verminderung der Granula des *Stratum granulosum* und Hyperkeratose beobachtet. Die Konzentration der freien Aminosäuren im *Stratum corneum* war reduziert, Veränderungen im Wassergehalt oder pH-Wert konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. Ebenso zeigten die Mäuse keinen erhöhten Wasserverlust über der Haut. Eine Änderung in der Proteinexpression von Loricrin, Involucrin oder Keratin 1 konnte nicht festgestellt werden. Die tieferen Schichten des *Stratum corneum* waren weniger resistent gegenüber mechanischem Stress, elektronenmikroskopisch imponierte in den Keratohyalin granula eine Desorganisation der Keratinfilamente. Außerdem konnte eine stärkere Hautpenetration liposomal verkapselter Antigene mit folgender verstärkter Immunreaktion nachgewiesen werden (Kawasaki et al. 2012). Die Tiere entwickelten also keine spontane Dermatitis und nur milde reversible Hautläsionen, die sowohl makro- als auch mikroskopisch der humanen Ichthyosis vulgaris ähneln. Endogene Kompensationsmechanismen des Gen-*Knockouts* sind aktuell unbekannt.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Der kausale Zusammenhang zwischen veränderter Hautbarriere und atopischen Krankheiten gilt als gesichert. So wurde eine starke Assoziation zwischen Defekten im Filaggrin-Gen und der Entwicklung einer atopischen Dermatitis festgestellt. Bei etwa der Hälfte der Erkrankten können Filaggrin-Mutationen nachgewiesen werden (Rodriguez et al. 2009). Im Kontrast zur großen Zahl an Veröffentlichungen mit Bezug zu Filaggrin steht ein relativ geringer Wissensstand über die anderen Proteine der Zellverhornung. Sehr wahrscheinlich prädisponieren Mutationen in weiteren Strukturproteinen der Epidermis ebenfalls für AD. Erst vor wenigen Jahren wurde gezeigt, dass Hornerin in gesunder humaner Haut exprimiert wird (Takaishi et al. 2005). Auch ein Zusammenhang zwischen Hornerin und Atopieneigung wird vermutet. So konnte bewiesen werden, dass die Hornerinexpression bei Menschen in erkrankten Hautbereichen herabgesetzt ist (Wu et al. 2009b).

Ein Filaggrin- und Hornerin-defizienter (*FlgHrnr*^{-/-}) Mausstamm wurde aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der Proteine, benachbarter Lage der Gene und wahrscheinlich partiell überlappender Funktion bei der Hautdifferenzierung erschaffen. Zudem vereint der Stamm Mutationen der beiden nach aktuellem Wissensstand am stärksten mit AD assoziierten Gen-Loci. Ziel dieser Arbeit war es, diesen Mausstamm im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) strukturell und funktionell zu

charakterisieren. Es sollte die Entwicklung der Tiere im Allgemeinen untersucht und ein Fokus auf die Morphologie, Zusammensetzung und Funktion der Epidermis gelegt werden. Dazu war es notwendig, Mäuse unterschiedlichen Alters zu untersuchen. Es galt zu bestimmen, ob Einschränkungen bezüglich der Überlebensfähigkeit oder der Entwicklung der Tiere bestehen, ob die Tiere im Verlauf eine ausreichende Barriere gegenüber Umweltreizen aufrechterhalten können und ob es Hinweise auf Kompensationsmechanismen auf Ebene der Gen- oder Proteinexpression gibt. Letztlich beinhaltet diese Arbeit die grundlegende Beschreibung des Mausstammes, um in weiterführenden Untersuchungen immunologischen Fragestellungen nachgehen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mauslinien

Tab. 1: Mauslinien

Mauslinie	Bezugsquelle
C57BL/6 („Wildtyp“)	TaconicArtemis GmbH, Köln, Deutschland
FlgHrnr ^{-/-} (Basis: C57BL/6)	TaconicArtemis GmbH, Köln, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Tab. 2: Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid 30 % / Bis Lösung 37,5:1	Bio-RAD Laboratories, München, Deutschland
AEC+ High Sensitivity Substrate Chromogen	DAKO, Hamburg, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Biotinylated tyramide	PerkinElmer, Waltham, USA
Blockmilch (Non-fat-dry-milk)	Bio-RAD, München, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete Mini – 7×Complete Stock Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DEPEX mounting medium	Serva, Heidelberg, Deutschland
DNA Loading Dye 6x	Fermentas, Waltham, USA
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Eosin G-Lösung 0,5%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Faramount mounting medium	DAKO, Hamburg, Deutschland
FCS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fluorescent mounting medium	DAKO, Hamburg, Deutschland
GelRed 10.000×	Biotium, Hayward, USA
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isofluoran	Abbott Laboratories, Libertyville, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lucifer yellow	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Luminol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Mayers Hämalanlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE LDS sample buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE Novex Bis-Tris-Gel 4-12%	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE reducing agent 10x	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE Sample Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE SDS Running Buffer 20x	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE Transfer Buffer 20x	Invitrogen, Carlsbad, USA
OCT-Compound	Sakura Finetek, Torrance, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS ohne Ca ²⁺ und Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
P-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin-Komplex	Calbiochem, San Diego, USA
Sulfo-NHS-Biotin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Taq-DNA-Polymerase	PEQLab, Erlangen, Deutschland
Target Retrieval Solution 10x	DAKO, Hamburg, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Toluidinblau O 0,1 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TSA blocking solution	PerkinElmer, Waltham, USA
Tween20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ziegen-Serum	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Reaktionssysteme

Tab. 3: Reaktionssysteme

Reaktionssysteme	Bezugsquelle
AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Bradford Reagenz Protein Assay	Bio-RAD, München, Deutschland
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, Hanover, USA
RNase-Free DNase Set	Omega Bio-tek, Norcross, USA
Target Retrieval Solution 10x	DAKO, Hamburg, Deutschland
TSA Fluorescein System	PerkinElmer, Waltham, USA

2.1.4 Antikörper

Tab. 4: Antikörper

Antikörper gegen	Hersteller
Anti-goat IgG, HRP-linked	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Anti-mouse goat IgG, biotin-conjugated	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-rabbit goat IgG, biotin-conjugated	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling, Denvers, USA
Filaggrin rabbit polyclonal IgG	HISS Diagnostics, Freiburg, Deutschland
Hornerin goat polyclonal	Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland
Hornerin rabbit polyclonal IgG	Abnova, Taipei City, Taiwan
Involucrin rabbit polyclonal IgG	Abcam, Cambridge, England
Keratin 10 mouse monoclonal IgG	Abcam, Cambridge, England
Keratin 14 rabbit polyclonal	Covance, Princeton, USA
Keratin 6 rabbit polyclonal	Covance, Princeton, USA
Loricrin rabbit polyclonal	Covance, Princeton, USA
Mouse isotype control IgG	Invitrogen, Carlsbad, USA
Rabbit isotype control IgG	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
β -Actin mouse monoclonal IgG	Millipore, Billerica, USA
Streptavidin, HRP-linked	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Streptavidin-Cy3	Biolegend, San Diego, USA

2.1.5 Primer

Tab. 5: Primer

Gencode	Hersteller
<i>GAPDH</i>	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
<i>Hornerin</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Involucrin</i>	Biomol, Hamburg, Deutschland
<i>Keratin 6</i>	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
<i>Keratin 10</i>	Biomol, Hamburg, Deutschland
<i>Keratin 14</i>	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
<i>Loricrin</i>	Biomol, Hamburg, Deutschland
<i>Profilaggrin</i>	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

2.1.6 Geräte

Tab. 6: Geräte

Geräte	Hersteller
Brutschrank HERAccl 150i CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dampfgarer Multigourmet	Braun, Neu-Isenburg, Deutschland
Flexcyclcr	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Fotokamera Finepix HS20	Fujifilm, Tokyo, Japan
Heizblock Thermo Stat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
LabGard Safety Cabinet	Nuair, Plymouth, USA
Las 4000 Image Reader	Fujifilm, Tokyo, Japan
Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axioimager M1	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Axiovert 200	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40	Zeiss, Jena, Deutschland
Mini Protean 3 Kammer	BioRad, München, Deutschland
Multi Gauge V3.2 (Software)	Fujifilm, Tokyo, Japan
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Photometer Genesys 10 Bio	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipet Boy acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Präzisionswaage CP323S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schüttler	Grant-bio, Cambridgeshire, UK
Tewameter TM210	Courage+Khazaka electronic GmbH, Köln, Deutschland
TissueLyser LT	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell	BioRad, München, Deutschland
Transfer-Pipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
TrayCell- Einsatz	Hellma, Müllheim, Deutschland
U:Genius	Syngene, Frederick, USA
Ultraschallbad Sonorex RK100	Bandelin electronic GmbH, Berlin, Deutschland
Vevo Compact Dual Anesthesia System	Visual Sonics Inc., Toronto, Kanada
Vortexer	Labinco, Breda, Niederlande
Wasseraufreinigung Stedim arium 611VT	Sartorius, Göttingen, Deutschland
XCell 2 Blot Module	Invitrogen, Carlsbad, USA
XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Zentrifuge Multifuge 1S-R Heraeus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tab. 7: Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Filterpapier	BioRad, München, Deutschland
Kanüle Microlance TM 3 0,9 mm × 40 mm, 20 G1 ½	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Nitrozellulose-Membran Trans-Blot®Transfer Medium Pure Nitrocellulose 0,45 µm	BioRad, München, Deutschland
Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritze Omnifix 40 Solo 1 ml	B. Braun Petzhold GmbH, Melsungen, Deutschland

Einwegartikel sowie technische Geräte, die oben nicht aufgelistet sind, wurden von folgenden Firmen erworben: Eppendorf (Hamburg), Schütt (Göttingen), Becton-Dickinson (Heidelberg) und Sarstedt (Nümbrecht).

2.1.8 Lösungen und Puffer

TBS:

10 mM Tris /HCl pH 7,0; 1 mM EDTA pH8; 150 mM NaCl in Aqua_{bidest.}

TBS/T:

0,05 % (v/v)-Tween in TBS

Blocklösung Immunhistochemie:

5%-Ziegenerum in PBS

Blocklösung Immunhistochemie mit TSA -Kit:

0,5%-TSA-Blocklösung in Tris

Blockmilch Western Blot:

5 % (w/v)-Non-fat-dry-milk in TBS/T

SDS-Proben-Puffer 5x:

200 mM Tris pH 6,8, 4 % (w/v)-SDS, 40 % (v/v)-Glycerol, 0,07 % (w/v)-Bromphenolblau

Transfer-Puffer:

5 mM Tris, 40 mM Glycin, 3,75 % (w/v)-SDS und 20%-Methanol in Aqua_{bidest.}

Trenngel für Western Blot (10 %):

2 ml Aqua_{bidest.}; 1,65 ml 30 % -Acrylamid ; 1,25 ml 1,5 M Tris HCl pH 8,8; 50 µl 10% (w/v)-SDS; 50 µl 10 %-Ammoniumpersulfat; 5 µl TEMED (Angaben für ein Gel)

Sammelgel für Western Blot :

1,05 ml Aqua_{bidest.}; 250 µl 30% Acrylamide; 190 µl 1,0M Tris HCl pH 6,8 ; 15 µl 10% (w/v)-SDS ; 15 µl 10 %-Ammoniumpersulfat ; 1,5 µl TEMED (Angaben für ein Gel)

Laufpuffer für Western Blot 10x:

2 M Glycin, 250 mM Tris und 0,5 % (w/v)-SDS in Aqua_{bidest.}

TU-DTT:

8 M Harnstoff, 35 mM Tris/HCl pH6.8, 50 mM DTT, 5% Glycerol

ECL-Lösung:

100mM Tris/HCl pH8.5, 0,225 % p-Cumarsäure, 0,5% Luminol, 0,009% Wasserstoffperoxid

NuPAGE Laufpuffer(Running Buffer):

5% NuPAGE-SDS-Running-Buffer in Aqua_{bidest.}

NuPAGE Transfer Puffer:

5% NuPAGE-Transfer-Buffer, 0,1% NuPAGE Antioxidant, 20% Methanol in Aqua_{bidest.}

2% SDS-Extraktionspuffer:

100 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 2% SDS

0,2% SDS-Extraktionspuffer:

100 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,2% SDS

2.2 Methoden

2.2.1 Mausgenerierung und Zucht

Der *FlgHrrr*^{-/-}-Mausstamm wurde von der TaconicArtemis GmbH (Köln, Deutschland) auf Basis der C57BL/6-Maus mit Hilfe des Kassettenaustauschverfahrens generiert. Dieser Schritt war nicht Inhalt dieser Arbeit. Die Tiere zeichnen sich durch einen völligen Verlust von *Flg* und *Hrrr*, inklusive der intergenomischen Sequenzen, aus. Zunächst wurden mittels Elektroporation die spezifischen Zielvektoren "loxP/F/neomycin/F" sowie "F3/puromycin/F3/loxP" in embryonale Stammzellen der C57BL/6-Maus eingeschleust, um die Genomsequenzen für Filaggrin und Hornerin zu ersetzen (Abb. 3). Nach Selektion wurden Chimären durch Injektion eines homologen rekombinanten Klons in Blastozysten erzeugt. Durch geeignete Verpaarung mit Flippase- beziehungsweise Cre-Rekombinase-exprimierenden Tieren wurden der Selektionsmarker und die intergenomische Gensequenz entfernt.

Dies wurde durch Genotypisierung der Tiere mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) bestätigt. Dazu wurde ein Filaggrin-Primer (Flg-f) in Kombination mit zwei unterschiedlichen Primern eingesetzt (Tab. 8). Der Filaggrin-Primer (Flg-f) bindet außerhalb des zu exzidierenden Bereiches. Ein weiterer Primer bindet am gegensätzlichen Strang im Bereich der zu exzidierenden Filaggrin-Sequenz (WT-r), so dass das Wildtyp-Allel detektiert wird. Der andere Primer (KO-r) bindet an einer Basensequenz, welche erst durch die Exzision entsteht, was die Detektion des KO-Allels erlaubt. Die jeweils amplifizierten Genprodukte unterscheiden sich in ihrer Größe und ermöglichen so einen Rückschluss auf den Genotyp. Homozygote Doppel-Knockout-Tiere (*FlgHrrr*^{-/-}) wurden zur Zucht eingesetzt und die Nachkommen für die folgenden Versuche genutzt.

Die Tierversuche wurden unter dem Tierversuchsantrag 10/0219 durch das Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt. Alle Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen unter spezifisch Pathogen-freien (SPF) Bedingungen gehalten. Es stand ihnen Futter und Wasser nach Bedarf zur Verfügung, es bestanden hygienisch optimierte Bedingungen, geschlossene Käfige mit einer kontrollierten Luftversorgung (*Individually ventilated cages*) sowie ein jeweils 12-stündiger Tag-/Nacht-Rhythmus.

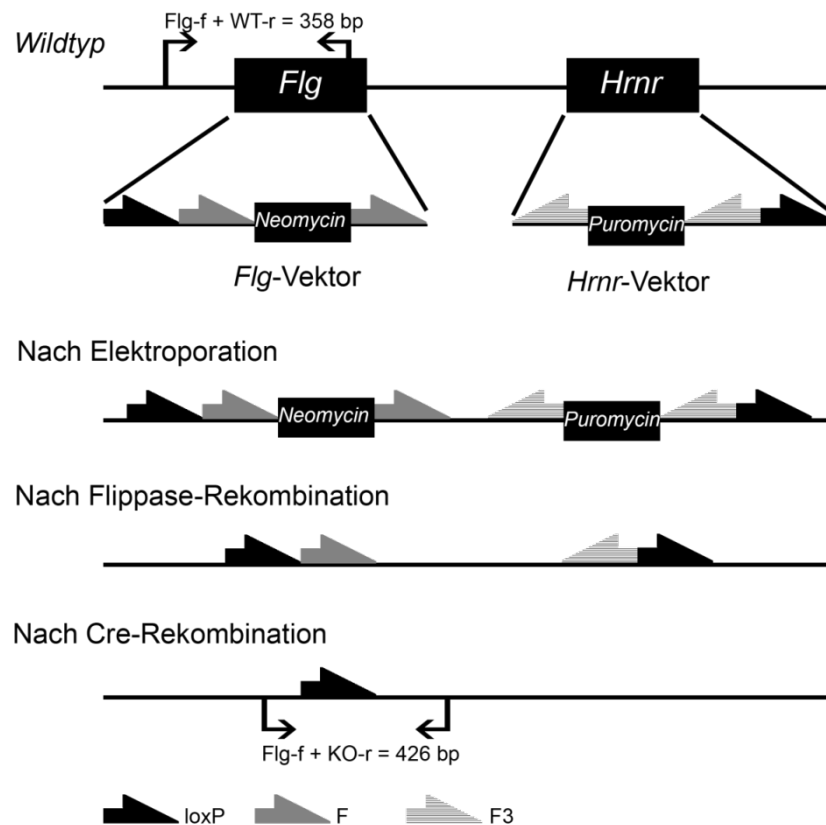


Abb. 3: Generierung der *FlgHrrr*^{-/-}-Doppel-Knockout-Maus. Das Schema gibt einen Überblick über die Verfahrensweise. Zunächst wurden die Gensequenzen von Filaggrin beziehungsweise Hornerin mittels Elektroporation durch Genkassetten mit Neomycin respektive Puromycin ersetzt, welche zusätzlich Bindungsstellen für die Rekombinasen Cre (loxP) und Flippase (F und F3) besitzen. Nach Verpaarung mit Flippase- und anschließend Cre-exprimierenden Tieren konnte ein vollständiger *Knockout* der Gensequenzen erreicht werden.

Tab. 8: Primer für die Genotypisierung der Mäuse

Primernamen	Primersequenz
Flg-f	5'- AGGCATGGTGGAACTGATGG -3'
WT-r	5'- CTGCTCTGGGTCTTCTGTTTCC -3'
KO-r	5'- TGTCCACAGTTAGATGACTG -3'

2.2.2 Zeitplanung der Verpaarungen und Alter der Tiere bei Versuchsdurchführung

Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit innerhalb eines Experiments zu erreichen und methodische Schwankungen zu minimieren, wurde grundsätzlich angestrebt, Experimente mit den zu vergleichenden Tieren zur selben Zeit durchzuführen. Neben neugeborenen Tieren wurden mehrere taggenaue Alterspunkte definiert. Durch terminierte Verpaarung wurden zeitgleich Würfe beider Mausstämmen generiert und in

der überwiegenden Zahl der Versuche eingesetzt. In der Immunhistochemie erfolgten die Färbungen in kompletten Serien aus jeweils gemeinsamen Ansätzen aus Antikörpern und anderen Chemikalien. Bei den molekularbiologischen Methoden wurden die letztlich miteinander zu vergleichenden Proben von Anfang an zeitgleich und mit denselben chemischen Reagenzien behandelt. Die funktionellen Essays mit Sulfo-NHS-Biotin und Lucifer Yellow wurden an jeweils auf den Tag genau gleich alten Tieren parallel durchgeführt.

Wenn eine Tötung des Tieres zur Gewebeentnahme notwendig war, wurde dies mittels Kohlendioxid-Insufflation und anschließendem Genickbruch durchgeführt.

2.2.3 Untersuchung des Phänotyps

Die Tiere wurden auf einer weißen Unterlage zusammen mit einem Maßstab unter vergleichbaren Lichtverhältnissen standardisiert fotografiert. Es wurden zusätzlich Detailaufnahmen der Ohren, Pfoten, Schwänze und gegebenenfalls der unbehaarten Haut erstellt. Anhand der Fotos wurden Messungen der Körper- sowie Schwanzlänge mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Zusätzlich wurde das Gewicht der Tiere ermittelt. Zur Messung der Ohrgröße (Fläche) wurden die abgetrennten Ohren flach auf eine Unterlage gelegt und in senkrechtem Winkel fotografiert. Auf den Fotos wurden mit ImageJ die Flächen der Ohren unter Beachtung des Überganges vom äußeren Gehörgang zum Ohr ermittelt.

2.2.4 Histologische Untersuchungen

2.2.4.1 Probengewinnung

Bei bereits behaarten Mäusen wurden zuerst die Rückenhaare gründlich und hautschonend rasiert. Die Rückenhaut der Tiere wurde entfernt, wobei bei den jüngeren Tieren der Nackenansatz als kraniale und der Schwanzansatz als kaudale Grenze gewählt wurde. Bei den älteren Tieren wurde Haut aus dem oberen Rücken mit dem Nackenansatz als kraniale Grenze gewonnen. Die entnommenen Gewebe wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd in *phosphate buffered saline* (PBS) fixiert. Danach erfolgte die Einbettung in Paraffin und es wurden Schnitte von 3 µm Dicke erstellt. Diese wurden in einem Brutschrank bei 45 °C für 24 Stunden getrocknet. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte durch dreimalige Inkubation in Xylol für jeweils 10 min und anschließender einmaliger Inkubation in Isopropanol für die gleiche Zeitspanne. Zur Rehydrierung wurden danach 10-minütige Inkubationen in 100%-, 90%-, 70%- sowie 50%-Ethanol durchgeführt und zuletzt erfolgten drei Waschstufen für jeweils fünf Minuten in PBS.

2.2.4.2 HE-Färbung

Die entparaffinierten Schnitte wurden für zehn Sekunden in Meyers Hämalaun-Lösung gegeben, mit Aqua_{bidest} gespült und danach für fünf Minuten mit laufendem kaltem Leitungswasser gewaschen. Danach erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit Eosin-Lösung. Nach erneuter Spülung wurde die zur Rehydrierung verwendete Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen. Die Eindeckelung der gefärbten Schnitte erfolgte mit DEPEX.

Die Analyse wurde mit einem Axioskop 2 durchgeführt und die Präparate wurden standardisiert fotografiert. Zur Bestimmung der Schichtdicken der Haut wurden pro Präparat eines Tieres zehn Messungen mit dem Programm ImageJ vorgenommen und Mittelwerte der Messungen gebildet.

2.2.4.3 Immunhistochemie

Die entparaffinierten Schnitte wurden in 1x *Target Retrieval Solution* in Aqua_{bidest} für 20 Minuten im Dampfgerät zur Demaskierung von Antigenen gegart und danach eine halbe Stunde zur Abkühlung bei Raumtemperatur gelagert. Danach erfolgte der bereits beschriebene Waschschrift in PBS. Nun wurde endogene Peroxidase durch 10-minütige Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid-Lösung inaktiviert, um so unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Nach erneutem Waschen erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Schnitte in Blocklösung in einer feuchten Kammer, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Für Färbungen von Keratin 6 und Keratin 10 wurde die im TSA-Kit enthaltene Blocklösung nach Herstellerangabe gelöst und verwendet. Danach wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in den unten angegebenen Verdünnungen in Blocklösung inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper in Blocklösung für eine Stunde. Um ein stärkeres Signal zu erhalten, wurde für die Färbungen von Keratin 6 und Keratin 10 das TSA-Verstärkung-Kit benutzt - biotinyliertes Tyramid wurde 1:50 mit der mitgelieferten Verdünnungslösung versetzt und für zehn Minuten auf die Schnitte gegeben.

Nach einem Waschschrift folgte die Inkubation mit 2% Streptavidin-Peroxidase in PBS für 40 Minuten. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit AEC-Lösung (3-Amino-9-ethylcarbazol) versetzt und nach 5-15 Minuten in Aqua_{bidest} für 10 Sekunden in Meyers Hämalaun-Lösung gegeben. Es folgte die 5-minütige Waschung unter fließendem kaltem Leitungswasser. Danach erfolgte die Eindeckelung der Schnitte mit Faramount. Für die *proliferating-cell-nuclear-antigen*-Färbung (PCNA-Färbung) wurde auf eine Gegenfärbung mit Hämalaun verzichtet. Bei PCNA handelt es sich um ein so genanntes Ringklemmprotein, welches während der eukaryotischen Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) Replikation mit der DNA-Polymerase interagiert und eine wichtige Rolle für den effizienten Ablauf des Prozesses spielt. Da PCNA primär in

der S-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, erlaubt diese Spezialfärbung, selektiv die Kerne proliferierender Zellen anzufärben.

Um Farbreaktionen, die auf unspezifischen Reaktionen der Lösungen basieren, erkennbar zu machen, wurde für jede Reihe ein Schnitt mit einem polyklonalen IgG-Antikörpermisch aus der gleichen Tierart anstelle des Primärantikörpers durchgeführt. Für Keratin 6 wurde ein bekannt stark reagierendes epidermales Gewebe eines menschlichen Embryos als Positivkontrolle mitgeführt.

Tab. 9: Histologische Antikörper

Antikörper gegen	eingesetzte Konzentration [$\mu\text{g/l}$]
Filaggrin	250
Hornerin	Konzentration nicht angegeben, Verdünnung 1:1000
Involucrin	50
Keratin 6	1000
Keratin 10	200
Keratin 14	125
Loricrin	250
PCNA	Konzentration nicht angegeben, Verdünnung 1:1000
Sekundärantikörper anti-Kaninchen	5000
Sekundärantikörper anti-Maus	2500

2.2.5 Probengewinnung für molekularbiologische Untersuchungen

2.2.5.1 Gewebeentnahme und Verarbeitung

Den neugeborenen und vier Tage alten Tieren wurde ein Stück vom Nacken bis zum Schwanzansatz entnommen. Bei allen älteren Mäusen wurden die Ohren am Ansatz abgetrennt und durch Ziehen Innen- und Außenseite voneinander separiert. Um die Epidermis von den restlichen Hautbestandteilen zu trennen, wurden die jeweiligen Hautstücke mit der Innenseite auf eine 10 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in PBS Lösung gelegt und für zehn Minuten bei 56 °C inkubiert. Dies führt zu einer Ablösung im Bereich der epidermalen Basallamina. Es erfolgte die mechanische Ablösung der Epidermis mittels Pinzette und Überführung in sterile Eppendorf-Gefäße.

Zur Isolation von Proteinen und Ribonukleinsäure (RNA) aus derselben Gewebeprobe wurde das Qiagen *AllPrep DNA RNA Protein Kit* verwendet. Nach dem mechanischen Aufschluss der Zellen durch eine magnetisch rotierende Stahlkugel erfolgte die Inaktivierung von RNA- und Protein-verdauenden Enzymen mittels einer denaturierenden Pufferlösung. Im Anschluss ermöglichte die milieuspezifische reversible Bindung von DNA beziehungsweise RNA an eine Silika-Gel-Membran die Isolation und Aufreinigung von RNA und Proteinen im Laufe mehrerer Zentrifugations- und Waschschriffe. Zu den epidermalen Proben wurden je eine gekühlte 5 mm durchmessende Stahlkugel sowie 600 μl des Puffers RLT hinzugefügt, und sie wurden

für fünf Minuten mit einer Frequenz von 50 Hz in einem TissueLyser geschüttelt. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 17000 g erfolgte die Überführung des Überstandes auf eine AllPrep DNA Zentrifugationssäule und eine anschließende 30-sekündige Zentrifugation bei 8000 g. Der Durchfluss wurde in einem neuen Eppendorf-Gefäß mit 430 µl absolutem Ethanol versetzt und auf eine AllPrep RNeasy Zentrifugationssäule gegeben. Es erfolgte eine zweifache Zentrifugation bei 8000 g für 15 Sekunden. Während der Durchfluss zur Proteinextraktion verwendet wurde, erfolgte eine Reinigung der reversibel an die Säule gebundenen RNA durch die einmalige Zugabe von 700 µl Puffer RW1 sowie die zweimalige Zugabe von 500 µl Puffer RPE mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 8000 g für 15 Sekunden und Verwerfen des Durchflusses. Abschließend erfolgte die Lösung der RNA mittels 30 µl RNase-freien Wassers unter erneuter zweimaliger Zentrifugation. Die gewonnene RNA wurde entweder sofort verwendet oder bei -80 °C gelagert. Der oben genannte Durchfluss zur Proteinextraktion wurde mit 1 ml Puffer APP vermischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 17000 g wurde der Überstand verworfen und das entstandene Sediment in 500 µl 70% Ethanol resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das entstandene Sediment für zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Der TU-DTT Puffer wurde im Verhältnis 7:1 mit dem *Complete mini protease inhibitor* vermischt. Nach Resuspension des Sediments in 100 µl TU-DTT Puffer erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C. Nach Abkühlung und erneuter Zentrifugation wurde der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

2.2.6 Nukleinsäureanalysen

2.2.6.1 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Mittels eines Photometers wurde die Gesamt-Nukleinsäurekonzentration in den isolierten RNA-Proben durch Extinktionsmessung bei 260 nm bestimmt. Es wurde je 1 µl der zu messenden Probe auf den TrayCell-Einsatz des Photometers gegeben und die optische Dichte gemessen. Da verunreinigende Proteine ein Absorptionsmaximum im Bereich von 280 nm aufweisen, ist es möglich, durch den Quotienten der Dichte 260 nm / 280 nm Rückschlüsse auf die Reinheit des Isolates zu ziehen. Der Quotient sollte nicht wesentlich unter 1,6 betragen.

2.2.6.2 Reverse-Transkriptase PCR

Das verwendete Aufreinigungsverfahren für RNA ist selektiv für Moleküle mit mehr als 200 Basenpaaren (Bp), sodass hauptsächlich mRNA isoliert wurde. Durch einen Oligo-d(T)-Primer wird selektiv mRNA in DNA umgeschrieben und eine Analyse der Genexpression mittels semiquantitativer PCR ermöglicht. Die mittels eines Reverse-

Transkriptase-Enzyms erstellte und zur RNA komplementäre DNA wird als *complementary DNA* (cDNA) bezeichnet. Zur Generierung der cDNA wurde das *First Strand cDNA Synthesis Kit* benutzt. Um Degeneration zu vermeiden wurden alle Proben und Lösungen auf Eis gelagert. Pro Ansatz wurden 2 µg RNA-Isolat mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl verdünnt und mit 1 µl d(T)18-Primer vermischt. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte eine Inkubation im Heizblock bei 70 °C für 5 Minuten. In diesem Schritt lagern sich die d(T)18-Primer an die Polyadenin-Enden der RNA an. Nach dem Abkühlen auf Eis und kurzem Herabzentrifugieren wurden den Proben die folgenden Substanzen auf ein Endvolumen von 20 µl hinzugefügt:

5X Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
Reverse Transkriptase	2 µl

Nach vorsichtigem Mischen und erneutem kurzen Zentrifugieren wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, um die enzymatische cDNA-Synthese stattfinden zu lassen. Danach erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 70 °C, um die Reaktion zu stoppen. Das Produkt wurde sofort auf Eis und dann bei -20 °C gelagert.

2.2.6.3 Primerdesign

Für die Gene *Krt6* und *Krt14* wurden geeignete Basenabfolgen ermittelt und die Synthese entsprechender Primer in Auftrag gegeben. Zuerst wurden mit dem Onlineprogramm Primer-BLAST passende, spezifisch zur jeweiligen mRNA komplementäre Paare aus Primern ermittelt. Dabei war ein Auswahlkriterium die Bindung des Primers über die Grenze zweier Exone hinweg, um die theoretisch mögliche Bindung an originäre intronhaltige DNA-Sequenzen zu verhindern. Darüber hinaus wurden eine Primerlänge im Bereich 18-25 bp, eine Schmelztemperatur zwischen 57 und 65 °C und ein Reaktionsprodukt über 200, aber möglichst weit unter 1000 bp vorausgesetzt. Ferner wurden ein hoher Anteil an den Basen Guanin und Cytosin, das Fehlen repetitiver Sequenzen und langer Folgen identischer Basen sowie das Ende der Basenfolge am 3'-Ende mit einem Guanin- oder Cytosin-Nukleotid präferiert. Sämtliche weiteren Primerpaare waren kommerziell erhältlich (Primersequenzen Tab. 11).

2.2.6.4 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht, es mit Hilfe speziell ausgewählter Primer gezielt DNA-Abschnitte exponentiell zu amplifizieren und so selbst kleine Ursprungsmengen nachzuweisen. In Verbindung mit der zuvor durchgeführten reversen Transkription von RNA zu cDNA kann übergeordnet auch von der Methodik der Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) gesprochen werden. Durch die Kombination ist es möglich, die Transkriptionsmenge ausgewählter Gene zwischen

den Proben zu vergleichen. Der gewählte Ansatz erlaubt keine absoluten Angaben bezüglich der ursprünglich vorhandenen Zahl an mRNA-Kopien und wird daher als semiquantitativ bezeichnet.

Mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase ist es möglich, die Abschnitte zwischen zwei Primersequenzen spezifisch zu vervielfältigen. Dabei führt jeder Durchgang der Reaktionsabfolge zu einer Verdopplung der Produktmenge, sodass insgesamt ein exponentieller Anstieg an Produkten zu verzeichnen ist, welcher in der Praxis allerdings nur innerhalb bestimmter Grenzen erreicht wird. Eine initiale Denaturierungsphase bei 94 °C für drei Minuten soll sicherstellen, dass die bestehenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen gelöst werden und auch die Primer einzeln vorliegen. Es folgt eine sich dreiteilig zyklisch wiederholende Reaktionsabfolge. In der jeweiligen Denaturierungsphase werden die zuvor synthetisierten DNA-Stränge von der Matrizen-DNA und voneinander getrennt. Die folgende Anlagerungsphase dient der Bindung der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz. Länge und Temperatur dieser Phase sind maßgeblich für die Spezifität der Reaktion. In der Elongationsphase werden am 3'-Ende der Primer enzymatisch zum gebundenen Matrizenstrang komplementäre Basen angelagert und so ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Primer und freie Nukleotide liegen im Ansatz im Überschuss vor. Während die Dauer der Elongationsphase die Produktlänge im ersten Durchgang bestimmt, werden in den weiteren Zyklen DNA-Stränge zwischen den beiden Primersequenzen mit exakt definierter Länge erstellt. Spätestens die Denaturierungsphase des folgenden Zyklus beendet die Strangsynthese. Nach Durchlauf einer definierten Zyklenzahl endet die Reaktion mit einer finalen Elongationsphase. Danach werden die Proben auf 4 °C gekühlt, um weitere Reaktionen zu unterbinden.

Die weiteren verwendeten Komponenten stammen mit Ausnahme der Primer aus dem *Taq-all-inclusive-Reaktionskit*. Die Reaktionskomponenten wurden im Sinne eines „Mastermixes“ gemischt und mit je 1 µl cDNA-haltiger Probe auf ein Gesamtvolumen von 25 µl je Reaktionsgefäß eingesetzt.

Ansatz für eine Reaktion:

Aqua dest.	12,3 µl
Reaktionspuffer S	2,5 µl
Enhancer Solution P	5 µl
Vorwärtsprimer	1 µl
Rückwärtsprimer	1 µl
dNTP 10 mM	1 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Probe	1 µl

Für jeden primerspezifischen PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, welche anstelle der cDNA-Probe 1 µl Aqua_{bidest} enthalten hat. Dies ermöglicht,

Verunreinigungen und unspezifische Signale zu entdecken. Die PCR wurde im Mastercycler nach in folgender Tabelle beschriebenen Bedingungen durchgeführt:

Tab. 10: Allgemeine PCR-Bedingungen

Phase	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
Denaturierung	94 °C	10 – 30 sec
Anlagerung	55 – 58 °C	30 – 40 sec
Elongation	72 °C	30 sec
Finale Elongation	72 °C	10 min

Nachfolgend sind die Primer mit ihren jeweiligen Reaktionsbedingungen aufgeführt.

Tab. 11: Primersequenzen und PCR-Bedingungen

Gen	Sequenz	Denaturierung Anlagerung Elongation	Zyklen
<i>Flg</i>	for 5'- GCAAGTGGTCAGGGAGGATAT -3' rev 5'- GGAACGATATACCTGGAGATGC -3'	94 °C/30 sec 55 °C/30 sec 72 °C/30 sec	40
<i>Gapdh</i>	for 5'- C TTCACCACCATGGAGAAGGC -3' rev 5'- GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'	94 °C/10 sec 58 °C/40 sec 72 °C/30 sec	20,25,30 25,30,35
<i>Hrnr</i>	nicht angegeben	94 °C/30 sec 55 °C/30 sec 72 °C/30 sec	40
<i>Inv</i>	for 5'- ACAAGCAAAGCAACCAACTC -3' rev 5'- TAGCTGCTGCTTCTCCAGAT -3'	94 °C/10 sec 58 °C/40 sec 72 °C/30 sec	25,30,35
<i>Krt6</i>	for 5'- GAGGAGTGCAGGTTGAATGGT -3' rev 5'- TACGAGGAAGCCAAGAGCATC -3'	94 °C/10 sec 58 °C/40 sec 72 °C/30 sec	25,30,35
<i>Krt10</i>	for 5'- CAAAATGTGTCCACTGGTGA -3' rev 5'- TGGTGAGTTCCTTGCTCTTC -3'	94 °C/10 sec 58 °C/40 sec 72 °C/30 sec	20,25,30
<i>Krt14</i>	for 5'- GGGCTCTTGTGGTATCGGTG -3' rev 5'- CAGCTCCTCTGTCTTGCTGAA -3'	94 °C/10 sec 58 °C/40 sec 72 °C/30 sec	25,30,35 30,35,40
<i>Lor</i>	for 5'- GTGGAAAGACCTCTGGTGGGA -3' rev 5'- TGAACCACCTCCATAGGAA -3'	94 °C/10 sec 58 °C/40 sec 72 °C/30 sec	25,30,35

2.2.6.5 DNA-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ermöglicht es, DNA-Fragmente im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufzutrennen. Die benötigten Gele wurden aus 1,5% Agarose in 1x

TBE-Puffer hergestellt. Die Lösung wurde in einer Mikrowelle erhitzt und aufgeköcht, bis sie homogen war. Anschließend wurden 3 µl GelRed pro 100 ml Agarose-Gel hinzugefügt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff färbt Nukleinsäuren und ermöglicht, diese durch Anregung mit ultraviolettem Licht sichtbar zu machen. Durch einen Tascheneinsatz werden innerhalb des Gels Räume für die Proben gelassen. Nach Polymerisation auf einem Gelträger erfolgte die Überführung in eine Gelkammer, welche mit 1x TBE-Puffer befüllt wurde. Den aufzutrennenden DNA-Proben wurden je 5 µl Ladepuffer beigemischt. Dadurch erhalten die Proben eine hohe Dichte, sind leichter in die Geltaschen zu pipettieren und werden für das bloße Auge sichtbar. Jeder Taschenreihe wurde eine farbige DNA-Leitersubstanz hinzugefügt, welche die Größenbestimmung der dargestellten DNA-Fragmente erlaubt. An die Gelkammer wurde eine Spannung von etwa 130 V angelegt. Die probenhaltigen Geltaschen befinden sich an der Kathodenseite, sodass die negativ geladenen DNA-Moleküle innerhalb des Gels Richtung Anode wandern. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Visualisierung der DNA-Banden mit einem U:Genius Gel-Dokumentationsgerät. Um Bandenintensitäten zu vergleichen und somit Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene mRNA-Menge zu ziehen, ist es nötig zu zeigen, dass gleiche Mengen cDNA synthetisiert wurden. Zu diesem Zweck wurden PCR-Reaktionen von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) durchgeführt. Dieses Gen wird in den meisten Zellen nahezu gleichermaßen exprimiert und kaum durch Zelltyp, Zellzyklus oder äußere Einflüsse reguliert.

2.2.7 Proteinanalysen

2.2.7.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Messung der Gesamtproteinmenge in den epidermalen Proteinisolaten wurde die Bradford-Methode eingesetzt, welche auf der Farbänderung von Rot nach Blau durch Proteinbindung an Coomassie-Brilliant-Blau basiert. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Lösung von 470 nm hin zu 595 nm und erlaubt so eine photometrische Messung. Der Einsatz parallel angesetzter Standardlösungen mit bekannten Proteinkonzentrationen ermöglicht die Kalibrierung anhand einer Standardkurve und somit letztlich die Ermittlung der Proteinkonzentrationen der Proben. Dazu wurde je 1 µl Probe mit 800 µl Aqua_{bidest} und 200 µl Bradford-Reagenz vermischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten die Messung der Absorption bei 595 nm und die Ermittlung der Proteinkonzentration.

2.2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht, Proteine im elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Durch das im Probenpuffer vorhandene Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und

erhalten negative Ladungen. Die Proteinlysate zur Analyse der Keratine 6, 10 und 14 wurden mit 3 μl SDS-Probenpuffer und Aqua_{bidest} auf eine Proteinkonzentration von 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt und bei 95 °C für fünf Minuten im Heizblock inkubiert. Die SDS-Gele wurden nach dem Gießen und Aushärten mit je 15 μl Probe beladen, wobei zur Besserung der Darstellung nur jede zweite Geltasche benutzt wurde. Ein Größenstandard wurde ebenfalls aufgetragen. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit 1x Laufpuffer befüllt und die Proteintrennung erfolgte bei 150 V für ca. eine Stunde.

Die Analyse der Proben für Filaggrin, Involucrin und Loricrin erfolgte mit dem NuPAGE System. Die Proteinlysate wurden mit 1,5 μl *Reducing Agent*, 3,75 μl *LDS Sample Buffer* und Aqua_{bidest} auf eine Konzentration von 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt und anschließend bei 70 °C für zehn Minuten im Heizblock inkubiert. Es wurden NuPAGE Bis-Tris-Gele 4-12% mit den Proben beladen. Das Äußere der Laufkammer wurde mit ca. 600 ml *SDS Running Buffer*, das Innere mit 200 ml *SDS Running Buffer* sowie 500 μl NuPAGE Antioxidant befüllt. Die Trennung der Proteine erfolgte bei 200 V für etwa eine Stunde.

2.2.7.3 Western Blot

Nachdem die Proteine im Polyacrylamid-Gel nach Größe aufgetrennt wurden, erfolgte die Übertragung auf eine Nitrozellulose-Membran, um die weiteren Nachweisreaktionen zu ermöglichen. Dies wurde mittels des *Semy-dry-Blot*-Verfahrens realisiert. Die aus der Gelelektrophorese-Apparatur gelösten Gele wurden auf eine von kaltem Transferpuffer durchtränkte Nitrozellulose-Membran gelegt. Beidseitig wurden drei in Transferpuffer getränkte Filterpapiere beziehungsweise im NuPAGE-Verfahren je ein Filterpapier und zwei Zellstoffschwämme, aufgelegt, und es erfolgte die Platzierung im jeweiligen Transfergerät. Für das klassische Blot-Verfahren wurde eine *Trans Blot-SD-Semi-Dry-Transfer-Cell* Kammer benutzt und für 50 Minuten eine Stromstärke von 155 mA angelegt. Die im NuPAGE-Verfahren benutzte *XCell 2 Blot Module* Kammer wurde im Inneren mit Transferpuffer aufgefüllt und im äußeren Teil wurden 400 ml Aqua_{bidest} hinzugefügt. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 300 mA für eine Stunde.

Um die Signaldetektion zu ermöglichen werden Antikörper eingesetzt. Die Erstantikörper binden an spezifische Epitope. Die Zweitantikörper sind mit der Meerrettichperoxidase konjugiert. Sie binden an die Erstantikörper und ermöglichen über das gebundene Enzym die Detektion mittels Chemolumineszenz der ECL-Lösung. Die Membranen wurden bei 4 °C auf einem Schüttler über Nacht in Blockmilch inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei Raumtemperatur für 90 Minuten. Nach drei Waschschritten a zehn Minuten in TBS-T auf einem Schüttler erfolgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach

drei weiteren Waschschrritten wurden die Membranen mit ECL-Lösung versetzt und die Signaldetektion erfolgte mit einem Image Reader Las-4000. Um die Menge eines detektierten Proteins zwischen den Proben vergleichen zu können, ist es nötig, dass die Proben insgesamt gleiche Mengen an Proteinen enthalten. Um dies zu zeigen, wurde mit Aktin ein ubiquitär vorhandenes, essentielles Strukturprotein im Blot dargestellt.

Nachfolgend werden die verwendeten Erst- und Zweitantikörper in jeweiliger Verdünnung angegeben.

Tab. 12: Im Western Blot verwendete Antikörper

Antikörper gegen	eingesetzte Konzentration [mg/ml]
Aktin	Konzentration nicht angegeben Verdünnung 1:10.000 in 5% Blockmilch/TBS-T
Filaggrin	100 in 5% Blockmilch/TBS-T
Involucrin	80 in 5% Blockmilch/TBS-T
Keratin 6	500 in 5% Blockmilch/TBS-T
Keratin 10	500 in 5% Blockmilch/TBS-T
Keratin 14	400 in 5% Blockmilch/TBS-T
Loricrin	250 in 5% Blockmilch/TBS-T
Sekundärantikörper Anti-Kaninchen	160 in 0,83% Blockmilch/TBS-T
Sekundärantikörper Anti-Maus	160 in 0,83% Blockmilch/TBS-T

2.2.8 Messung der *outside-in*-Barriere mittels Lucifer Yellow

Bei Lucifer Yellow handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, er kann also angeregt durch eine Lichtquelle Licht anderer Wellenlänge emittieren. Gesunde Tierhaut ist für diesen Stoff nur in den obersten Schichten des *Stratum corneum* durchlässig.

Die getöteten Tiere wurden für eine halbe Stunde mit dem Rücken in 1 mM Lucifer Yellow-Lösung in PBS gelegt. Die Rückenhaut wurde präpariert und in *OCT-Compound* bei -80 °C eingefroren. Danach wurden Schnitte von 8 µm Dicke angefertigt und 30 Minuten in 4% PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschschrtritt mit PBS erfolgte die Eindeckelung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol) 1:1000 in *Fluorescent Mounting Medium*. Pro Serie wurde je ein Kontrollschnitt ohne Lucifer Yellow beziehungsweise ohne DAPI und unter Verzicht beider Substanzen erstellt, um unspezifische Signale und Eigenfluoreszenz darstellen zu können. Die Signalermittlung wurde mit einem Axioimager M1 mit Hilfe der Filter für Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und DAPI durchgeführt. Dabei wurden die Belichtungszeiten innerhalb einer Serie anhand des Wildtyps kalibriert.

2.2.9 Bestimmung der *outside-in*-Barriere mittels Toluidinblau

Toluidinblau ist ein blauer Farbstoff, der für intravitale und histologische Färbungen eingesetzt wird. Bei unvollständig ausgebildeter Hautbarriere kann der Stoff die Haut penetrieren und ermöglicht so eine räumliche und zeitliche Beobachtung der Reifung der Hautbarrierefunktion.

Die getöteten Tiere wurden für je eine Minute in PBS und dann in einer Reihe von 25%, 50%, 75% und 100%-Methanol in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reihe in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen. Danach wurden die Tiere für vier Minuten bei Raumtemperatur in 0,1% Toluidin-Lösung in PBS gelegt. Anschließend erfolgte eine Inkubation in PBS für 15 Minuten, um überschüssigen Farbstoff abzuwaschen. Letztlich wurden Fotografien der Tiere angefertigt.

2.2.10 Messung der *inside-out*-Barriere durch Sulfo-NHS-Biotin

Bei Sulfo-NHS-Biotin handelt es sich um ein kleines Biotin-haltiges Molekül, welches sich bei intradermaler Injektion im intakten Gewebe nach apikal nur bis zum *tight junction*-reichen *Stratum granulosum* der Epidermis ausbreitet. Die Gabe eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Biotin-affinen Streptavidins ermöglicht die Darstellung der Biotinausbreitung.

Den getöteten Tieren wurden 20 µl einer 5 mg/ml Biotin, 1 mM CaCl₂ in PBS Lösung mit einer Präzisionsspritze in die Rückenhaut injiziert. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Herstellung von Gefrierschnitten aus der Rückenhaut wie in 2.2.8 beschrieben. Die Schnitte wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Danach erfolgte die Fixierung in 4% PFA in PBS für 30 Minuten, ein Waschschrift in PBS und die Inkubation in Blocklösung 5% *fetal calf serum* (FCS) in PBS bei 4 °C über Nacht. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-Cy3 1:500 verdünnt in 2,5% FCS in PBS. Nach einem Waschschrift erfolgte die Eindeckelung mit DAPI 1:1000 in *Fluorescent Mounting Medium*. Die Signalermittlung wurde mit einem Axioimager M1 mit Hilfe der Filter für DsRed und DAPI durchgeführt. Dabei wurden die Belichtungszeiten innerhalb einer Serie anhand des Wildtyps kalibriert.

2.2.11 Erfassung des Wasserverlustes der Haut (TEWL)

Das Tewameter[®] erlaubt es, den aktuellen Wasserverlust der Haut (TEWL = *transepidermal water loss*) an der Stelle unter der Messsonde zu ermitteln. Um den Einfluss von Störfaktoren auf die empfindliche Messung möglichst gering zu halten, wurden alle Experimente auf einer Sterilbank bei abgeschalteter Luftzufuhr durchgeführt. Es wurde eine zusätzliche Barriere gegen Luftströmungen eingesetzt und der Untersucher trug zu jeder Zeit Handschuhe.

Unter Schonung der Haut wurde eine Rückenpartie fein rasiert, wobei je Maus eine Hautstelle ausgewählt wurde, deren Haar sich nicht im aktiven Wachstumszustand befand. Am Folgetag wurde ein basaler Verdunstungswert ermittelt und es wurden je zwei Streifen Tesafilm nacheinander auf die rasierte Stelle geklebt, angedrückt und abgezogen. Verdunstungswerte wurden über die folgenden vier Tage ermittelt. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt und die Werte wurden nach der Stabilisierung der jeweiligen Messung registriert. Die Raumtemperatur betrug 20-23 °C und die Luftfeuchtigkeit 40-70%.

2.2.12 Ultraschallbehandlung verhornter Zellhüllen

Um die mechanische Stabilität der Bestandteile der verhornten Haut zu beurteilen, wurde zuerst die Epidermis isoliert und dann wurden die Zellhüllen vereinzelt. Die Rückenhaut getöteter vier Tage alter Tiere wurde präpariert und für 30 Sekunden bei 65 °C schwimmend in einer 10 mM EDTA/PBS-Lösung inkubiert. Mittels zweier Pinzetten erfolgte die mechanische Abtrennung der Epidermis. Diese wurde kurz in PBS gespült und dann für 20 Minuten bei 95 °C in 2% SDS-Extraktionspuffer inkubiert. Die Proben wurden dann bei 12000 g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurde erneut 2% SDS-Extraktionspuffer hinzugegeben. Heiz- und Zentrifugationsschritt wurden einmalig wiederholt. Zweimalig wurde 0,2% SDS-Extraktionspuffer hinzugegeben und jeweils erneut zentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2% SDS-Extraktionspuffer und die Proben wurden kurzzeitig bei 4 °C gelagert. Die Anzahl an Zellhüllen wurde mittels einer Zählkammer für jede Probe ermittelt und es wurden jeweils Ansätze aus 1 ml mit 4×10^5 Zellhüllen generiert. Die Ansätze wurden dann in Eppendorf-Gefäßen in ein Ultraschallbad überführt. Die Darstellung erfolgte mit einem AxioVert Mikroskop, die Auszählung mit Hilfe des Programms ImageJ.

2.2.13 Statistik

Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Zwischen den Gruppen wurden statistische Vergleiche mit dem *Student's-paired-t*-Test durchgeführt. Beim Vergleich von Gruppen geringer Größe kann der t-test für das Erkennen großer Unterschiede als zuverlässig eingestuft werden (de Winter 2013). Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Doppelter *Knockout* von Filaggrin und Hornerin führt zu *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen

Voraussetzung für die wissenschaftliche Nutzbarkeit des vorliegenden *Knockout*-Mausstammes ist die tatsächliche Inaktivierung beziehungsweise Entfernung der Ziel-Gene. Da die Filaggrin- und Hornerin-Gene aus aufeinanderfolgenden und sich wiederholenden DNA-Sequenzen aufgebaut sind, musste die Deletion im *Knockout*-Stamm auf verschiedenen Ebenen nachgewiesen werden. Dadurch konnte eine theoretisch mögliche Restaktivität verbliebender (Teil)-Sequenzen der Gene ausgeschlossen werden. Neugeborene Mäuse sowie Tiere im Alter von vier, zehn, 21, 42 sowie 84 Tagen wurden untersucht. Gleich alte Wildtyp-Mäuse dienten als Positivkontrolle.

Im Western Blot wurde kein Filaggrin-Protein in den *Knockout*-Tieren detektiert. Der Wildtyp zeigte neben der zu erwartenden Bande bei etwa 27 kDa auch deutliche Signale bei Vielfachen dieser Größe wie ca. 54 kDa und ca. 110 kDa. Es fanden sich insgesamt Banden über ein weites Spektrum an Proteingrößen (Abb. 4a). Ein spezifischer Nachweis von Hornerin im Western Blot gelang mit kommerziell erhältlichen Antikörpern nicht. Auch in der Immunhistochemie konnte für Filaggrin und Hornerin kein Signal in den *Knockout*-Tieren detektiert werden. In Wildtyp-Mäusen wurde Filaggrin mit körnigem Muster in Keratohyalin granula des *Stratum granulosum* angefärbt. Im *Stratum corneum* zeigte sich ein gleichmäßigeres Signal. Hornerin wies ein homogeneres Anfärbemuster auf, welches scharf begrenzt im *Stratum granulosum* begann und sich nach apikal fortsetzte (Abb. 4b). Mittels RT-PCR konnte keine Transkription der Gene von Pro-Filaggrin und Hornerin in der *Knockout*-Maus nachgewiesen werden. GAPDH wurde als Ladekontrolle eingesetzt (Abb. 4c).

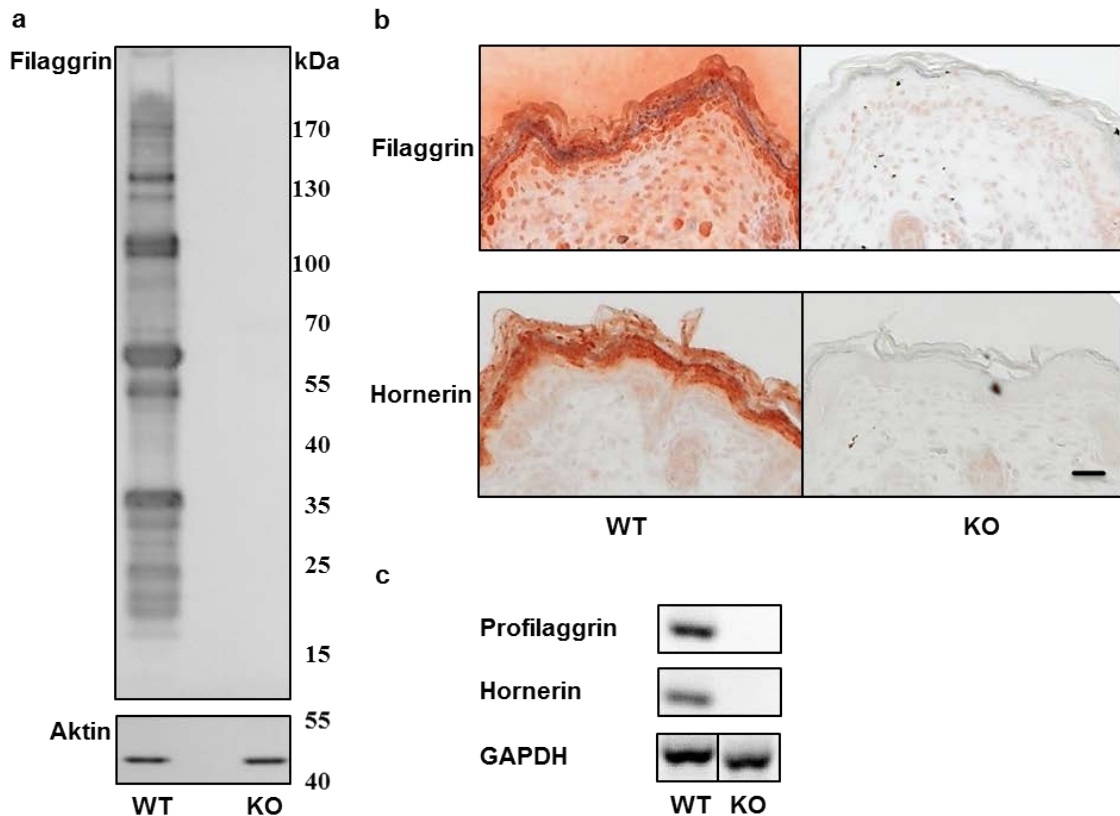


Abb. 4: Filaggrin und Hornerin sind in *FlgHrrn*^{-/-}-Mäusen nicht nachweisbar.

a) Aus den Proteinisolaten der *epidermal sheets* wurden Western Blots mit einem Antikörper gegen Filaggrin durchgeführt. Zur Ladekontrolle wurde Aktin detektiert. Abgebildet sind die Blots je eines neugeborenen Tieres beider Stämme. Das Ergebnis ist repräsentativ für die oben genannten Altersgruppen (n = 5, Skala = Proteinmasse in Kilodalton). Der Wildtyp zeigte viele Banden über ein weites Spektrum, bei keinem *Knockout*-Tier ließ sich ein Signal detektieren. **b)** Aus in Paraffin fixierter Rückenhaut von Mäusen beider Stämme wurden 3 µm dicke Schnitte immunhistochemisch mit gegen Filaggrin- beziehungsweise Hornerin gerichteten Antikörpern gefärbt. Das dargestellte Ergebnis bezieht sich auf neugeborene Mäuse (n = 3, Maßstab = 50 µm). Gleiche Ergebnisse wurden für Tiere im Alter von 4, 10 sowie 84 Tagen erzielt (n = 3). Der Wildtyp zeigte eine Anfärbung im *Stratum granulosum* sowie *Stratum corneum*, während bei keinem *Knockout*-Tier ein Signal detektiert werden konnte. **c)** *Epidermal sheets* wurden von neugeborenen Tieren gewonnen und nach mRNA-Isolation und Generierung von cDNA wurden PCRs für *Flg* und *Hrrn* durchgeführt. *GAPDH* diente als Ladekontrolle. Die dargestellten Ergebnisse stammen von neugeborenen Mäusen (n = 6). Mit den verwendeten Primern konnte in keinem *Knockout*-Tier ein amplifiziertes Genprodukt nachgewiesen werden, während alle Tiere des Wildtyps Banden ähnlicher Dichte zeigten. Gleiche Ergebnisse konnten bei Mäusen im Alter zwischen 4 und 84 Tagen erzielt werden (n = 6).

3.2 *FlgHrnr*^{-/-}-Mäuse entwickeln transient Hautsymptome

Um die Entwicklung der Mäuse zu verfolgen, wurden verschiedene Tiere am Tag ihrer Geburt (Null Tage; Neugeborene) sowie junge Tiere im Alter von vier, zehn und 21 Tagen sowie adulte Tiere im Alter von 42 sowie 84 Tagen in Gruppen von jeweils mindestens drei Tieren pro Stamm inspiziert und fotodokumentiert. Am Tag der Geburt wiesen die mutierten Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen lediglich eine etwas weniger dehnbare Haut auf (Abb. 5a). Darüber hinaus waren keine weiteren Unterschiede auszumachen (nicht dargestellt).

Am vierten Lebenstag trat ein deutlicher phänotypischer Unterschied zutage. Die Haut wirkte gespannt und trocken und wies generalisiert grobe Hautschuppen auf. Des Weiteren erschienen die Pfoten geschwollen und bei den meisten *Knockout*-Tieren war die jeweils fünfte Zehe aller Pfoten abduziert. Am gesamten Schwanz fanden sich zirkuläre Einziehungen und Schuppung (Abb. 5b).

Im Alter von zehn Tagen waren die Tiere bereits vollständig behaart. Strich man diesen Tieren durch das Haar oder rasierte man die Haut, so zeigten sich bei den *Knockout*-Mäusen vermehrt einzelne Hautschuppen, der deutlich pathologische Phänotyp jüngerer Mäuse war aber nicht mehr nachweisbar. Die Pfoten zeigten keine Schwellung mehr, die Haut war allerdings besonders an der Unterseite der Tiere grob geschuppt. Die Haut des Schwanzes hatte zahlreiche zirkuläre Einschnürungen und Schuppen. Während der Schwanz der Wildtyp-Mäuse weich und flexibel war, war die Haut der mutierten Tiere rigide. Die Schwanzspitzen wurden auf der Länge einiger Millimeter rot bis schwarz und gingen bei den meisten *Knockout*-Tieren verloren (Abb. 5c).

Danach bildeten sich die Veränderungen an Schwanz und Haut zurück, sodass bereits im Alter von 21 Tagen keine Hautsymptome mehr zu beobachten waren. Dieser Zustand hatte bis in das Erwachsenenalter der Tiere Bestand (Abb. 5d).

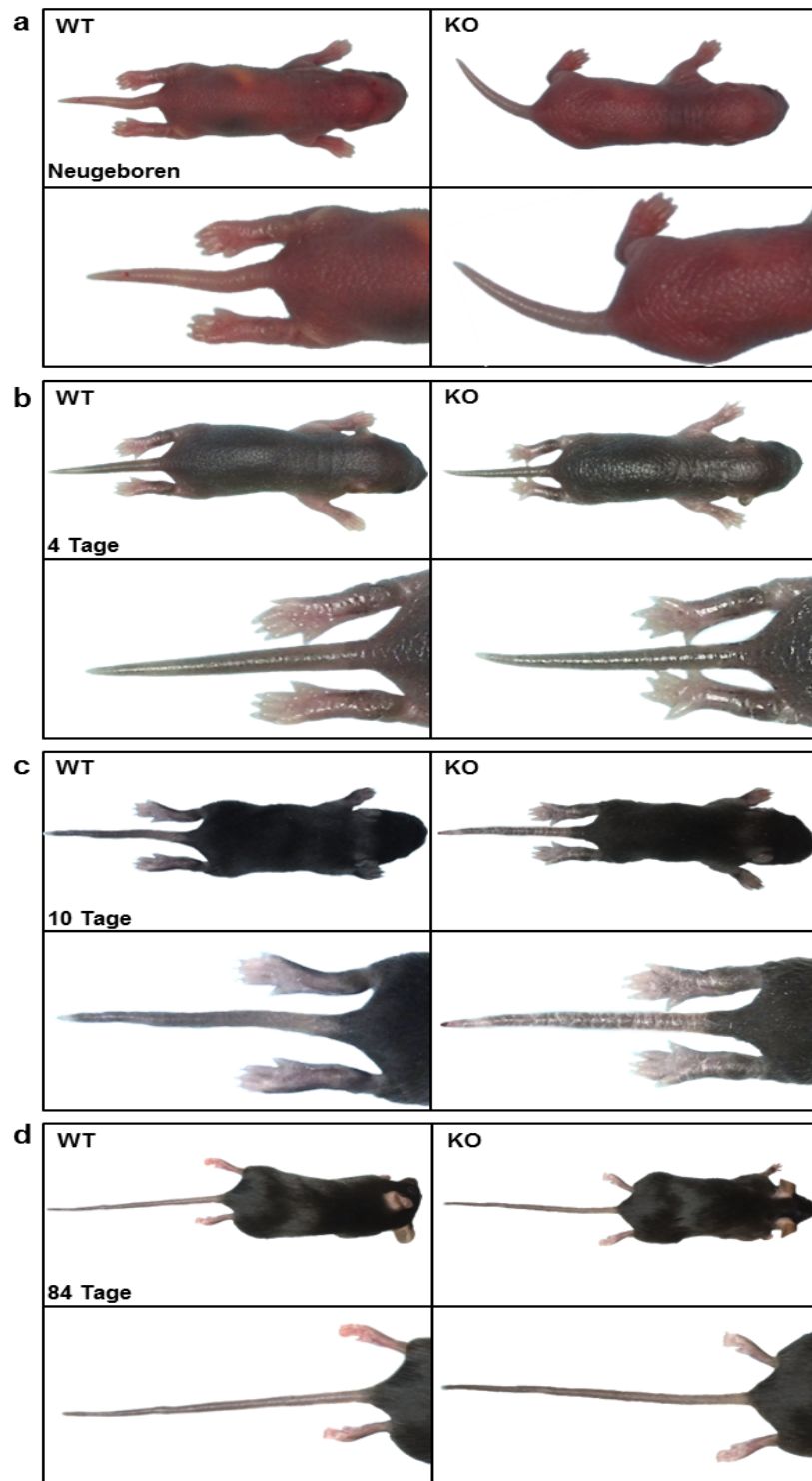


Abb. 5: *FlgHnr*^{-/-}-Mäuse entwickeln transient schuppige Haut und Veränderungen an Schwanz und Pfoten. **a)** Neugeborene Mäuse zeigten keine wesentlichen Unterschiede. **b)** Im Alter von vier Tagen wirkte die Haut gespannt, stärker gefurcht und es zeigten sich am ganzen Körper grobe Schuppen. Die Pfoten wirkten geschwollen. Am Schwanz entstanden zirkuläre Einziehungen. **c)** Mit zehn Tagen waren Einschnürungen an Schwanz und Pfoten sichtbar. Bei einigen Tieren war eine Verfärbung der Schwanzspitze zu beobachten, bei der es im Verlauf zum Verlust selbiger kam. Die Pfoten wirkten nicht mehr geschwollen. **d)** Im Alter von 84 Tagen waren die Hautsymptome nicht mehr erkennbar.

3.3 *FlgHrrr*^{-/-}-Mäuse haben kürzere Schwänze und kleinere Ohren

Um die Entwicklung der Mäuse zu quantifizieren, wurden Körper- und Schwanzlänge sowie die Körpermasse der mutierten sowie der Wildtyp-Mäuse bestimmt. Die Körpermasse als Parameter für Entwicklungsreife und -geschwindigkeit war zu keinem Alterszeitpunkt signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Mausstämmen. An den Tagen zehn und 21 schien der Wildtyp mit 5,26 g (SD±0,76 g) beziehungsweise 8,35 g (SD±1,44 g) tendenziell schwerer als die *FlgHrrr*^{-/-}-Mäuse mit 5,0 g (SD±0,62 g) beziehungsweise 7,78 g (SD±0,48 g) zu sein. Das Gewicht älterer Mäuse zeigte sowohl zwischen den beiden Stämmen als auch innerhalb der pro Stamm gemessenen Tiere eine nur sehr geringe Variabilität (Abb. 6a).

Bei Betrachtung der reinen Körperlängen, definiert als Strecke von der Nasenspitze bis zur Schwanzwurzel, wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren festgestellt (nicht dargestellt). Ab einem Alter von zehn Tagen konnten signifikante Unterschiede der Schwanzlängen ermittelt werden. Während Wildtyp-Mäuse im Alter von zehn Tagen eine durchschnittliche Schwanzlänge von 3,43 cm (SD±0,28 cm) aufwiesen, betrug die Länge bei der *FlgHrrr*^{-/-}-*Knockout*-Maus im Mittel 2,78 cm (SD±0,2 cm). Nach 21 Tagen Lebenszeit betrugen diese Werte 4,85 cm (SD±0,12 cm) und 4,4 cm (SD±0,25 cm), an Tag 42 6,93 cm (SD±0,41 cm) und 6,01 cm (SD±0,4 cm), an Tag 56 7,24 cm (SD±0,19 cm) und 6,84 cm (SD±0,48 cm) sowie an Tag 84 8,0 cm (SD±0,33) und 7,13 cm (SD±0,22 cm) (Abb. 6b).

Erwachsene *FlgHrrr*^{-/-}-*Knockout*-Mäuse hatten deutlich kleinere Ohren als Wildtyp-Mäuse, im Verlauf vergrößerte sich der Unterschied (Abb. 6c). Mit 42 Tagen konnte bei den *Knockout*-Tieren im Mittel eine Ohrfläche von 0,58 cm² (SD±0,04 cm²) gegenüber 0,78 cm² (SD±0,03 cm²) bei Wildtyp-Tieren ermittelt werden. Die Ohren waren somit durchschnittlich rund 26 Prozent kleiner. Bei den 84 Tage alten Tieren wurde eine Fläche von 0,58 cm² (SD±0,05 cm²) gegenüber 0,85 cm² (SD±0,06 cm²) gemessen. Dies entspricht einer Verringerung der Ohrfläche um etwa 31 Prozent (Abb. 6d).

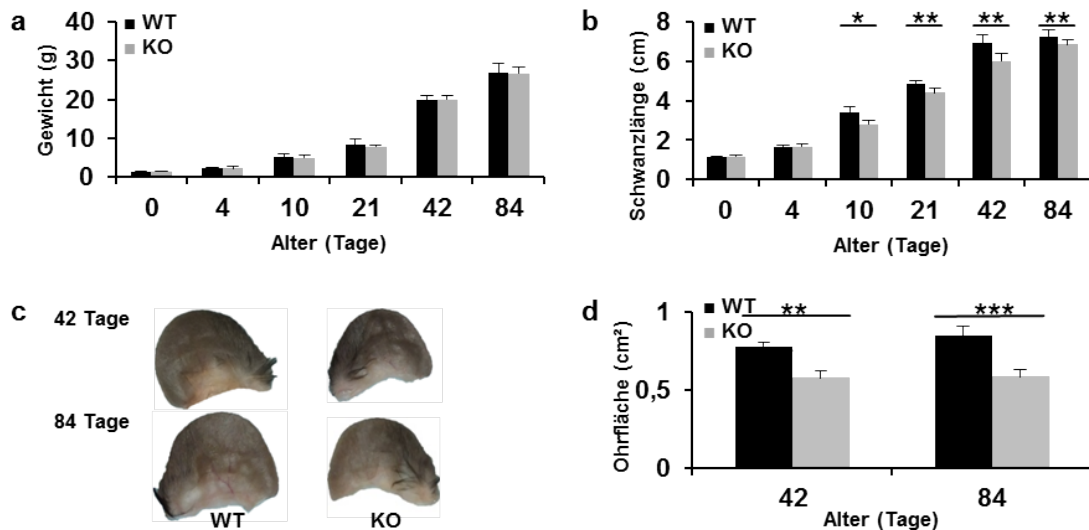


Abb. 6: *FlgHrrn*^{-/-}-Mäuse haben kleinere Ohren und kürzere Schwänze. a) Tiere verschiedenen Alters wurden gewogen und die Ergebnisse als Mittelwerte dargestellt (n = 6, Fehlerbalken = Standardabweichung). Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Körpermasse zwischen den Stämmen festgestellt werden. b) Dargestellt wurde die Durchschnittslänge des Schwanzes pro Stamm und Alter (n = 6, Fehlerbalken = Standardabweichung, Signifikanzniveau: * = p<0,05, ** = p<0,01 ermittelt mit dem *Student's t*-Test). Ab einem Alter von zehn Tagen besaßen die *Knockout*-Tiere einen signifikant kürzeren Schwanz. c) Die Ohren der Tiere wurden abgetrennt und flach auf einer Unterlage fotografiert. d) Die Ermittlung der Ohrfläche erfolgte computergestützt. Dargestellt wurde die durchschnittliche Ohrfläche pro Stamm und Alter (n = 6, Fehlerbalken = Standardabweichung, Signifikanzniveau: ** = p<0,01, *** = p<0,001). An beiden Zeitpunkten zeigten die *Knockout*-Tiere signifikant kleinere Ohren.

3.4 Aberrantes *Stratum granulosum* und kompakte Hyperkeratose in *FlgHrrn*^{-/-}-Mäusen

Um den strukturellen Aufbau der Haut, besonders der Epidermis, darstellen zu können, wurden Schnitte der Rückenhaut von Mäusen unterschiedlicher Altersstufen mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dabei werden basophile Strukturen wie Zellkerne blauviolett, azidophile Strukturen rötlich eingefärbt.

Im Vergleich der Färbungen neugeborener Mäuse fanden sich innerhalb der Dermis keine Auffälligkeiten gegenüber dem Wildtyp (nicht dargestellt). Im *Stratum granulosum* der Epidermis waren die namensgebenden Granula nur vereinzelt zu erahnen. Unregelmäßig waren an der Grenzschicht zum *Stratum corneum* flächig intensiver angefärbte Zellen zu erkennen, welche im Wildtyp aufgrund der deutlichen Granulierung aller Zellen dieser Schicht nicht abgrenzbar waren. In beiden Stämmen fanden sich in dieser Schicht unregelmäßig vereinzelt Zellen mit noch vorhandenem Zellkern. Die verhornte Zellschicht der *Knockout*-Mäuse erschien dichter und weniger dick.

Im Alter von vier Tagen waren innerhalb der Dermis bereits deutlich die Haarfollikel im Anagen zu erkennen (nicht dargestellt). Beide Stämme zeigten im Vergleich zu Neugeborenen ein dickeres und aus mehr Schichten bestehendes *Stratum corneum* (Abb. 7a). Dessen Struktur wirkte im Wildtyp durch lakunenartige Zwischenräume aufgelockert. Diese waren bei *FlgHrrnr*^{-/-}-Tieren kaum zu finden, sodass ein kompakterer Eindruck entstand. Der morphologische Unterschied war bei den vier Tage alten Tieren wesentlich deutlicher zu erkennen als bei Mäusen anderen Alters. Die *FlgHrrnr*^{-/-}-Mäuse wiesen nach der Geburt und im Alter von 4 Tagen ein kompakteres *Stratum corneum* auf. Die Dicke dieser Hautschicht war im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant verringert (Abb. 7b). Im Alter von zehn Tagen bestand die Epidermis der inzwischen komplett behaarten Tiere aus weniger kernhaltigen Schichten. Oberhalb des klar abgrenzbaren *Stratum basale* fanden sich nur wenige weitere kernhaltige Zellen, bis sich das *Stratum corneum* anschloss. Dieses war im Vergleich zu jüngeren Tieren dünner und weniger kompakt (Abb. 7a).

Antikörper gegen PCNA färben spezifisch Zellkerne, welche sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden und identifizieren somit proliferierende Zellen. Lichtmikroskopisch wurden alle signalreichen Kerne gezählt, die sich in der Epidermis befinden (Abb. 7c). Die jeweils im Gesichtsfeld betrachtete Länge des Hautschnittes wurde ermittelt und die Zellkernzahl dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse wurden als Verhältnis der Kerndichte im *Knockout*-Stamm zu derjenigen im Wildtyp-Stamm dargestellt. Von jedem Stamm wurden von je drei Tieren der genannten Lebensalter fünf Gesichtsfelder in 20-facher Vergrößerung betrachtet. Bei neugeborenen Tieren betrug das Verhältnis 1,2, bei vier Tage alten 0,95, bei zehn Tage alten 1,3 und bei 84 Tage alten 0,8 (Abb. 7d).

Immunhistochemische Färbungen erlauben in Geweben die räumliche Zuordnung der Proteinexpression. In der Epidermis sind dadurch Bezugnahmen auf die verschiedenen Schritte des Verhornungsprozesses möglich. Es wurden Schnitte der Rückenhaut neugeborener Tiere sowie von Mäusen im Alter von vier, zehn sowie 84 Tagen verwendet. In Abb. 7e sind die Ergebnisse repräsentativ für vier Tage alte Tiere dargestellt. In der Involucrin-Färbung zeigte sich ein Signal innerhalb der abflachenden Zellen des *Stratum granulosum* mit Betonung nach apikal. Bei den jüngeren Tieren ließen sich zwei bis drei signalreiche Zellschichten ausmachen. Ab einem Alter von zehn Tagen ließ sich die Färbung nur noch als inkonsistentes Band unterhalb des *Stratum corneum* erkennen. Das *Stratum corneum* selbst zeigte keine Färbung. Loricrin wurde ebenfalls im *Stratum granulosum* exprimiert, allerdings mit weniger ausgeprägter apikaler Betonung. Bei den älteren Tieren erschien die Involucrin-Färbung konstanter und war nur vereinzelt unterbrochen. Das *Stratum corneum* zeigte kein Signal. Keratin 6 wurde nicht konsistent exprimiert. Ab einem Alter der Tiere von zehn Tagen wurde die

Kutikula der Haarfollikel angefärbt. Keratin 10 wurde suprabasal und Keratin 14 im *Stratum basale* sowie der basalen Schicht des *Stratum spinosum* exprimiert.

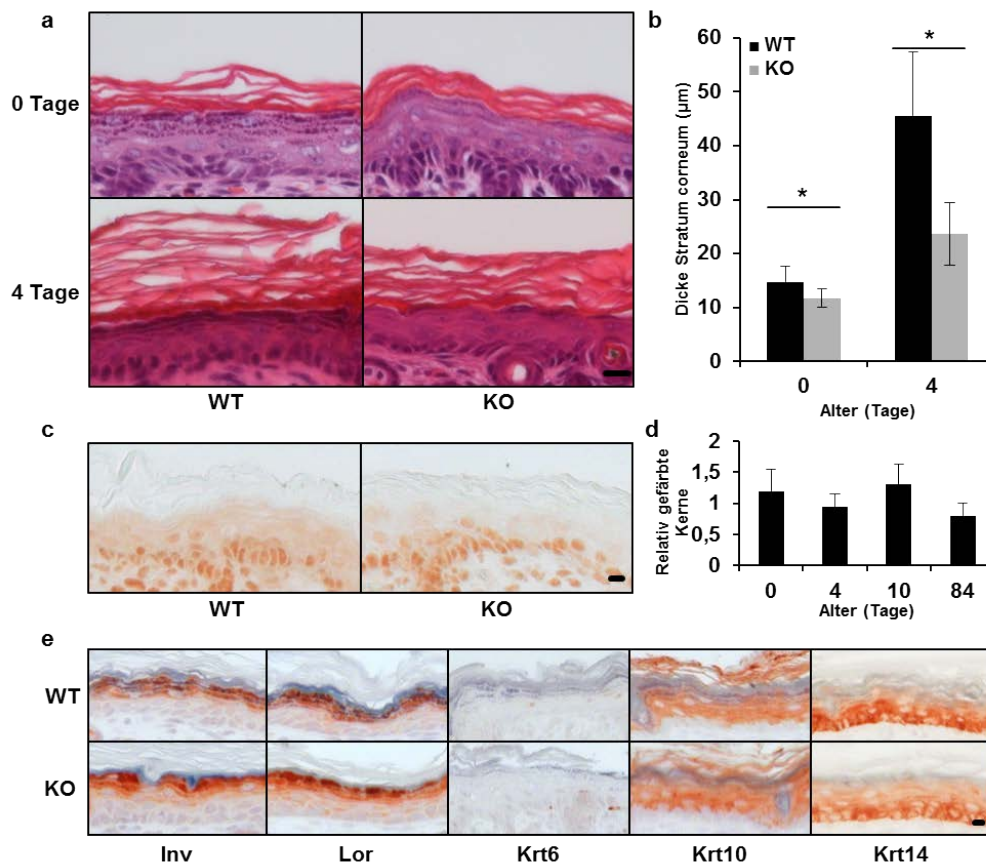


Abb. 7: Kompakte Hyperkeratose und verminderte Granula im *Stratum granulosum* in *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen. a) Paraffin-eingebettete Rückenhaut wurde in 3 µm dicken Schnitten mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Dargestellt sind Schnitte von neugeborenen sowie 4 Tage alten Tieren (n = 3, Maßstab = 10 µm). Die Granula im *Stratum granulosum* waren in *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen weitgehend verloren. Das *Stratum corneum* wirkte kompakter und weniger dick. b) Die Schichtstärke des *Stratum corneum* wurde bei Neugeborenen und Tieren im Alter von 4 Tagen ermittelt (n = 3, Fehlerbalken = Standardabweichung, Signifikanzniveau: * = p<0,05). Es wurde für beide Altersgruppen eine signifikant verringerte Dicke in *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen ermittelt. c) Die PCNA-Kernfärbung an Schnitten paraffin-fixierter Rückenhaut ergab d) keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Anzahl proliferierender Zellen innerhalb der Epidermis (Maßstab = 50 µm). e) Immunhistochemische Färbungen wurden an der Rückenhaut von Mäusen im Alter von 0, 4, 10 und 84 Tagen durchgeführt. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis 4 Tage alter Tiere (n = 3, Maßstab = 50 µm, Inv = Involucrin, Lor = Loricrin, Krt6 = Keratin 6, Krt10 = Keratin 10, Krt14 = Keratin 14). Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in Signalstärke oder Signallokalisation.

3.5 Unveränderte Expression relevanter Proteine des Verhornungsprozesses in *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen

Um Veränderungen der Zellhomöostase und des Verhornungsprozesses zu erfassen, wurden die Transkription und Proteinexpression mehrerer gut charakterisierter Genprodukte bei Mäusen unterschiedlichen Alters untersucht.

Im Western Blot können die Proteine im Zellysate im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und anschließend durch spezifische Antikörper detektiert werden. Vergleichende Aussagen über die vorhandene Proteinmenge sind anhand der Signalintensität und -größe ebenfalls möglich.

Für Involucrin und Loricrin zeigten sich, neben der der Proteinmasse entsprechenden Bande, weitere Signale sowohl über- als auch unterhalb der jeweiligen Größe. Der Western Blot für Keratin 6 zeigte für neugeborene Mäuse nur sehr schwache Signale. Auch für Keratin 10 und 14 konnten Signale für unterschiedliche Proteinmassen detektiert werden. Die Ausprägungen dieser zusätzlichen Banden waren abhängig vom Alter der Tiere. Abb. 8a zeigt das Ergebnis bei vier Tage alten Tieren. Durch die Messung der Bandendichte und Normalisierung mittels des ubiquitär exprimierten Aktin ist eine relative Messung der vorhandenen Proteinmenge möglich (Abb. 8b). Auch unter wiederholter Proteinextraktion und mehrfachen Messwiederholungen waren die Detektionssignale für Aktin zwischen den Tieren inkonstant. Soweit unter dieser Einschränkung beurteilbar zeigten sich keine konsistenten Unterschiede über verschiedene Alterszeitpunkte hinweg.

Durch RT-PCR können Unterschiede in der Genexpression detektiert und Rückschlüsse auf die Menge transkribierter mRNA gezogen werden. Zur Normalisierung wurde GAPDH eingesetzt (Abb. 8c). Es zeigten sich keine konsistenten Unterschiede zwischen den Mausstämmen über die Alterszeitpunkte hinweg. Abb. 8d zeigt repräsentativ das Ergebnis für vier Tage alte Tiere.

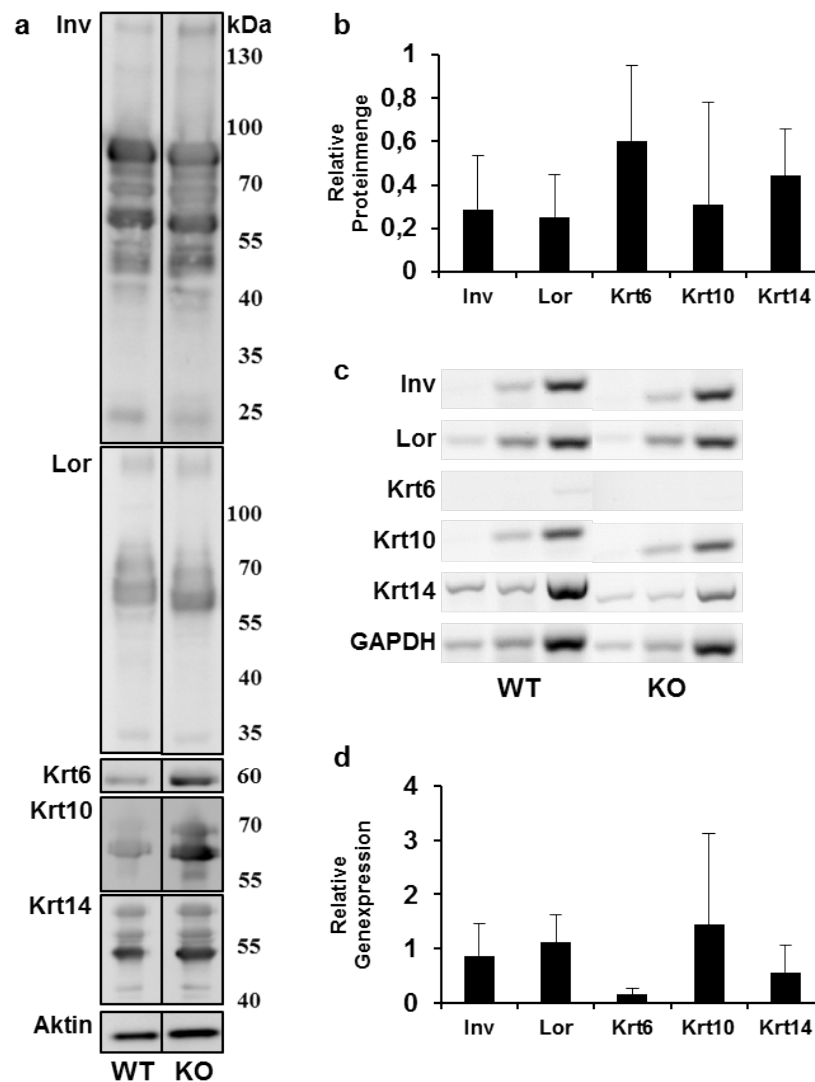


Abb. 8: Die Expression relevanter Differenzierungsmarker ist in *FlgHrnr*^{-/-}-Mäusen unverändert. **a)** Proteine aus *epidermal sheets* von Mäusen im Alter von 0 bis 84 Tagen wurden durch Western Blots identifiziert. Abgebildet sind Blots vier Tage alter Tiere. Als Ladekontrolle diente Aktin (n = 3, Skala = Proteinmasse in Kilodalton). **b)** Zur densitometrischen Auswertung wurde die Intensität der Banden mit Aktin ins Verhältnis gesetzt, um Schwankungen in der verwendeten Proteingesamtmenge auszugleichen. Anschließend wurde der Mittelwert der jeweiligen *Knockout*-Maus in Relation zum Wildtyp dargestellt. Gezeigt ist das Ergebnis der Experimente an vier Tage alten Tieren (n = 3, Fehlerbalken = Standardabweichung). Über alle Zeitpunkte betrachtet ließen sich keine konsistenten Veränderungen der Proteinexpression erkennen. **c)** Aus *epidermal sheets* wurde mRNA in cDNA umgeschrieben, um die Genexpression zu analysieren. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis für vier Tage alte Tiere (n = 6). **d)** Zur densitometrischen Auswertung wurden die Bandendichten jeweils mit GAPDH ins Verhältnis gesetzt, um Schwankungen in der eingesetzten Probenmenge auszugleichen. Anschließend wurden die Mittelwerte des *Knockout*-Stammes in Relation zum Wildtyp für das jeweilige Alter errechnet und für Mäuse im Alter von vier Tagen dargestellt (n = 6, Fehlerbalken = Standardabweichung). Zu allen Zeitpunkten war die Genexpression der beiden Stämme ähnlich.

3.6 *FlgHrnr*^{-/-}-Mäuse entwickeln eine funktionelle *outside-in*-Hautbarriere

Funktionell kann die Hautbarriere in die Regulation der Stoffabgabe an die Umwelt (*inside-out*) und die Aufnahme von Substanzen aus der Umgebung (*outside-in*) eingeteilt werden. Die Barrierefunktion gegenüber externen Stoffen wurde mittels zweier Experimente untersucht.

Für die Untersuchungen mit Lucifer Yellow wurden zu drei Zeitpunkten (E18.5 = embryonaler Tag/Tage seit Zeugung, Tag null und Tag vier) Proben von jeweils drei Mäusen pro Stamm verwendet. Zu allen untersuchten Alterszeitpunkten zeigte sich eine Penetration des Farbstoffes durch das *Stratum corneum* mit einer scharfen Abgrenzung nach basal. Ein tieferes Eindringen von Lucifer Yellow konnte bei keinem Tier beobachtet werden (Abb. 9a).

An Tag E16.5 zeigten die Tiere beider Stämme eine vollständige intensive Anfärbbarkeit mit Toluidinblau. An Tag E17.5 war die Rückenpartie nicht mehr angefärbt. Es verlief eine relativ scharfe Permeabilitätsgrenze von rostral nach kaudal. Es bestanden zwischen den Tieren Unterschiede in der Ausdehnung der impermeablen Zone. Bei den *Knockout*-Tieren waren die interindividuellen Unterschiede stärker ausgeprägt. Insgesamt konnte allerdings keine eindeutige Differenz in der Entwicklungsgeschwindigkeit zwischen den Mausstämmen festgestellt werden. Auch das Muster der Barriere-Entwicklung erschien bei den *Knockout*-Tieren nicht aberrant. An Tag E18.5 sowie bei älteren ebenfalls untersuchten Tieren konnte keine Permeabilität für den Farbstoff festgestellt werden (Abb. 9b). Um die mit dieser Methode feststellbare Entwicklung der Permeabilitätsbarriere der Haut für das menschliche Auge deutlicher zu visualisieren, wurde zusätzlich eine Abbildung mit einem verschobenen Farbspektrum angefertigt, welche eine höhere Kontrastwahrnehmung ermöglicht (Abb. 9c).

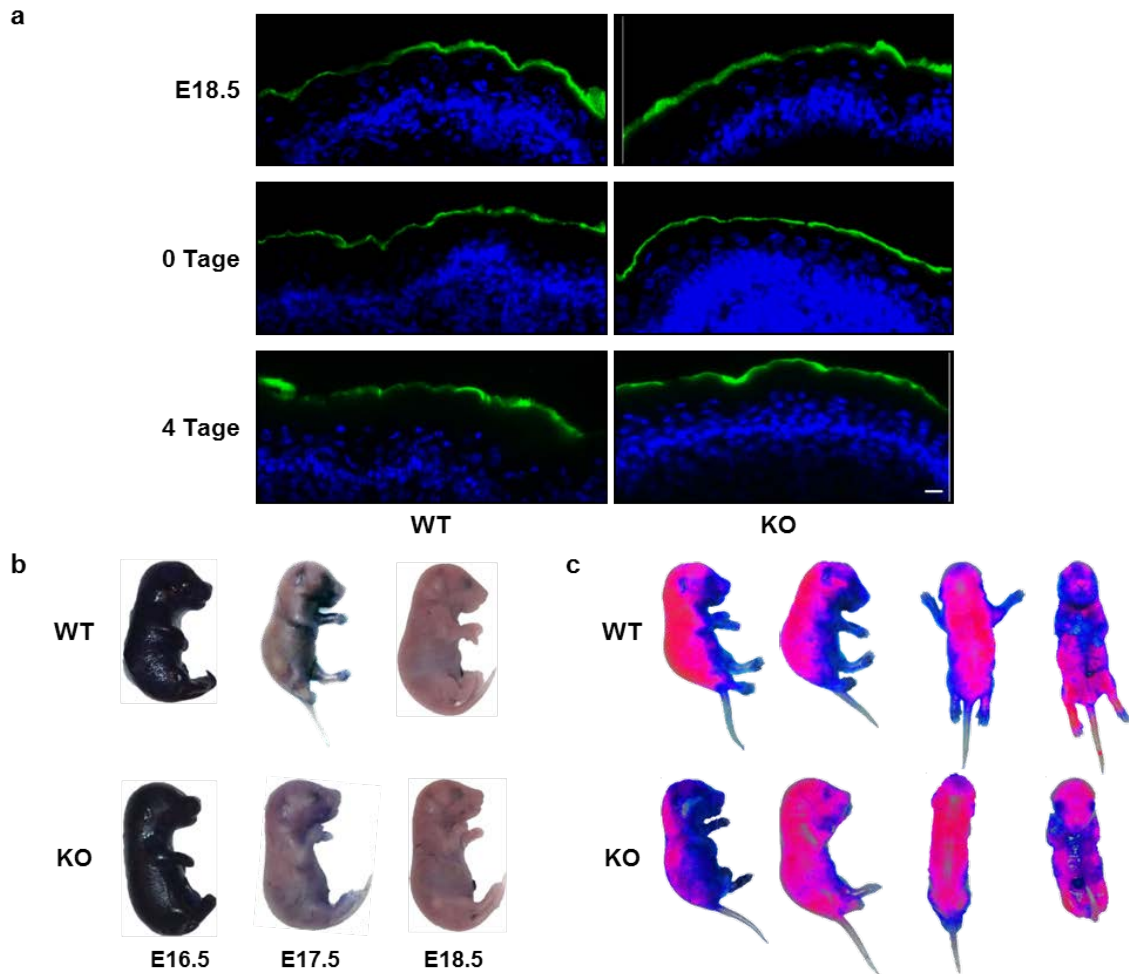


Abb. 9: Die funktionelle *outside-in*-Barriere in *FlgHrrn*^{-/-}-Mäusen entwickelt sich regelrecht. a) Tiere im Alter von E18.5, null und vier Tagen wurden mit dem Rücken in Lucifer Yellow inkubiert. Anschließend wurden Gefrierschnitte dieser Haut angefertigt und zusätzlich mit DAPI als Kernfärbung versetzt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte in den Kanälen für FITC und DAPI (n = 3, Maßstab = 10 µm). Es zeigte sich keine veränderte Penetration von Lucifer Yellow, welches bei allen Tieren ausschließlich im *Stratum corneum* nachweisbar war. b) Tiere mehrerer prä- und postnataler Alterspunkte wurden in Toluidinblau inkubiert (n >= 3). Während zum Zeitpunkt E16.5 eine vollständige Anfärbung der Tiere erfolgte, zeigte sich an E17.5 eine Anfärbbarkeit meist nur noch ventral. Dabei war die Ausprägung der Impermeabilität im *Knockout*-Stamm variabler. Zum Zeitpunkt E18.5 und später zeigte kein Tier eine Anfärbbarkeit. c) Verschobenes Farbspektrum bei E17.5 zur besseren Kontrastierung der Permeabilitätsgrenze. Lila entspricht Impermeabilität.

3.7 Die funktionelle *inside-out*-Barriere ist in *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen unverändert

Auch zur Beurteilung der *inside-out*-Barriere wurden zwei komplementäre Versuchsreihen durchgeführt. Pro Stamm wurden jeweils drei neugeborene sowie vier Tage alte Mäuse mit Biotin-Sulfon-Penetrations-Experimenten untersucht. Oberhalb der Basallamina zeigte sich ein scharf abgegrenztes Signal entlang der Interzellularspalten des *Stratum basale* und *Stratum spinosum*. Bei keinem Tier konnte eine vollständige Penetration des *Stratum granulosum* angenommen werden, da das Farbsignal nie alle kernhaltigen Schichten einschloss. Entsprechend unterschieden sich die Stämme nicht bezüglich Ausbreitungsmuster und -höhe des Fluoreszenzstoffes (Abb. 10a).

Die Körpermasse neugeborener sowie vier Tage alter Mäuse beider Stämme zeigte bei einer Beobachtung über 6 Stunden ohne Nahrungsaufnahme oder Urinabgabe nur eine minimale Abnahme (Abb. 10b). Eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Stämmen für neugeborene ($F(8,53) = 0,001$; $p = 1$) sowie vier Tage alte Tiere ($F(9,79) = 0,0004$; $p = 0,99$).

Die Messung des Wasserverlustes über der Haut mittels TEWA-Meter wurde an jeweils neun Mäusen im Alter von etwa acht Wochen durchgeführt. Der TEWL erwachsener Tiere einen Tag nach Rasur des Rückens zeigte sich für die *Knockout*-Tiere tendenziell geringer (Abb. 10c). Nach mechanischer Beanspruchung mittels *tape stripping* ergab eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung einen Effekt des Mausstammes ($F(6,125) = 12,13$; $p < 0,01$) auf die Höhe des Wasserverlustes. Ein Bonferroni-korrigierter *post-hoc* Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen. *FlgHrrr*^{-/-}-Mäuse haben tendenziell einen geringeren Wasserverlust als gleich alte Wildtyp-Tiere. Die mittlere Differenz betrug initial ca. 2,8 g/m²/h, nach 24 Stunden 9,7 g/m²/h und nach 96 Stunden 3,7 g/m²/h. Der Kurvenverlauf zeigte dabei eine über die Zeit relativ konstante Differenz zwischen den Stämmen, die Steilheit der Kurven hatte an den meisten Zeitpunkten eine ähnliche Größe (Abb. 10d).

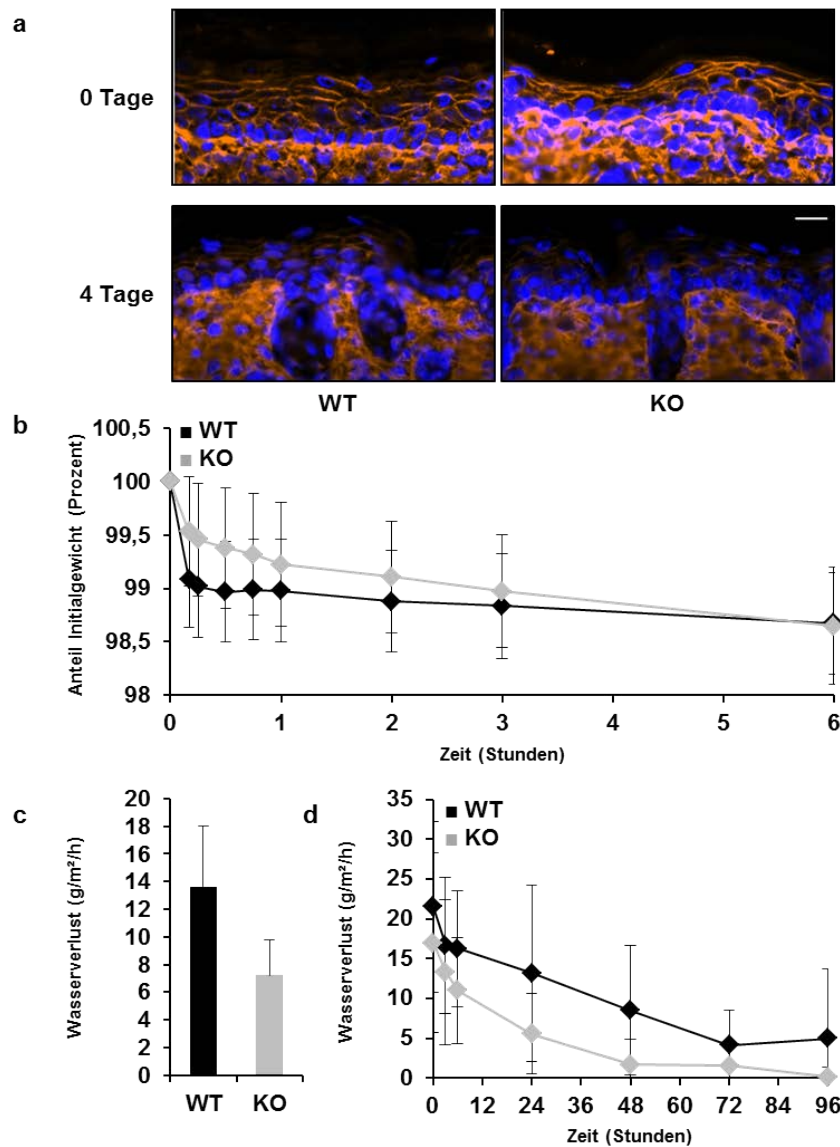


Abb. 10: Die Retention von Biotin und Wasser ist in *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen unverändert. **a)** Neugeborenen und 4 Tage alten Tieren wurde Sulfo-NHS-Biotin intradermal in die Rückenhaut injiziert. Gefrierschnitte wurden mit fluoreszenzgekoppeltem Streptavidin sowie DAPI inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte im Fluoreszenzmikroskop in den Kanälen dsRed und DAPI (n = 3, Maßstab = 10 µm). Bei allen Tieren konnte lediglich eine partielle Penetration des *Stratum granulosum* ohne Unterschied im Signalmuster festgestellt werden. **b)** Vier Tage alte Tiere wurden über sechs Stunden wiederholt gewogen. Zu Nahrungsaufnahme oder Urinabgang kam es nicht. Dargestellt wurde die durchschnittliche Gewichtsentwicklung bezogen auf das Anfangsgewicht (n = 4, Fehlerbalken = Standardabweichung). Wildtyp-Mäuse zeigten zu Beginn der Messung einen tendenziell höheren Gewichtsverlust ohne Signifikanz. **c)** Erwachsene Tiere wurden am Rücken rasiert, am Folgetag wurde der TEWL ermittelt (n = 9). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert des Wasserverlusts. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen. **d)** Der Wasserverlust rasierter Rückenhaut acht Wochen alter Mäuse wurde nach zweifachem *tape stripping* über 96 h aufgezeichnet. Dargestellt wurde der durchschnittliche Wasserverlust pro Stamm (n = 9, Fehlerbalken = Standardabweichung). Der *Knockout*-Stamm zeigte zu allen Zeitpunkten tendenziell einen geringeren Wasserverlust, Signifikanz bestand nicht.

3.8 Die verhornten Zellhüllen in *FlgHrrr*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen gleichen sich in Form und mechanischer Stabilität

Es wurden die Zellhüllen (*cornified envelopes*) von jeweils drei Tieren im Alter von vier Tagen präpariert. Betrachtet man diese nach der Isolierung ohne weitere Manipulation, so lassen sich zwischen den Stämmen keine Unterschiede in Bezug auf die Größe oder die Form der Zellhüllen feststellen (Abb. 11a).

Zur Untersuchung der Disruptions-Resistenz wurden Zellsuspensionen für insgesamt 20 Minuten bei Zimmertemperatur in einem Ultraschallbad inkubiert. Zu festgelegten Zeitpunkten (initial, 1, 5, 10, 15 und 20 Minuten) wurde jeweils eine Probe aus den Lösungen entnommen und die Anzahl intakter sowie defekter Zellhüllen gezählt. Intakte Zellhüllen wurden anhand der Lichtbeugung in ihrem Randbereich von defekten unterschieden (Abb. 11b). Dargestellt wurden die Ergebnisse als mittlerer Anteil der intakten Zellhüllen an allen Zellhüllen pro Mausstamm. Dabei besteht sowohl initial als auch im Zeitverlauf kein wesentlicher Unterschied zwischen den Stämmen. Nach fünf Minuten sind in beiden Gruppen rund die Hälfte der Hüllen defekt (Abb. 11c).

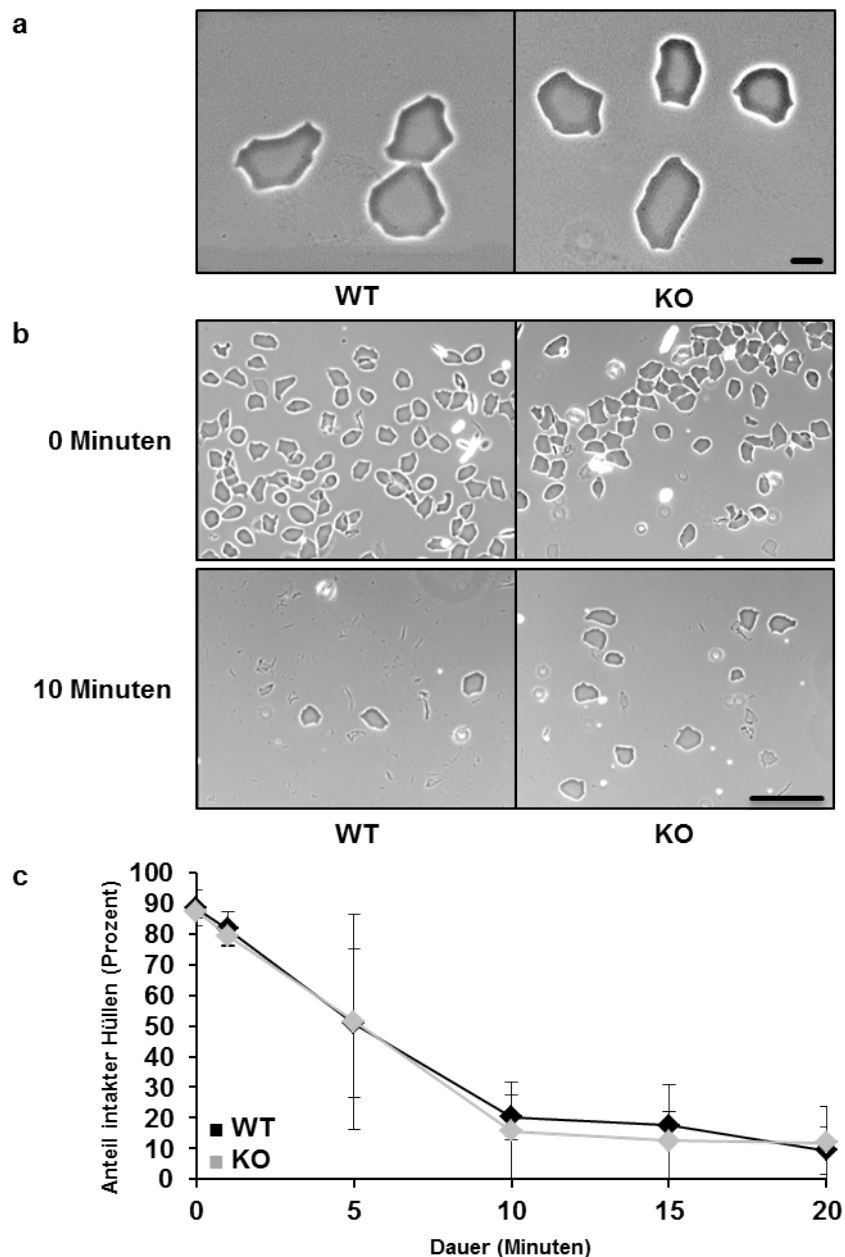


Abb. 11: Die verhornten Zellhüllen gleichen sich in Morphologie und Stabilität. **a)** Aus Rückenhaut 4 Tage alter Mäuse wurden Zellhüllen (*cornified envelopes*) isoliert und lichtmikroskopisch untersucht ($n = 3$, Maßstab = $10 \mu\text{m}$). Bezüglich Größe, Form und Verhältnis zwischen eher runden und eher eckigen Hüllen konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden. **b)** Aus Rückenhaut 4 Tage alter Mäuse wurden Zellhüllen isoliert und jeweils in gleicher Anzahl in einem Ultraschallbad inkubiert. Dabei wurden über 20 Minuten regelmäßige Proben entnommen und lichtmikroskopisch untersucht und die Anzahl intakter und defekter Hüllen bestimmt ($n = 3$, Maßstab = $100 \mu\text{m}$). **c)** Dargestellt wurde der durchschnittliche Anteil intakter Zellhüllen an der Gesamtzahl sichtbarer Hüllen (Fehlerbalken = Standardabweichung). Es zeigte sich über die Zeit kein Unterschied bezüglich physikalischer Belastbarkeit der Zellhüllen zwischen Wildtyp- und *FlgHnr^{-/-}*-Mäusen.

4 Diskussion

4.1 *FlgHrrnr*^{-/-}-Mäuse entwickeln einen transienten hyperkeratotischen Phänotyp, aber keine spontane Dermatitis

In der komplexen Genese der atopischen Dermatitis scheinen Gendefekte eine Schlüsselrolle als prädisponierende Faktoren einzunehmen. Der Einsatz von *Knockout*-Mausstämmen mit spezifischen Genverlusten erlaubt es, Veränderungen *in vivo* zu betrachten und Rückschlüsse auf Funktionen und mögliche ätiologische Bedeutung für den Menschen zu ziehen. Mit der Generierung der *FlgHrrnr*^{-/-}-Maus steht ein Modell zur Verfügung, in welchem zwei der am stärksten mit AD assoziierten Gen-Loci ausgeschaltet sind. Die Charakterisierung des Mausstamms zeigt, dass die Tiere uneingeschränkt lebens- und entwicklungsfähig sind. Nach der Geburt entwickeln die Mäuse einen transienten hyperkeratotischen Phänotyp, zeigen allerdings keine spontanen ekzematösen Effloreszenzen.

Der etablierte *flaky-tail*-Mausstamm (*Flg*^{ft}) zeichnet sich durch einen funktionellen Verlust von Filaggrin aus. Ähnlich dem in dieser Arbeit charakterisierten Stamm zeigen die Tiere wenige Tage nach der Geburt eine grobe Schuppung der Haut mit Ausheilung im Verlauf, zirkuläre Einschnürungen des Schwanzes mit Verlust der Schwanzspitze, kleinere Ohren und eine lichtmikroskopisch nachweisbare Verringerung der Anzahl der Keratohyalin granula (Presland et al. 2000). Es bestehen unterschiedliche Aussagen dazu, ob und in welchem Alter die Tiere Läsionen im Sinne einer spontanen Dermatitis entwickeln (siehe 1.6). Dies lässt auf einen starken Einfluss der Haltungsbedingungen der Tiere schließen und unterstreicht die Annahme, dass Umweltfaktoren einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung einer Dermatitis und sukzessive auf die Untersuchungsergebnisse haben können. Somit ist der Vergleich der Ergebnisse zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen nur eingeschränkt möglich. Neben der zusätzlichen Mutation im *Tmem79/Matt*-Gen exprimiert die *Flg*^{ft}-Maus ein unvollständiges Profilaggrin-Protein, welches wahrscheinlich nicht weiter prozessiert wird (Saunders et al. 2013; Presland et al. 2000). Der Einfluss dieses Proteins auf den Organismus ist derzeit unbekannt.

Der nachfolgend generierte reine Filaggrin-*Knockout*-Stamm (*Flg*^{-/-}) zeigte, wie der in dieser Arbeit beschriebene Stamm, keine spontane Dermatitis und ein ähnliches Muster der Hautschuppung sowie eine Reduktion der Granula im *Stratum granulosum*. Ebenso bestand eine Verdichtung und Dickenabnahme des *Stratum corneum* im Sinne einer kompakten Hyperkeratose. Die in dieser Arbeit berichtete Verkleinerung der Ohren und der Verlust der Schwanzspitze wurden für den reinen Filaggrin-*Knockout* nicht berichtet

(Kawasaki et al. 2012). Da diese phänotypischen Veränderungen allerdings für die *flaky-tail*-Maus beschrieben wurden, scheint die ätiologische Zuordnung zum Funktionsverlust des Filaggrin wahrscheinlich (Presland et al. 2000). Als mögliche Erklärung der diskrepanten Beobachtungen lassen sich wiederum Unterschiede in den Haltungsbedingungen vermuten. Als Ursache des Verlustes der Schwanzspitze werden Einschnürungen, welche während des Wachstums aufgrund einer rigiden Haut entstehen, und eine dadurch verursachte Durchblutungsstörung mit folgender Nekrose vermutet (Recordati et al. 2015).

Wie der *FlgHrrr*^{-/-}-Stamm weist auch der *Flg*^{-/-}-Stamm für wässrige Agenzien keine erhöhte Permeabilität der Epidermis und speziell des *Stratum corneum* auf. Allerdings wurde für letzteren Stamm eine erhöhte Durchlässigkeit für liposomal verkapselte Stoffe gezeigt (Kawasaki et al. 2012). Veränderungen der Barrierefunktion können also selektiv sein und von Eigenschaften wie der Polarität der untersuchten Stoffe abhängen. Die *Flg*^{-/-}-Tiere zeigen einen unveränderten Wassergehalt des *Stratum corneum* und auch der Wasserverlust über der Haut, gemessen mittels eines TEWA-Meters, war unverändert. Nicht beschrieben wurde, ob und wie die erwachsenen Tiere vor den Messungen enthaart wurden, was den direkten Vergleich mit den in dieser Arbeit gemessenen Werten erschwert. In der vorliegenden Arbeit kann zumindest analog bei neugeborenen Tieren auf einen unveränderten Wasserverlust anhand des konstanten Körpergewichts geschlossen werden. Die Messungen mittels TEWA-Meter nach zweimaligem *tape stripping* erwachsener *FlgHrrr*^{-/-}-Tiere legen einen tendenziell geringeren Wasserverlust der *Knockout*-Tiere nach mechanischer Belastung nahe. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Messgerätes ist die angewandte Messmethode trotz aller Versuche der Standardisierung und Optimierung fehleranfällig. Nach *Knockout* des Proteins Claudin 1 beziehungsweise des Enzyms Transglutaminase 1 mit letalen Verläufen kurz nach der Geburt der Tiere zeigten sich mit Erhöhungen des Wasserverlustes um Faktor 20 beziehungsweise 100 vielfach größere Unterschiede (Furuse et al. 2002; Matsuki et al. 1998). In Relation dazu waren die für *FlgHrrr*^{-/-}-Mäuse ermittelten Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gering. Für die *Flg*^{-/-}-Maus wurde beschrieben, dass mit steigender Zahl der *tape strippings* eine vermehrte Extraktion von Schichten des *Stratum corneum* besteht (Kawasaki et al. 2012). Ähnliche Experimente sowie die Untersuchung des Einflusses einer höheren Zahl an *tape strippings* auf den TEWL könnten zukünftig auch mit *FlgHrrr*^{-/-}-Mäusen durchgeführt werden.

Während Filaggrin und Hornerin in Wildtyp-Mäusen während des gesamten Lebens in der Epidermis exprimiert werden, hat der Verlust von Filaggrin den größten Einfluss auf den Phänotyp in den ersten Tagen nach der Geburt. Filaggrin macht in der Epidermis zusammen mit den Keratinen einen Massenanteil von bis zu 90% aus (Candi et al. 2005). Denkbar ist, dass im Zeitverlauf die deletierten Filaggrin-Funktionen durch

andere Proteine übernommen werden und so eine Kompensation mit teilweiser Restitution physiologischer Verhältnisse möglich ist. Dies würde eine Regulation anderer Proteine der Zellverhornung erwarten lassen, die aber bislang nicht nachgewiesen werden konnte.

Auf der anderen Seite ist es auch denkbar, dass die Bedeutung dieser Proteine für die Homöostase der Haut im Verlauf abnimmt und somit der Funktionsverlust im *Knockout*-Tier an Gewicht verliert. Wie in dieser Arbeit gezeigt, verringert sich die Anzahl der Zellschichten innerhalb der Epidermis schon einige Tage nach der Geburt wesentlich. Dies lässt sich durch eine verringerte Zellteilungs- und Desquamationsrate und/oder eine beschleunigte terminale Differenzierung innerhalb der Epidermis erklären. Eine verringerte Schichtzahl lässt einen Einfluss auf die Diffusionsstrecken und somit die notwendige Zusammensetzung zum Erhalt der Funktionstüchtigkeit der Hautbarriere vermuten. Parallel zu diesen Veränderungen entwickeln die Tiere eine Behaarung, welche am zehnten Tag ihres Lebens bereits kräftig ausgeprägt ist. Dieser neue sowohl mechanische als auch thermische Schutz übernimmt möglicherweise einen Teil der vorher durch die Zellen der Epidermis bereitgestellten Funktionen. Entsprechend kann dieses Mausmodell in Teilaspekten potentiell die größte Übertragbarkeit auf den Menschen bieten, wenn Experimente auf noch unbehaarte Tiere in den ersten Lebensstagen konzentriert werden.

4.2 Die Funktion von Hornerin in der epidermalen Differenzierung

Hornerin ist bei Menschen und Mäusen ein bisher kaum charakterisiertes Protein mit möglicher Funktion bei der Zellverhornung. Der Vergleich des in dieser Arbeit charakterisierten *FlgHnr^{-/-}*-Stammes mit der in der Literatur beschriebenen *Flg^{-/-}*-Maus erlaubt potentiell indirekte Rückschlüsse auf die Funktion von Hornerin. Tatsächlich lassen sich aber im Vergleich der Stämme keine wesentlichen Unterschiede feststellen. Unterschiede im Phänotyp oder den funktionellen Eigenschaften der Haut konnten nicht objektiviert werden.

Aktuell ist wenig über physiologische (oder pathologische) Funktionen von Hornerin bekannt. Schon die Erstbeschreiber des murinen Hornerins vermuteten aufgrund der Expression in verschiedenen Plattenepithelien pleiotrope Effekte (Makino et al. 2001; Makino et al. 2003). Mittlerweile konnte durch verfeinerte Methodik gezeigt werden, dass auch der Mensch Hornerin in der Epidermis exprimiert (Wu et al. 2009b). Da der *FlgHnr^{-/-}*-Stamm im Vergleich zur *Flg^{-/-}*-Maus im sogenannten *steady state* keine zusätzlichen pathologischen Veränderungen zeigte und auch keine spontane Dermatitis entwickelte, sollten weiterführende Untersuchungen bezüglich der Penetration von Allergenen und anderen Noxen in die Haut sowie resultierende Immunantworten des Organismus durchgeführt werden. Somit könnten pathogenetische Faktoren der

atopischen Dermatitis an diesem Mausstamm weiter erforscht werden. Möglicherweise können Expositionsexperimente zusätzliche Erkenntnisse zu den in der vorliegenden Arbeit unter möglichst Pathogen-freien Bedingungen gewonnenen Ergebnissen liefern. Weiterhin erscheint die Generierung und Charakterisierung eines *Hrrnr*^{-/-}-Stammes als logischer Schritt, um gezielte Rückschlüsse auf die Rolle des Proteins zu ermöglichen. Idealerweise sollten *Flg*^{-/-}- und *Hrrnr*^{-/-}-Mäuse unter gleichen Bedingungen untersucht werden. Unter ökonomischen und ethischen Gesichtspunkten ist dabei allerdings zu bedenken, dass der gesicherte pathogenetische Beitrag des Hornerins für den Menschen nach derzeitiger Studienlage von unklarer und möglicherweise geringer Größe ist (Esparza-Gordillo et al. 2009). Die Suche nach weiteren Risiko-Allelen in verschiedenen ethnischen Gruppen könnte einen ersten Schritt darstellen.

4.3 Kompensationsmechanismen der *FlgHrrnr*^{-/-}-Maus und anderer *Knockout*-Stämme sind weitgehend unbekannt

Zusätzlich zu den Untersuchungen der Hautmorphologie und der funktionellen Testungen wurden Veränderungen in Translation und Transkription weiterer gut charakterisierter Gene der Hautverhornung gesucht. Neben drei Typen von Keratinfilamenten wurden mit Loricrin und Involucrin zwei Bestandteile der verhornten Zelloberfläche einbezogen. Angesichts des milden Phänotyps der *FlgHrrnr*^{-/-}-Maus erscheint eine Kompensation durch die verstärkte Expression anderer Proteine im Verhornungsprozess möglich. In Zusammenschau der Ergebnisse konnten allerdings keine wegweisenden Unterschiede zum Wildtyp-Stamm festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen anderer *Knockout*-Mausstämmen. So ergab ein dieser Arbeit ähnliches Untersuchungsprogramm in der *Flg*^{-/-}-Mäusen ebenfalls keine Veränderungen (Kawasaki et al. 2012). Involucrin-defiziente Mäuse zeigten neben einer völlig unauffälligen Entwicklung der Haut ebenfalls keine Veränderungen der untersuchten Genexpression (Djian et al. 2000). Der *Knockout* von Loricrin, einem Protein, das etwa 70% der Masse der verhornten Zelloberflächen des *Stratum corneum* ausmacht, erbrachte Tiere, welche sich zunächst verlangsamt entwickeln und nach der Geburt eine dünne durchsichtige Haut besitzen. Überraschenderweise verschwindet der pathologische Phänotyp etwa fünf Tage nach der Geburt vollständig. Es konnten Erhöhungen in der Expression von Repetin sowie zwei Proteinen der *small proline rich*-Proteinfamilie nachgewiesen werden (Koch et al. 2000). Wahrscheinlich sind nicht alle für einen funktionierenden Verhornungsprozess notwendigen Gene bekannt und ausreichend charakterisiert. Diese These wird dadurch gestützt, dass eine Proteom-Studie der Loricrin-defizienten Maus reaktive Veränderungen der Expression von etwa 40 verschiedenen Proteinen in der Haut gegenüber Wildtyp-Mäusen zeigte (Rice et al. 2016). Wahrscheinlich trägt eine unbekannte Anzahl dieser Proteine in jeweils variablem Ausmaß zum Erhalt der Hautfunktionen bei.

Vergleicht man die relative Expressionsstärke von Filaggrin und Hornerin zwischen menschlichen Individuen, so bestehen auch in gesunden Populationen ganz erhebliche interindividuelle Unterschiede der nachweisbaren Proteinmengen - im Falle von Hornerin von bis zu Faktor 500 (Pellerin et al. 2013). Die Zusammensetzung der Hautbarriere unterliegt also höchstwahrscheinlich bereits physiologisch einer großen Variabilität und wird in ihrer Funktion nicht allein durch wenige „übergeordnete“ Proteine bestimmt. Im Laufe der Evolution haben sich Defektallele im Filaggrin-Gen und auch Polymorphismen der Wiederholungszahl innerhalb des Genes trotz der deutlichen Prädisposition für Hauterkrankungen erhalten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei heterozygoten Defekträgern mit nur leichter Beeinträchtigung der Hautbarriere ein Vorteil etwa bei der Induktion immunologischer Abwehrmechanismen im Vergleich zur „Restpopulation“ bestehen könnte (Irvine und McLean 2006). Außerdem konnten bei Trägern einer Filaggrin-Mutation erhöhte Vitamin-D-Spiegel nachgewiesen werden. Die klinische Bedeutung ist jedoch bisher unklar (Thyssen et al. 2012; Thyssen et al. 2014). Ein weiter gefasster Ansatz wäre, dass eine große Heterogenität in der Zusammensetzung der Hautbarriere durch Varianten in vielen weiteren Genen bestehen könnte und sich Individuen grundlegend in der Konzentration diverser Proteine unterscheiden. Dadurch entstünde zwischen wenigen Generationen eine individuelle Hautbarriere mit deutlichen Unterschieden in Zusammensetzung und Eigenschaften. Dadurch wäre für einzelne Individuen einer Population ein Überlebensvorteil in einer sich verändernden Umwelt zu erwarten.

Vor diesem Hintergrund ist es ferner wichtig, dass die meisten in der Forschung eingesetzten Mausstämme, wie auch der B6J-Stamm, Inzuchtlinien sind. Alle Tiere einer Linie sind genetisch fast vollkommen identisch. Dies erscheint aber gegenüber der genetischen Diversität in der „freien Wildbahn“ in komplexen Forschungskontexten problematisch. Die funktionelle Bedeutung des zu untersuchenden Gens könnte beispielsweise ausgerechnet im eingesetzten Mausstamm unterdurchschnittlich ausgeprägt sein. Der Einsatz mehrerer Inzuchtlinien oder das Hinzufügen genetisch heterogener Auszuchtlinien in *Knockout*-Studien könnte helfen, weitere Erkenntnisse zu sammeln und bessere Rückschlüsse auf humane Erkrankungen zu ziehen.

4.4 Methodische Limitationen

Die vorliegende Arbeit wurde konzipiert, um auf breiter Basis mittels unterschiedlicher Methoden mögliche Auswirkungen des doppelten Gendefekts detektieren zu können. Dazu wurden Tiere aus zwei Stämmen zu verschiedenen Alterszeitpunkten untersucht. Innerhalb eines Stammes sind die eingesetzten Mäuse jeweils genetisch identisch. Es bestanden standardisierte Haltungsbedingungen in spezifisch Pathogen-freier Umgebung. Ferner wurden möglichst konsistente Bedingungen innerhalb der jeweiligen

Methoden angestrebt und vielfach die Würfe zeitgleich verpaarter Mäuse benutzt. Größere Sicherheit auf der Suche nach kleinen Unterschieden zwischen den Mausstämmen ließe sich erhalten, indem Versuche auf wenige oder einen Alterszeitpunkt konzentriert würden, um größere Fallzahlen zu erhalten. Diese Arbeit könnte die Grundlage zur Auswahl eines geeigneten Mausalters sein.

Die Analyse der Proteinexpression innerhalb eines so stark vernetzten und unlöslichen Komplexes wie der Epidermis ist schwierig. Untersuchungen aus in Zellkultur gezüchteten Keratinozyten sind methodisch weniger anfällig, blenden aber komplexe organismische Wechselwirkungen aus. Die zusätzliche Analyse der Proteinexpression in *Knockout*-Zellen aus Zellkultur kann somit ergänzende Erkenntnisse erbringen.

In der relativen Quantifizierung der Proteinmenge ist die Normalisierung auf das ubiquitär exprimierte Mikrofilament Aktin weit verbreitete Praxis. Die Eignung als Normalisierungs-Gen setzt voraus, dass dessen Expression von durchgeführten Experimenten und Veränderungen anderer Gene weitgehend unbeeinflusst ist. Für Filaggrin ist die Interaktion mit Keratinfilamenten lange bekannt und untersucht. Es bestehen zumindest Hinweise, dass auch eine Interaktion mit Aktin existiert (Presland et al. 2001). Wäre die Struktur des Aktin-Netzwerks durch die Absenz von Filaggrin beeinflusst, könnte dies die Löslichkeit des Aktins und die letztlich im Western Blot nachgewiesene Proteinmenge verändern. Dazu sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die Messung des TEWL mittels TEWA-Meter ist methodisch schwierig. Die Messsonde muss orthogonal zur Haut aufgesetzt werden. Bereits kleine Änderungen im Aufsatzwinkel und im Aufsatzdruck haben Auswirkungen auf die ermittelten Werte. Auch besteht eine große Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen. Der Untersucher selbst kann durch seine Atmung, Bewegung und Haut eine erhebliche Störgröße sein. Letztlich ist die Versuchsdurchführung nicht einfach standardisierbar, sodass ein Vergleich der Ergebnisse zwischen verschiedenen Untersuchern oder gar Arbeitsgruppen kaum möglich ist. Ein anerkannter Standard zur TEWL-Messung bei Tieren wäre also notwendig.

5 Zusammenfassung

FlgHrnr^{-/-}-Mäuse weisen vollständige Genverluste von Filaggrin (Flg) und Hornerin (Hrnr) auf, den beiden beim Menschen am häufigsten mit atopischer Dermatitis assoziierten Genen. In dieser Arbeit wurde der doppelt defiziente Stamm mit Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) verglichen und grundlegend strukturell und funktionell charakterisiert. Die erfolgreiche Deletion von Filaggrin und Hornerin konnte auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden. Die Tiere sind normal lebens- und reproduktionsfähig und entwickeln in den ersten Lebensstagen eine schuppige Haut, welche sich mit zunehmender Körperbehaarung wieder der Erscheinung des Wildtyps angleicht. Ausgewachsene Tiere fallen durch kleinere Ohren und den Verlust der Schwanzspitze auf. Lichtmikroskopisch imponiert eine deutliche Verringerung der Dichte an Granula innerhalb des *Stratum granulosum* und eine kompakte Hyperkeratose des *Stratum corneum* als Zeichen eines aberranten Verhornungsprozesses. Wesentliche Veränderungen in der Expression anderer bekannter epidermaler Differenzierungsmarker konnten nicht objektiviert werden. Auf funktioneller Ebene war die Hautbarriere von *FlgHrnr*^{-/-}-Mäusen ähnlich derjenigen der Wildtyp-Mäuse.

Welche Kompensationsmechanismen die Homöostase des Verhornungsprozesses vor dem Hintergrund der Filaggrin- und Hornerin-Defizienz weitgehend aufrechterhalten, ist derzeit unbekannt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um ein besseres Verständnis der Zellverhornung zu erhalten und die Rolle von Filaggrin und Hornerin in der Maus einordnen zu können. Letztlich sind nur dadurch sichere Rückschlüsse auf die Mechanismen beim Menschen möglich.

Die vorliegende Charakterisierung der *FlgHrnr*^{-/-}-Mäuse stellt die Grundlage für weitergehende spezialisierte Untersuchungen an diesem Mausstamm dar. So scheinen sowohl Analysen der Zusammensetzung der Epidermis, speziell des *Stratum corneum*, als auch immunologische Experimente großes Potential für zukünftigen Erkenntnisgewinn zu bieten.

6 Anhang

6.1 Detaillierte Analysen: Involucrin

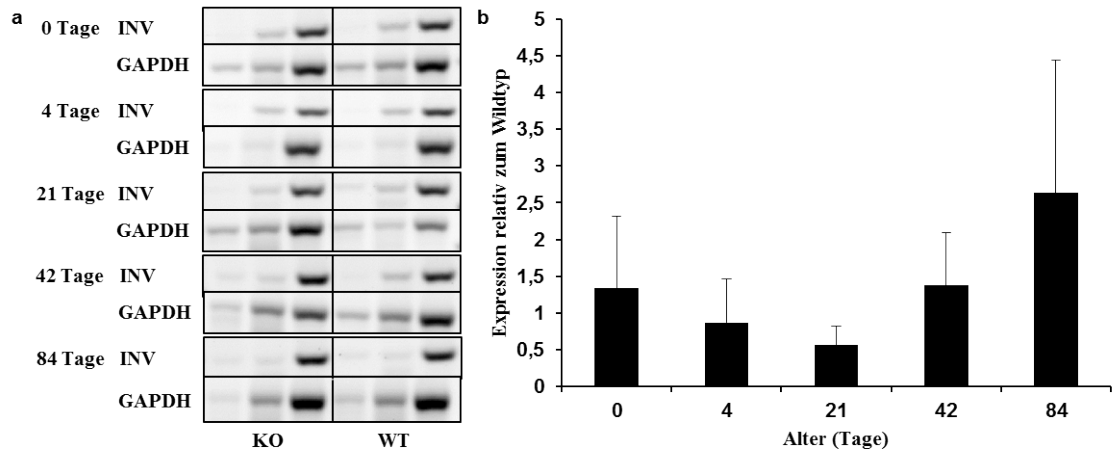


Abb. A1: Genexpression von Involucrin **a** Aus den Lysaten der *epidermal sheets* von Mäusen im Alter von 0, 4, 21, 42 und 84 Tagen wurde cDNA generiert und semiquantitative PCR mit Primern für Involucrin durchgeführt. Alle Proben zeigten ein einzelnes Signal mit einer Größe von etwa 230 bp (Zyklen: 25, 30, 35; Ladekontrolle GAPDH mit 236 bp). **b** Zur densitometrischen Auswertung wurden die Bandendichten jeweils mit GAPDH ins Verhältnis gesetzt, anschließend wurden die Mittelwerte des *Knockout*-Stammes in Relation zu Wildtyp-Mäusen für das jeweilige Alter dargestellt (N = 6, Fehlerbalken = Standardabweichung).

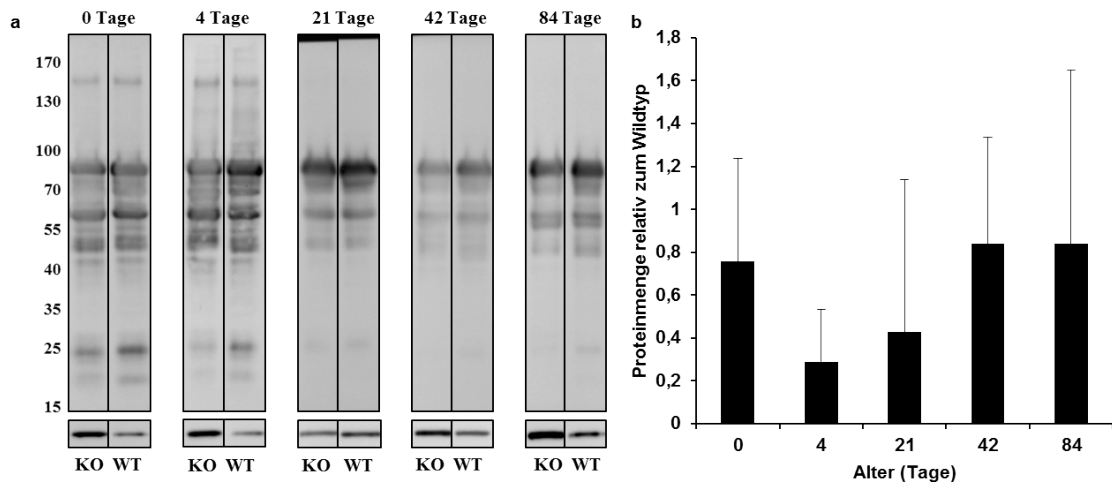


Abb. A2: Proteinexpression von Involucrin a Aus den Lysaten der *epidermal sheets* von Mäusen im Alter von 0, 4, 21, 42 und 84 Tagen wurden Western Blots mit einem Antikörper gegen Involucrin durchgeführt. Neben der theoretisch erwarteten Bande bei 57 kDa existierten weitere Signale sowie ober- als auch unterhalb dieser Größe. Die intensivste und über alle Altersstufen konstante Bande bestand bei etwa 90 kDa (Ladekontrolle Aktin mit 43 kDa). **b** Zur densitometrischen Auswertung wurde die Intensität der Bande relativ zu Aktin betrachtet. Anschließend wurde der Mittelwert der jeweiligen *Knockout*-Mausgruppe in Relation zu Wildtyp-Mäusen dargestellt (N = 6, Fehlerbalken = Standardabweichung). Insgesamt zeigte sich bei den mutierten Tieren eine tendenziell geringere Involucrin-Expression zu allen Zeitpunkten.

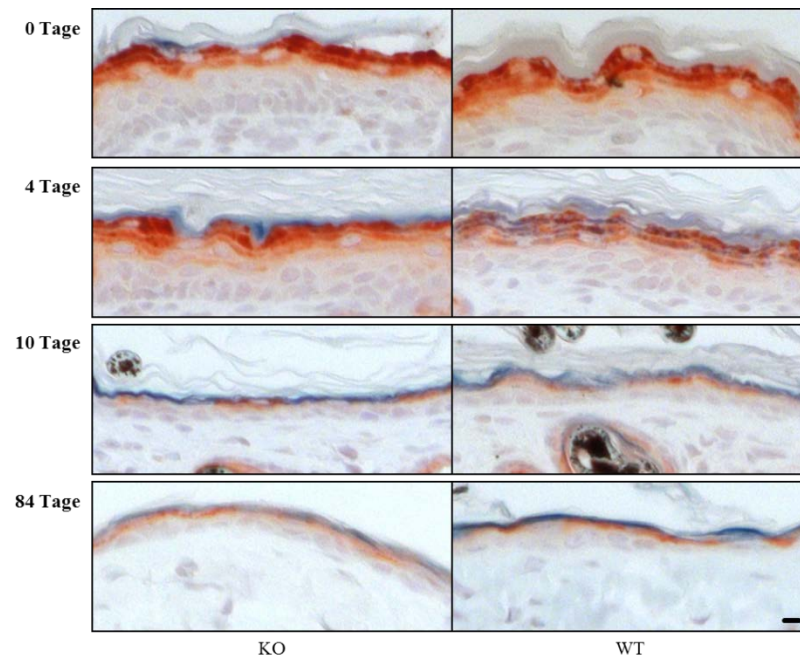


Abb. A3: Immunhistochemischer Nachweis der Involucrin-Expression An Schnitten der Rückenhaut von Mäusen im Alter von 0, 4, 10 und 84 Tagen wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen Involucrin durchgeführt (Maßstab = 50 µm). Bei allen Tieren zeigte sich ein Signal innerhalb der abflachenden Zellen des *Stratum granulosum* mit Betonung nach apikal. Bei den jüngeren Tieren ließen sich zwei bis drei signalreiche Zellschichten ausmachen. Ab einem Alter von zehn Tagen ließ sich die Färbung nur noch als inkonsistentes schmales Band unterhalb des *Stratum corneum* erkennen. Das *Stratum corneum* selbst zeigte keine Anfärbung. Zwischen den Mausstämmen bestanden keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Signalausdehnung oder –intensität. Zu beachten sind die Granula im *Stratum granulosum* des Wildtyps, welche durch die Gegenfärbung mit Hämalaun sichtbar werden.

6.2 Detaillierte Analysen: Loricrin

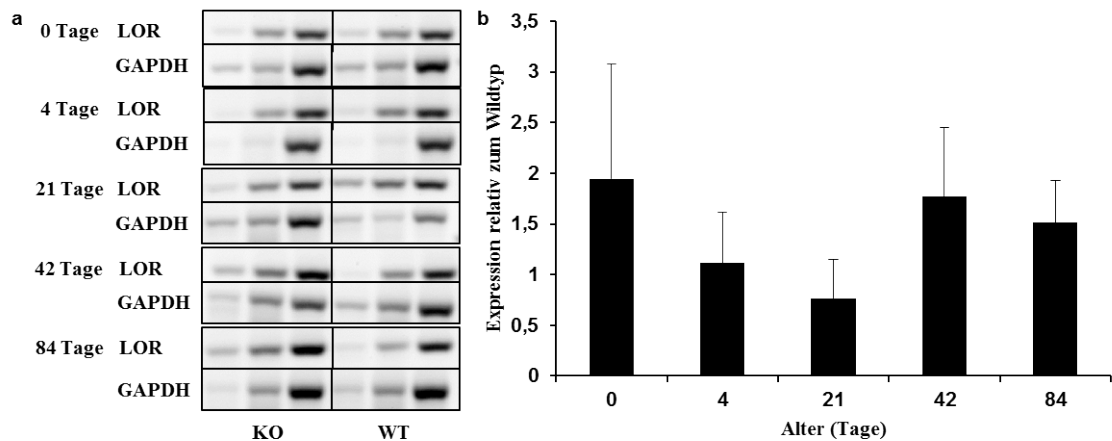


Abb. A4: Genexpression Loricrin **a** In allen Proben ergab sich ein einzelnes Signal mit einer Größe von 150 bp (Zyklen 25, 30, 35). **b** Densitometrische Auswertung (N = 6, Fehlerbalken = Standardabweichung).

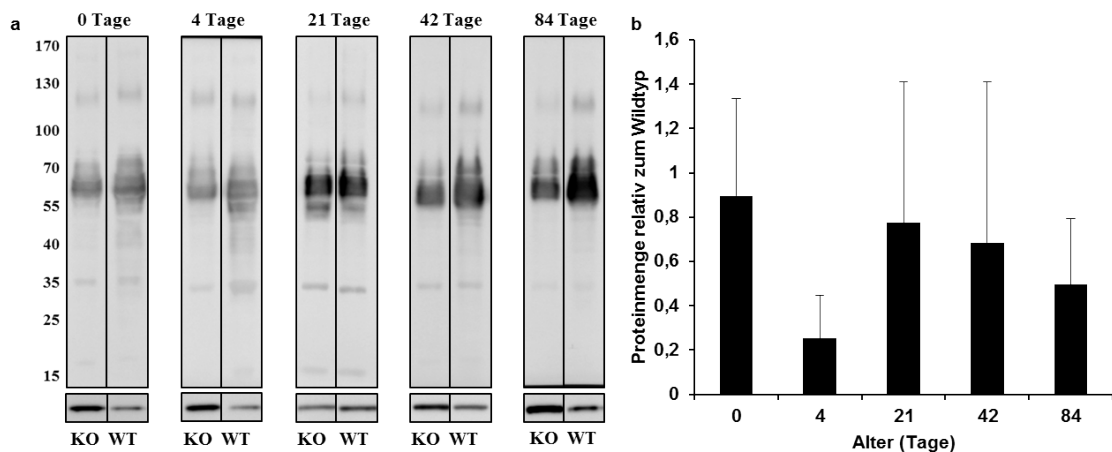


Abb. A5: Proteinexpression Loricrin **a** Es zeigte sich die stärkste Bande im theoretisch zu erwartenden Gewichtsbereich von 56 kDa. Zusätzlich ergaben sich Signale schwacher Intensität bei 35 sowie ca. 120 kDa über alle Altersstufen hinweg (Ladekontrolle Aktin). **b** Densitometrische Auswertung (N = 6, Fehlerbalken = Standardabweichung). Insgesamt zeigte sich eine tendenziell verringerte Loricrin-Expression in den Hautzellen der *Knockout*-Tiere, wobei die Differenz besonders bei den 4 Tage alten Tieren hervortrat.

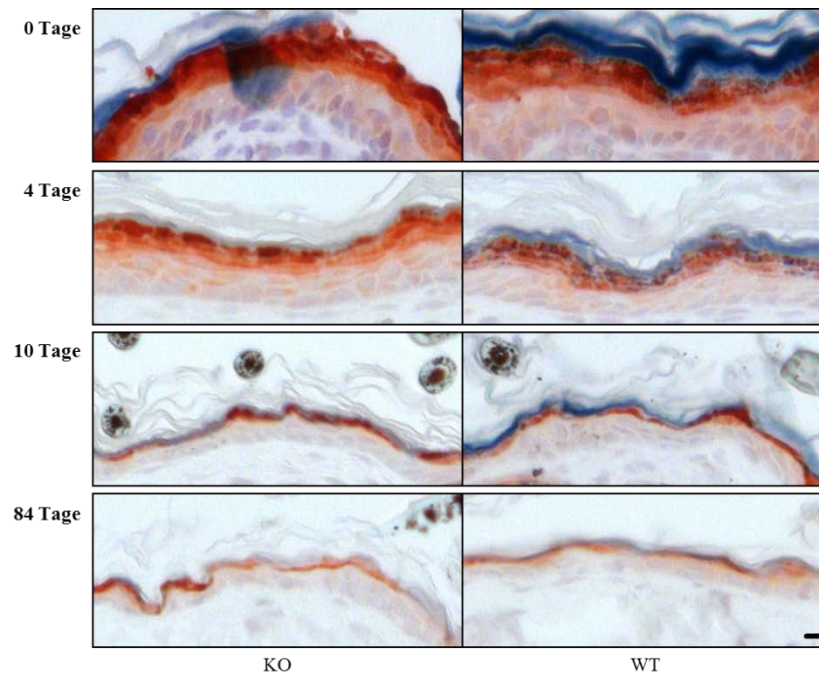


Abb. A6: Immunohistochemischer Nachweis von Loricrin Es zeigte sich, ähnlich wie bei der Involucrin-Färbung, ein deutliches Signal im *Stratum granulosum*. Die Betonung nach apikal war nicht so stark wie für Involucrin ausgeprägt. Ebenfalls waren etwa drei Zellschichten intensiv angefärbt. Bei den älteren Tieren erschien das Färbemuster konstanter als für Involucrin und war nur vereinzelt unterbrochen. Das *Stratum corneum* zeigte kein Farbsignal. Zwischen den Mausstämmen ließen sich keine wesentlichen Unterschiede ausmachen (Maßstab = 50 µm).

6.3 Detaillierte Analysen: Keratin 6

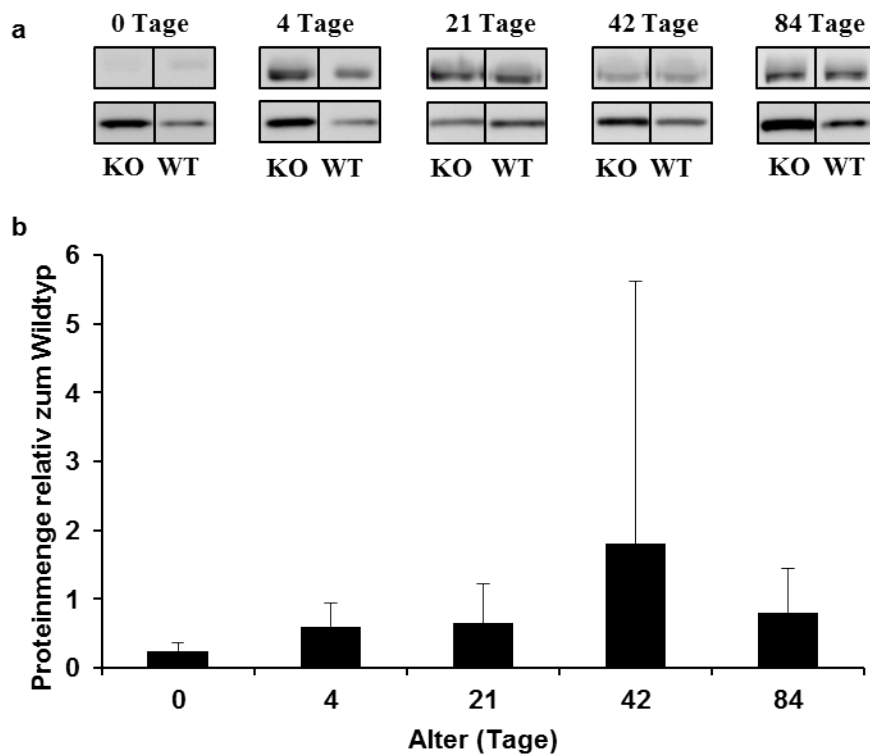


Abb. A7: Proteinexpression Keratin 6 **a** Im Western Blot zeigte sich eine einzelne Bande bei 60 kDa. Für neugeborene Mäuse konnten nur sehr schwache Signale detektiert werden (Ladekontrolle Aktin). **b** Densitometrische Auswertung (N = 6, Fehlerbalken = Standardabweichung).

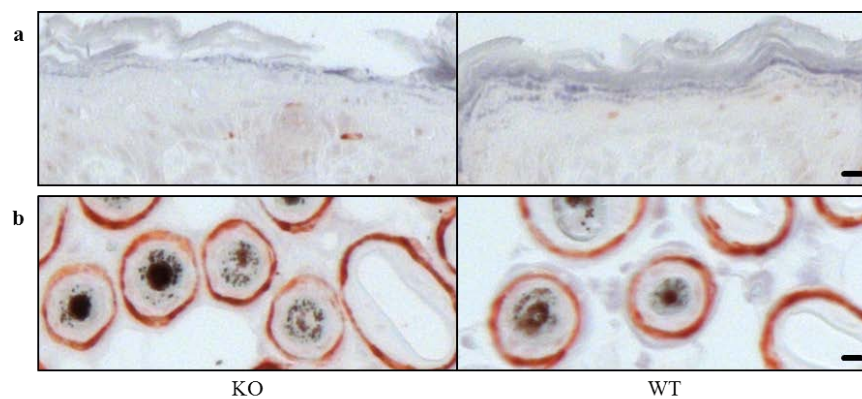


Abb. A8: Immunhistochemische Färbungen Keratin 6 **a** In der immunhistochemischen Färbung zeigten sich in der Epidermis keinerlei konsistente Färbemuster (Maßstab = 50 µm). **b** Bei den Tieren ab einem Alter von zehn Tagen fand sich eine Anfärbung der Kutikula der Haarfollikel der Dermis. Zwischen den Mausstämmen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

6.4 Detaillierte Analysen: Keratin 10

In der PCR für Keratin 10 ergab sich ein einzelnes Signal.

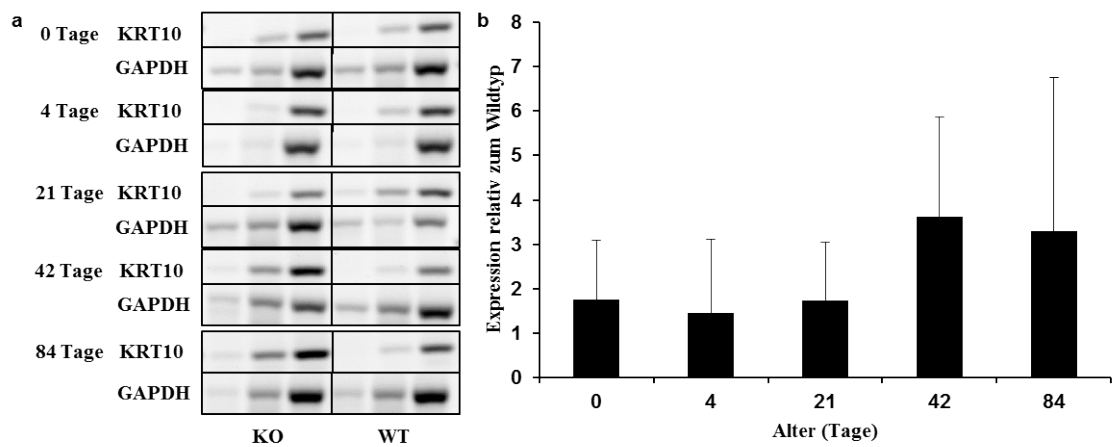


Abb. A9: Genexpression Keratin 10 **a** In allen Proben trat ein einzelnes Signal mit einer Größe von 163 bp auf (Zyklen 20, 25, 30). **b** Densitometrisch zeigten die *Knockout*-Tiere eine tendenziell höhere Expression von Keratin 10, es bestanden allerdings große Unterschiede zwischen den einzelnen Proben.

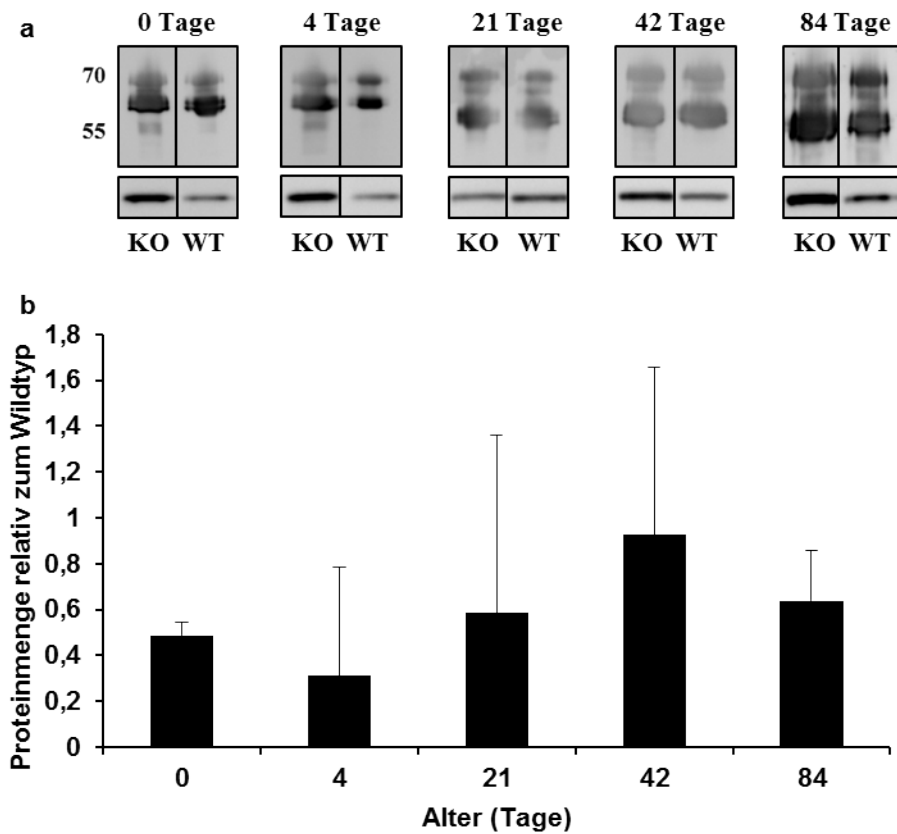


Abb. A10: Proteinexpression Keratin 10 **a** Neben der konsistenten erwarteten Bande bei 56 kDa bei den neugeborenen und vier Tage alten Tieren trat ein weiteres Signal knapp unterhalb von 70 kDa auf. Letzteres war bei den älteren Tieren deutlich schwächer ausgeprägt, zusätzlich imponierte ein starkes Signal oberhalb von 70 kDa. **b** Densitometrisch bestand tendenziell eine geringere Expression, besonders bei den jüngeren *Knockout*-Tieren.

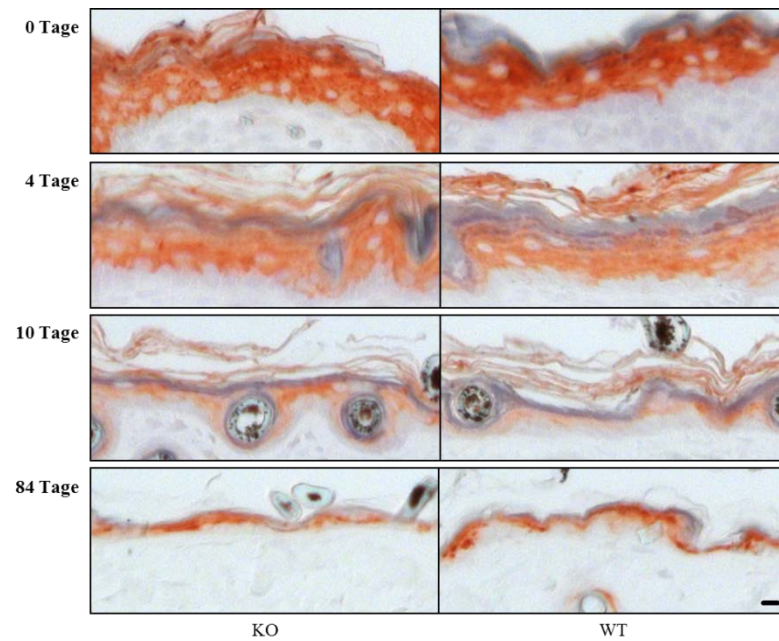


Abb. A11: Immunhistochemischer Nachweis von Keratin 10 Es zeigte sich eine Anfärbung der gesamten Epidermis unter strenger Aussparung des *Stratum basale*. Zwischen den Mausstämmen ließen sich in keinem Alter wesentliche Unterschiede im Färbemuster oder der Färbeintensität bestimmen.

6.5 Detaillierte Analysen: Keratin 14

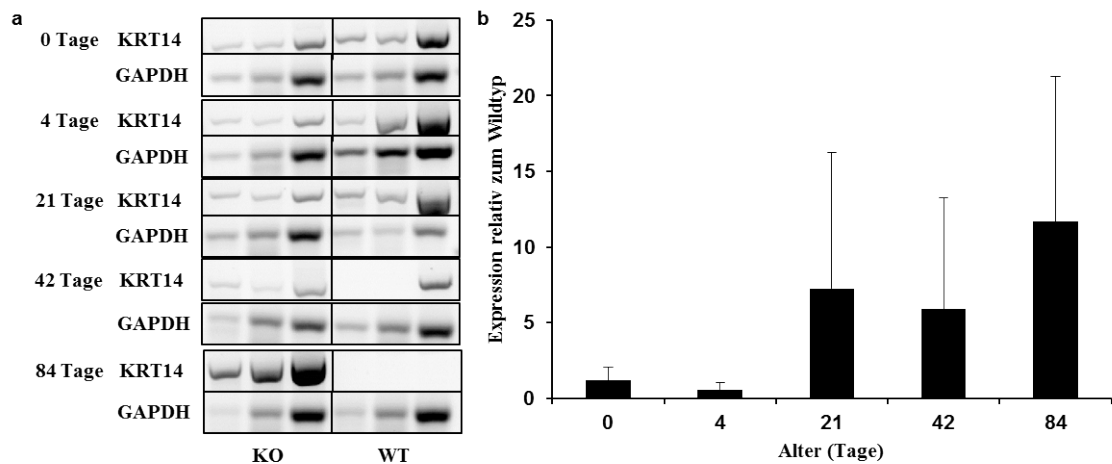


Abb. A12: Genexpression Keratin 14 **a** Es konnte in allen Proben ein einzelnes Signal mit einer Größe von etwa 190 bp detektiert werden (Zyklen 30, 35, 40). **b** Densitometrisch fiel bei den älteren *Knockout*-Tieren eine erhebliche Erhöhung der Keratin 14 Genexpression auf.

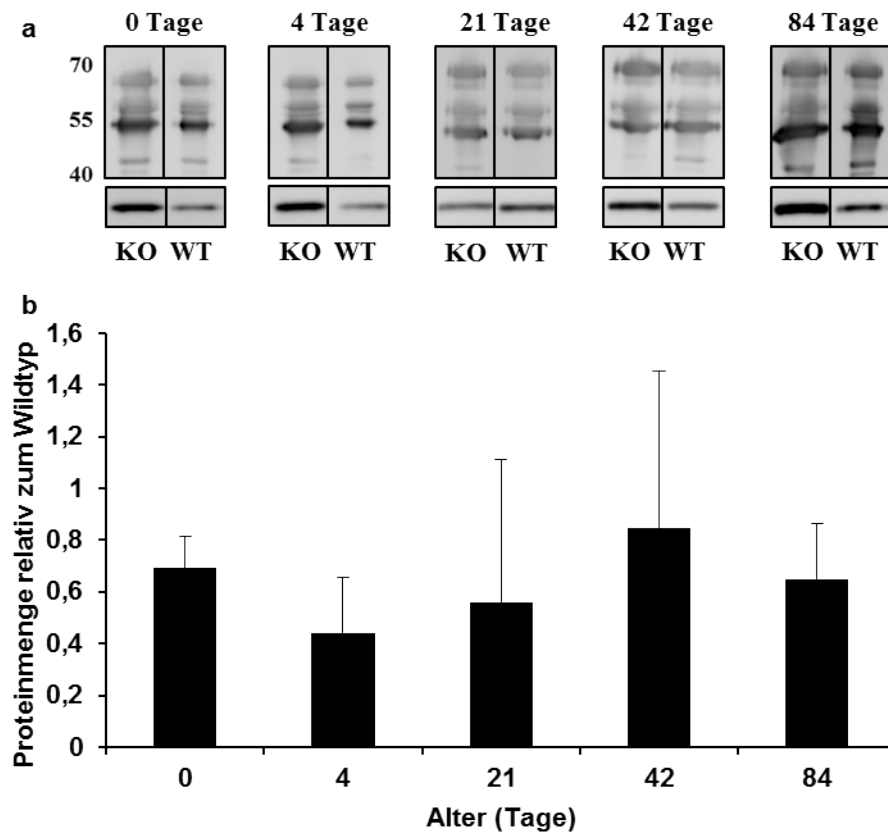


Abb. A13: Proteinexpression Keratin 14 **a** Bei allen Tieren bestand neben dem erwarteten Signal bei 55 kDa zusätzlich ein Signal bei etwa 60 kDa. Die Proben der neugeborenen und vier Tage alten Tiere wiesen außerdem eine Bande unterhalb von 70 kDa auf, während sich bei den älteren Mäusen ein Signal bei etwa 70 kDa fand (Ladekontrolle Aktin). **b** Densitometrisch zeigte sich für die jüngeren Tiere eine tendenziell verringerte Expression von Keratin 14.

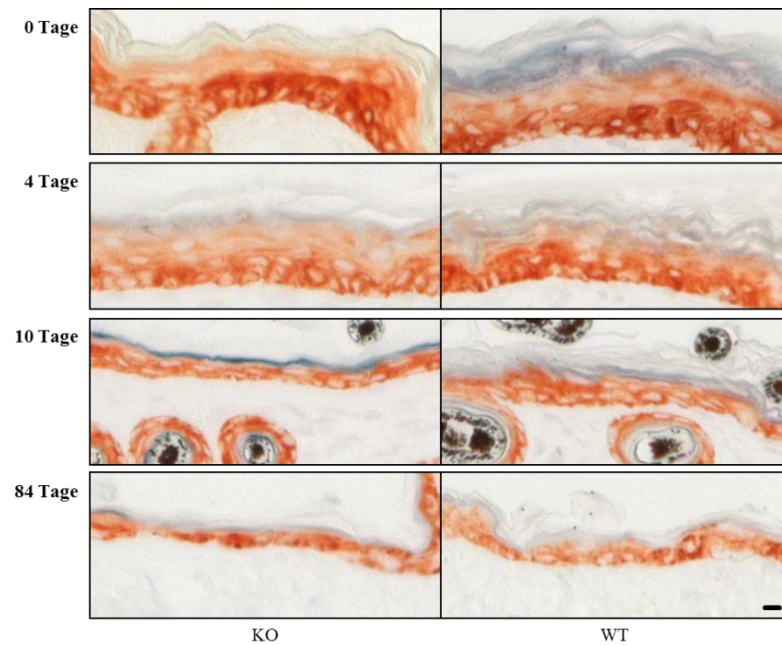


Abb. A14: Immunhistochemischer Nachweis von Keratin 14 Es zeigte sich ein starkes Signal des *Stratum basale* sowie der basalen Schicht des *Stratum spinosum*. Die weiteren Schichten bis zum *Stratum granulosum* imponierten weniger signalintensiv. Das *Stratum corneum* war nicht angefärbt. Zwischen den Mausstämmen gab es zu keinem Alterspunkt wesentliche Unterschiede.

7 Literaturverzeichnis

- Bantz SK, Zhu Z, Zheng T (2014): The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma. *J Clin Cell Immunol* 5, 202
- Barker JNWN, Palmer CNA, Zhao Y, Liao H, Hull PR, Lee SP, Allen MH, Meggitt SJ, Reynolds NJ, Trembath RC et al. (2007): Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *J Invest Dermatol* 127, 564–567
- Baurecht H, Irvine AD, Novak N, Illig T, Buhler B, Ring J, Wagenpfeil S, Weidinger S (2007): Toward a major risk factor for atopic eczema: meta-analysis of filaggrin polymorphism data. *J Allergy Clin Immunol* 120, 1406–1412
- Brown SJ, Relton CL, Liao H, Zhao Y, Sandilands A, Wilson IJ, Burn J, Reynolds NJ, McLean WHI, Cordell HJ (2008a): Filaggrin null mutations and childhood atopic eczema: a population-based case-control study. *J Allergy Clin Immunol* 121, 940-946.e3
- Brown SJ, Sandilands A, Zhao Y, Liao H, Relton CL, Meggitt SJ, Trembath RC, Barker JNWN, Reynolds NJ, Cordell HJ et al. (2008b): Prevalent and low-frequency null mutations in the filaggrin gene are associated with early-onset and persistent atopic eczema. *J Invest Dermatol* 128, 1591–1594
- Brown SJ, Kroboth K, Sandilands A, Campbell LE, Pohler E, Kezic S, Cordell HJ, McLean WHI, Irvine AD (2012): Intragenic copy number variation within filaggrin contributes to the risk of atopic dermatitis with a dose-dependent effect. *J Invest Dermatol* 132, 98–104
- Candi E, Schmidt R, Melino G (2005): The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 328–340
- Cardona ID, Cho SH, Leung DYM (2006): Role of bacterial superantigens in atopic dermatitis: Implications for future therapeutic strategies. *Am J Clin Dermatol* 7, 273–279
- Carlsen BC (2011): Filaggrin mutation mapping in the African population. *Br J Dermatol* 165, 931–932
- Chen H, Common JEA, Haines RL, Balakrishnan A, Brown SJ, Goh CSM, Cordell HJ, Sandilands A, Campbell LE, Kroboth K et al. (2011): Wide spectrum of filaggrin-null mutations in atopic dermatitis highlights differences between Singaporean Chinese and European populations. *Br J Dermatol* 165, 106–114

- Contzler R, Favre B, Huber M, Hohl D (2005): Cornulin, a new member of the “fused gene” family, is expressed during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 124, 990–997
- Dale BA, Presland RB, Lewis SP, Underwood RA, Fleckman P (1997): Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *J Invest Dermatol* 108, 179–187
- de Winter JCF (2013): Using the Student’s t-test with extremely small sample sizes. *Pract Assess Res Eval* 18, 10
- Djian P, Easley K, Green H (2000): Targeted Ablation of the Murine Involucrin Gene. *J Cell Biol* 151, 381–388
- Esparza-Gordillo J, Weidinger S, Folster-Holst R, Bauerfeind A, Ruschendorf F, Patone G, Rohde K, Marenholz I, Schulz F, Kerscher T et al. (2009): A common variant on chromosome 11q13 is associated with atopic dermatitis. *Nat Genet* 41, 596–601
- Fallon PG, Sasaki T, Sandilands A, Campbell LE, Saunders SP, Mangan NE, Callanan JJ, Kawasaki H, Shiohama A, Kubo A et al. (2009): A homozygous frameshift mutation in the mouse Flg gene facilitates enhanced percutaneous allergen priming. *Nat Genet* 41, 602–608
- Fennessy M (2000): The epidemiology and experience of atopic eczema during childhood: A discussion paper on the implications of current knowledge for health care, public health policy and research. *J Epidemiol Community Health* 54, 581–589
- Fluhr JW, Elias PM (2002): Stratum corneum pH: Formation and Function of the ‘Acid Mantle’. *Exog Dermatol* 1, 163–175
- Fuchs E, Green H (1980): Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19, 1033–1042
- Fuchs E, Cleveland DW (1998): A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279, 514–519
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002): Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156, 1099–1111
- Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM (1990): Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry* 29, 9432–9440
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI (1985): Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76, 1427–1435

- Greisenegger E, Novak N, Maintz L, Bieber T, Zimprich F, Haubenberger D, Gleiss A, Stingl G, Kopp T, Zimprich A (2010): Analysis of four prevalent filaggrin mutations (R501X, 2282del4, R2447X and S3247X) in Austrian and German patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24, 607–610
- Gruber R, Janecke AR, Fauth C, Utermann G, Fritsch PO, Schmuth M (2007): Filaggrin mutations p.R501X and c.2282del4 in ichthyosis vulgaris. *Eur J Hum Genet* 15, 179–184
- Henderson J, Northstone K, Lee SP, Liao H, Zhao Y, Pembrey M, Mukhopadhyay S, Smith GD, Palmer CNA, McLean WHI et al. (2008): The burden of disease associated with filaggrin mutations: a population-based, longitudinal birth cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 121, 872-877.e9
- Henry J, Hsu C-Y, Haftek M, Nachat R, Koning HD de, Gardinal-Galera I, Hitomi K, Balica S, Jean-Decoster C, Schmitt A-M et al. (2011): Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. *FASEB J* 25, 1567–1576
- Irvine AD, McLean WHI (2006): Breaking the (un)sound barrier: filaggrin is a major gene for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 126, 1200–1202
- Ishida-Yamamoto A, Igawa S (2015): The biology and regulation of corneodesmosomes. *Cell Tissue Res* 360, 477–482
- Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Presland RB, Dale BA, Iizuka H (1998): Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. *Lab Invest* 78, 1245–1253
- Johansson SGO, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TAE, Ring J et al. (2004): Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 113, 832–836
- Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M (2012): Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol* 129, 1538
- Koch PJ, Viragh PA de, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M et al. (2000): Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J Cell Biol* 151, 389–400
- Krieg P, Schuppler M, Koesters R, Mincheva A, Lichter P, Marks F (1997): Repetin (Rptn), a new member of the “fused gene” subgroup within the S100 gene family encoding a murine epidermal differentiation protein. *Genomics* 43, 339–348

- Kypriotou M, Boéchat C, Huber M, Hohl D (2013): Spontaneous atopic dermatitis-like symptoms in a/a ma ft/ma ft/J flaky tail mice appear early after birth. *PLoS ONE* 8, e67869
- Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P (2006): Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci* 28, 359–370
- Lee SC, Wang M, McBride OW, O’Keefe EJ, Kim IG, Steinert PM (1993): Human trichohyalin gene is clustered with the genes for other epidermal structural proteins and calcium-binding proteins at chromosomal locus 1q21. *J Invest Dermatol* 100, 65–68
- Leung DYM, Bieber T (2003): Atopic dermatitis. *Lancet* 361, 151–160
- Lorand L, Graham RM (2003): Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 140–156
- Mahan JT, Donaldson DJ (1992): Divalent cations and extracellular matrix receptor function during newt epidermal cell migration. *J Cell Sci* 101, 173–181
- Makino T, Takaishi M, Morohashi M, Huh NH (2001): Hornerin, a novel profilaggrin-like protein and differentiation-specific marker isolated from mouse skin. *J Biol Chem* 276, 47445–47452
- Makino T, Takaishi M, Toyoda M, Morohashi M, Huh N-h (2003): Expression of Hornerin in Stratified Squamous Epithelium in the Mouse: A Comparative Analysis with Profilaggrin. *J Histochem Cytochem* 51, 485–492
- Manabe M, Sanchez M, Sun TT, Dale BA (1991): Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris. *Differentiation* 48, 43–50
- Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, Yamada K, Kinoshita C, Fushiki S, Ueda E, Morishima Y, Tabata K, Yasuno H et al. (1998): Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1044–1049
- Mischke D, Korge BP, Marenholz I, Volz A, Ziegler A (1996): Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex (“epidermal differentiation complex”) on human chromosome 1q21. *J Invest Dermatol* 106, 989–992
- Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A et al. (2010): Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *Am J Pathol* 176, 2385–2393

- On HR, Lee SE, Kim SE, Hong WJ, Kim HJ, Nomura T, Suzuki S, Shimizu H, Kim SC (2017): Filaggrin Mutation in Korean Patients with Atopic Dermatitis. *Yonsei Med J* 58, 395–400
- Oyoshi MK, Murphy GF, Geha RS (2009): Filaggrin-deficient mice exhibit TH17-dominated skin inflammation and permissiveness to epicutaneous sensitization with protein antigen. *J Allergy Clin Immunol* 124, 485-93, 493.e1
- Pellerin L, Henry J, Hsu C-Y, Balica S, Jean-Decoster C, Méchin M-C, Hansmann B, Rodriguez E, Weindinger S, Schmitt A-M et al. (2013): Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* 131, 1094–1102
- Presland RB, Boggess D, Lewis SP, Hull C, Fleckman P, Sundberg JP (2000): Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris. *J Invest Dermatol* 115, 1072–1081
- Presland RB, Kuechle MK, Lewis SP, Fleckman P, Dale BA (2001): Regulated expression of human filaggrin in keratinocytes results in cytoskeletal disruption, loss of cell-cell adhesion, and cell cycle arrest. *Exp Cell Res* 270, 199–213
- Quiggle AM, Goodwin ZA, Marfatia TR, Kumar MG, Ciliberto H, Bayliss SJ, Guzman Strong C de (2015): Low filaggrin monomer repeats in African American pediatric patients with moderate to severe atopic dermatitis. *JAMA Dermatol* 151, 557–559
- Rawlings AV, Harding CR (2004): Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17, 43–48
- Rawlings AV, Matts PJ (2005): Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol* 124, 1099–1110
- Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA (1994): Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J Invest Dermatol* 103, 731–741
- Recordati C, Basta SM, Benedetti L, Baldin F, Capillo M, Scanziani E, Gobbi A (2015): Pathologic and Environmental Studies Provide New Pathogenetic Insights Into Ringtail of Laboratory Mice. *Vet Pathol* 52, 700–711
- Rice RH, Durbin-Johnson BP, Ishitsuka Y, Salemi M, Phinney BS, Rocke DM, Roop DR (2016): Proteomic Analysis of Loricrin Knockout Mouse Epidermis. *J Proteome Res* 15, 2560–2566
- Ring J, Kramer U, Schafer T, Behrendt H (2001): Why are allergies increasing? *Curr Opin Immunol* 13, 701–708
- Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, Irvine AD, Weidinger S (2009): Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1361-1370.e7

Saunders SP, Goh CSM, Brown SJ, Palmer CNA, Porter RM, Cole C, Campbell LE, Gierlinski M, Barton GJ, Schneider G et al. (2013): Tmem79/Matt is the matted mouse gene and is a predisposing gene for atopic dermatitis in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 132, 1121–1129

Scharschmidt TC, Man M-Q, Hatano Y, Crumrine D, Gunathilake R, Sundberg JP, Silva KA, Mauro TM, Hupe M, Cho S et al. (2009): Filaggrin deficiency confers a paracellular barrier abnormality that reduces inflammatory thresholds to irritants and haptens. *J Allergy Clin Immunol* 124, 496-506, 506.e1-6

Schmid-Ott G, Jaeger B, Meyer S, Stephan E, Kapp A, Werfel T (2001): Different expression of cytokine and membrane molecules by circulating lymphocytes on acute mental stress in patients with atopic dermatitis in comparison with healthy controls. *J Allergy Clin Immunol* 108, 455–462

Scott IR, Harding CR (1986): Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. *Dev Biol* 115, 84–92

Simon M, Green H (1984): Participation of membrane-associated proteins in the formation of the cross-linked envelope of the keratinocyte. *Cell* 36, 827–834

Smith FJD, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S et al. (2006): Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* 38, 337–342

Steven AC, Steinert PM (1994): Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 2), 693–700

Takaishi M, Makino T, Morohashi M, Huh N-H (2005): Identification of human hornerin and its expression in regenerating and psoriatic skin. *J Biol Chem* 280, 4696–4703

Thyssen JP, Thuesen B, Huth C, Standl M, Carson CG, Heinrich J, Kramer U, Kratzsch J, Berg ND, Menne T et al. (2012): Skin barrier abnormality caused by filaggrin (FLG) mutations is associated with increased serum 25-hydroxyvitamin D concentrations. *J Allergy Clin Immunol* 130, 1204-1207.e2

Thyssen JP, Bikle DD, Elias PM (2014): Evidence That Loss-of-Function Filaggrin Gene Mutations Evolved in Northern Europeans to Favor Intracutaneous Vitamin D3 Production. *Evol Biol* 41, 388–396

Weidinger S, O’Sullivan M, Illig T, Baurecht H, Depner M, Rodriguez E, Ruether A, Klopp N, Vogelberg C, Weiland SK et al. (2008): Filaggrin mutations, atopic eczema, hay fever, and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1203-1209.e1

- Williams HC, Strachan DP, Hay RJ (1994): Childhood eczema: disease of the advantaged? *BMJ* 308, 1132–1135
- Wu Z, Hansmann B, Meyer-Hoffert U, Gläser R, Schröder J-M (2009a): Molecular identification and expression analysis of filaggrin-2, a member of the S100 fused-type protein family. *PLoS ONE* 4, e5227
- Wu Z, Meyer-Hoffert U, Reithmayer K, Paus R, Hansmann B, He Y, Bartels J, Glaser R, Harder J, Schroder J-M (2009b): Highly complex peptide aggregates of the S100 fused-type protein hornerin are present in human skin. *J Invest Dermatol* 129, 1446–1458
- Zaiou M, Nizet V, Gallo RL (2003): Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol* 120, 810–816

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. M. P. Schön, der mir die Durchführung dieser Arbeit in einem strukturierten und motivierten Umfeld ermöglichte und mit großem Interesse den Fortschritt der Arbeit verfolgt hat.

Weiterer großer Dank geht an Dr. A. Braun, die mich in meinem Projekt direkt betreut und unterstützt hat. Sie stellte eine umfassende Projektplanung und qualitativ hochwertige wissenschaftliche Einarbeitung sicher. Dank ihr ließen sich die zahlreichen kleineren und größeren Hürden in der experimentellen Arbeit überwinden, sodass die Motivation nie verloren ging.

Zudem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Schön. Insbesondere danke ich Frau Dr. V. Lorenz für die zahlreichen Hilfestellungen und interessanten Diskussionen. Ich danke A. Bennemann, U. Unkelbach und K. Zachmann, ohne die die Durchführung der Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Ich danke Dr. B. Brauns, Dr. K. Amschler und Prof. M. Schön für Anregungen und Hilfe.

Veröffentlichte Arbeiten

Rahrig S*, Dettmann JM*, Brauns B, Lorenz VN, Buhl T, Kezic S, Elias PM, Weidinger S, Mempel M, Schön MP et al. (2019): Transient epidermal barrier deficiency and lowered allergic threshold in filaggrin-hornerin (FlgHrn^{-/-}) double-deficient mice. *Allergy* 74, 1327-1339

*geteilte Erstautorenschaft